

动脉粥样硬化斑块核磁成像分子对比剂的新进展

张天毅, 曹正宇, 田野

(哈尔滨医科大学附属第一医院心内科, 黑龙江省哈尔滨市 150001)

[关键词] 动脉粥样硬化; 核磁共振; 分子对比剂

[摘要] 动脉粥样硬化是全球高患病率和致死率的疾病之一, 归因于易损斑块破裂导致的心肌梗死等严重并发症。核磁分子成像软组织分辨率高, 联合分子对比剂, 可实现靶向精确动脉粥样硬化斑块成像。随动脉粥样硬化机制的研究深入, 靶点渐增, 合成技术愈加成熟, 分子对比剂种类增多, 更具转化价值。核磁分子成像将为斑块的早期诊断、斑块分类、精准治疗提供重要影像学证据。文章综述了动脉粥样硬化斑块核磁分子成像对比剂的新进展。

[中图分类号] R543.5

[文献标识码] A

New research progress in MR imaging molecular contrast agents for atherosclerotic plaques

ZHANG Tianyi, CAO Zhengyu, TIAN Ye

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

[KEY WORDS] atherosclerosis; MRI; molecular contrast agents

[ABSTRACT] Atherosclerosis is one of the major causes of the high morbidity and mortality worldwide because of severe complications caused by vulnerable plaque rupture, such as myocardial infarction. With high resolution on soft tissue, magnetic resonance(MR) molecular imaging, combined with molecular contrast agents, may achieve plaque-targeted accurate imaging. Since the pathogenesis of atherosclerosis is more deeply investigated, and the synthetic technology is more advanced, there are more molecular contrast agents of great values for conversion. MR molecular imaging will provide evidence of diagnosis, classification and precision treatment for atherosclerosis. This essay reviewed recent advances in atherosclerotic MR molecular contrast agents.

心血管疾病的死亡率较高, 及至 2015 年仍有约 1 770 万人死于心血管疾病, 约占全球总死亡率的 31%。高死亡率主要因为动脉粥样硬化(atherosclerosis, As) 斑块破裂导致的心肌梗死、脑卒中及动脉闭塞等致死致残并发症的发生^[1]。As 是一种慢性炎症性疾病, 损伤的血管壁内皮细胞募集单核细胞等炎症细胞。单核细胞分化为巨噬细胞吞噬氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 形成泡沫细胞分泌多种促炎因子^[2], 进一步加剧炎症。平滑肌细胞等可分泌多种蛋白构成细胞外基质及纤维帽, 而基质中蛋白酶可降解纤维帽, 使之变薄易于破裂^[3]。此外, 在缺氧等因素作用

下, 斑块内新生血管出现, 且极易破裂造成斑块内出血, 增加斑块易损性^[4]。

斑块的核磁分子成像技术应用分子对比剂直观地显示以上过程中的特征细胞及分子, 为 As 斑块的早期诊断、易损性分级、个体化治疗及疗效监测提供影像学支持, 且成像无创可重复、软组织分辨率高、靶向性强。分子对比剂是一种人工合成的能够与靶点特异结合的对比剂, 能够强化显示斑块内靶细胞及靶点分子的含量变化^[5]。根据对比剂靶点分子不同大致分为以下几类: 靶向内皮细胞、靶向巨噬细胞、靶向平滑肌细胞及靶向细胞外基质及水解酶的对比剂。本文就近年来 As 斑块核磁成像

[收稿日期] 2018-11-08

[修回日期] 2019-01-25

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81530052)

[作者简介] 张天毅, 硕士研究生, 主要研究方向为动脉粥样硬化斑块的核磁共振靶向成像, 探索无创高分辨斑块成像用以诊断动脉粥样硬化斑块, E-mail 为 1846198428@qq.com。通信作者田野, 博士后, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事声动力治疗相关心血管病的疗效与机制探究, 致力于医、理、工多学科交叉和转化研究, E-mail 为 yetian6@163.com。

分子对比剂的新进展展开综述。

1 靶向内皮细胞的核磁对比剂

1.1 靶向内皮细胞表面黏附分子的核磁对比剂

内皮细胞在 ox-LDL 等危险因素的刺激下表达多种黏附分子,是 As 形成早期的生物学指标,如血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、E 选择素、P 选择素等^[6]。以往研究构建了交联氧化铁联合 VCAM-1 的分子对比剂、超小顺磁性氧化铁纳米颗粒 (ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide, USPIO) 联合 P 选择素的纳米颗粒、靶向 E 选择素的纳米颗粒等^[7]。但这些对比剂与内皮细胞的结合力有待提高。近期有研究以烟草花叶病毒为载体合成了靶向 VCAM-1 的钆 (gadolinium, Gd) 对比剂,该对比剂为非球型粒子,在血流中着边能力增加,更易于与内皮细胞表面的 VCAM-1 结合。在主动脉斑块小鼠模型中,约 70% 的斑块内有该对比剂的富集,无斑块区域未见富集, T1 信号增强趋势与之相符,信噪比从基线的 12.6 增长至 28.7,而无斑块区域以及阴性对照只有 10 ~ 15,提示该对比剂的特异性与敏感性较高 (图 1)。且免疫组化证明强化区与 VCAM-1 分布对应,靶向性佳。烟草花叶病毒载体主要分布于肝脾,约 96 h 被组织代谢完全,未见溶血及血栓形成。此外该对比剂成像 Gd 注射量仅为 0.002 5 mmol/kg,安全性较好^[8]。

1.2 靶向内皮细胞表面其他分子的核磁对比剂

内皮细胞表面的其他分子也可为分子对比剂的靶点。研究发现 As 斑块中内皮细胞表面的白细胞分化抗原 81 (leucocyte differentiation antigen, CD) 上调先于炎症瀑布,是理想的早期诊断 As 的分子标记物^[9]。有研究将微型氧化铁粒子 (micron-sized particles of iron oxide, MPIO) 联合 CD81 抗体合成的对比剂用于内皮细胞,并发现细胞的 T2 信号减低。与无 CD81 抗体的对比剂相比,该对比剂使载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 敲除小鼠模型斑块 T2 信号降低 8.96 倍,且经免疫组化及荧光证实降低区域为富含对比剂与 CD81 的斑块,显示出良好的靶向性。游离的 MPIO 随血流清除速度快,削弱了背景的影响,图像质量更佳。该对比剂的安全性、体内分布及药代动力学尚不明确^[10]。

1.3 靶向新生血管内皮细胞的核磁分子对比剂

新生血管与斑块的炎症和内出血相关,并促进

了斑块的不稳定性^[11]。新生血管内皮整合素 $\alpha_5\beta_3$ 、血管特异结合性短肽 (CTKNSYLMC, GEBP11) 等分子表达量增加,为新生血管靶向分子成像提供可能,如靶向 $\alpha_5\beta_3$ 的钆氟碳化合物纳米颗粒、钆泛影葡胺纳米乳剂等^[12]。近期研究选择 GEBP11 为靶点,因 GEBP11 多肽对新生血管内皮亲和力和特异性均强于 $\alpha_5\beta_3$ 。将其接合在 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒上,用于腹主动脉斑块模型小鼠,斑块 T2 信号降低为原来的 1/6,且荧光共定位显示强化部位仅与新生血管内皮细胞分布吻合,显示出良好的特异性。应用该对比剂后,细胞活力、细胞周期、器官解剖及病理均未见异常。可刺激 T 细胞轻度增殖,半衰期约 6.2 h,15 天被组织完全清除^[13]。

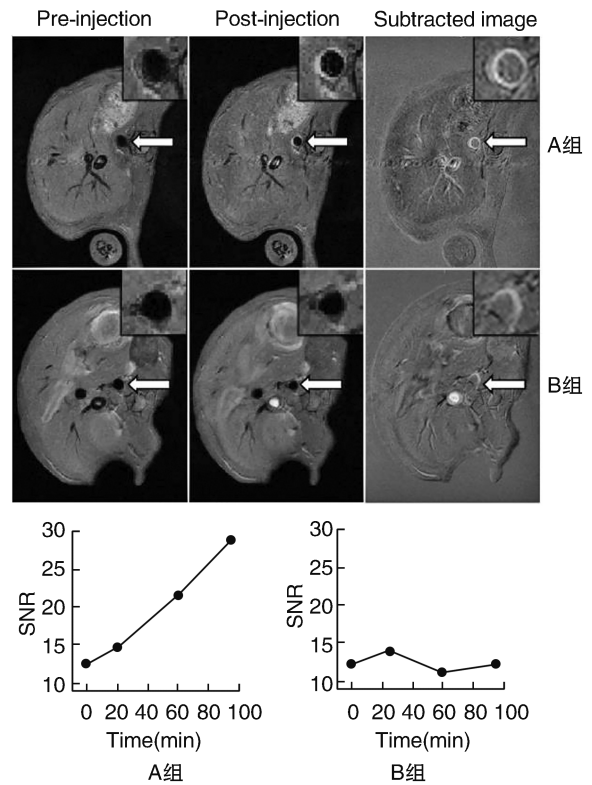


图 1. ApoE^{-/-}小鼠注射对比剂前、注射对比剂后 90 min 腹主动脉斑块核磁扫描图像、剪影像及信噪比随时间变化图 A 组注射 VCAM 靶向钆对比剂, B 组注射普通钆对比剂。

Figure 1. Time-dependent changes of magnetic resonance imaging, scissors and signal-to-noise ratio in abdominal aortic plaque of ApoE^{-/-} mice before and 90 minutes after contrast injection

2 靶向巨噬细胞的核磁对比剂

2.1 靶向巨噬细胞表面分子的核磁对比剂

巨噬细胞表面分子参与炎细胞募集过程,并反

映斑块炎症水平^[14],如 $\alpha 4\beta 1$ 及 CD163 等。 $\alpha 4\beta 1$ 联合 Gd 脂质体的 T1 对比剂对 ApoE^{-/-} 鼠斑块有明显的强化,强化区域与斑块位置相符,且富含对比剂和巨噬细胞,而非斑块区域、内皮细胞及平滑肌细胞无 T1 信号增强,显示出良好的特异性。该对比剂经网状内皮系统清除,72 h 后已从血中清除,主要分布于肝脾,胆汁中有分布,而肾及尿液中未见分布,几乎无肾毒性^[15]。具有 CD163 抗体功能的金涂层氧化铁纳米颗粒可与 ApoE^{-/-} 小鼠斑块内巨噬细胞特异结合,降低斑块 T2 信号强度,反映斑块的炎症水平。该模型非斑块区域未见对比剂分布,阻断 CD163 后,该对比剂的强化效果与对照组相同,反映出该对比剂特异性。该对比剂未见明显细胞毒性,主要分布于肝中,但低于注射量的 10%,注射 24 h 后,可见碱性磷酸酶活性稍有提高^[16]。

2.2 靶向巨噬细胞内脂质及其受体的核磁对比剂

斑块内巨噬细胞吞噬 ox-LDL 产生特异氧化表位,发挥致炎作用,促进斑块的进展。氧化表位的抗体与锰合成的纳米颗粒,经巨噬细胞吞噬释放出锰,使得斑块 T1 信号增强,巨噬细胞活力不受影响。在 ApoE^{-/-} 小鼠中半衰期为 15 h,在肝脾中均有分布,且与无抗体对比剂相比,有抗体对比剂在主动脉中分布较多,其他器官中反而较少^[17]。血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like ox-LDL receptor-1, LOX-1) 的表达量与斑块易损性呈正相关,LOX-1 抗体与 USPIO 结合构成新型 T2 分子对比剂强化小鼠颈动脉斑块 T2 信号,效果可维持 24 h 以上,扫描时间窗长,经免疫组化证明强化区域与 LOX-1、巨噬细胞分布密切相关。该对比剂水溶性好,流体动力学大小仅为 20 nm 左右,常温下 4 周内保持稳定,在小鼠体内半衰期 13.09 h,主要经肾代谢^[18]。

3 靶向平滑肌细胞的核磁对比剂

平滑肌细胞存在并参与斑块发展,是斑块核磁分子成像的另一靶点。已有研究靶向组织因子合成 T1 对比剂强化斑块 T1 信号,而无组织因子抗体结合的单独对比剂则无靶向成像的功能^[19]。近年有研究合成靶向性更佳的平滑肌细胞靶向的分子对比剂。研究显示前纤维蛋白 1 高表达于动脉粥样硬化斑块中,通过调节血管平滑肌细胞的增殖迁移参与斑块形成。因此将前纤维蛋白 1 抗体与 Fe₃O₄ 纳米颗粒连接合成 T2 对比剂反映斑块中血管平滑肌细胞的含量及功能。该对比剂流体大小为 30.2

nm,室温条件下 2 周内保持稳定,24 h 内未见细胞毒性,在小鼠体内主要分布于肝肾,但 48 h 后基本从体内清除^[20]。

4 靶向细胞外基质及水解酶的核磁对比剂

4.1 靶向细胞外基质蛋白的核磁对比剂

平滑肌细胞和巨噬细胞分泌的细胞外基质蛋白是斑块重要组成成分,包括弹性蛋白、纤维蛋白及胶原等,其合成、降解及重组与血管重构相关。大量研究采用靶向弹性蛋白、纤维蛋白及胶原等经典细胞外基质联合对比剂实现斑块的成像,如靶向纤维蛋白的 Gd 纳米颗粒及靶向弹性蛋白的 Gd 对比剂等^[21]。以靶向弹性蛋白的 Gd 分子对比剂为例,该对比剂可强化兔的 A_s 斑块 T1 信号,且与免疫组化中弹性蛋白染色对应,显示出良好的特异性。该对比剂可清晰显示血管壁轮廓及厚度,提高评估血管壁重塑的精确度^[22]。

4.2 靶向细胞外基质水解酶的核磁对比剂

斑块的进展与细胞外基质的水解酶相关,如基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)及髓系过氧化物酶(MPO)等^[23]。靶向 MMP-9 的分子对比剂和靶向 MPO 的 Gd 对比剂均可强化显示斑块,且强化区与相应酶分布一致^[24]。腱糖蛋白 C 是一种多功能的细胞外糖蛋白,高表达于进展期斑块,与斑块炎症及破裂有关。它能够上调并激活巨噬细胞中 MMP-9,促进细胞外基质降解,引起平滑肌细胞凋亡,加速斑块发展。腱糖蛋白 C 和 USPIO 构成的纳米颗粒水和直径为(47.18±1.48) nm,可强化 ApoE^{-/-} 小鼠斑块 T2 信号,约为非靶向对比剂对照组的 5 倍,且信号强化程度与不同分期斑块中的腱糖蛋白 C 含量相关,提示该对比剂可为斑块分期提供信息^[25]。

5 小结

目前核磁分子对比剂仍有诸多局限。分子对比剂多数为纳米颗粒,其应用于人体的安全性仍存在争议。因此一方面应对纳米颗粒的安全性进一步实验评估,另一方面应研发稳定的对比剂化合物以突破纳米颗粒的限制。目前分子对比剂只能显示斑块中一种分子或细胞的含量,并不能全面系统的分析斑块中所有成分及占比。应用多靶标的分子对比剂,借由不同显像时间或不同成像技术为解决该问题提供思路。此外,分子成像尚不能与斑块的

病理分期相对应,应实验探究成像特点与病理特点的对对应性,为分子成像斑块分期制定标准。

随着 As 斑块靶标的涌现及 As 发病机制的深入探索,新型分子对比剂不断涌现。目前分子对比剂不仅为了显像斑块,更为了早期诊断斑块,显示斑块内成分、斑块炎症水平及斑块的易损性,这与临床需求相符。新型对比剂兼顾分辨率、特异性、靶向性及安全性。核磁分子成像技术可显示斑块的解剖学结构及生理学功能,也可实现靶细胞及分子动态定量分析研究,具有花费低及无创安全的优势,或可为临床中斑块的分期、早期诊断、疗效评估及预后提供依据,从而实现斑块早期干预及精准治疗。此外,研发具有治疗功能的分子对比剂有望实现动脉粥样硬化的诊疗一体化,这将是未来动脉粥样硬化核磁分子成像的研究焦点。

[参考文献]

- [1] Bejarano J, Navarro-Marquez M, Morales-Zavala F, et al. Nanoparticles for diagnosis and therapy of atherosclerosis and myocardial infarction: evolution toward prospective theranostic approaches [J]. *Theranostics*, 2018, 8(17): 4710-4732.
- [2] 尹凯,唐朝克. 炎症调控胆固醇逆向转运的机制研究[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(7): 655-657.
- [3] Raggi P, Genest J, Giles JT, et al. Role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis and therapeutic interventions [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 276: 98-108.
- [4] Sadat U, Jaffer FA, van Zandvoort MA, et al. Inflammation and neovascularization intertwined in atherosclerosis: imaging of structural and molecular imaging targets [J]. *Circulation*, 2014, 130(9): 786-794.
- [5] Makowski MR, Botnar RM. MR imaging of the arterial vessel wall: molecular imaging from bench to bedside [J]. *Radiology*, 2013, 269(1): 34-51.
- [6] 薛峰,杜从阔,全慧,等. CSE/H2S 通过 KLF6 拮抗 ox-LDL 诱导的内皮细胞炎症反应 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(6): 550-556.
- [7] Kanwar RK, Chaudhary R, Tsuzuki T, et al. Emerging engineered magnetic nanoparticulate probes for molecular MRI of atherosclerosis: how far have we come? [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2012, 7(6): 899-916.
- [8] Bruckman MA, Jiang K, Simpson EJ, et al. Dual-modal magnetic resonance and fluorescence imaging of atherosclerotic plaques in vivo using VCAM-1 targeted tobacco mosaic virus [J]. *Nano Lett*, 2014, 14(3): 1551-1558.
- [9] Tourani M, Karkhah A, Najafi A. Development of an epitope-based vaccine inhibiting immune cells rolling and migration against atherosclerosis using in silico approaches [J]. *Comput Biol Chem*, 2017, 70: 156-163.
- [10] Yan F, Yang W, Li X, et al. Magnetic Resonance imaging of atherosclerosis using CD81-targeted microparticles of iron oxide in mice [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 758616.
- [11] Chistiakov DA, Melnichenko AA, Myasoedova VA, et al. Role of lipids and intraplaque hypoxia in the formation of neovascularization in atherosclerosis [J]. *Ann Med*, 2017, 49(8): 661-677.
- [12] Wang K, Pan D, Schmieder AH, et al. Atherosclerotic neovascularization MR imaging with mixed manganese-gadolinium nanocolloids in hyperlipidemic rabbits [J]. *Nanomedicine*, 2015, 11(3): 569-578.
- [13] Su T, Wang YB, Han D, et al. Multimodality imaging of angiogenesis in a rabbit atherosclerotic model by GEBP11 peptide targeted nanoparticles [J]. *Theranostics*, 2017, 7(19): 4791-4804.
- [14] 钟丽园,彭田红,高安博,等. 分拣受体 Sortilin 促进巨噬细胞内脂质蓄积 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(2): 139-143.
- [15] Woodside DG, Tanifum EA, Ghaghada KB, et al. Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaque at clinically relevant field strengths (1T) by targeting the integrin alpha4 beta1 [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 3733.
- [16] Tarin C, Carril M, Martin-Ventura JL, et al. Targeted gold-coated iron oxide nanoparticles for CD163 detection in atherosclerosis by MRI [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17135.
- [17] Nguyen TH, Bryant H, Shapsa A, et al. Manganese G8 dendrimers targeted to oxidation-specific epitopes: in vivo MR imaging of atherosclerosis [J]. *J Magn Reson Imaging*, 2015, 41(3): 797-805.
- [18] Wen S, Liu DF, Cui Y, et al. In vivo MRI detection of carotid atherosclerotic lesions and kidney inflammation in ApoE-deficient mice by using LOX-1 targeted iron nanoparticles [J]. *Nanomedicine*, 2014, 10(3): 639-649.
- [19] Lanza GM, Yu X, Winter PM, et al. Targeted antiproliferative drug delivery to vascular smooth muscle cells with a magnetic resonance imaging nanoparticle contrast agent: implications for rational therapy of restenosis [J]. *Circulation*, 2002, 106(22): 2842-2847.
- [20] Wang Y, Chen J, Yang B, et al. In vivo MR and fluorescence dual-modality imaging of atherosclerosis characteristics in mice using profilin-1 targeted magnetic nanoparticles [J]. *Theranostics*, 2016, 6(2): 272-286.
- [21] Wu X, Balu N, Li W, et al. Molecular MRI of atherosclerotic plaque progression in an ApoE^{-/-} mouse model with a CLT1 peptide targeted macrocyclic Gd(III) chelate [J]. *Am J Nucl Med Mol Imaging*, 2013, 3(5): 446-455.
- [22] Phinikaridou A, Andia ME, Indermuehle A, et al. Vascular remodeling and plaque vulnerability in a rabbit model of atherosclerosis: comparison of delayed-enhancement MR imaging with an elastin-specific contrast agent and unenhanced black-blood MR imaging [J]. *Radiology*, 2014, 271(2): 390-399.
- [23] Jiang XB, Yuan WS, Wang JS, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression in carotid atherosclerotic plaque and contrast-enhanced MRI in a swine model [J]. *J Neurointerv Surg*, 2014, 6(1): 24-28.
- [24] Ali M, Pulli B, Chen JW. Molecular imaging of macrophage enzyme activity in cardiac inflammation [J]. *Curr Cardiovasc Imaging Rep*, 2014, 7(4): 9258.
- [25] Li Y, Liu J, Huang JW, et al. In vivo MRI detection of atherosclerosis in ApoE-deficient mice by using tenascin-C-targeted USPIO [J]. *Acta Radiol*, 2018, 59(12): 1431-1437.

(此文编辑 许雪梅)