

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP 在兔股骨损伤修复中分布变化的实验研究

曹敏 李雪娜 刁尧 李娜 杜补林 李亚明

中国医科大学附属第一医院核医学科, 沈阳 110001

通信作者: 李亚明, Email: ymli2001@163.com

【摘要】 目的 研究骨显像剂 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -亚甲基二膦酸盐(MDP)在骨损伤修复不同阶段的分布状况。方法 用电钻股骨凿孔的方法,制作兔股骨损伤模型共 30 只,根据骨损伤修复的不同阶段(第 1、2 和 3 周)分成 A、B 和 C 组,每组 10 只。在骨损伤修复不同阶段的最后 1 d 行股骨 SPECT/CT 显像,得到实验侧和对照侧感兴趣区(ROI)放射性计数,计算靶/本底比值(T/B)。应用磷屏成像分析 3 组模型标本光强度,放射自显影观察 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP 在骨细胞的具体分布情况。采用单因素方差分析和配对 t 检验分析数据。结果 SPECT/CT 显像示 A、B 和 C 组的放射性计数 T/B 分别为 1.16 ± 0.14 、 1.39 ± 0.23 和 1.18 ± 0.10 , 差异有统计学意义($F=5.83, P<0.01$)。A、B 和 C 组实验侧(50.00 ± 12.45 、 59.50 ± 12.83 和 55.10 ± 9.26)的最大放射性计数均高于对照侧(43.20 ± 9.57 、 50.00 ± 12.30 和 44.30 ± 6.50 ; t 值: 3.24, 2.28 和 5.77, 均 $P<0.05$)。磷屏成像示 A、B 和 C 组股骨标本的光强度差异有统计学意义($37\ 324.67\pm 6\ 481.50$ 、 $60\ 950.33\pm 9\ 781.72$ 和 $43\ 905.00\pm 4\ 957.92$; $F=8.25, P=0.02$)。放射自显影观察到在骨修复的不同阶段, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP 在骨细胞和成骨细胞的细胞内和细胞外均有分布。结论 在骨损伤修复的不同阶段, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP 均有显著的分布浓聚,提示其在骨组织中浓聚机制除与羟基磷灰石的化学吸附作用外,还存在其他途径。

【关键词】 创伤和损伤; 伤口愈合; 股骨; 放射性核素显像; 体层摄影术, 发射型计算机, 单光子; 体层摄影术, X 线计算机; $^{99\text{m}}$ 锝美罗酸盐; 兔

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20200217-00046

Experimental study on the distribution of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP in the repair of femoral bone injury in rabbits

Cao Min, Li Xuena, Diao Yao, Li Na, Du Bulin, Li Yaming

Department of Nuclear Medicine, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

Corresponding author: Li Yaming, Email: ymli2001@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the distribution of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -methylene diphosphonate (MDP) at different stages of bone injury repair. **Methods** A total of 30 rabbit models of femur injury were established by the method of electric drill and perforation of femur. According to the different stages of bone injury repair (at 1, 2 and 3 week), rabbits were divided into group A, B and C ($n=10$ each group). Femoral SPECT/CT imaging was performed on the last day of different stages of bone injury repair to obtain radioactivity counts in the region of interest (ROI) on the test side and control side and to calculate target/background ratio (T/B). The light intensity of 3 groups was analyzed by phosphor screen imaging and the distribution of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP in bone cells was observed by autoradiography. One-way analysis of variance and paired t test were used to analyze the data. **Results** The T/B values of group A, B and C were 1.16 ± 0.14 , 1.39 ± 0.23 and 1.18 ± 0.10 , respectively ($F=5.83, P<0.01$). There were significant differences of the maximum radiation count between the test side (50.00 ± 12.45 , 59.50 ± 12.83 and 55.10 ± 9.26) and the control side (43.20 ± 9.57 , 50.00 ± 12.30 and 44.30 ± 6.50) in group A, B and C (t values: 3.24, 2.28 and 5.77, all $P<0.05$). There were significant differences in the light intensity of bone specimens in group A, B and C by phosphor screen imaging ($37\ 324.67\pm 6\ 481.50$, $60\ 950.33\pm 9\ 781.72$ and $43\ 905.00\pm 4\ 957.92$; $F=8.25, P=0.02$). $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP were deposited in both intracellular and extracellular during different stages of bone repair in osteocytes and osteoblasts under autoradiography. **Conclusion** At different stages of bone injury repair, the concentration of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP is significantly distributed, suggesting that there are other ways of concentration mechanism of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP in bone tissue besides the chemical adsorption with hydroxyapatite.

【Key words】 Wounds and injuries; Wound healing; Femur; Radionuclide imaging; Tomography, emission-computed, single-photon; Tomography, X-ray computed; Technetium Tc $^{99\text{m}}$ medronate; Rabbits

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20200217-00046

SPECT/CT 骨显像时,骨显像剂 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -亚甲基二膦酸盐(methylene diphosphonate, MDP)与骨组织中的羟基磷灰石通过离子交换或化学吸附作用分布于骨骼组织。通常情况下,当骨骼病变以成骨性改变为主时,CT 图像上表现为高密度, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP 全身骨显像图表现为骨骼局部骨代谢增高;当骨骼病变以溶骨性改变为主时,CT 图像表现为低密度,骨骼局部骨代谢减低;当骨骼病变以混合性改变为主时,表现为骨骼局部骨代谢增高和减低的混合性改变^[1-3]。然而在临床工作中,一些在 CT 上表现为低密度的病变,在 SPECT 骨显像中与显像剂 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP 有较多的结合^[4-5]。在这些骨代谢增高的病例中,部分为溶骨性病变,与通常认知不符。这些在 CT 上的低密度病变是否有活跃的骨修复即成骨过程发生,骨显像剂进入血流在骨组织中分布是否还存在其他方式?本研究制作了兔股骨损伤修复模型来探讨 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP 的分布及其在骨组织中的具体定位情况。

材料与方法

一、材料

1. 实验动物。健康的雄性新西兰大白兔 30 只,4~6 月龄,体质量(2.00 ± 0.16) kg,由中国医科大学动物实验部提供,许可证号:SLXK(京)2016-0003。清洁环境下分笼饲养。

2. 主要试剂与仪器。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 由北京原子高科股份有限公司提供;注射用 MDP 由江苏省原子医学研究所江原制药厂提供; $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP 放化纯 $>95\%$;核-4 乳胶由山西师范大学物理研究所提供;氨基甲酸乙酯购于上海山浦化工有限公司(批号:20130917);盐酸赛拉嗪 II 注射液[速眠新 II; 兽药试字(2004)005013]购自沈阳立博恒生物试剂有限公司。磷屏成像仪 PMI 170-9400 购自美国 Bio-Rad 公司;Symbia T2 SPECT/CT 仪购自德国 Siemens 公司。

二、方法

1. 动物模型制备及实验分组。以电钻凿孔的方法^[6],制作兔股骨损伤的模型 30 只,其中左侧股骨为实验侧,右侧股骨为对照侧。制作模型兔后不加任何干预措施,待其自然生长修复。按体质量肌肉注射速眠新 II(0.35 ml/kg)加体积分数 20%氨基甲酸乙酯(6 ml/kg)麻醉,待兔睫毛、角膜反射消失,骨骼肌完全松弛,呼吸频率 30~50 次/min 且平稳,以腹式呼吸为主即为麻醉成功。取实验兔左腿为实验侧,予术区电动褪毛器褪毛,去皮,取兔大腿中部外侧纵行切

口,逐层分离软组织,最大程度避免损伤软组织,于股外侧肌和股后肌之间的肌间隔钝性分离,充分暴露兔股骨干;电钻在股骨中上 1/3 处打孔(孔径 3 mm),造成骨缺损,随即缝合皮肤,贴无菌敷料,放回笼中饲养。将实验兔按照手术后的修复期分为 3 组:A 组(骨缺损修复第 1 周)、B 组(骨缺损修复第 2 周)、C 组(骨缺损修复第 3 周),每组 10 只。动物实验符合医学伦理学要求(CMU22002200000066)。

2. SPECT/CT 骨显像。在骨损伤修复不同阶段的最后 1 d 分别给 3 组实验兔从耳缘静脉注射骨显像剂 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP(37 MBq),2 h 后行 SPECT/CT 股骨显像。将麻醉完全的实验兔四肢伸展固定于特制的木板上,采取仰卧体位,足先进。SPECT/CT 采集范围 360°,步进 12°,10 s/帧,双探头各采集 180°;矩阵 256×256,放大倍数 2.0,采集时间 15 min,得到各组兔的骨扫描平面图,之后继续采集股骨局部的断层融合图。在 SPECT 采集区域内行 CT 扫描,电压 110 kV,电流 45~90 mA,层厚 1 mm。采集完毕的图像传输至后处理工作站,观察各组实验兔的骨显像图,并通过 Symbia T2 SPECT/CT 后处理工作站分别在实验侧骨损伤区域和对照侧相应区域勾画感兴趣区(region of interest, ROI),由电脑自动生成 ROI 的放射性计数;计算靶/本底比值(target/background ratio, T/B)=实验侧最大放射性计数/对照侧最大放射性计数。

3. 磷屏成像。以耳缘静脉空气栓塞法处死模型兔,取股骨处理干净后待测。用清屏器清除磷屏上原有影像,将待测样品用塑料薄膜密封,将密封好的样品与磷屏紧密贴压在一起置于专用曝光盒内曝光 30 min,之后取下样品袋终止曝光。将上述已曝光的磷屏紧贴在磷屏仪扫描,利用仪器自带的 OptiQuant 软件分析影像数据,计算 ROI 的光强度^[7-8]。

4. 放射自显影。将造模区域的标本切成长径 1 cm 的小骨块,使用德国 Leica TP 1050 组织自动脱水机进行组织脱水;在树脂包埋液试剂(德国 EXAKT 公司)中浸泡 2 h;然后进行 14 h 的光固化,做成树脂组织块;将组织快固定在硬组织切磨系统(德国 EXAKT 公司)中的切片机上,初始切割的硬组织切片厚度为 70 μm ,然后使用硬组织切磨系统中的磨片机,进行厚度的打磨,最终切片的厚度为 13~18 μm 。将涂好核-4 乳胶的组织切片 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,持续曝光 48 h,曝光结束后进行显影定影处理^[9]。

5. 统计学处理。采用 IBM SPSS 23.0 软件进行统计学分析,符合正态分布的定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示;

实验侧和对照侧 ROI 的放射性计数比较采用配对 *t* 检验,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著差异 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. SPECT/CT 骨显像。在骨损伤第 1 周时,CT 显示缺损区为两断端分离的低密度影像,在 SPECT/CT 图像上表现为骨代谢增高,骨损伤周围区域也有显像剂浓聚(图 1)。A、B 和 C 组的 T/B 分别为 1.16 ± 0.14 、 1.39 ± 0.23 和 1.18 ± 0.10 ,差异有统计学意义($F = 5.83, P < 0.01$);其中 A 组和 B 组、B 组和 C 组相比差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。A、B 和 C 组实验侧(50.00 ± 12.45 、 59.50 ± 12.83 和 55.10 ± 9.26)和对照侧(43.20 ± 9.57 、 50.00 ± 12.30 和 44.30 ± 6.50)的最大放射性计数差异均有统计学意义(*t* 值:3.24、2.28 和 5.77,均 $P < 0.05$)。

2. 磷屏成像(图 2)。A、B 和 C 组实验侧的放射性光强度分别为 $37\ 324.67 \pm 6\ 481.50$ 、 $60\ 950.33 \pm 9\ 781.72$ 和 $43\ 905.00 \pm 4\ 957.92$,差异有统计学意义($F = 8.25, P = 0.02$);其中 A 组和 B 组、B 组和 C 组相比差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

3. 放射自显影(图 3)。图 3 中黑色的银颗粒代表 $^{99}\text{Tc}^m$ -MDP 在骨组织中的分布位置,在 3 组选取 5 个邻近缺损区域的视野,观察到在损伤修复的不同阶段,3 组切片中银颗粒的沉积位置并无特殊选择性,表明在损伤修复的不同阶段, $^{99}\text{Tc}^m$ -MDP 在骨细胞和成骨细胞的细胞内和细胞外均有分布。

讨 论

骨损伤修复分为 4 期,分别为血肿形成期、纤维骨痂形成期、骨性骨痂形成期和骨痂改建或再塑期。在骨损伤修复时约 2~3 d 为血肿形成期,血肿机化成肉芽组织,约 1 周时肉芽组织发生纤维化,形成纤维性骨痂^[10];纤维性骨痂逐渐分化出现骨母细胞,骨母细胞增殖分化成成骨细胞和透明软骨;成骨细胞产生类骨质,即以钙盐结晶为基础的羟基磷灰石

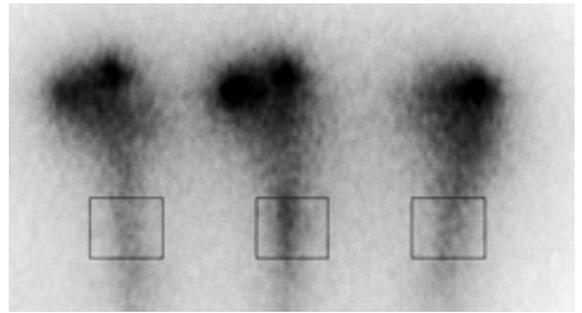


图 2 股骨损伤模型兔实验侧股骨标本的磷屏成像图。从左到右依次为股骨损伤修复第 1、2 和 3 周,方框为骨损伤所在区域

结晶;类骨质转变成编织骨,纤维性骨痂中的软骨组织也经软骨化骨过程演变成为骨组织,形成骨性骨痂^[11-12]。

SPECT/CT 骨显像最常用的显像剂为 $^{99}\text{Tc}^m$ -MDP,其具有骨组织摄取高且迅速、血液和软组织清除快的优点^[13]。通常认为,经静脉注射的 $^{99}\text{Tc}^m$ -MDP 随血流进入骨组织,与骨组织中的羟基磷灰石通过化学吸附作用分布于骨骼组织。当骨骼组织局部血流量增加、无机盐代谢旺盛以及病变以成骨性改变为主时,全身骨显像图像表现为 $^{99}\text{Tc}^m$ -MDP 骨骼局部骨代谢增高;反之则表现为骨骼局部骨代谢减低^[3]。前期本科室收集的一些骨代谢增高的病例中,部分病例在 CT 上表现为低密度的溶骨性改变,而并非成骨性改变^[4],这与通常认知的在 SPECT 显像机制不相符,但目前尚缺乏相关研究。

本研究通过制作兔股骨损伤修复模型,对此进行了探讨。股骨 SPECT/CT 显像示骨损伤修复第 1 周时,骨损伤断端分离,CT 图像表现出两断端分离的低密度影像;而在 SPECT 图像中实验侧与对侧相比,表现出骨显像剂 $^{99}\text{Tc}^m$ -MDP 分布显著浓聚。在磷屏成像中观察到骨损伤修复在第 1 周时,骨损伤区域的光强度要高于其他正常组织,此时在骨修复第 1 周时骨组织还处于纤维性骨痂生长期,CT 的低密度影像说明成骨并不活跃,此时缺少生成羟基磷灰石晶体的基础。在 HE 染色后的放射自显影结果观察到,银颗粒在骨细胞和成骨细胞的细胞内和细

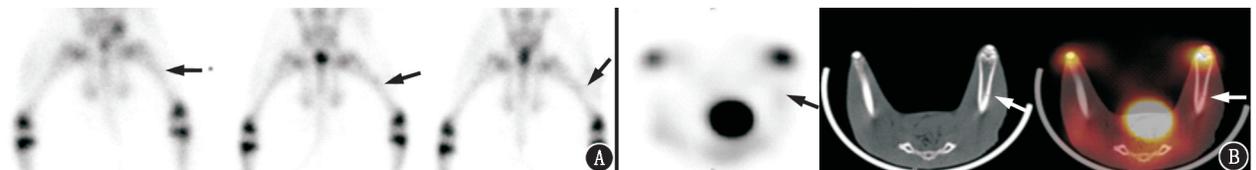


图 1 股骨损伤模型兔不同修复期的 $^{99}\text{Tc}^m$ -亚甲基二膦酸盐(MDP) SPECT/CT 显像图。A. 从左到右依次为骨损伤修复第 1、2 和 3 周的骨显像图,箭头所示为造模区域;B. 骨损伤修复第 1 周时的 SPECT、CT 和 SPECT/CT 融合图,结果示骨代谢增高,骨损伤周围区域也有显像剂浓聚(箭头示)

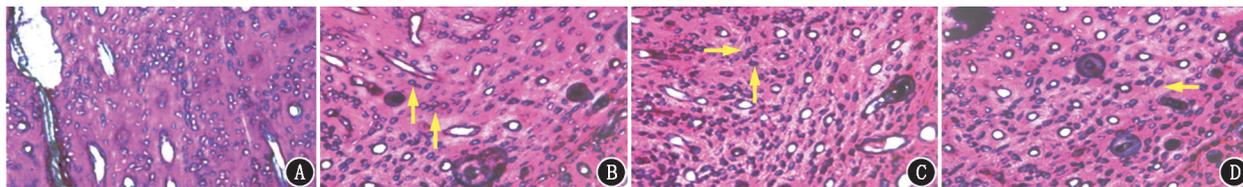


图3 股骨损伤模型兔不同修复期的股骨标本切片 HE 染色图($\times 200$)。A.正常骨组织;B.骨损伤修复第1周,箭头示骨细胞;C.骨损伤修复第2周,箭头示成骨细胞;D.骨损伤修复第3周,箭头示成骨细胞;黑色的银颗粒代表 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -亚甲基二膦酸盐(MDP)在骨组织中的分布位置,其在骨细胞和成骨细胞的细胞内和细胞外均有沉积

胞外均有分布。有研究显示 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP 随着血流进入骨组织,在骨细胞中的沉积没有选择性^[13],且多沉积在组织的矿化边缘^[6],这与本实验中 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP 在骨细胞中的分布位置并无特殊选择结果一致。以上结果提示, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP 在骨组织中浓聚机制除与羟基磷灰石的化学吸附作用外,还存在其他途径。

本实验结果提示随着股骨损伤的修复, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP 在骨中的分布是一个动态过程,骨显像剂在第1周时已有明显浓聚,在第2周时达到高峰,之后趋于稳定。有研究报道,在骨显像中未成熟的胶原对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记的磷酸化合物的亲和力高于羟基磷灰石晶体,且非晶体的磷酸钙的摄取显著高于成熟的羟基磷灰石晶体^[14],这可以解释为什么成骨活性增强的区域显像剂明显增加。这也与本实验在第2周时显像剂浓聚最为明显的结果一致,且与通常认识的在成骨活跃的区域显像剂分布浓聚相符合。而未成熟的胶原对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记的磷酸化合物的亲和力高于羟基磷灰石晶体^[14] 这个观点也从侧面说明了骨显像剂进入骨组织存在不同的途径。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Meftah M, Katchis SD, Scharf SC, et al. SPECT/CT in the management of osteochondral lesions of the talus[J]. *Foot Ankle Int*, 2011, 32(3): 233-238. DOI:10.3113/FAI.2011.0233.
- [2] Papamerouriou YM, Kenanidis E, Gamie Z, et al. Treatment of multiple myeloma bone disease: experimental and clinical data[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(2): 213-230. DOI:10.1517/14712598.2015.978853.
- [3] 邱艳芳,赵艳萍.骨转移瘤的影像学诊断研究现状[J].*海南医学*, 2015, 26(4): 543-546. DOI:10.3969/j.issn.1003-6350.2015.04.0196.
Qiu YF, Zhao YP. Research status of imaging diagnosis of osseous metastatic tumor[J]. *Hainan Med J*, 2015, 26(4): 543-546. DOI:10.3969/j.issn.1003-6350.2015.04.0196.
- [4] 王姝,李亚明,李娜,等.溶骨性骨代谢增高病灶的 SPECT/CT 骨显像特点及与 CT 表现的相关性[J].*中华核医学与分子影像杂志*, 2015, 35(6): 466-469. DOI:10.3760/ema.j.issn.2095-2848.2015.06.011.
Wang S, Li YM, Li N, et al. SPECT/CT imaging characteristic of osteolytic lesions with increased bone metabolism and its correlation with CT manifestation[J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2015, 35(6): 466-469. DOI:10.3760/ema.j.issn.2095-2848.2015.06.011.
- [5] Zhao H, Han J, Lv F, et al. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP uptake in implantation metastasis of gastric cancer: the additional value of SPECT/CT[J]. *Clin Nucl Med*, 2013, 38(10): 838-840. DOI:10.1097/RLU.0b013e3182a43089.
- [6] Einhorn TA, Vigorita VJ, Aaron A. Localization of technetium-99m methylene diphosphonate in bone using microautoradiography[J]. *J Orthop Res*, 1986, 4(2): 180-187. DOI:10.1002/jor.1100040206.
- [7] 刁尧,廖琳丹,王姝,等.碘标记毒死蜱及其在小鼠体内的生物分布[J].*同位素*, 2015, 28(4): 248-252. DOI:10.7538/tws.2015.28.04.0248.
Diao Y, Liao LD, Wang S, et al. Radioiodine-labeling of chlorpyrifos and its biodistribution in mice[J]. *Journal of Isotopes*, 2015, 28(4): 248-252. DOI:10.7538/tws.2015.28.04.0248.
- [8] Ampatzis K, Dermon CR. Sexual dimorphisms in swimming behavior, cerebral metabolic activity and adrenoceptors in adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Behav Brain Res*, 2016, 312: 385-393. DOI:10.1016/j.bbr.2016.06.047.
- [9] Lamart S, Miller BW, Van der Meeren A, et al. Actinide bioimaging in tissues: comparison of emulsion and solid track autoradiography techniques with the iQID camera[J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186370. DOI:10.1371/journal.pone.0186370.
- [10] Su B, O'Connor JP. NSAID therapy effects on healing of bone, tendon, and the enthesis[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2013, 115(6): 892-899. DOI:10.1152/jappphysiol.00053.2013.
- [11] Aikawa T, Matsubara H, Ugaji S, et al. Contribution of methylglyoxal to delayed healing of bone injury in diabetes[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(1): 403-409. DOI:10.3892/mmr.2017.6589.
- [12] Chegini Kord M, Ebrahimpour A, Sadighi M, et al. Minimally invasive repair of acute achilles tendon rupture using gift box technique[J]. *Arch Bone Jt Surg*, 2019, 7(5): 429-434.
- [13] Lamart S, Miller BW, Van der Meeren A, et al. Actinide bioimaging in tissues: comparison of emulsion and solid track autoradiography techniques with the iQID camera[J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186370. DOI:10.1371/journal.pone.0186370.
- [14] 李林法,沈文华,闻世凤,等. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 全身骨显像对转移性骨肿瘤的诊断价值[J].*浙江医学*, 1992, 14(4): 23-24.
Li LF, Shen WH, Wen SF, et al. Diagnostic value of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ whole body bone scan for metastatic bone tumor[J]. *Zhengjiang Med J*, 1992, 14(4): 23-24.