

超声分子成像技术在靶向诊疗动脉粥样硬化中的进展

阎文江 陈良 杨晶晶

(教育部、国家卫健委、中国医学科学院心血管重构与功能研究重点实验室 省部共建心血管转化医学重点实验室 山东大学齐鲁医院, 山东 济南 250012)

【摘要】 动脉粥样硬化是一种无症状的慢性炎症性疾病, 最终导致斑块的形成。当斑块不稳定糜烂破裂触发血栓形成, 阻塞血管, 导致急性心肌梗死和脑卒中。目前, 动脉粥样硬化的预防主要通过监测和控制危险因素(吸烟、高血压、高血糖和高血脂)的监测和控制。在严格控制危险因素以及强化药物治疗的情况下, 剩余风险对临床仍是一个巨大的挑战。更早期检测预防动脉粥样硬化病变, 阻止斑块继续发展破裂势在必行。近年来靶向超声微泡发展迅速, 超声微泡靶向成像技术可在分子和细胞水平上早期识别和诊断动脉粥样硬化斑块的特征和成分组成, 为动脉粥样硬化疾病的治疗提供了更多的机会。

【关键词】 动脉粥样硬化; 靶向超声微泡; 内皮细胞; 血管新生

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2022.04.006

Molecular Ultrasound Imaging Technology for Targeting Diagnosis and Treatment of Atherosclerosis

YAN Wenjiang, CHEN Liang, YANG Jingjing

(The Key Laboratory of Cardiovascular Remodeling and Function Research, Chinese Ministry of Education, Chinese National Health Commission and Chinese Academy of Medical Sciences, The State and Shandong Province Joint Key Laboratory of Translational Cardiovascular Medicine, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China)

【Abstract】 Atherosclerosis is an asymptomatic chronic inflammatory disease, which eventually leads to the formation of plaque. When an unstable plaque suddenly ruptures, it triggers the formation of thrombi which leading to acute myocardial infarction and stroke by blocking the vessels. Currently, the prevention of atherosclerosis is mainly through monitoring and control of the risk factors (smoking, hypertension, hyperglycemia and hyperlipidemia). Residual risk remains a huge clinical challenge in the context of strict control of risk factors and intensive drug therapy. Therefore, early detection and prevention of atherosclerotic lesions and preventing the continued development of plaque rupture are imperative. In the past few years, the microbubbles functionalized with different targeting ligands to assess different stages of atherosclerosis has been successfully introduced in the preclinical applications. This technology has the potential to substantially improve the precision in the diagnosis and treatment of atherosclerosis.

【Key words】 Atherosclerosis; Targeted ultrasound microbubbles; Endothelium; Angiogenesis

心血管疾病是目前全球因疾病导致死亡的主要原因, 其中 85% 的缺血性事件是心肌梗死和脑卒中, 而动脉粥样硬化是这些缺血性事件的潜在原因。目前, 动脉粥样硬化的治疗主要包括控制危险因素、溶栓和介入治疗恢复阻塞相关血管的血流。尽管在预防、诊断和治疗动脉粥样硬化方面取得了一些进展, 但临床现状仍任重道远。分子诊断和治疗技术从 20 世纪 80 年代兴起, 近年来得到了长足的发展。对动脉粥样硬化的显像和治疗从单纯的解剖学狭窄的严重程度, 发展为斑块生物学特性以及成分的诊疗水平。

超声技术具有超高的空间和时间分辨率, 并且其具有无创、便捷和经济的特点, 一直是临床上最常用的影像学技术, 尤其是近几年纳米颗粒以及微泡分子介质的的发展, 使得超声技术可对动脉粥样硬化发生发展进行靶向分子成像的诊断和治疗, 为动脉粥样硬化性疾病的诊疗提供了巨大的机会。

1 对比增强超声技术对动脉粥样硬化斑块显像的临床应用

欧洲超声医学和生物学会联合会^[1]在 2017 年对比增强超声(contrast-enhanced ultrasound, CEUS)在

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81900321)

通信作者: 杨晶晶, E-mail: beautyyj@126.com

血管系统的应用中指出,在临床实践中推荐其用于区分颈动脉和/或椎动脉闭塞和狭窄的残余血流;鉴别颅外颈动脉、椎动脉、腹主动脉及其主要分支的解剖;诊断疑为炎性大血管和腹主动脉的辅助手段;应用于主动脉腔内修复的随访等方面。而关于斑块特征成像的推荐,CEUS 可用于评估提示斑块不稳定性的颈动脉斑块血管新生,不过相关研究和应用主要局限于颈动脉^[2]。CEUS 技术检测表明斑块新生血管形成与组织学发现有很好的相关性,并且 Saha 等^[3]总结了一个用于描述斑块血管新生的分级系统,将其分为三级:(1)轻度,仅在外膜附近的斑块边界处存在移动的微泡;(2)中度,微泡出现在斑块的肩部和内侧,但不出现在顶端;(3)严重,整个斑块(包括尖端)都存在微泡。尽管 CEUS 在评估血管新生方面有许多优势,但仍需一种最佳的定量方法以及标准化的测量方法^[4]。与常规多普勒超声相比,CEUS 在评估斑块纤维帽溃瘍的形成中也具有更高的敏感性和特异性。

从实际临床应用角度出发,CEUS 具有成本低,成像的持续时间短(10 min)以及对目标的空间分辨率和灵敏度相对平衡的特点,是非常适合基于人群筛查目的的成像方法^[5]。但目前,只有少数造影剂被批准并推荐用于临床应用,例如 Definity/Luminy、SonoVue/Lumason 或 Sonazoid,因此造影剂的限制在某种程度上限制了 CEUS 在临床实践中的发展和应用^[6]。因此目前临床在实际应用中还是相对较少,将来随着造影剂的进一步改进以及超声技术的进一步普及,临床应用空间会很大。

2 超声分子成像技术对动脉粥样硬化斑块特征显像的临床前期研究

分子成像需具有三个因素:靶向配体(抗体、抗原结合片段和肽),成像工具(超声、计算机断层扫描、磁共振成像、正电子发射计算机断层显像/单光子发射计算机断层成像和近红外荧光成像)和检测剂(微泡、碘化化合物、放射性核苷酸、超顺磁性化合物和荧光染料)。分子成像是针对对体内的细胞和分子水平上生物过程的特征进行描述和测定,可同时获取分子成像数据以及形态或功能特征,而这些数据可详细描述疾病的病理生理学状态,从而为精准治疗开辟了道路。超声分子成像技术是基于由微泡组成的超声特异性造影剂基础的成像,用抗体和小肽等结合配体修饰的造影剂,这些功能化超声造影剂,即靶向造影剂或靶向微泡,可与参与各种疾病过程的生物标志物结合。目前关于临床前期的研究,通过应用超声分子成像技术,在各种不同的实验动物,包括小鼠、大鼠、兔和猪的颈动脉、升主动脉和主动脉弓中,进行了很多有关

动脉粥样硬化发生发展的不同阶段的研究。

基于微泡的超声造影剂有血池限制,其应用仅限于与灌注相关或发生在血管腔内皮表面的事件,是单纯的血管内制剂,不能被用于检测那些血管腔外的动脉粥样硬化靶点。所以超声分子成像技术主要依赖于检测动脉粥样硬化部位内皮细胞相关的改变。在过去的数十年中,应用配体修饰的微泡的超声分子成像技术在动脉粥样硬化病变区域识别活化受损的内皮细胞取得了很大的进展,使用靶向成像可直接可视化动脉粥样硬化炎症及免疫反应的分子或细胞成分。

2.1 内皮细胞相关分子作为靶向检测目标

血管腔内血流的变化产生的应变导致内皮细胞的损伤是目前公认的促动脉粥样硬化因素。连接黏附分子 A(junctional adhesion molecule A, JAM-A)被证明是对血流急性变化最敏感的生物标志物,在依赖于血流变化动脉粥样硬化的好发部位的内皮细胞上特异性上调,继而促进单核细胞在血管壁的募集和积累。Curaj 等^[7]应用可与活化的内皮细胞的 JAM-A 靶向结合的微泡 MB_{JAM-A} 对小鼠动脉粥样硬化模型进行超声分子成像,发现 MB_{JAM-A} 可与活化的内皮细胞上的 JAM-A 特异结合,从而早期识别动脉粥样硬化炎症内皮功能障碍。血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)在血管内皮细胞表面或潜在的血管脉管上表达,参与动脉粥样硬化初始阶段单核细胞和 T 淋巴细胞向内皮细胞的募集和黏附,是动脉粥样硬化发生发展过程的关键分子之一。因而 VCAM-1 是分子成像的理想靶标。Kaufmann 等^[8]应用靶向结合 VCAM-1 的纳米微泡增强剂能快速量化在动脉粥样硬化不同阶段发生的血管炎性变化。P 选择素也是调节动脉粥样硬化过程中白细胞募集的关键内皮黏附分子,在动脉粥样硬化易发病变部位早期出现,参与动脉粥样硬化的发生。Kaufmann 等^[9]通过超声分子成像技术同时靶向显示 VCAM-1 和 P 选择素,从而实现了在内膜黄瘤(脂肪条纹)发生之前,炎性细胞进入血管壁时检测到动脉粥样硬化血管炎症的存在和发生,早期检测到动脉粥样硬化启动事件,为动脉粥样硬化的早期筛查和危险分层提供了方法。

在动脉粥样硬化的进展阶段,识别高风险的动脉粥样硬化斑块对于指导管理和预防严重的心血管事件的发生至关重要。血小板聚集和黏附是通过血小板膜糖蛋白(glycoprotein, GP) I b-IX-V 复合物与已经构象激活的血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)的 A1 域相互作用。vWF 的活化是通过黏附于基质蛋白、高剪切应力或 vWF 多聚化失调来促进的。因此,活化 vWF 的靶向成像可检测导致动脉粥样硬化

血栓并发症的首发事件,或检测炎症环境,因为短暂的血小板黏附促进内皮细胞活化。GP I b 与 vWF 之间的相互作用是血栓形成早期的高亲和力事件,即使在高剪切应力的情况下也能促进细胞的募集。McCarty 等^[10]应用可与血管内皮上活化的 vWF 靶向结合的含重组 GP I b α 微泡的超声造影剂靶向检测不稳定斑块。他们在 LDLR^{-/-}/Apobec-1^{-/-} 基因敲除小鼠中,验证了靶向结合活化 vWF 的分子成像技术可检测高危的晚期动脉粥样硬化斑块。该研究提供了 vWF 作为动脉粥样硬化危险分层的分子影像学靶点的证据,并可用于预测斑块不稳定血栓形成等高危事件的发生。Moccetti 等^[11]通过与内皮细胞表面的黏附分子特异性结合的小分子肽配体进行内皮细胞的靶向超声成像,在晚期动脉粥样硬化的小鼠模型中,通过靶向结合斑块内皮细胞的标志物(包括 P 选择素、VCAM-1、氧化型低密度脂蛋白受体-1 和 vWF)进行超声分子成像,证明其检测高风险的晚期动脉粥样硬化斑块的可行性。而为了克服在大动脉血管中靶向微泡的细胞黏附不足,Yan 等^[12]通过将 VCAM-1 和细胞间黏附分子-1 抗体以及合成的聚合 sialyl Lewis X 同时整合到微泡的表面,设计了同时与 VCAM-1/细胞间黏附分子-1/P 选择素结合的微泡 MB_{vis}。MB_{vis} 与炎性内皮细胞具有良好的亲和力,使其具有比单靶标或双靶标以及对照微泡更加显著的优势,可监测动脉粥样硬化发生发展或评估药物干预成效。

急性冠状动脉综合征或不稳定型心绞痛患者血小板聚集率及循环血小板表面 GP II b/III a 表达均高于稳定型心绞痛或健康志愿者。因此,GP II b/III a 受体是动脉粥样硬化斑块中聚集血小板的潜在标志物。含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(arginine-glycine-aspartic acid, RGD) 序列的肽对 GP II b/III a 具有高度的黏附性。Guo 等^[13]研制了一种 cRGD 修饰的微泡(MB-cRGD),它能与活化血小板上的 GP II b/III a 特异性地结合。他们应用 MB-cRGD 微泡靶向显示黏附和聚集在内皮细胞表面的活化的血小板,证明 GP II b/III a 受体可作为动脉粥样硬化斑块不稳定性的生物标志物,用于超声分子成像检测。

2.2 通过靶向检测血管新生的超声分子成像

作为动脉粥样硬化斑块发生发展和不稳定性的先决因素,斑块内血管新生和滋养血管已引起广泛的关注,并且已被确定为斑块内出血和斑块破裂的独立预测因子。在动脉粥样硬化斑块的内膜下通常存在大量的新生血管,促进动脉粥样硬化的进展并引起临床症状。对斑块内新生血管的成像可显示斑块的生物学特性,有助于动脉粥样硬化的危险分层。

血管内皮生长因子是由血管壁的内皮细胞和平滑肌细胞分泌的参与血管新生和血管通透性的主要分子。血管内皮生长因子受体-2 是血管内皮生长因子在血管发育中发挥重要作用的主要受体,促进动脉粥样硬化斑块的发生发展。Liu 等^[14]使用可与血管内皮生长因子受体-2 靶向结合的微泡成功地检测到兔腹主动脉不稳定斑块,证明血管内皮生长因子作为靶向分子在超声分子成像技术中评估动物模型易损斑块的可行性。玻璃粘连蛋白受体整合蛋白 $\alpha v\beta 3$ 是内皮活化的潜在标志物,在新生血管和易损斑块中多见,与斑块的外膜滋养血管以及斑块内血管新生明显相关。Daeichin 等^[15]使用抗 $\alpha v\beta 3$ 整合素的生物素化抗体的靶向微泡无创地评估 ApoE^{-/-} 小鼠颈动脉斑块部位外膜滋养血管的特征。与血管新生相关的炎症以及此过程中涉及的炎症因子被广泛认为是衡量动脉粥样硬化斑块稳定性的指标,而白介素-8 是由巨噬细胞、单核细胞和内皮细胞分泌的炎症因子,它是动脉粥样硬化斑块病变部位与炎症反应相关的重要的血管生成因子,可促进动脉粥样硬化斑块的发生和发展。Lu 等^[16]合成了带有白介素-8 多克隆抗体的 SonoVue 微泡检测兔腹主动脉粥样硬化斑块,证明该分子诊断技术更容易检测到斑块的存在以及斑块的特征,尤其是斑块滋养血管的情况,有望成为一种非常有价值的诊断方法。目前动物模型研究成功通过靶向结合活化内皮细胞相关的黏附分子或炎症因子的超声分子成像,检测动脉粥样硬化的发生发展以及识别易损斑块。

3 超声分子靶向治疗方面的进展

超声分子治疗,通过微泡进行药物和基因递送是最新研究的热点。通过药物和微泡的共注射或通过试剂掺入微泡,应用超声脉冲控制微泡的破坏,声孔效应和空化效应能提高细胞膜的通透性,从而使药物或治疗基因可精确高效地在靶组织释放,提高了药物的利用率或基因干预的有效率。目前很多临床前研究成功地证实靶向微泡破坏技术在改善心肌梗死后心功能、促进心肌细胞再生和减少心肌组织的再灌注损伤等治疗方面的可行性。也有部分研究^[17-19]通过靶向微泡破坏技术基因治疗高血压以及糖尿病心脏病。在急性血管事件的抗栓治疗方面,Wang 等^[20]设计了一种新型的治疗性微泡,将重组纤溶药物、回声增强微泡和活化血小板特异性单链抗体结合在一起。他们在使用氯化铁诱导的小鼠颈动脉血栓模型中,测试了这种治疗性微泡在超声微泡成像以及靶向溶栓治疗中的效果。证明了这种技术能同时进行血栓的诊断和治疗,以及溶栓成败的监测。但目前为

止,尚无靶向微泡破坏技术在抑制动脉粥样硬化进展、促进斑块消退以及稳定易损斑块方面的相关研究。

4 超声分子成像技术靶向诊疗动脉粥样硬化的发展方向和应用前景

动脉粥样硬化通常是一种慢性炎症性疾病,早期病变通常是无症状的,且检测困难。炎症在动脉粥样硬化的发生发展中起着重要的作用,研发新的策略以便更敏感地检测和早期预防动脉粥样硬化,以及早期识别不稳定斑块阻止其进一步糜烂破裂是未来的发展方向。目前动脉粥样硬化的治疗并不能有效地消除或逆转斑块^[21],同样在动脉粥样硬化血栓形成后,也需探索新的无严重副作用的药物治疗方式,以迅速有效地溶解血栓。近年来通过对分子影像学诊断和治疗相结合方法的研究,为解决动脉粥样硬化疾病提供了潜在的机会。超声靶向分子治疗可将治疗药物精准地运送到病变部位,与全身给药相比,减少药物剂量从而减少全身用药时经常发生的副作用。Wang 等^[22]研究显示应用与活化的血小板特异性结合的 GP II b/III a 靶向微泡的超声分子成像可动态观察急性动脉血栓形成的图像,并且可实时监测体内药物溶栓的成功或失败。超声分子诊疗有望成为治疗心血管疾病的个性化药物的解决方案。

5 目前临床转化的局限性

超声分子诊疗具有巨大潜力,在临床前的研究中,微泡可与不同的靶向配体结合,用来检测心肌缺血、血栓形成,并评估动脉粥样硬化不同阶段的斑块在细胞水平的生物学特征。但临床应用的转化还是面临很多困难,微泡在人体循环系统的作用时间限制了微泡与目标结合的时间跨度,由于动脉内的生理性高血流速度,微泡在作用靶点的滞留时间相对较短,超声很难探测到较大的血管部位。目前仍缺少有效的可安全使用的临床传递系统,需开发可安全用于人体的可结合化学分子和配体的相关造影剂等。另外仍需优化治疗参数,因为啮齿动物中已描述了许多不良事件,例如微血管渗漏、心脏内溶血、毛细血管破裂或炎性细胞浸润。

参考文献

- [1] 杨伯文,韩红. 超声造影在腹主动脉瘤腔内修复术后内漏诊断中的应用进展[J]. 中华超声影像学杂志,2019,28(4):365-368.
- [2] Sidhu PS, Cantisani V, Dietrich CF, et al. The EFSUMB Guidelines and Recommendations for the Clinical Practice of Contrast-Enhanced Ultrasound (CEUS) in Non-Hepatic Applications: Update 2017 (Short Version) [J]. *Ultraschall Med*, 2018, 39(2):154-180.
- [3] Saha SA, Gourineni V, Feinstein SB. The use of contrast-enhanced ultrasonography for imaging of carotid atherosclerotic plaques: current evidence, future directions [J]. *Neuroimaging Clin N Am*, 2016, 26(1):81-96.
- [4] Rix A, Curaj A, Liehn E, et al. Ultrasound microbubbles for diagnosis and treatment of cardiovascular diseases [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2020, 46(5):545-552.
- [5] 陈银花,陈勇,马勇,等. 二维纵向应变对室壁运动正常患者冠状动脉左主干和三支病变的预测价值[J]. 中国循环杂志,2019,34(1):55-60.
- [6] Porter TR, Mulvagh SL, Abdelmoneim SS, et al. Clinical applications of ultrasonic enhancing agents in echocardiography: 2018 American Society of Echocardiography Guidelines Update [J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2018, 31(3):241-274.
- [7] Curaj A, Wu Z, Rix A, et al. Molecular ultrasound imaging of junctional adhesion molecule a depicts acute alterations in blood flow and early endothelial dysregulation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(1):40-48.
- [8] Kaufmann BA, Sanders JM, Davis C, et al. Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis with targeted ultrasound detection of vascular cell adhesion molecule-1 [J]. *Circulation*, 2007, 116(3):276-284.
- [9] Kaufmann BA, Carr CL, Belcik JT, et al. Molecular imaging of the initial inflammatory response in atherosclerosis: implications for early detection of disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(1):54-59.
- [10] McCarty OJ, Conley RB, Shentu W, et al. Molecular imaging of activated von Willebrand factor to detect high-risk atherosclerotic phenotype [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2010, 3(9):947-955.
- [11] Moccetti F, Weinkauff CC, Davidson BP, et al. Ultrasound molecular imaging of atherosclerosis using small-peptide targeting ligands against endothelial markers of inflammation and oxidative stress [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2018, 44(6):1155-1563.
- [12] Yan F, Sun Y, Mao Y, et al. Ultrasound molecular imaging of atherosclerosis for early diagnosis and therapeutic evaluation through leucocyte-like multiple targeted microbubbles [J]. *Theranostics*, 2018, 8(7):1879-1891.
- [13] Guo S, Shen S, Wang J, et al. Detection of high-risk atherosclerotic plaques with ultrasound molecular imaging of glycoprotein II b/III a receptor on activated platelets [J]. *Theranostics*, 2015, 5(4):418-430.
- [14] Liu H, Wang X, Tan KB, et al. Molecular imaging of vulnerable plaques in rabbits using contrast-enhanced ultrasound targeting to vascular endothelial growth factor receptor-2 [J]. *J Clin Ultrasound*, 2011, 39(2):83-90.
- [15] Daeichin V, Kooiman K, Skachkov I, et al. Quantification of endothelial $\alpha v \beta 3$ expression with high-frequency ultrasound and targeted microbubbles: in vitro and in vivo studies [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2016, 42(9):2283-2293.
- [16] Lu Y, Wei J, Shao Q, et al. Assessment of atherosclerotic plaques in the rabbit abdominal aorta with interleukin-8 monoclonal antibody-targeted ultrasound microbubbles [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(4):3083-3092.
- [17] Qian L, Thapa B, Hong J, et al. The present and future role of ultrasound targeted microbubble destruction in preclinical studies of cardiac gene therapy [J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(2):1099-1111.
- [18] He Y, Zhang B, Chen Y, et al. Image-guided hydrogen gas delivery for protection from myocardial ischemia-reperfusion injury via microbubbles [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(25):21190-21199.
- [19] Yan P, Chen KJ, Wu J, et al. The use of MMP2 antibody-conjugated cationic microbubble to target the ischemic myocardium, enhance Timp3 gene transfection and improve cardiac function [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(3):1063-1073.
- [20] Wang X, Gkanatsas Y, Palasubramaniam J, et al. Thrombus-targeted theranostic microbubbles: a new technology towards concurrent rapid ultrasound diagnosis and bleeding-free fibrinolytic treatment of thrombosis [J]. *Theranostics*, 2016, 6(5):726-738.
- [21] 黄村榕,刘伟达,杨进刚,等. 中国 ST 段抬高型心肌梗死患者初始他汀类药物用药强度与远期预后相关性研究 [J]. 中国循环杂志, 2020, 35(6):560-565.
- [22] Wang X, Hagemeyer CE, Hohmann JD, et al. Novel single-chain antibody-targeted microbubbles for molecular ultrasound imaging of thrombosis: validation of a unique noninvasive method for rapid and sensitive detection of thrombi and monitoring of success or failure of thrombolysis in mice [J]. *Circulation*, 2012, 125(25):3117-3126.

收稿日期:2021-09-11