

本文引用: 曾佳玉, 程丹, 何隆薇. 荧光成像在动脉粥样硬化中的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(5): 375-385.

[文章编号] 1007-3949(2022)30-05-0375-11

· 专家论坛 ·

## 荧光成像在动脉粥样硬化中的研究进展

曾佳玉<sup>1,2</sup>, 程丹<sup>3</sup>, 何隆薇<sup>1,2</sup>

(南华大学衡阳医学院 1. 药学院, 2. 附属第一医院临床医学研究所, 湖南省衡阳市 421001;

3. 南华大学衡阳医学院附属南华医院临床研究所, 湖南省衡阳市 421002)

[专家简介] 何隆薇, 教授, 博士研究生导师。2015 年毕业于湖南大学, 获化学专业博士学位。随后加入济南大学, 历任讲师、副教授; 2020 年 9 月加入南华大学药学院, 被聘为特聘教授, 并入选南华大学“青年优秀人才”。主要从事有机小分子荧光探针设计及活性分子检测、分子医学影像、药物分析等领域的研究。先后主持国家自然科学基金、山东省自然科学基金、南华大学高层次人才启动项目等多个科研项目。迄今在 *Chem Soc Rev*、*Chem Sci*、*ACS Appl Mater Interfaces*、*Chem Comm*、*Anal Chem*、*Chem Eur J* 等学术期刊上共发表 20 余篇论文。

[关键词] 动脉粥样硬化; 荧光成像; 近红外

[摘要] 动脉粥样硬化是导致心脑血管疾病高死亡率和致残率的重要因素之一, 由于其致病机制和异质分布特征尚不清楚, 在体内实现动脉粥样硬化的“早发现, 早诊断, 早治疗”仍然是一个巨大的挑战。荧光成像因其灵敏快捷、非侵入性、高时空分辨率、实时原位等独特优势, 特别是具有更低背景干扰和更深组织穿透能力的近红外荧光成像, 被广泛应用于疾病发病机制研究、药物疗效评估、手术导航等基础和临床医学领域, 给检测动脉粥样硬化的发生发展及治疗带来新的契机。荧光成像在动脉粥样硬化的研究中越来越受到关注。文章综述了荧光成像技术在动脉粥样硬化研究中的新进展。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A



### Research progress of fluorescence imaging in atherosclerosis

ZENG Jiayu<sup>1,2</sup>, CHENG Dan<sup>3</sup>, HE Longwei<sup>1,2</sup>

(1. School of Pharmaceutical Science, 2. Institute of Clinical Medicine, the First Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 3. Clinical Research Institute, Affiliated Nanhua Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang, Hunan 421002, China)

[KEY WORDS] atherosclerosis; fluorescence imaging; near-infrared

[ABSTRACT] Atherosclerosis (As) is one of the important factors leading to high mortality and disability rate of cardiovascular and cerebrovascular diseases. Since its pathogenesis and heterogeneity distribution are still not clear, the “early detection, diagnosis and treatment” of As *in vivo* remains a great challenge. Fluorescence imaging is widely used in basic and clinical medical fields such as disease pathogenesis research, drug efficacy evaluation, and surgical navigation, because of its unique advantages such as sensitivity, noninvasive, high spatial and temporal resolution and real-time *in situ*, especially near-infrared fluorescence imaging with lower background interference and deeper tissue penetration, and it provides a new opportunity for the detection and treatment of the development and progression of As. Fluorescence imaging has attracted more and more attention in the research of As. This paper reviews the new progress of fluorescence imaging technology in the study of As.

[收稿日期] 2021-07-26

[修回日期] 2021-09-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(21904035); 湖南省自然科学基金项目(2020JJ5033); 南华大学高层次人才启动基金(201RGC012)

[作者简介] 曾佳玉, 博士研究生, 研究方向为小分子有机荧光探针设计及生物医学荧光成像, E-mail 为 zengjiayu\_hn@163.com。通信作者何隆薇, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为分子荧光探针及活性分子检测、分子影像, E-mail 为 helongwei0110@163.com。

心脑血管疾病是全球范围内导致死亡的主要原因之一。心脑血管疾病的流行性、长期性,在很大程度上加重了家庭和社会的精神和经济负担。动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是心脑血管疾病的常见病因而病理生理基础。As是一种慢性全身性炎症性疾病,主要发生在大中型动脉内膜。现有研究表明,生物酶活性异常、脂质代谢紊乱、结构蛋白失常以及氧化应激等参与As形成的机制<sup>[1-7]</sup>。因此,监测As相关生物活性分子的种类和浓度的时空变化,探讨其对As机制的调控、疾病预防、早期诊断和治疗评估显得尤为重要。

当前对As相关机制的检测方法主要有:油红O检测、免疫组织化学法、酶联免疫检测法、电化学方法、色谱法等<sup>[8-12]</sup>。然而,上述方法均无法实时示踪生物细胞及活体中相关活性分子浓度的时空变化。随着先进显微成像技术和设备的迅速发展,在临床上,非侵入性的可视化成像技术广泛应用于As病变的诊疗,比如计算机断层扫描(computer tomography, CT)、正电子发射型计算机断层显像(positron emission tomography, PET)、磁共振(magnetic resonance, MR)、光学相干断层扫描(optical coherent tomography, OCT)、光声成像(photoacoustic imaging, PAI)等<sup>[13-19]</sup>。荧光成像作为一种新兴的非侵入性可视化的成像技术,包括荧光反射成像(fluorescence reflection imaging, FRI)、光学频域成像(optical frequency domain imaging, OFDI)、荧光分子断层成像(fluorescence molecular tomography imaging, FMTI)、双光子荧光成像(two-photon fluorescence imaging, TPF)等,因其灵敏快捷、非侵入性、高时空分辨率、实时原位等独特优势,特别是具有更低背景干扰和更深组织穿透能力的近红外荧光(near-infrared fluorescence, NIRF)成像,在疾病的机制研究、疗效评估以及手术导航等基础医学和临床医学领域深受欢迎<sup>[20-26]</sup>。荧光成像结合其他分子成像技术的特点和优势,形成更加高效、精准的双/多模态成像检测方法,为检测As的发生发展及早期诊断和治疗带来新的契机<sup>[27-29]</sup>。

荧光探针作为荧光成像检测的核心部分,它的光学性能,比如发射/激发波长、荧光量子产率、灵敏度、选择性等,决定着检测的效率和精准度。探针一般由荧光团和识别基团两个重要部分组成,引入功能配体或靶向基团可以使其进入特定目标细胞器、细胞或组织,增加成像信号的靶本底比值(target-to-background ratio, TBR)。目前,科研工作者构建了众多荧光探针用于As成像检测。光学性

能优越的小分子有机荧光染料在用于构建As探针中颇受关注,比如荧光素<sup>[30]</sup>、花菁类染料<sup>[31-33]</sup>、萘酰亚胺<sup>[34]</sup>、芘<sup>[35]</sup>、俄勒冈绿<sup>[36]</sup>和Alexa 647<sup>[37]</sup>等,利用这些染料进行生物成像往往能获得高亮度和较稳定的荧光信号。由于近红外光具有深组织穿透能力、低组织光吸收和散射、弱生物光损伤等优点,基于NIRF染料比如吲哚菁绿(indocyanine green, ICG)、七甲川菁等的探针可以在活体中进行原位检测As<sup>[38-44]</sup>,获取更加真实准确的检测信号。与小分子有机荧光染料相比,纳米材料通常在光学性质稳定性、细胞毒性、水溶性及生物相容性等方面更有优势。为此,将小分子有机荧光探针进行纳米修饰或直接利用纳米荧光材料构建的纳米荧光探针被广泛应用于As成像检测<sup>[34,44-46]</sup>。结合其他成像检测手段的优势,双模态As荧光探针,例如OCT-NIRF<sup>[39-40,42,47]</sup>、FMT-NIRF<sup>[33]</sup>、OFD-NIRF<sup>[48]</sup>、FMT-CT<sup>[49]</sup>、FMT-MR<sup>[31]</sup>等,更能够适用于复杂环境和样本的检测,获得多样性检测信号。近年来,众多课题组利用荧光成像检测细胞及活体中与As疾病相关的生物酶、活性分子、脂质、支架蛋白等。根据检测靶向目标进行分类,本文将就近年来As斑块荧光成像的新进展展开综述。

## 1 生物酶

组织蛋白酶B(cathepsin B, CB)是一种由巨噬细胞产生的半胱氨酸蛋白酶,As斑块的扩张与失稳破裂与巨噬细胞中CB的活性升高密切相关<sup>[2]</sup>。开发用于As斑块巨噬细胞中CB的非侵入性可视化检测工具对识别与心肌梗死相关的炎症、高危病变具有十分重要的意义,有助于As相关疾病的临床前研究和治疗方法评估。2008年,Jaffer等<sup>[50]</sup>开发了一种基于NIRF导管和CB激活的NIRF探针(Prosense750,激发/发射波长:750 nm/770 nm),用于检测CB的活性(图1)。在蛋白酶试剂组中,对兔子动脉血管进行离体FRI实验发现,NIRF信号主要来自于As斑块,斑块TBR高达 $(10.3 \pm 1.8)$ ,而在控制组中几乎观察不到NIRF信号[TBR为 $(1.8 \pm 0.3)$ ]。动脉免疫荧光成像也证实蛋白酶试剂组斑块的荧光明显强于控制组,说明Prosense750可以区分As病变血管和正常血管。随后,该课题组还利用Prosense750可视化特性选择性检测炎症性高危冠状动脉斑块<sup>[51]</sup>,这对了解冠状动脉炎症的时空分布特征、单个斑块诱发心肌梗死的风险以及冠状动脉As斑块炎症的药物研发具有积极作用。

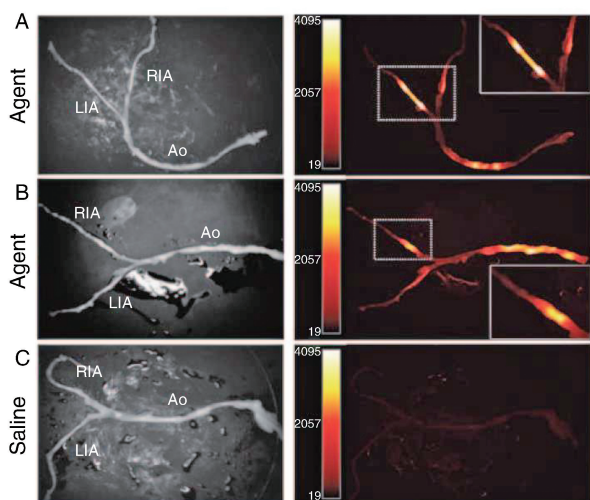


图 1. 离体 As 动脉配对的白光和 NIRF 反射成像

A 和 B 为蛋白酶试剂组;C 为对照组。

RIA:右髂动脉(right iliac artery);LIA:左髂动脉(left iliac artery);  
Ao:主动脉(aorta)。

Figure 1. Paired white light and NIRF reflectance imaging of As artery *ex vivo*

2011 年, Jaffer 等课题组<sup>[52]</sup>开发了另一种 CB 激活的 NIRF 探针(Prosense VM110, 激发/发射波长:750 nm/780 nm)和自动回撤 2D 成像导管,用于 360°观察血管内 NIRF 成像;在注射 VM110 的 As 动

物体内进行动脉 2D NIRF 导管成像发现斑块区有强烈的荧光信号,表明 CB 活性升高(图 2)。离体动脉血管 FRI 也证实 NIRF 信号主要来自于 As 斑块(TBR 比对照组高 140%)。此外,对植入金属裸支架的冠状动脉(植入后第 7 天)进行 2D NIRF 成像,发现在大外曲率支架边缘处的血管荧光信号更加明显,说明此处的 CB 活性更高。这种效应可能是由与支架支柱结构相关的差异流量(弯曲处)介导的炎症引起的,VM110 可作为植入支架引起的冠状动脉 As 炎症的有效检测工具,并为研制更为科学的金属支架外形结构提供帮助。随后,该团队设计了可同时进行体内微结构和分子成像的 OFDI 和 NIRF 成像的双模态动脉内导管(直径 800  $\mu\text{m}$ )<sup>[48]</sup>。给患有 As 病变的实验兔静脉注射 Prosense750 24 h 后进行双模态 OFD-NIRF 成像,OFDI 显微结构成像显示兔髂动脉右下角有明显的局灶性斑块,通过 NIRF 成像观察到该斑块区域有强荧光信号。RAM-11 抗体荧光标记成像发现斑块内含有大量巨噬细胞,免疫组织化学染色证实该斑块中的 CB 信号也很高。这种双模态成像可获取 OFDI 提供的 As 斑块内微结构形态和 NIRF 成像提供的炎症斑块蛋白酶活性的互补信息,从而有效地提高诊断水平。

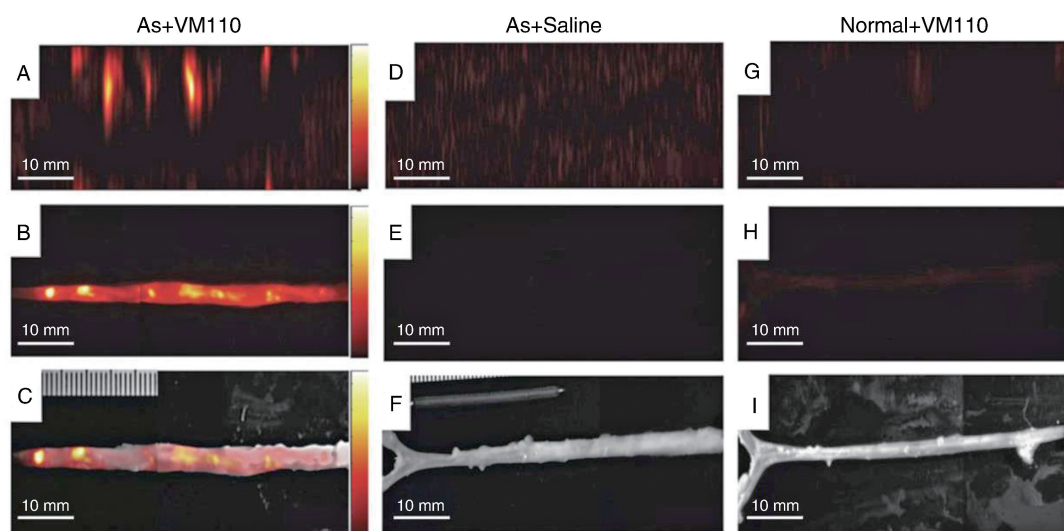


图 2. 体内 As CB 活性的高分辨率 NIRF 分子成像

A、D 和 G 为血管内 NIRF 导管的体内成像;B、E 和 H 为 800 nm 处离体荧光反射成像;C、F 和 I 为离体近红外荧光-白光融合图像。

Figure 2. High-resolution NIRF molecular imaging of As CB activity *in vivo*

2016 年, Abd-Elrahman 等<sup>[53]</sup>开发一种可快速检测 As 斑块巨噬细胞中 CB 的荧光探针(GB123 和 GB137, 激发/发射波长:649 nm/666 nm),并应用到 As 小鼠模型中(图 3)。给小鼠注射 GB123(4 h)或

GB137(2 h)后,对结扎颈动脉进行活体 FMTI,以及 Maestro™ 成像系统对颈动脉进行离体成像,结果显示两种成像方法都可以明显观察到特异性定位于富含巨噬细胞的颈动脉病灶处的强荧光信号,但

GB137 能更快速和更精准定位在颈动脉病变上。免疫荧光共定位成像实验也证明动脉切片中的探针信号主要产生于 As 斑块中的巨噬细胞。同一年,该团队还将探针 GB123 用于定量检测斑块组织和巨噬细胞亚型中的 CB<sup>[32]</sup>,结果表明不稳定的人颈动脉斑块中 CB 和组织蛋白酶 S (cathepsin S, CS) 的活性增加,在有症状患者的颈动脉斑块中观察到较高的 CB 和 CS 活性(无症状患者为 0.65 和 0.77,有症状患者为 0.99 和 1.17;  $P=0.008$  和  $P=0.005$ )。此外, M2 巨噬细胞共聚焦荧光成像实验结果表明不稳定斑块的 CB 活性比稳定斑块高 5 倍(25.52 比 5.22;  $P=0.008$ )。上述研究表明 CB 探针 GB123 和 GB137 有望成为颈动脉高危斑块的诊断工具。

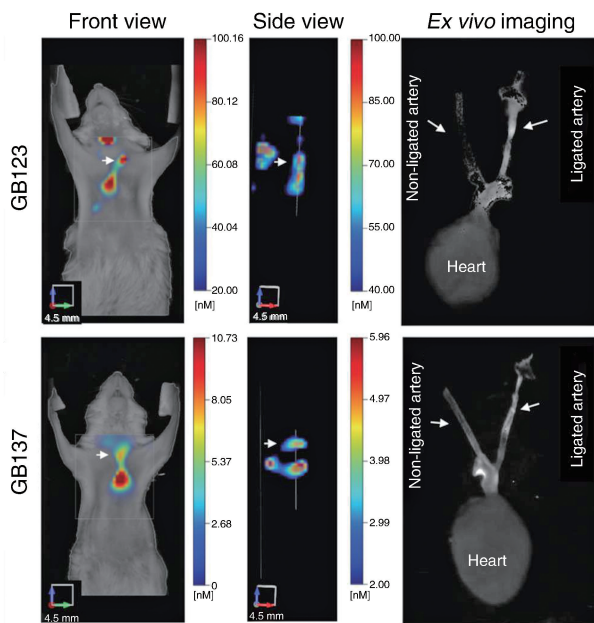


图 3. 小鼠 As 斑块的非侵入性成像

Figure 3. Non-invasive imaging of mouse As plaques

As 易损斑块可能是导致动脉栓塞的关键因素,检测斑块易损性对于 As 的诊断具有临床意义。Narita 等<sup>[38]</sup>合成了一种 CB 激活的荧光开启探针 Peptide-ICG2 (激发/发射波长: 750 nm/845 nm),并封装到含磷脂酰丝氨酸的脂质体 (P-ICG2-PS-Lip) 中,使其可以在不稳定斑块的巨噬细胞中积累。RAW264 和 2H11 细胞成像实验结果显示只能在前者观察到明显的探针荧光,表明 P-ICG2-PS-Lip 被选择性吸收到巨噬细胞中。将 P-ICG2-PS-Lip 静脉注射到载脂蛋白 E 基因敲除 (apolipoprotein E gene knocked-out, ApoE<sup>-/-</sup>) 的 As 模型小鼠或遗传型高胆固醇血症模型兔中,并对主动脉进行荧光成像,在

动脉壁上的斑块上观察到了 ICG 荧光,说明 P-ICG2-PS-Lip 可以检测 As 斑块。

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 活性的升高与 As 斑块中的细胞外基质重塑和急性血栓形成并发症的发生有关<sup>[3]</sup>。2006 年, Deguchi 等<sup>[33]</sup>使用可激活的 NIRF 探针 (Cy5.5Upa, 激发/发射波长: 675 nm/694 nm) 进行光学分子成像可以检测 As 斑块中 MMP 的酶促作用,该探针基于 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白水解而激活。作者分别使用了摄入高胆固醇饮食 12 周的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠和年龄匹配的 ApoE<sup>+/+</sup>小鼠作为 As 模型组和对照组,小鼠注射探针 24 h 后进行离体 FRI 检测, ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的主动脉产生强烈的 NIRF 信号,对照组 ApoE<sup>+/+</sup>小鼠的主动脉只有微弱的信号,加入 MMP-2 和 MMP-9 抑制剂可以消除 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠主动脉的 NIRF 信号。进行 FMTI 也能得到相似的荧光变化现象。免疫荧光图像显示 MMP-2 和 MMP-9 主要位于巨噬细胞内。实验结果说明可以通过 MMP 荧光成像来检测 As 中的炎症病灶。

一般来说,运动训练 (exercise training, ET) 有助于治疗 As。Kim 等<sup>[45]</sup>的研究团队使用金纳米 NIRF 探针 (AuNP) (激发/发射波长: 670 nm/700 nm) 检测 MMP 活性变化来研究运动训练对 As 的影响 (图 4)。作者以 18 周龄的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠作为研究对象,分别进行 6 周常规运动训练 (ET5+1)、训练 5 周并停止训练 1 周 (ET5+0)、训练最后 1 周 (ET0+1) 和 6 周内完全无训练 (ET0+0),尾静脉注射 AuNP 探针 24 h 后,对离体颈动脉和主动脉进行 NIRF 成像;与完全无训练组 (ET0+0) 相比,常规训练组 (ET5+1) 小鼠颈动脉 MMP 活性降低,但 MMP 活性会因停止训练 (ET5+0) 或短期训练 (ET0+1) 而显著提升。实验结果表明不训练或短期的停止训练会降低 As 的保护作用。

高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 对 As 的潜在益处归因于其主要蛋白质成分载脂蛋白 A I (apolipoprotein A I, ApoA I)。血管壁中的大多数 ApoA I 处于脂质贫乏的形式,会被位于 As 斑块中的蛋白酶降解,导致对其 As 保护功能产生负面影响<sup>[54]</sup>。2017 年, Maafi 的团队报告了可激活的 NIRF 探针 ApoA I-Cy5.5 (激发/发射波长: 630 nm/650 ~ 750 nm) 用于评估 As 斑块中 ApoA I 蛋白酶的水解活性<sup>[31]</sup> (图 5)。通过 ApoA I 蛋白上的 Cy5.5 荧光团分子获得荧光猝灭, ApoA I 裂解导致 NIRF 增强。在活体 FMT-MRI 双模态成像中,与野生型 (wild type, WT) 小鼠相比,注射的探针在人 ApoB 转

基因  $LDLR^{-/-}$  As 小鼠 (ATX) 的主动脉中显示出更强的荧光发射。通过体外主动脉成像证实,与对照小鼠相比,ATX 小鼠的荧光信号增加了 10 倍 ( $P \leq$

0.05)。研究结果说明该探针可能有助于评估 As 的新分子机制,并通过增强 ApoA I 功能来改善目前基于 HDL 的治疗方法。

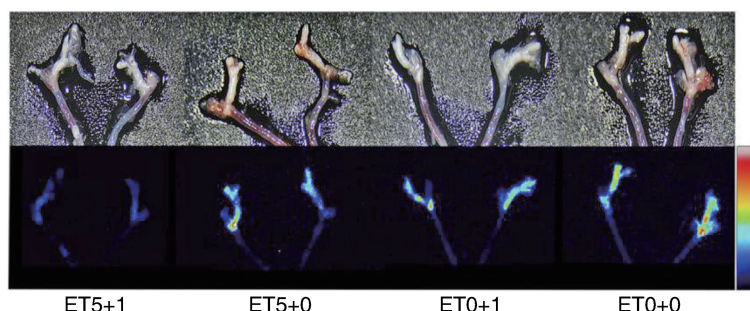


图 4. 运动训练和去训练对高脂饮食  $ApoE^{-/-}$  小鼠颈动脉 MMP-2/9 活性的影响  
上排为明场彩色照片;下排为相应的 NIRF 的发光图像。

Figure 4. Effects of exercise training and detraining on carotid MMP-2/9 activity in high-fat diet  $ApoE^{-/-}$  mice

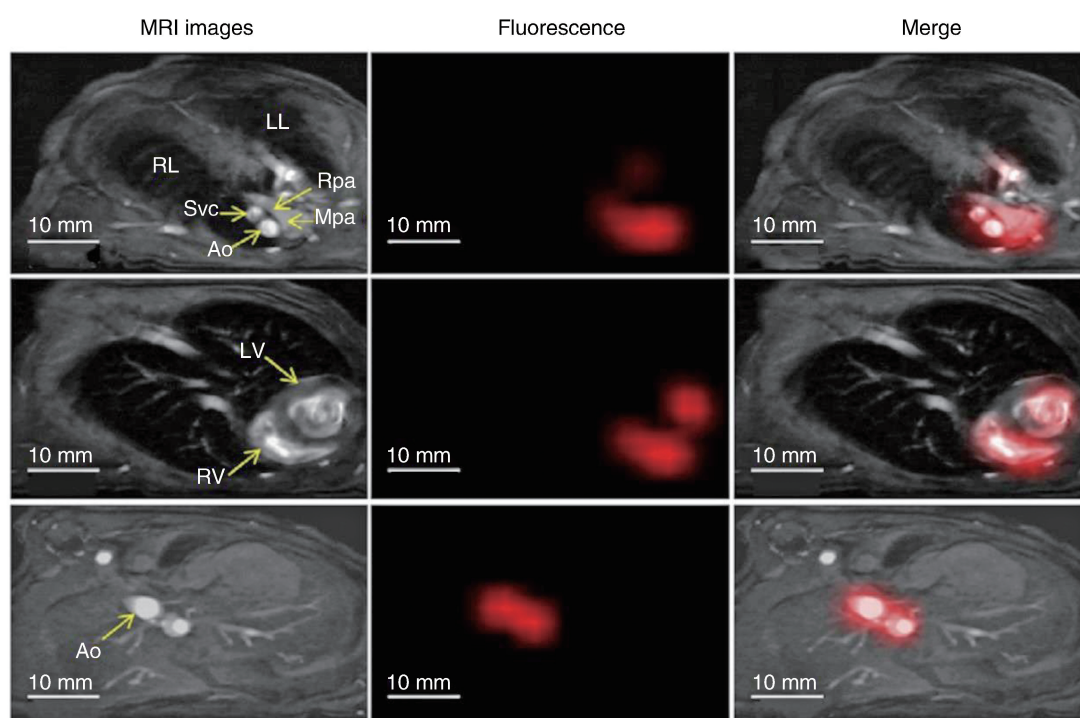


图 5. 使用 FMT-MRI 成像系统评估 ApoA I-Cy5.5 探针在体内的激活

RL:右肺(right lung);LL:左肺(left lung);Svc:上腔静脉(superior vena cava);Rpa:右肺动脉(right pulmonary artery);  
Mpa:肺主动脉(main pulmonary artery);RV:右心室(right ventricle);LV:左心室(left ventricle);Ao:主动脉(aorta)。

Figure 5. Activation of the ApoA I-Cy5.5 probe assessed by FMT-MRI imaging system *in vivo*

## 2 脂质代谢

富含胆固醇的脂质核心斑块更容易破裂,常造成心脑血管的急性缺血。血管内超声和 OCT 在识别脂质核心斑块性质方面作用有限,近红外光谱法可以根据胆固醇分子近红外光谱吸收模式检测富

含脂质的斑块<sup>[55]</sup>。在人类 As 标本中,ICG 与斑块巨噬细胞和脂质存在共定位现象<sup>[56]</sup>。2014 年, Lee 等<sup>[39]</sup>使用 ICG 的全集成高速 OCT-NIRF 成像技术来评估体内富含脂质的炎症斑块(图 6)。为了准确识别冠状动脉大小血管富含脂质的 As 斑块,研究者采用高脂饮食或球囊损伤的兔子作为 As 模型,经静

脉注射 ICG 20 min 后进行 OCT-NIRF 双模态成像 (导管回拉速度  $\leq 20$  mm/s, 激发/发射波长: 805 nm/830 nm), 如图 6 所示, 与对照组相比, As 组主动脉斑块的 TBR 高 3.9 倍  $[(6.28 \pm 1.10)$  比  $(1.60 \pm 0.15)]$ , 髂动脉斑块 TBR 高 3.6 倍  $[(6.35 \pm 1.41)$  比  $(1.77 \pm 0.07)]$ 。对离体动脉进行 FRI 分析, As 组主动脉、髂动脉 TBR 分别比对照组高 3.9 倍  $[(8.38 \pm 0.94)$  比  $(2.16 \pm 0.41)]$ 、3.2 倍  $[(6.30 \pm 0.87)$  比  $(2.21 \pm 0.12)]$ , 与在体信号分析呈相关性 ( $r=0.85, P<0.01$ ), 细胞实验和组织病理学也验证了体内成像结果。随后, Kim 团队在 As 猪模型冠状动脉中也通过 OCT-NIRF 双模态成像准确评估搏动冠状动脉中的高危斑块炎症和药物洗脱支架相关炎症<sup>[40]</sup>。2016 年, Verjans 等<sup>[47]</sup>在人类颈动脉斑块中进行 OCT-NIRF 双模态成像检测, 在 8 名待经颈动脉内膜切除术患者中, 给予 5 例患者术前 25 min 静脉注射 ICG (0.25 mg/kg), 3 例注射生理盐水作为对照, 血管内 OCT-NIRF 成像数据显示 ICG 信号 (激发/发射波长: 805 nm/830 nm) 富集于斑块、血管狭窄和内皮屏障受损区域, 对切除的内膜斑块进行 FRI 和组织病理学分析也得到一致结果。上述研究成果说明 OCT-NIRF 双模态结构-分子成像策略可以对冠状动脉粥样硬化的图像病理生物学方面进行研究, 增强临床对检测高风险冠状动脉斑块的能力。

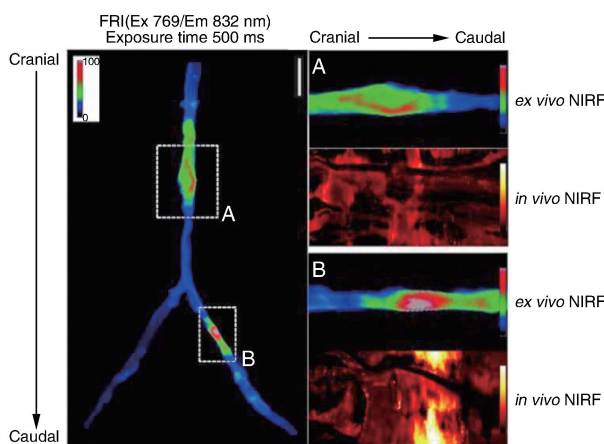


图 6. 在体 NIRF 和离体 FRI 比较

A 和 B 分别为主动脉、髂动脉的在体 NIRF 信号和离体 FRI 图像。

Figure 6. Comparison of *in vivo* NIRF and *ex vivo* FRI

低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 是人体胆固醇的主要载体, LDL 进入动脉内膜后, 主要被活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 氧化, 聚集形成氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density

lipoprotein, ox-LDL), 促进脉管内膜炎发生; ox-LDL 的疫苗及其抗体可以预防和治疗 As<sup>[5]</sup>。ox-LDL 可作为评估 As 斑块稳定性的指标之一。Lu 等<sup>[41]</sup>将抗小鼠 ox-LDL 多克隆抗体与 NIR797 染料偶联合成了 ox-LDL 靶向 NIRF 探针 (anti-ox-LDL-NIR797, 激发/发射波长: 684 nm/745 nm), 在高胆固醇饮食诱发的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 As 病变进行 NIRF 成像 (图 7)。给予动物尾静脉注射探针 24 h 后, 离体 NIRF 成像显示 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的整个主动脉 (主动脉根、弓和分叉) 发出强 NIRF 信号  $(47.41 \pm 7.94)$ , 比未注射探针  $(10.66 \pm 5.96)$  或注射 PBS  $(6.75 \pm 1.28)$  的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠和注射探针的 WT 小鼠  $(2.76 \pm 1.92)$  的主动脉处的荧光信号都更明亮。免疫荧光研究证实了 ox-LDL/巨噬细胞和 NIR797 荧光染料的共定位。此外, 给予阿托伐他汀治疗后 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠主动脉的 anti-ox-LDL-NIR797 信号显著降低。实验结果说明 ox-LDL 靶向探针可用于 As 斑块分子成像, 并有助于易损斑块的诊断和疗效评估。

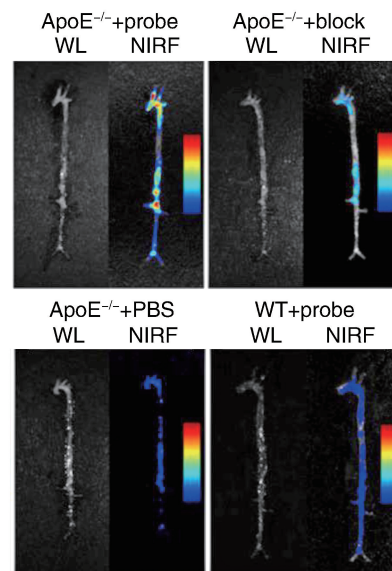


图 7. 主动脉标本的离体 NIRF 成像

WL: 明场 (white light)。

Figure 7. *Ex vivo* NIRF imaging of aortic specimens

2016 年, Khamis 团队将特异性结合 ox-LDL 的小鼠单克隆抗体 LO1 用 NIRF 染料标记得到 LO1-750 (激发/发射波长: 750 nm/800 nm), 用于检测人类冠状动脉粥样硬化病变中的 ox-LDL, 特异性鉴定坏死核心<sup>[49]</sup>, 通过间接免疫组织化学染色证实 LO1-750 可以特异性鉴定离体人类冠状动脉病变中的坏死核心。将 LO1-750 注入高脂喂养的 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠中, 通过 FMT 与 CT 检测到主动脉弓及其分支

内发生的特定局灶性病变。离体共聚焦显微镜检查证实了 LO1-750 主要定位于巨噬细胞附近的 As 部位。此外,作者使用定制的动脉内 NIRF 检测导管在家兔主动脉病变中成功地对体内注射的 LO1-750 定位进行了体外 2D 成像。上述结果说明 LO1-750 可以特异性识别人类冠状动脉斑块坏死核心的 ox-LDL,为 As 斑块 ox-LDL 的定量检测提供实验参考。

### 3 结构蛋白

胶原蛋白对维持正常以及 As 血管壁的完整性和稳定性至关重要,As 病变富含基质,胶原蛋白占总斑块蛋白 60%,胶原蛋白的含量及转化是监测 As 的发生发展以及评估其治疗效果的指标之一<sup>[57]</sup>。Megens 等<sup>[36]</sup>报道了胶原蛋白特异性荧光分子显像剂 CNA35-OG488 (激发/发射波长:488 nm/510 nm),为小鼠健康动脉和 As 动脉中的胶原蛋白标记,并通过 TPLSF 来检测 As。给小鼠静脉注射 CNA35-OG488 4 h 后,取颈动脉进行双光子荧光成像,ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 As 斑块和紧邻斑块的内膜中 CNA35-OG488 荧光信号较强且检测到斑块区域的胶原蛋白呈网状分布,WT 小鼠和 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠弹性动脉的外膜和中膜未显示胶原蛋白信号,表明血管内的 CNA35-OG488 探针无法进入健康动脉和 As 动脉的未破坏层。实验结果说明 CNA35-OG488 可作为胶原蛋白良好的荧光分子显像剂,用于评估 As 斑块中胶原蛋白含量及血管壁的通透性。

纤维蛋白沉积和内皮缺失是未愈合支架的特征,这些支架具有较高的支架血栓形成风险。OCT 越来越多地用于评估支架组织覆盖范围,作为衡量支架愈合的指标,但无法准确识别上覆组织是否代表生理性新内膜。Hara 等<sup>[42]</sup>报道了一种纤维蛋白 NIRF 分子显像剂 FTP11-CyAm7 (激发/发射波长:744 nm/769 nm)进行体内荧光成像,结合同步 OCT 支架覆盖,评估并比较了金属裸支架 (bare metal stent, BMS) 和药物洗脱支架 (drug-eluting stent, DES) 上的纤维蛋白沉积和持久性。给实验兔肾下主动脉中分别植入一个 BMS 和一个 DES,静脉注射 FTP11-CyAm7 的第 7 天和第 28 天进行 NIRF-OCT 双模态荧光成像,与 BMS 相比,DES 在第 7 天和第 28 天显示出更多的纤维蛋白沉积和纤维蛋白持久性。值得注意的是,对于在第 7 天被 OCT 识别为覆盖的边缘支架支柱,(92.8%±9.5%)的 DES 和 (55.8%±23.6%)的 BMS 支柱是 NIRF 纤维蛋白阳

性;在第 28 天,(18.6%±10.6%)的 DES 和 (5.1%±8.7%)的 BMS 支柱保持纤维蛋白阳性 ( $P < 0.001$ )。证明使用 NIRF 分子显像剂 FTP11-CyAm7 进行血管内成像可确定支架部位的 OCT 信号为纤维蛋白覆盖,比单独使用 OCT 成像提高了对愈合支架的特异性检测率。2020 年,Cui 等<sup>[43]</sup>利用血浆纤维蛋白靶向的 NIRF 探针 FTP11-CyAm7 (激发/发射波长:750 nm/770 nm)分析了颈静脉窦小鼠体内动静脉血栓形成和炎性巨噬细胞对他汀类药物的反应,证实他汀类药物能改善实验兔动静脉窦的通畅,血管内纤维蛋白沉积可作为评估颈静脉窦的直接证据。

虽然 As 斑块的无创分子成像研究一直在探索中,临床对斑块特征和脆弱性的准确评估仍处于起步阶段,有必要进一步加强 As 分子成像的灵敏度和特异度。斑块的不同组成对 As 的预后至关重要,然而几乎没有任何分子探针靶向标记斑块中活化的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC)。2016 年,Wang 等<sup>[46]</sup>使用前纤维蛋白 1 (profilin-1) 靶向磁性氧化铁纳米荧光探针 (PC-NPs) 通过 MR 和 NIRF 双模态成像探索 As 斑块。以高脂饮食的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠为研究对象,给小鼠静脉注射 PC-NPs 36 h 后,体内 NIRF 成像显示 PC-NPs 信号富集在 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的颈动脉粥样硬化斑块中,这与 MR 成像结果一致。给予阿托伐他汀治疗后,PC-NPs 荧光信号较之前减弱,且 PC-NPs 荧光强度与离体组织 VSMC 病理学结果有较强相关性。实验结果说明 PC-NPs 可作为分析斑块特征和评价 As 药物干预效果的潜在双模态成像探针。血管内 NIRF 成像的临床转化将为 As 斑块提供更详细的生物信息。

### 4 ROS 和胆红素

ROS 的过量产生和伴随的氧化应激在 As 的所有阶段中都发挥了重要作用<sup>[7]</sup>。最近,Manea 等<sup>[44]</sup>将一种不渗透细胞的 ROS NIRF 探针 (RB700,激发/发射波长:680 nm/706 nm)封装至靶向血管细胞黏附分子 1 的空间稳定脂质体中,形成纳米探针 VLP-RB700,用于检测 As 的 ROS 过量产生 (图 8)。通过共聚焦激光扫描荧光成像证实 VLP-RB700 可被人的内皮细胞和巨噬细胞有效吸收,且 ROS 羟基自由基可使其荧光显著增强。对接受正常饮食的 C57BL/6J 和 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠和高胆固醇饮食的

ApoE<sup>-/-</sup>小鼠注射 VLP-RB700, 2 h 后分别进行离体主动脉 NIRF 成像。如图 8 所示, 正常饮食的 C57BL/6J 和 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠主动脉荧光较弱, 而高胆

固醇饮食的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的主动脉处有强荧光, 尤其在 As 病灶处, 说明 As 会导致 ROS 大量产生。

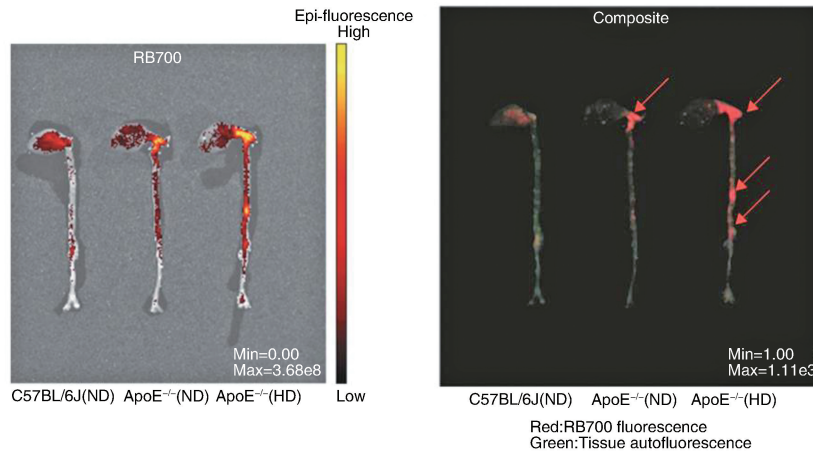


图 8. ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 As 主动脉病变与 ROS 共定位图像

ND: 正常饮食 (normal diet); HD: 高胆固醇饮食 (high-cholesterol diet)。

Figure 8. Colocalization images of As aorta lesions and ROS in ApoE<sup>-/-</sup> mice

近期, Wang 等<sup>[34]</sup>设计了具有泡沫细胞靶向的血小板膜 (platelet membrane, Mp) 包裹的 ROS 纳米荧光探针 TBNG@ Mp (激发/发射波长: 411 nm/486 nm)。细胞共聚焦荧光成像表明 TBNG@ Mp 可以特异性识别泡沫细胞, 且可被泡沫细胞吸收。经 6 周高脂喂食的 SD 大鼠形成早期 As 模型, 模型鼠尾静脉注射探针, 2 h 后进行活体荧光成像, 结果表明, 早期胸主动脉可见强荧光信号, 正常大鼠无荧光信号, 说明 TBNG@ Mp 可用于早期检测 As, 这对 As 的预防和早期治疗具有重要作用。

次氯酸 (HClO) 是一种重要的 ROS, 可以通过过氧化物和髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 反应产生, 它被证实与 As 和其他炎症状态的发生密切相关<sup>[58]</sup>。Shepherd 等<sup>[30]</sup>开发了基于磺胺基萘荧光素的 HClO 荧光探针 (SNAPF, 激发/发射波长: 614 nm/676 nm)。细胞荧光成像显示, 在佛波酯预处理的中性粒细胞和巨噬细胞内可以观察到探针的强荧光信号, 而加入 MPO 抑制剂 (4-氨基苯甲酰胺) 后荧光明显减弱, 说明 SNAPF 可以检测细胞内源性 HClO。人 As 病理组织切片在 37 °C 下孵育探针 1 h 后进行荧光成像, 也可以检测到探针的强荧光信号, 免疫组织化学染色实验证实粥样斑块产生的荧光信号主要来自于 MPO 表达的巨噬细胞。

2020 年, Wang 等<sup>[35]</sup>构建了基于苝染料的 HClO 激活型荧光探针 S-C1O (激发/发射波长:

360 nm/475 nm), 探针在二甲基亚砷溶液中与 HClO 反应后荧光显著增强, 通过共聚焦纤维荧光成像在 RAW264.7 细胞也能观察到脂多糖诱导产生的内源性 HClO 引发探针增强的荧光信号; 作者对 As 患者血清的 HClO 进行荧光光谱测试, 发现荧光强度比健康人血清强将近 5 倍, 说明 As 患者血清中的 HClO 含量会升高, 探针 S-C1O 可以以此来检测 As。

胆红素作为有效的脂溶性抗氧化剂, 具有抑制 LDL 氧化和 As 的作用<sup>[59]</sup>。2017 年, Htun 等<sup>[37]</sup>通过使用 As 小鼠模型显示了 NIR 自发荧光与斑块内出血和血红素降解产物 (特别是胆红素) 存在相关性 (图 9)。研究者首先利用 Odyssey 红外成像系统 (激发波长: 785 nm) 对 50 例患者术后动脉内膜样本 (其中 24 例是无症状患者) 进行 NIRF 成像分析, 发现斑块的自发 NIR 平均荧光强度 (404.7 ± 83.2) 远高于非斑块 (10.3 ± 3.2), 并通过组织病理学验证了平均荧光强度高于 20 是不稳定斑块的临界值。为进一步验证, 作者以 As “串联狭窄模型” 小鼠为研究对象研究不稳定 As 斑块, 如图 9 所示, 荧光发射计算机断层扫描 (fluorescence emission computed tomography, FLECT) 显示出血的不稳定斑块 NIRF 信号明显高于健康动脉, 离体颈动脉 NIRF 成像结果也与之一致。该研究说明不稳定的 As 斑块会产生 NIR 自发荧光, 可通过 FLECT 技术对其进行识别检测。

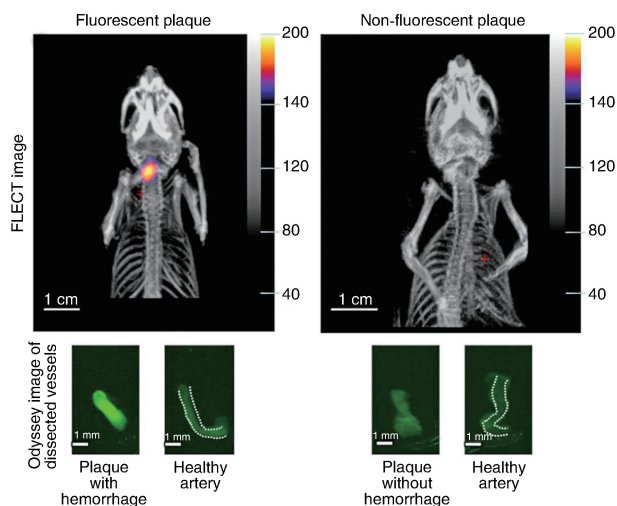


图 9. 串联狭窄模型小鼠的 FLECT 图像

Figure 9. FLECT images of tandem stenosis model mice

## 5 结语与展望

综上所述,以 NIRF 成像为代表的分子成像技术在 As 斑块检测展示出了独特的优势和应用前景,能为心血管疾病的临床诊断和治疗、药物疗效评估提供新思路、新工具和新方法。尽管广大科研工作者为揭示 As 发病机制付出了巨大努力,越来越多的新型生物标志物被发现,但是 As 的发病机制仍然是一个谜团,临床精准诊疗 As 相关疾病还要进行艰巨而漫长的探索。开发光学和生物性能优越的荧光分子工具对实现 As 的精准检测至关重要,比如提高组织穿透深度和特异性检测能力。总之,荧光成像技术是一项优越的可视化检测手段,结合目前先进的显微成像技术和设备,有望为揭示 As 致病机制和评估 As 病变提供强有力的帮助,在临床应用中具有巨大潜力。

### [参考文献]

- [1] SONG P, FANG Z, WANG H, et al. Global and regional prevalence, burden, and risk factors for carotid atherosclerosis: a systematic review, Meta-analysis, and modelling study[J]. *Lancet Glob Health*, 2020, 8(5): e721-e729.
- [2] WUOPIO J, HILDEN J, BRING C, et al. Cathepsin B and S as markers for cardiovascular risk and all-cause mortality in patients with stable coronary heart disease during 10 years: a CLARICOR trial sub-study[J]. *Atherosclerosis*, 2018, 278: 97-102.
- [3] OLEJARZ W, BACHETA D, KUBIAK-TOMASZEWSKA G. Matrix metalloproteinases as biomarkers of atherosclerotic plaque instability[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 3946.
- [4] AFONSO C B, SPICKETT C M. Lipoproteins as targets and markers of lipoxidation[J]. *Redox Biol*, 2019, 23: 101066.
- [5] ZHANG S, LI L, CHEN W, et al. Natural products: the role and mechanism in low-density lipoprotein oxidation and atherosclerosis [J]. *Phytother Res*, 2021, 35 (6): 2945-2967.
- [6] DWECK M R, AIKAWA E, NEWBY D E, et al. Noninvasive molecular imaging of disease activity in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 119(2): 330-340.
- [7] OCHOA C D, WU R F, TERADA L S. ROS signaling and ER stress in cardiovascular disease[J]. *Mol Aspects Med*, 2018, 63: 18-29.
- [8] ZHU J, LIU B, WANG Z, et al. Exosomes from nicotine-stimulated macrophages accelerate atherosclerosis through miR-21-3p/PTEN-mediated VSMC migration and proliferation[J]. *Theranostics*, 2019, 9(23): 6901-6919.
- [9] SUTTON N R, BOUIS D, MANN K M, et al. CD73 promotes age-dependent accretion of atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(1): 61-71.
- [10] TRPKOVIC A, RESANOVIC I, STANIMIROVIC J, et al. Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2015, 52(2): 70-85.
- [11] PACKARD R, LUO Y, ABIRI P, et al. 3-D electrochemical impedance spectroscopy mapping of arteries to detect metabolically active but angiographically invisible atherosclerotic lesions [J]. *Theranostics*, 2017, 7(9): 2431-2442.
- [12] HIROWATARI Y, YOSHIDA H. Innovatively established analysis method for lipoprotein profiles based on high-performance anion-exchange liquid chromatography [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2019, 26(12): 1027-1040.
- [13] MANNES P Z, TAVAKOLI S. Imaging immunometabolism in atherosclerosis [J]. *J Nucl Med*, 2021, 62(7): 896-902.
- [14] CALCAGNO C, PÉREZ-MEDINA C, MULDER W J M, et al. Whole-body atherosclerosis imaging by positron emission tomography/magnetic resonance imaging[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(5): 1123-1134.
- [15] PIRI R, GERKE O, HØILUND-CARLSEN P F. Molecular imaging of carotid artery atherosclerosis with PET: a systematic review[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2020, 47(8): 2016-2025.
- [16] WÜST R C I, CALCAGNO C, DAAL M R R, et al. Emerging magnetic resonance imaging techniques for atherosclerosis imaging [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(5): 841-849.
- [17] LI Z, TANG H, TU Y. Molecular and nonmolecular imaging of macrophages in atherosclerosis[J]. *Front Cardio-*

- vasc Med, 2021, 8: 670639.
- [18] ISKANDER-RIZK S, WU M, SPRINGELING G, et al. *In vivo* intravascular photoacoustic imaging of plaque lipid in coronary atherosclerosis [J]. EuroIntervention, 2019, 15(5): 452-456.
- [19] XIE Z, YANG Y, HE Y, et al. *In vivo* assessment of inflammation in carotid atherosclerosis by noninvasive photoacoustic imaging [J]. Theranostics, 2020, 10(10): 4694-4704.
- [20] CORDOVA R, KIEKENS K, BURRELL S, et al. Submillimeter endoscope demonstrates feasibility of *in vivo* reflectance imaging, fluorescence imaging, and cell collection in the fallopian tubes [J]. J Biomed Opt, 2021, 26(7): 076001.
- [21] SHIBUTANI H, FUJII K, KAWAKAMI R, et al. Tangential signal dropout artefact in optical frequency domain imaging [J]. EuroIntervention, 2021, 17(4): e326-e331.
- [22] SWEER J A, CHEN M T, SALIMIAN K J, et al. Wide-field optical property mapping and structured light imaging of the esophagus with spatial frequency domain imaging [J]. J Biophotonics, 2019, 12(9): e201900005.
- [23] CHENG J, ZHANG P, CAI C, et al. Depth-recognizable time-domain fluorescence molecular tomography in reflective geometry [J]. Biomed Opt Express, 2021, 12(7): 3806-3818.
- [24] LIAN L, DENG Y, XIE W, et al. High-dynamic-range fluorescence molecular tomography for imaging of fluorescent targets with large concentration differences [J]. Opt Express, 2016, 24(17): 19920-19933.
- [25] WU J, LIANG Y, CHEN S, et al. Kilohertz two-photon fluorescence microscopy imaging of neural activity *in vivo* [J]. Nat Methods, 2020, 17(3): 287-290.
- [26] FAN J L, RIVERA J A, SUN W, et al. High-speed volumetric two-photon fluorescence imaging of neurovascular dynamics [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 6020.
- [27] ZHAO M, LI B, ZHANG H, et al. Activatable fluorescence sensors for *in vivo* bio-detection in the second near-infrared window [J]. Chem Sci, 2021, 12(10): 3448-3459.
- [28] LI C, CHEN G, ZHANG Y, et al. Advanced fluorescence imaging technology in the near-infrared-ii window for biomedical applications [J]. J Am Chem Soc, 2020, 142(35): 14789-14804.
- [29] ANTARIS A L, CHEN H, CHENG K, et al. A small-molecule dye for NIR-II imaging [J]. Nat Mater, 2016, 15(2): 235-242.
- [30] SHEPHERD J, HILDERBRAND S A, WATERMAN P, et al. A fluorescent probe for the detection of myeloperoxidase activity in atherosclerosis-associated macrophages [J]. Chem Biol, 2007, 14(11): 1221-1231.
- [31] MAAFI F, LI B, GEBHARD C, et al. Development of a new bioactivatable fluorescent probe for quantification of apolipoprotein A-I proteolytic degradation *in vitro* and *in vivo* [J]. Atherosclerosis, 2017, 258: 8-19.
- [32] ABD-ELRAHMAN I, MEIR K, KOSUGE H, et al. Characterizing cathepsin activity and macrophage subtypes in excised human carotid plaques [J]. Stroke, 2016, 47(4): 1101-1108.
- [33] DEGUCHI J O, AIKAWA M, TUNG C H, et al. Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages *in vivo* [J]. Circulation, 2006, 114(1): 55-62.
- [34] WANG Q, LOU R, YIN Q, et al. A nano-detection system based on a chemical probe for early diagnosis of atherosclerosis *in situ* [J]. Analyst, 2021, 146(14): 4674-4682.
- [35] WANG B, ZHANG F, WANG S, et al. Imaging endogenous HClO in atherosclerosis using a novel fast-response fluorescence probe [J]. Chem Commun (Camb), 2020, 56(17): 2598-2601.
- [36] MEGENS R T, OUDE E M, CLEUTJENS J P, et al. Imaging collagen in intact viable healthy and atherosclerotic arteries using fluorescently labeled CNA35 and two-photon laser scanning microscopy [J]. Mol Imaging, 2007, 6(4): 247-260.
- [37] HTUN N M, CHEN Y C, LIM B, et al. Near-infrared autofluorescence induced by intraplaque hemorrhage and heme degradation as marker for high-risk atherosclerotic plaques [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 75.
- [38] NARITA Y, SHIMIZU K, IKEMOTO K, et al. Macrophage-targeted, enzyme-triggered fluorescence switch-on system for detection of embolism-vulnerable atherosclerotic plaques [J]. J Control Release, 2019, 302: 105-115.
- [39] LEE S, LEE M W, CHO H S, et al. Fully integrated high-speed intravascular optical coherence tomography/near-infrared fluorescence structural/molecular imaging *in vivo* using a clinically available near-infrared fluorescence-emitting indocyanine green to detect inflamed lipid-rich atheromata in coronary-sized vessels [J]. Circ Cardiovasc Interv, 2014, 7(4): 560-569.
- [40] KIM S, LEE M W, KIM T S, et al. Intracoronary dual-modal optical coherence tomography-near-infrared fluorescence structural-molecular imaging with a clinical dose of indocyanine green for the assessment of high-risk plaques and stent-associated inflammation in a beating coronary artery [J]. Eur Heart J, 2016, 37(37): 2833-2844.
- [41] LU T, WEN S, CUI Y, et al. Near-infrared fluorescence imaging of murine atherosclerosis using an oxidized low

- density lipoprotein-targeted fluorochrome [J]. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2014, 30(1): 221-231.
- [42] HARA T, UGHI G J, MCCARTHY J R, et al. Intravascular fibrin molecular imaging improves the detection of unhealed stents assessed by optical coherence tomography *in vivo* [J]. *Eur Heart J*, 2015, 38(6): 447-455.
- [43] CUI J, KESSINGER C W, JHAJJ H S, et al. Atorvastatin reduces *in vivo* fibrin deposition and macrophage accumulation, and improves primary patency duration and maturation of murine arteriovenous fistula [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(5): 931-945.
- [44] MANEA S A, VLAD M L, REBLEANU D, et al. Detection of vascular reactive oxygen species in experimental atherosclerosis by high-resolution near-infrared fluorescence imaging using VCAM-1-targeted liposomes entrapping a fluorogenic redox-sensitive probe [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6685612.
- [45] KIM J, JANG H J, SCHELLINGERHOUT D, et al. Effects of exercise training and detraining on atheromatous matrix metalloproteinase activity in mice [J]. *Atherosclerosis*, 2020, 299: 15-23.
- [46] 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.
- [47] VERJANS J W, OSBORN E A, UGHI G J, et al. Targeted near-infrared fluorescence imaging of atherosclerosis: clinical and intracoronary evaluation of indocyanine green [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2016, 9(9): 1087-1095.
- [48] YOO H, KIM J W, SHISHKOV M, et al. Intra-arterial catheter for simultaneous microstructural and molecular imaging *in vivo* [J]. *Nat Med*, 2011, 17(12): 1680-1684.
- [49] KHAMIS R Y, WOOLLARD K J, HYDE G D, et al. Near infrared fluorescence (NIRF) molecular imaging of oxidized LDL with an autoantibody in experimental atherosclerosis [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21785.
- [50] JAFFER F A, VINEGONI C, JOHN M C, et al. Real-time catheter molecular sensing of inflammation in proteolytically active atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2008, 118(18): 1802-1809.
- [51] CALFON M A, VINEGONI C, NTZIACHRISTOS V, et al. Intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of atherosclerosis: toward coronary arterial visualization of biologically high-risk plaques [J]. *J Biomed Opt*, 2010, 15(1): 11107.
- [52] JAFFER F A, CALFON M A, ROSENTHAL A, et al. Two-dimensional intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of inflammation in atherosclerosis and stent-induced vascular injury [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 57(25): 2516-2526.
- [53] ABD-ELRAHMAN I, KOSUGE H, WISES S T, et al. Cathepsin activity-based probes and inhibitor for preclinical atherosclerosis imaging and macrophage depletion [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e160522.
- [54] CHEN W, WU Y, LU Q, et al. Endogenous ApoA-I expression in macrophages: a potential target for protection against atherosclerosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 505: 55-59.
- [55] KUKU K O, SINGH M, OZAKI Y, et al. Near-infrared spectroscopy intravascular ultrasound imaging: state of the art [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2020, 7: 107.
- [56] VINEGONI C, BOTNARU I, AIKAWA E, et al. Indocyanine green enables near-infrared fluorescence imaging of lipid-rich, inflamed atherosclerotic plaques [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(84): 45r-84r.
- [57] STEFFENSEN L B, RASMUSSEN L M. A role for collagen type IV in cardiovascular disease? [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 315(3): H610-H625.
- [58] HU C H, NEISSEL V M, HALPERN O S, et al. Small molecule and macrocyclic pyrazole derived inhibitors of myeloperoxidase (MPO) [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2021, 42: 128010.
- [59] MARUHASHI T, KIHARA Y, HIGASHI Y. Bilirubin and endothelial function [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2019, 26(8): 688-696.

(此文编辑 曾学清)