

◆ 实验研究

Dual targeted microbubbles in assessment of mice myocardium ischemia-reperfusion injury

LIU Yang, WANG Zhi-gang, LIU Xing-zhao, REN Jian-li, LI Pan*
(Institute of Ultrasound Imaging, the Second Affiliated Hospital,
Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To assess the imaging effect of mice myocardium with ischemia-reperfusion injury by CEUS with microbubbles dually targeted to P-selectin and ICAM-1 (MBd). **Methods** The targeted microbubbles were prepared by using avidin-biotin method, then were observed and evaluated by confocal laser scanning microscope and flow cytometry, respectively. Twenty-four mice were randomly divided into MBd (microbubbles targeted to dual ligands, $n=10$) group, MBp (microbubbles targeted to P-selection, $n=10$) group and MBc (non-targeted microbubbles, $n=4$) group. Ischemia-reperfusion injury of myocardium was induced to make experiment models by ligating the left anterior descending branch of coronary arteries. Sixty minutes after reperfusion, MBd, MBp and MBc were injected to mice through tail vein in each group, respectively. The contrast images were collected and quantitatively analyzed with Sonomath image system. **Results** The endothelial cells attachment and contrast enhancement of ultrasound imaging in MBd group and MBp group were significantly stronger than in MBc group (both $P<0.05$). Compared to MBp group, the delay time of ultrasound imaging was longer in MBd group ($P<0.05$). **Conclusion** CEUS with dual targeted microbubbles is a noninvasive method to detect and evaluate mice injured myocardium after ischemia-reperfusion injury.

[Key words] Microbubbles; Ischemia-reperfusion; Contrast media; Ultrasonography; P-selectin

双靶向超声微泡造影剂评价小鼠缺血再灌注心肌

柳 阳, 王志刚, 刘兴钊, 任建丽, 李 攀*
(重庆医科大学附属第二医院超声影像研究所, 重庆 400010)

[摘要] **目的** 制备同时携带 P 选择素和 ICAM-1 抗体的靶向超声微泡造影剂, 以评估小鼠缺血再灌注损伤心肌声学造影显像效果。**方法** 采用生物素-亲和素方法制备靶向微泡, 于激光共聚焦显微镜下观察微泡形态, 流式细胞仪检测连接效率。将 24 只健康昆明小鼠随机分成 3 组: 结合双抗体选择素微泡组 (MBd 组) 10 只, 结合 P 选择素单抗组 (MBp 组) 10 只, 空白微泡组 (MBc 组) 4 只。结扎冠状动脉左前降支近左主干分支, 制作心肌缺血再灌注模型, 60 min 后经尾静脉分别注射 MBd、MBp 及 MBc, 采集心肌对比造影图像。所有图像均采用 Sonomath 超声影像分析仪处理。**结果** MBd 组和 MBp 组对缺氧内皮细胞的黏附力以及对缺血再灌注区心肌显像增强程度显著高于 MBc 组 (P 均 <0.05), MBd 组对缺血再灌注区心肌显像延迟时间高于 MBp 组 ($P<0.05$)。**结论** 双靶向微泡联合超声造影是检测和评估小鼠缺血再灌注心肌的无创性手段。

[关键词] 微泡; 缺血再灌注; 造影剂; 超声检查; P 选择素

[中图分类号] R445.1; R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2012)12-2113-04

[基金项目] 国家自然科学基金(81130025)、青年科学基金项目(30900370)、重庆高校优秀成果转化资助项目(Kjzh10201)。

[作者简介] 柳阳(1982—), 男, 湖北十堰人, 硕士, 主治医师。研究方向: 心血管疾病的超声诊断。E-mail: hbsyliuyang@gmail.com

[通讯作者] 李攀, 重庆医科大学附属第二医院超声影像研究所, 400010。E-mail: cqlipan@163.com

[收稿日期] 2012-08-02 **[修回日期]** 2012-09-22

心肌缺血再灌注损伤指冠状动脉痉挛或狭窄造成心肌血供短暂减少而产生的一系列病理生理过程,常见于冠心病、急性冠脉综合征等疾病。以传统手段(如心肌酶标记物)检测心肌缺血再灌注损伤的敏感性较低,检测窗口期短,不能精确定位和动态观察。缺血再灌注损伤时,内皮细胞表达 P 选择素,后者作用于白细胞起始附着滚动环节,其与细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的亲合力会影响黏附的稳定性^[1]。李美瑜等^[2-3]研制了携 P 选择素单抗靶向微泡 Sialyl Lewis^x 和抗 ICAM-1 单抗双配体微泡,并于体外实验中证实其黏附效能较高。袁野等^[4]证明 Sialyl Lewis^x 介导高效滚动,抗 P-选择素单抗介导微泡速度的骤降,两者在微泡靶向黏附时可发挥互补作用。本实验制备同时携带 P 选择素和 ICAM-1 抗体的靶向超声微泡造影剂,利用其在炎症反应中介导白细胞黏附的特性,对血管内皮进行靶向超声造影成像。

1 材料与方 法

1.1 微泡制备与鉴定

1.1.1 微泡制备 将二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二苯基磷酰基叠氮化物(DPPA, Sigma)、甘油及甘露醇分别与二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)/生物素化聚乙二醇二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG2000-biotin)混合并孵育,充入全氟丙烷气体(C₃F₈),制得普通脂质微泡(MBc)和生物素化脂质微泡。将生物化脂质微泡依次与链霉亲和素(streptavidin, SA)及抗 P 选择素单抗(biotin mouse anti-mouse CD62P, BD)单独低温孵育,制得连接抗 P 选择素单抗的脂质微泡(MBp);同法孵育 P 选择素单抗及 ICAM-1 单抗(biotin mouse anti-mouse CD54, BD)制得双靶向微泡(MBd)。

1.1.2 微泡鉴定 分别将用 FITC 标记的山羊抗大

鼠 IgG、FITC 标记的山羊抗大鼠 IgG 与罗丹明 b 标记 MBp 及 MBd 置于激光共聚焦显微镜下观察,应用 Sonomath 定量分析软件计算微泡浓度。取适量 MBp、MBd,分别与 FITC 标记的二抗孵育,以流式细胞术检测抗体与微泡的结合效率。

1.2 实验动物与模型制作

1.2.1 实验动物 健康雄性昆明小鼠 24 只(由重庆医科大学动物中心提供),6~8 周龄,体质量 25~30 g,随机分成 3 组:载双抗体微泡组(MBd 组)10 只,载 P 选择素微泡组(MBp 组)10 只及空白微泡组(MBc 组)4 只。

1.2.2 建立心肌缺血再灌注模型 术前禁饲、禁饮 24 h。以 1%戊巴比妥钠(6 ml/kg 体质量)腹腔注射进行麻醉,应用 MPA 生物信号采集处理系统记录心电图信号。以 20 号套管针经口行气管插管,呼吸机辅助呼吸(潮气量 2 ml、呼吸频率 120 次/分,吸呼比 1:1.5)。于胸骨左侧第 3、4 肋间开口,暴露心脏,以 10-0 手术缝线紧贴左心耳下缘穿入心肌约 0.1 cm,将自制聚乙烯管与左前降支起始部同时结扎,观察到心电图 ST 段抬高可初步确定心肌缺血模型建立成功。30 min 后抽出聚乙烯管,关闭胸腔,拔除气管插管,60 min 后采集心肌对比造影图像。

1.3 MCE 图像采集 应用 Philips iU22 超声诊断仪,经胸 MCE iU 固定探头行 MCE,连续存储图像 15 帧作为本底图像。扫查小鼠左心室短轴切面并固定,应用 0.5 ml 注射器经尾静脉分别弹丸式注射 0.3 ml MBd、MBp 或 MBc。MCE 过程中每 1 min 储存 1 张图像,30 min 后每 5 min 储存 1 张图像,直至 2 h 末。于 MBd 组与 MBc 组的 MCE 图像中左前降支供血区内随机各取 10 像素,测量声学强度。心肌延迟显像:心肌造影开始时,以 10 min 为步长记录 MBd 组及

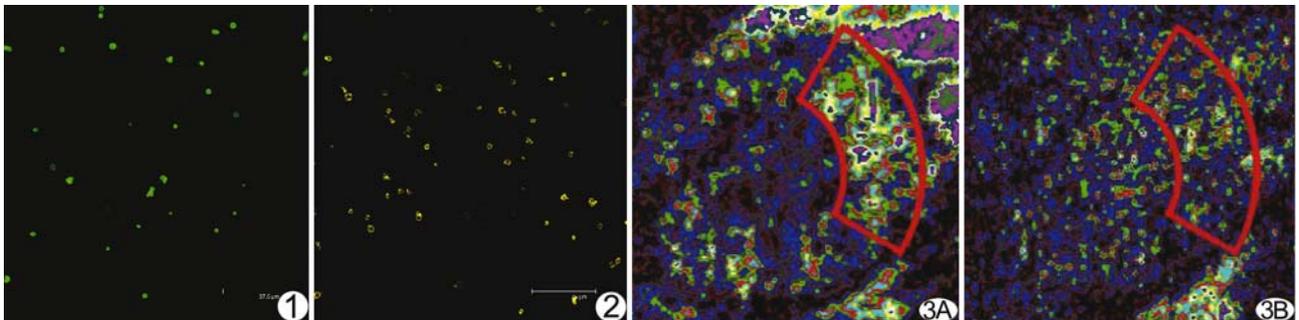


图 1 连接 P 选择素抗体的微泡造影剂 FITC 荧光二抗标记显示 P 选择素连接充分(×800) **图 2** 同时连接 P 选择素单抗和 ICAM-1 单抗的微泡造影剂 分别标记 FITC 和罗丹明 b 二抗的超声微泡,因颜色混叠而呈现黄色(×400) **图 3** 心肌缺血再灌注后 MCE 的彩色编码图像 A. MBd 组微泡有较强的造影增强效果; B. MBc 组微泡几乎无增强效应 (红框表示心肌缺血再灌注区)

MBp 组心肌缺血区造影图像声强度 (video intensity, VI) 值至 2 h 末 (此步骤重复 3 次, 分别以 MBd1、2、3 及 MBp1、2、3 亚组表示)。

1.4 图像分析 应用 Sonomath 超声影像分析仪, 以造影前缺血区回声强度值为基准, 分别计算各组 MCE 各时间点所得声学强度与基准值的差值, 制作心肌显影的彩色编码图像和三维地形图。

1.5 病理检查 MCE 结果记录结束后, 迅速将小鼠处死, 取小鼠缺血区心肌组织和周边非缺血区组织, 脱水、石蜡包埋, 切片行 HE 染色, 于显微镜下观察。

1.6 统计学分析 应用 SPSS 13.0 统计分析软件, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用两样本配对 *t* 检验, 趋势分析使用两样本秩和检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造影剂物理性质 微泡浓度为 3.79×10^9 /ml, 平均粒径 (1668.00 ± 260.20) nm, 分布均匀, 平均表面电位 (-1.24 ± 0.35) mV。激光共聚焦显微镜下观察, 山羊抗大鼠 IgG-FITC 标记的 MBp 由绿色荧光包绕 (图 1), 抗 P 选择素抗体连接充分, 流式细胞仪检测其抗体结合效率为 98.65%。分别由 FITC 和罗丹明 b 标记的 MBd 的两种荧光混叠而显示为黄色荧光 (图 2), 抗体结合效率为 81.47%。

2.2 心肌显像 VI 值分析 24 只小鼠中, 22 只建模成功。经 Sonomath 分析仪处理, MBd 组缺血再灌注心肌组织可见增强显影 (图 3A), 而 MBc 组未见明显造影增强效果 (图 3B)。MBd 组与 MBc 组间以及 MBp 组与 MBc 组间 VI 值的差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。

2.3 心肌延迟显像 每单位时间内, MBd 组所测得 VI 值与 MBp 组相比呈现出较缓慢的下降幅度, 有更长的延迟显像时间, MBd 与 MBp 的各组数值间的差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05, 图 4)。

2.4 病理学检测 光镜下观察, 正常心肌细胞排列整齐, 细胞形态完好; 缺血再灌注区心肌细胞肿胀变形, 可见炎性细胞。免疫组化: 正常心肌组织未测出 P 选择素表达, 缺血再灌注区心肌组织 P 选择素显著表达 (图 5)。

3 讨论

脂质微泡是由磷脂构成的双

层壳结构, 外表面为亲水端, 内表面为疏水端, 具有良好的生物相容性和低免疫源性^[5]; 其壳膜较薄, 内含惰性气体全氟戊烷, 可产生较好的谐波信号。本实验选用脂质微泡作为造影剂, 超声显影效果较理想。

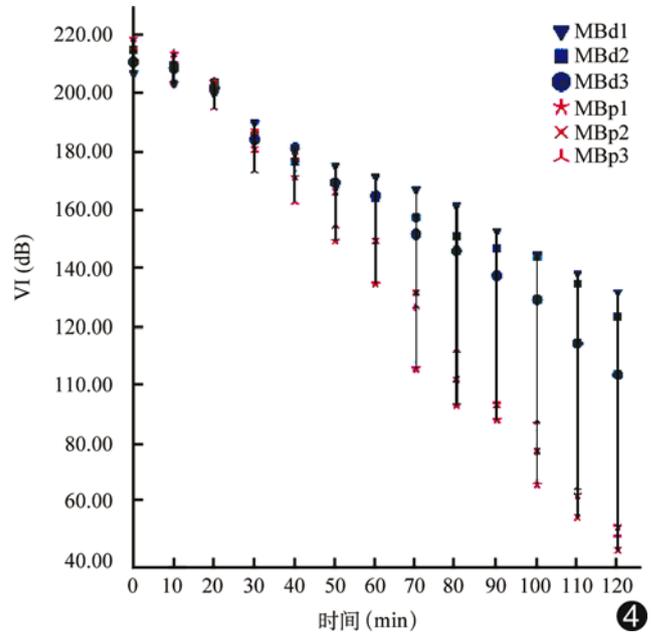


图 4 时间-强度变化图 50 min 前, MBd1、2、3 亚组 (蓝色符号) 与 MBp1、2、3 亚组 (红色符号) 所测得 VI 值大致在同一水平; 50 min 后, MBd 各亚组 VI 值下降趋势相比 MBp 各亚组放缓, 所有 VI 测值均高于 MBp 各亚组

许多缺血性疾病均可致血管内皮出现炎症反应, 使血管内皮表面疾病相关标记物表达上调; 超声靶向对比增强造影剂可藉由内皮细胞表达的疾病特异性标记物识别并黏附于血管内皮^[6]。白细胞黏附至血管内皮是炎症反应的第一步, 由一系列级联放大反应构成。选择素家族介导多形核白细胞与内皮细胞上配体 (如

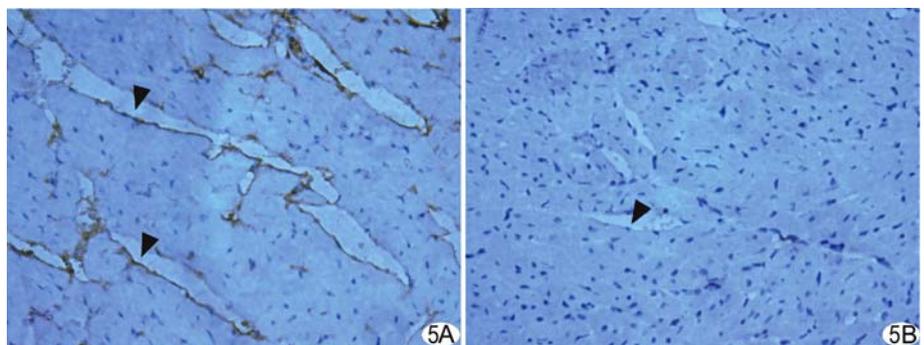


图 5 P 选择素免疫组化染色图像 (×400) A. 缺血再灌注心肌组织, 血管壁可检测出 P 选择素 (箭); B. 正常心肌组织, 血管壁未测出 P 选择素 (箭)

P 选择素糖蛋白-1)的起始锚定和滚动,内皮细胞表面趋化因子使整合素 β_2 表达上调,使之与免疫球蛋白超家族成员(如 ICAM-1)紧密结合,储存于血小板 α 颗粒和内皮细胞 Weibel-Palade 小体中的 P 选择素受到适宜刺激(如组胺、凝血酶)后可识别细胞表面寡糖结构^[7];当血管内皮出现足够数量的 P 选择素后,可促使中性粒细胞等炎性细胞大量滚动、黏附,引发一系列炎症级联反应^[8]。炎症反应中,内皮细胞表面的 IL-1 或 TNF α 刺激 ICAM-1 基因表达急剧增高,其产物滞后于 P 选择素识别并锚定炎性细胞,可易化和稳定细胞间黏附。本实验针对炎症反应中 P 选择素和 ICAM-1 作用的序贯性特点设计制作连接两种抗体的超声微泡,并证实其相对于连接单一抗体的微泡载双抗体的微泡对缺血再灌注损失心肌组织具有更强的黏附能力,可延长检测时间,提高检出率。

P 选择素在血管内皮上表达不均匀,多呈集束状分布,导致微泡对内皮的黏附亦表现为群集式吸附^[9]。Rychak 等^[10]提出影响靶向微泡与内皮细胞黏附存在 3 个因素:①微泡几何形状,主要指微泡的大小(α);②生物物理学性质,即配体与靶点密度的比例(β);③非特异性反应参数,包括力学参数、配体靶点黏附力。依此理论,优化可控变量 α 及 β ,有望取得更为理想的超声造影效果。

Rychak 等^[10]研究显示,当剪切力、抗体/配体连接黏附力等条件固定不变时,抗体/配体载体与靶点的结合率取决于载体表面结合抗体/配体的效率。本实验中小鼠心肌毛细血管内血液呈稳流状态,流速 < 10 mm/s,有利于靶向微泡与血管内皮充分接触,产生高效的靶向结合;而超声微泡与单一抗体连接充分,双抗体连接效率稍低,考虑可能与流式细胞术检测技术有关。

综上所述,靶向微泡可因抗原-抗体反应及表面电荷等因素而于早期阶段无创检测出缺血所致的炎症反

应,在缺血性心肌病未产生临床症状之前显示损伤区域^[11]。本实验制备同时携带 P 选择素和 ICAM-1 抗体的靶向超声微泡造影剂,以活体实验证实了其增强显影强度和延长显影时间的可行性,为研制针对心血管缺血性疾病的靶向载药微泡提供了一种潜在方案。

[参考文献]

- [1] Takagi J, Springer TA. Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev*, 2002, 186:141-163.
- [2] 李美瑜,肖云彬,宾建国,等.体外评价携 Sialyl Lewis^x 和抗 ICAM-1 单抗双配体超声微泡的靶向黏附性能. *中国医学影像技术*, 2010, 26(7):1209-1213.
- [3] 李美瑜,杨莉,吴爵非,等.携 Sialyl Lewis^x 和抗 ICAM-1 单抗双配体微泡靶向黏附行为方式的体外研究. *中华超声影像学杂志*, 2011, 20(2):168-171.
- [4] 袁野,李美瑜,滕中华,等.定点追踪技术评价携 Sialyl Lewis^x 和抗 P-选择素单抗靶向微泡在高剪切应力下的黏附行为. *中国医学影像技术*, 2012, 28(6):1036-1040.
- [5] Bendas G. Immunoliposomes: A promising approach to targeting cancer therapy. *BioDrugs*, 2001, 15(4):215-224.
- [6] Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*, 1994, 76(2):301-314.
- [7] van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol*, 2009, 85(2):195-204.
- [8] Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood*, 2008, 111(11):5271-5281.
- [9] Hancock JF. Lipid rafts: Contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(6):456-462.
- [10] Rychak JJ, Lindner JR, Ley K, et al. Deformable gas-filled microbubbles targeted to P-selectin. *J Control Release*, 2006, 114(3):288-299.
- [11] 景香香,王志刚.超声造影剂靶向性作用机制的研究进展. *临床超声医学杂志*, 2003, 5(6):359-360.