

Detecting endothelial dysfunction of abdominal aorta in rabbits in vitro with microbubbles conjugated anti-ICAM-1

LI Xin, GAO Yun-hua, TAN Kai-bin, LIU Ping, BIAN Ai-na

(Department of Ultrasound, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective** To discuss the value and feasibility of targeted microbubbles conjugated to anti-ICAM-1 in monitoring endothelial dysfunction. **Methods** Fluorescein isothiocyanate (FITC) was mixed with self-made microbubbles and anti-ICAM-1 conjugated microbubbles respectively. Eight New Zealand rabbits were fed with cholesterol diet to create the animal model of endothelial dysfunction. Aorta was dissected and tissue slides were prepared. Two kinds of microbubbles were added to the glass slide and the behaviors of targeted and nontargeted microbubbles were observed through fluoroscope. **Results** Microbubbles retained within the endothelium were much more for anti-ICAM-1 containing than for standard microbubbles. The fluorescent signal from the endothelium for targeted microbubbles was much higher than that of nontargeted ones. **Conclusion** Microbubbles conjugated to anti-ICAM-1 have been shown to bind to activated endothelial cells. It can be used to assess early endothelial damage.

[Key words] Targeted microbubbles; Abdominal aorta; Endothelial function; Animals, laboratory

携 ICAM-1 单抗超声造影剂体外评估兔腹主动脉内皮损伤实验研究

李馨, 高云华, 谭开彬, 刘平, 卞爱娜

(第三军医大学新桥医院超声科, 重庆 400037)

[摘要] **目的** 探讨携 ICAM-1 单抗的超声造影剂评价血管内皮损伤的可行性及其价值。**方法** FITC 标记自制含氟碳声振白蛋白造影剂及携 ICAM-1 单抗的靶向超声造影剂。新西兰大白兔 8 只, 高脂饮食建立内皮损伤动物模型后, 取兔腹主动脉做冰冻病理切片, 随机分两组, 分别滴加非靶向造影剂、靶向造影剂, 比较两种微泡内皮分布情况及相应荧光染色度的差异。**结果** 靶向造影剂组内皮黏附微泡明显增多, 荧光染色较强。**结论** 携 ICAM-1 单抗的造影剂微泡可靶向黏附于损伤内皮, 据此可评价早期内皮损伤。

[关键词] 靶向造影剂; 腹主动脉; 内皮功能; 动物, 实验

[中图分类号] R445.1; Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2004)10-1501-02

血管内皮功能障碍是动脉粥样硬化的启动因素。研究表明, 内皮受损与内皮细胞过多表达白细胞黏附因子(主要为 ICAM-1)有关。由于 ICAM-1 在正常组织中几乎不表达, 因此携抗 ICAM-1 的造影剂微泡可特异结合于损伤内皮细胞表面。本研究制备 FITC 标记的携 ICAM-1 单抗的靶向超声造影剂, 建立内皮损伤家兔模型, 采用体外免疫荧光法监测微泡在损伤内皮靶向显影情况, 探讨携抗 ICAM-1 的超声造影剂评价早期内皮损害的价值和可行性。

1 资料与方法

1.1 建立血管内皮损伤动物模型 健康新西兰大白兔 8 只, 平均体重 2.2 kg, 每日给予 1%胆固醇颗粒 2 g 喂养 4 周, 采

用高脂饮食损伤血管内皮。

1.2 靶向超声造影剂的制备 使用我科自制含氟碳声振白蛋白造影剂, 去下清液, 微泡大小 $2\sim 5\ \mu\text{m}$, 浓度 7×10^9 个/ml。抗体均购自北京中山生物技术有限公司。将 1 ml 造影剂与 1 ml ICAM-1 单克隆抗体混合, 随后加入抗体偶连剂, 4°C 孵育 2 h, 洗涤、离心, 分层后取上浮液, 再加入 FITC 标记二抗 1 ml, 37°C 孵育 30 min, 洗涤数次后得抗 ICAM-1 及 FITC 双重标记的白蛋白靶向超声造影剂(图 1)。FITC 标记非靶向造影剂以示对照。

1.3 病理检查 高脂喂养 4 周后, 将所有实验对象全部处死, 立刻解剖动物, 截取兔腹主动脉。标本分两份, 一部分 3%戊二醛固定, 电镜观察血管内皮损伤情况。另一部分冰冻切片、丙酮固定。切片随机分两组。第 1 组滴加非靶向造影剂, 第 2 组滴加靶向造影剂。两组同时 37°C 恒温孵育 30 s, 取出, 滴加少许 PBS 液漂洗, 加盖玻片, 置于光镜病理模式下,

[作者简介] 李馨(1970—), 女, 四川成都人, 博士, 主治医师。研究方向: 超声造影技术在心血管疾病中的应用。E-mail: lixin_dp@163.com

[收稿日期] 2004-05-09

图1 FITC 标记携 ICAM-1 单抗的靶向超声造影剂(×200) 图2 兔腹主动脉内皮黏附大量携 ICAM-1 单抗靶向造影剂微泡后荧光显像(×200) 图3 兔腹主动脉内皮黏附少量普通声振白蛋白氟碳微泡后荧光显像(×200)

观察两种微泡与血管内皮黏附情况。固定视野,调至荧光显像模式,比较两组内皮荧光染色度。

2 结果

2.1 电镜检查 高脂饮食第4周,所有标本均显示不同程度内皮损伤。电镜见线粒体肿胀,内质网扩张,内皮间隙增宽,部分连续中断,内皮细胞脱落、缺失。

2.2 免疫荧光检查 两组血管内皮层均可见造影剂微泡黏附,第2组黏附微泡明显多于第1组。内皮荧光染色度较第1组强(图2,3)。

3 讨论

动脉粥样硬化是由于众多危险因素损伤内皮细胞而发生的一系列炎症反应。研究表明,内皮受损与内皮细胞过多表达白细胞黏附因子有关,主要为 ICAM-1 表达增多^[1]。由于 ICAM-1 在正常组织中几乎不表达,因此携 ICAM-1 单抗的造影剂微泡可靶向结合于损伤内皮。已有学者用电镜、活体显微镜观察到携抗 ICAM-1 的造影剂微泡大量黏附于病变组织微循环中^[2,3]。Villanueva^[4]注意到受损的冠状动脉内皮细胞表面有大量抗 ICAM-1 标记的脂质体微泡黏附,并据此评价冠状动脉内皮功能障碍。本研究应用抗体偶联剂,制备 FITC 标记、携 ICAM-1 单抗的靶向超声造影剂,对不带抗体的非靶向造影剂也做荧光标记,采用免疫荧光技术体外评估造影剂与损伤血管内皮黏附现象,比较两类造影剂微泡黏附程度及相应内皮荧光染色度的差异,探讨携 ICAM-1 单抗的造影剂靶向检测内皮功能障碍的可行性,为靶向超声造影评价动脉粥样硬化早期内皮损伤奠定基础。

高脂饮食第4周,电镜证实腹主动脉内皮损伤模型建立成功。随着内皮损伤启动,黏附分子等各种炎症介质大量表达。标本经冰冻、固定处理后,携 ICAM-1 单抗的造影剂微泡,将靶向识别 ICAM-1 高表达的活化内皮细胞并与其特异结合。因此第2组切片滴加靶向造影剂、孵育后大量微泡黏附于血管内膜,牢固结合的微泡漂洗过后在内膜面形成强绿色荧光带。实验结果表明,内皮损伤过程中,细胞黏附蛋白家族中的 ICAM-1、整合素等同时可介导普通白蛋白微泡与之

黏附,所以第1组切片内膜面也有部分普通白蛋白微泡分布。由于非特异结合的微泡经缓冲液漂洗后损失较多,所以内皮荧光染色较弱。靶向造影剂微泡与普通含氟碳微泡相比,评价内皮功能损伤敏感性更高。

新型的靶向性造影剂可携带药物、基因、单克隆抗体等物质,具备特异性组织摄取和生物学分布的功能^[5]。本研究初步表明,以微泡为载体,整合和抗体制备靶向超声造影剂,成本较低,微泡性能稳定,靶向显影成效高。携 ICAM-1 单抗的造影剂微泡可靶向识别、黏附损伤内皮。与电镜、光镜检查相比,超声造影操作简便、重复性好^[6],因而可望成为早期内皮功能障碍的检测手段之一。

[参考文献]

[1] Almenar QA, Duperray A, Miles LA, et al. Apical tomography and modulation of ICAM-1 expression on activated endothelium [J]. Am J Pathol, 1995, 147(5):1278-1288.

[2] Lindner JR, Song J, Christiansen J, et al. Ultrasound assessment of injury and inflammation using microbubbles targeted to P-selectin [J]. Circulation, 2001, 104(17):2107-2112.

[3] Linder JR. Detection of inflamed plaques with contrast ultrasound [J]. Am J Cardiol, 2002, 90(Suppl):32L-35L.

[4] Villanueva FS, Jankowski RJ, Klibanov S, et al. Microbubbles targeted to intercellular adhesion molecule-bind to activated coronary artery endothelial cells [J]. Circulation, 1998, 98(1):1-5.

[5] Christiansen JP, Leong-Poi H, Xu F, et al. Non-invasive imaging of myocardial reperfusion injury using leukocyte-targeted contrast echocardiography [J]. Circulation, 2002, 105(15):1764-1767.

[6] Xu ZZ. Colour Doppler flow image and intravascular contrast-enhanced ultrasonography [J]. Chin J Med Imaging Technol, 2002, 18(10):1063.

徐智章. 超声血流成像和血管内超声造影 [J]. 中国医学影像技术, 2002, 18(10):1063.