

剪切流场下超声微泡与内皮细胞黏附规律及其应用

刘贻尧, 张 烈, 熊小燕, 杨 红

(电子科技大学生命科学与技术学院 成都 610054)

【摘要】新型超声造影剂(超声微泡)的开发已经逐渐成为超声医学的研究热点。该文综述了各类靶向超声微泡在外周血管疾病的超声诊断领域中的研究进展,尤其是在动脉粥样硬化早期诊断和分子影像中的应用。同时还深入阐述了靶向超声微泡在剪切流场下与血管内皮细胞之间的黏附动力学规律,为靶向超声微泡最终广泛应用于临床提供了实验依据和参考信息。

关键词 黏附; 内皮细胞; 超声微泡; 剪切力; 超声

中图分类号 Q66; R45.1

文献标识码

doi:10.3969/j.issn.1001-0548.2009.05.019

Adhesion of Targeted Microbubbles to Endothelial Cells and their Potential Applications in Diagnosis of Cardiovascular Diseases

LIU Yi-yao, ZHANG Lie, XIONG Xiao-yan, and YANG Hong

(School of Life Science and Technology, University of Electronic Science and Technology of China Chengdu 610054)

Abstract Ultrasound and microbubbles have been widely used for diagnostic imaging in clinical fields without producing significant adverse effects for many decades. To further improve the image contrast, development of targeted microbubbles is becoming the hot subject of ultrasound medicine in recent years. The goal of this brief review is to illustrate selected examples of targeted microbubbles that have been applied to the arenas of atherosclerosis, thrombosis, and vascular biology. The adhesion interactions of targeted microbubbles-endothelial cells under shear flow are also reviewed. The overall characterization of targeted microbubbles in vitro will be helpful for the clinic applications in the future.

Key words adhesion; endothelial cells; microbubbles; shear stress; ultrasound

1 血管内皮功能紊乱与血管疾病发生

血管内皮细胞是覆盖在血管内腔表面的连续单层扁平细胞,是介于循环血液与血管平滑肌之间的生理屏障,与血液直接接触。在维持血管收缩、舒张方面起着关键作用,具有多种功能^[1]:

1) 生理屏障功能。血管内皮作为血管壁与血流之间的屏障,具有选择性通透功能,屏障作用减弱时,血液中的脂质易渗入血管壁。当血管内皮剥脱、内皮下胶原组织暴露时,引起血小板的黏附、聚集,促进炎性细胞、单核细胞浸润,吞噬低密度脂蛋白,形成泡沫细胞,并引起血栓形成。

2) 释放血管舒张因子:(1) 一氧化氮(NO)是血管内皮细胞释放的第二信使物质,由L-精氨酸在一氧化氮合成酶作用下合成,其作用是舒张血管抑制血小板黏聚、抑制血管平滑肌细胞增生;(2) 前列环素(PGI₂)是血管内皮细胞膜上磷脂中的花生

四烯酸的代谢产物,它通过刺激腺苷酸环化酶升高环腺苷酸(cAMP)水平而产生作用,是强效的血小板聚集抑制剂;(3) 血管内皮细胞还可释放一些血管收缩因子,如内皮素可促进血管平滑肌细胞收缩。

当处于某些疾病状态时,内皮细胞就会改变其功能,成为血栓形成、平滑肌增殖、白细胞黏附和血球渗出的一个活性启动因子,一些血管舒张物质(如NO和PGI₂等)分泌量减少,促凝血因子(包括组织因子)和内皮细胞相关生长因子表达量增加,血管舒张因子浓度下降;另一方面,内皮细胞表面上有关白细胞黏附分子(leukocyte adhesion molecules)的表达也会上调(up-regulation),从而加强了白细胞的捕获(capture)与迁移(migration),这些一系列的反应过程称为内皮功能紊乱(endothelial dysfunction)。内皮功能紊乱被认为是炎症、高血压、动脉粥样硬化、移植排斥和瘤形成(neoplasia)等多种疾病的原初反应之一^[2-5]。

收稿日期: 2008-07-09

基金项目: 国家自然科学基金(30700151)

作者简介: 刘贻尧(1974-),男,博士,教授,博士生导师,主要从事生物力学和纳米医学等方面的研究。

心血管疾病中较为常见的是动脉粥样硬化。动脉粥样硬化与多种黏附分子的表达密切相关, 其中包括血管细胞黏附分子(VCAM-1)、细胞间黏附分子(ICAM-1)、P-选择素(P-selectin)等。动脉粥样硬化的早期表现为血管内皮细胞功能紊乱, 而在血管内皮细胞功能紊乱发生的早期阶段, VCAM-1在内皮细胞表面的表达量就会大幅上调, 从而在动脉粥样硬化发生发展过程中调节白细胞的黏附及在穿越内皮的迁移中起关键的调节作用^[6-7]。

2 超声微泡及其发展与应用

动脉粥样硬化一直是西方发达国家的主要死亡原因之一。随着我国人民生活水平的提高和饮食习惯的改变, 该病也成为我国人群主要的死亡原因, 因此, 很多研究人员希望能够对动脉粥样硬化进行早期的诊断与检测。但是, 目前临床血管成像技术在检测动脉粥样硬化方面还十分有限, 主要采用X射线血管成像术(X-ray angiography)和磁共振血管成像(magnetic resonance angiography)。超声造影剂超声微泡(ultrasound contrast agents)已成为临床超声安全、稳定和有效的回声增强剂, 主要由白蛋白与右旋糖酐或者脂质包裹惰性气体或空气、增强信噪比的超声增强显影剂。其原理主要是声波对气体反射比液体大近1 000倍, 通过声衰减、声速的改变和增强后散射等方式改变声波与组织间的吸收, 反射和折射等相互作用使超声回声增强, 从而得到更高的对比分辨力, 达到有利于诊断疾病的目的^[8]。

超声造影剂的发展经历了以下的3个阶段:

(1) 第一个阶段是以实验用生理盐水、乳液和含有自由气泡的液体为代表的第一代声学造影剂, 但由于它没有成膜物质, 不稳定, 不能经外周静脉注射, 而是通过心导管插入主动脉或心腔内, 属创伤性检查方法。

(2) 第二个阶段是以包裹空气的人血清白蛋白、脂类或多糖等为代表的第二代声学造影剂, 以Albunex、Levovist等为代表, 其膜材料较稳定, 直径较小, 主要分布在8 μm以下, 在血液中的持续时间明显延长, 经外周静脉注射不仅可以增强右心室显影, 还可稳定地通过肺毛细血管显影左心腔及外周血管, 实现无创诊断。

(3) 第三个阶段是分子较大、溶解度和弥散度低的惰性气体(如氟碳气体或硫化气体)代替空气、氧气、二氧化碳、氮气等气体作为填充气体。新的抗压性和稳定性高的膜材料, 如磷脂、非离子表面活

性剂及可生物降解的高分子多聚物等的引入, 使新一代超声造影剂(如SonoVue)的微泡直径更为缩小并趋于一致, 理化性能稳定, 稳定性、抗压性得以进一步的提高^[9]。

文献[10]报道了用白蛋白和右旋糖酐制备得到的微泡可以在激活的补体介导下被动黏附于血管内皮细胞上, 在补体缺失的基因敲除的小鼠体内血管则几乎没有黏附滞留的微泡, 体现了微泡的被动寻靶作用。文献[11]证明了这一点, 自行制备的负电荷脂质膜微泡可以激活补体, 并且在补体介导下被动黏附于血管内皮细胞上。其后的超声造影也取得了一定的效果。

但是, 仅凭微泡的被动靶向作用黏附于血管内皮上, 并不能有效地实现血管病变部位的靶向成像以及相关的靶向治疗作用, 而且, 血管内皮细胞功能紊乱不仅是动脉粥样硬化的诱因, 还是其他许多病因的前期表现, 如炎症反应、高血压、移植排斥等。针对相关黏附分子在内皮细胞功能紊乱时会高表达的特点, 已有许多的研究利用这些相关黏附分子作为靶点, 制备出一些靶向超声微泡造影剂。对这些疾病作早期无创的超声诊断, 其原理主要是把这些黏附分子的相应配体连接到超声微泡造影剂的表面, 在到达疾病部位之后与血管内皮细胞高度黏附、滞留, 达到主动寻靶的目的。

3 靶向超声微泡在剪切流场下的体外黏附研究

为了模拟不同的血流环境, 许多研究已经结合平行板流动腔实验来评价靶向超声微泡与炎性内皮细胞的黏附规律。平行板流动腔是由两个厚度均一的有机玻璃板固定在一起, 里面放置载玻片, 载玻片上即有培养的细胞或者底物, 其表面与上层有机玻璃板下表面之间的距离应小于0.5 μm, 同时结合蠕动泵, 调节不同的流量, 达到不同的剪切力, 以观察流体的二维流动规律。剪切力与流量的关系式为 $\tau = 6\eta Q / wh^2$, 其中, τ 为剪切力; η 为流体的黏度; Q 为流量; w 为流室的宽度; h 为流室的高度。平行板流动腔的示意图如图1所示。

靶向超声微泡与基底物间的黏附规律与其所处的流体剪切力环境有密切的关系, 已有实验证明其之间的黏附规律并不是单一的线性关系, 而是随着剪切力的变化有升有降。文献[12]报道利用抗P-选择素抗体连接到脂质微泡表面, 结合平行板流动腔技术, 在低剪切应力条件下观察抗P-选择素超声微泡

与辅有P-选择素基底之间的黏附规律。P-选择素是一种分子量约为140 000的跨膜糖蛋白,主要分布在内皮细胞及血小板上。当内皮细胞受损和血小板活化时,跨膜型P-选择素在血小板及内皮细胞表面表达明显增多;同时,血浆可溶性P-选择素浓度也升高。P-选择素一方面参与介导白细胞与内皮细胞的起始黏附;另一方面,血小板活化时表面表达的P-选择素可促进白细胞与血小板的黏附及在血栓部位的聚集^[13-15]。利用P-选择素作为靶点,使靶向微泡与其特异性黏附。有研究发现随着剪切应力的增加,靶向微泡与基底之间的黏附并不是简单地随着剪切力的增大,它们之间的黏附越多,而是随着剪切力从 $0.2 \sim 1.7 \times 10^{-5}$ N之间变化,它们的黏附是在 0.6×10^{-5} N达到最高;而后剪切力再增高,它们之间的黏附反而下降。这表明超声微泡与基底之间在低剪切力条件下的黏附是一个复杂的过程。

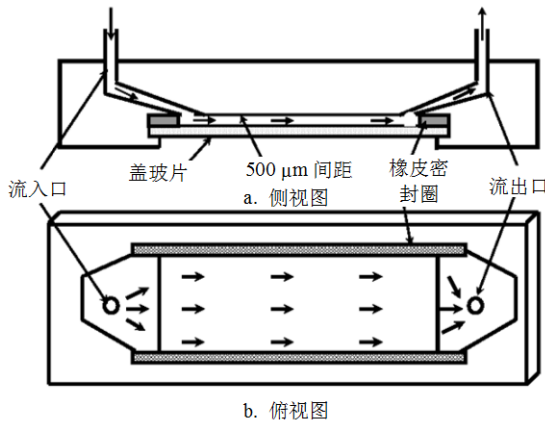


图1 平板流动腔的示意图

由于靶向超声微泡在靶点部位的大量黏附可以明显地增强显影的效果,因此,靶向超声微泡可以同时应用在其他相关的研究上,如急性心脏移植排斥的成像分析。据报道,在接受心脏移植的患者中,术后第一年有大约20%的病人死于急性心脏移植排斥,最主要的诱因就是内皮功能障碍。内皮功能障碍时细胞间黏附分子的表达量会大幅度地上调,可以利用该性质来对移植的病变部位进行无创靶向诊断^[16-17]。文献[18]利用细胞间黏附分子作为靶点,对急性心脏移植排斥进行无创诊断。将抗细胞间黏附分子的抗体连接到包裹有全氟碳气体的脂质表面,合成靶向超声微泡。由靶向超声微泡与内皮细胞的黏附规律可知,抗细胞间黏附分子的靶向超声微泡(anti-ICAM-1 targeted microbubbles)能大量黏附到炎症内皮细胞表面;而对于同型对照的超声微泡和正常内皮细胞组而言,这种黏附并没有特异性。在后

期的超声成像中也验证了这一点,而且靶向超声微泡取得了很好的增强显影效果。

4 靶向超声微泡在动脉粥样硬化及血管新生检测中的应用

动脉粥样硬化已成为目前世界上主要的死亡病因之一,而动脉粥样硬化的前期表现也是血管内皮功能障碍,除ICAM-1分子外,VCAM-1分子也会高表达。VCAM-1分子是通过与其配体淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)来介导白细胞与内皮细胞的黏附,并且募集循环血液中的白细胞;同时,白细胞释放一些炎症介质和细胞因子,促进VCAM-1分子的进一步升高,从而引起更多的白细胞黏附于血管壁,成为血栓形成的基础^[19]。因此,文献[20]利用抗-VCAM-1靶向微泡对动脉粥样硬化进行早期无创诊断,在合成抗-VCAM-1靶向超声微泡后,先用平行板流动腔模拟不同的血流条件,以此对靶向超声微泡与内皮细胞的黏附规律进行评价。随着剪切力的增加,靶向超声微泡与炎症内皮细胞的黏附越来越少,可能是由于随着剪切力的增加,更多黏附不稳定的微泡被冲走所致。为了模拟心脏泵血的生理环境,在高剪切力条件(8×10^{-5} N和 12×10^{-5} N)时,每隔5 s降低 0.5×10^{-5} N的剪切力。研究发现每降低一次剪切力,黏附的微泡会增多一些,表明在高剪切力条件下,对比于持续不变的流动状态,搏动的流动状态下会有更多的微泡稳定地黏附在炎症内皮细胞上。在后续活体的超声成像实验中,炎症以及动脉粥样硬化的部位取得了非常好的显影效果。该研究为动脉粥样硬化的早期无创诊断提供了一些很好的实验依据,而且在模拟心脏泵血时的实验设计非常巧妙。在近期研究中,我们制备了一种基于VCAM-1黏附分子为靶标的靶向超声微泡,并对该超声微泡的抗体连接密度、剪切力大小、黏附率与黏附强度三者之间的关系进行了深入的研究^[21]。这些研究表明了靶向超声微泡在检测动脉粥样硬化的研究中有广泛的前景。

除此之外,也有一些研究利用靶向微泡对肿瘤转移灶部位的新生血管进行检测,文献[22]报道了将抗endoglin(CD105)的抗体连接到白蛋白微泡表面,观察其与内皮细胞的黏附。endoglin是一种分子量为180 kDa、存在于细胞表面的同源二聚体跨膜糖蛋白,是转化生长因子受体- β (TGF- β)受体复合物的组成部分和内皮细胞增殖相关膜抗原,在高增殖活性内皮细胞和许多恶性肿瘤组织血管内皮细胞中高表

达,参与血管生成,因此,它是一种理想的肿瘤新生血管的标记物。研究人员在制备出靶向白蛋白微泡后观察与内皮细胞的静态黏附,发现亲和素与白蛋白的质量比为1:31.25。抗体增加0.8 μM 浓度时,抗体与白蛋白微泡有最佳的结合率,66.5 \pm 0.2%的微泡都可有效地结合上抗体。在荧光显微观察中,也发现有非常多的微泡黏附到了内皮细胞的表面。

$\alpha\text{v}\beta 3$ 是整合素家族的重要成员之一,由 α 和 β 亚基以非共价键结合而形成的、广泛分布于细胞表面的跨膜异二聚体糖蛋白,主要介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质(extracellular matrix)之间的相互黏附。 $\alpha\text{v}\beta 3$ 在静息期的内皮细胞表面呈低水平表达,内皮细胞受到血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor)等因子作用下 $\alpha\text{v}\beta 3$ 的表达就会显著上调, $\alpha\text{v}\beta 3$ 能促进内皮细胞、肿瘤细胞分泌和诱导蛋白水解酶如金属基质蛋白酶(matrix metalloproteinase)的激活。此外, $\alpha\text{v}\beta 3$ 可同时黏附金属基质蛋白酶和细胞外基质,从而使金属基质蛋白酶导向靶目标,通过金属基质蛋白酶降解细胞外基质成分为内皮细胞迁移提供便利。因此, $\alpha\text{v}\beta 3$ 也是一种理想的肿瘤新生血管标记物^[23-26]。文献[27]利用 $\alpha\text{v}\beta 3$ 的配体连接到脂质微泡的表面,对转移灶的新生血管进行靶向成像,证明了靶向的 $\alpha\text{v}\beta 3$ 微泡大量黏附到了肿瘤新生血管部位,并且增强显影的效果非常好。

5 展 望

综上所述,虽然靶向超声微泡已经初步应用到相关疾病的早期无创检测中,但目前利用超声微泡实现早期临床诊断仍处于实验探索阶段,还有以下的许多问题亟待解决:

(1) 血管内膜屏障问题。目前的超声微泡体积往往较大,很难穿越毛细血管到达组织结合到病变部位上(如实体肿瘤细胞膜上)。所以,开发能够穿越血管内皮的纳米级超声微泡成为新兴的研究热点。

(2) 超声微泡的安全性问题。虽然目前国内外已经有一些公司合成了成熟的、用于临床诊断的微泡,但是经过我国批准使用的只有意大利Bracco公司生产的SonoVue微泡。由于微泡无论怎样对于人体都是一种外来物质,因此,它对人体还是有一定的毒性。对于不同年龄、体重,微泡注射剂量都有严格的要求,否则可能发生胸闷,呼吸困难。另外,在进行诊断时超声的频率和辐射剂量也有要求。

(3) 抗体以怎样的合适密度连接到超声微泡的表面。

(4) 不同的流场形式对靶向超声微泡的黏附影响规律。

虽然靶向超声微泡造影剂目前还未能完全应用于临床,但是,作为一种安全、有效、操作简单并具有一定靶向性的无创诊断手段,靶向超声微泡已受到了越来越多的关注,显示了巨大的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 黄亚莉, 陆 彤. 衰老与血管内皮功能障碍[J]. 心血管病学进展, 2007, 28(5): 766-770.
HUANG Ya-li, LU Tong. Aging and endothelium dysfunction[J]. Cardiovascular Diseases Advances, 2007, 28(5): 766-770.
- [2] 丁 品, 李 健. 血管内皮功能障碍与冠状动脉疾病的关系及防治进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2007, 15: 87-89.
DING Ping, LI Jian. The relationship of endothelium dysfunction and coronary artery disease, and its prevention advances[J]. Journal of Practical Heart, Brain and Lung Vascular Diseases, 2007, 15: 87-89.
- [3] VANBOUTTE P M. Endothelial dysfunction and atherosclerosis[J]. Journal of European Heart, 1997, 18: 19-29.
- [4] BIEGELSEN E S, LOSCALZO J. Endothelial function and atherosclerosis[J]. Coronary Artery Disease, 1999, 10: 214-256.
- [5] TADDEI S, SALVETTI A. Endothelial dysfunction in essential hypertension: clinical implications[J]. Journal of Hypertension, 2002, 20: 1671-1674.
- [6] LEY K, TEDDER T F. Leukocyte interactions with vascular endothelium: new insights into selectin-mediated attachment and rolling[J]. Journal of Immunology, 1995, 155: 525-528.
- [7] SHERIDAN F M, COLE P G, RAMAGE D. Leukocyte adhesion to the coronary microvasculature during ischemia and perfusion in an in vivo canine model[J]. Circulation, 1996, 93: 1784-1787.
- [8] 刘忠华, 刘贻尧, 杨 红. 超声空化效应和超声微泡在生物学中的应用[J]. 生物技术通讯, 2008, 5: 475-478.
LIU Zhong-hua, LIU Yi-yao, YANG Hong. Applications of ultrasonic cavitation and ultrasound microbubbles in biomedicine and therapy[J]. Biotechnology Letter, 2008, 5: 475-478.
- [9] 杜永峰, 于 铭, 闫 焯. 微泡超声造影剂材料研究进展[J]. 功能材料, 2004, 35: 2473-2476.
DU Yong-feng, YU Ming, YAN Ye. Advances in ultrasound microbubble materials[J]. Functional Materials, 2004, 35: 2473-2476.
- [10] ANDERSON D R, TSUTSUI J M, XIE F, et al. The role of complement in the adherence of microbubbles to dysfunctional arterial endothelium and atherosclerotic plaque[J]. Cardiovascular Research, 2007, 73: 597-606.
- [11] FISHER N G, CHRISTIANSEN J P, KLIBANOV A, et al.

- Influence of microbubble surface charge on capillary transit and myocardial contrast enhancement[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2002, 40:811-819.
- [12] TAKALKAR A M, KLIBANOV A L, RYCHAK J J, et al. Binding and detachment dynamics of microbubbles targeted to P-selectin under controlled shear flow[J]. *Journal of Controlled Release*, 2004, 96: 473-482.
- [13] 水 华, 杨成梯, 辛 楠. P-选择素在心血管疾病中的应用价值[J]. *心血管病学进展*, 2001, 22: 165-167. SHUI Hua, YANG Cheng-ti, XIN Nan. The significance and application of P-selectin in cardiovascular diseases[J]. *Cardiovascular diseases Advances*, 2001, 22: 165-167.
- [14] SAKAMOTO T, SUEFUJI H, SUMIDA H, et al. Soluble P-selectin is released into the coronary circulation after coronary spasm[J]. *Circulation*, 1995, 92:1726-1730.
- [15] USHIYAMA S, LAUE T M, MOORE K L, et al. Structural and functional characterization of monomeric soluble P-selectin and comparison with membrane P-selectin[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268: 15229-15237.
- [16] HOSENPU D, BENNETT L E, KECK B M, et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation[J]. *Journal of Heart Lung Transplant*, 2001, 20: 805-815.
- [17] NARULA J, ACIO, E R, NARULA N, et al. Annexin-V imaging for noninvasive detection of cardiac allograft rejection[J]. *Nature*, 2001, 7: 1347-1352.
- [18] WELLER G E, LU E, CSIKARI M M, et al. Ultrasound imaging of acute cardiac transplant rejection with microbubbles targeted to intercellular adhesion molecule-1[J]. *Circulation*, 2003, 108: 218-224.
- [19] NAKASHIMA Y, RAINES E W, PLUMP A S, et al. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse[J]. *Arteriosclerosis Thrombus and Vascular Biology*, 1998, 18: 842-851.
- [20] KAUFMANN B A, SANDERS J M, DAVIS C, et al. Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis with targeted ultrasound detection of vascular cell adhesion molecule-1[J]. *Circulation*, 2007, 116: 276-284.
- [21] LIU Yi-yao, ZHANG Lie, YANG Hong. Anti-VCAM-1 targeted microbubbles: preparation, characterization and adhesion on endothelial cells under flow[J]. *Journal of Medical Biomechanics*, 2008, 23(suppl): 32.
- [22] Korpanty G, Grayburn P A, Shohet R V, et al. Targeting vascular endothelium with avidin microbubbles[J]. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 2005, 31: 1279-1283.
- [23] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. *New England Journal of Medicine*, 1971, 285:1182-1186.
- [24] Brooks P C, Clark R A, Chersesh D A, et al. Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis[J]. *Science*, 1994, 264: 569-571.
- [25] Weidner N, Semple J P, Welch W R, et al. Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in invasive breast carcinoma[J]. *New England Journal of Medicine*, 1991, 324: 1-8.
- [26] Zetter B R. Angiogenesis and tumor metastasis[J]. *Annual of Medicine Review*, 1998, 49: 407-424.
- [27] Ellegala D B, Leong-Poi H, Carpenter J E, et al. Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to $\alpha v \beta 3$ [J]. *Circulation*, 2003, 108: 336-341.

编辑 黄 莘



刘贻尧, 教授, 博士生导师。先后于1998、2001和2004年在重庆大学和日本群馬大学(Gunma University)获得学士、硕士和博士学位, 2005~2007年在日本德岛大学医学部健康生命科学研究所(Institute of Health Biosciences)从事博士后研究, 2007年7~9月在日本德岛大学医学部做访问学者。现为中国生物力学与生物流变学专业委员会委员, 中国生物物理学会和中国生物医学工程学会会员。目前主要从事生物流体力学与血流循环、微/纳米靶向载体制备及其在血液循环中流变学行为与动力学规律等相关交叉学科的研究工作, 重点围绕血流剪切力作用下细胞的黏附、迁移及其分子调控机理, 以及动脉粥样硬化和炎症反应的纳米探针分子标记、分子成像与药物输送(治疗)展开。迄今为止在国内外重要学术期刊发表论文40余篇, 其中SCI收录20余篇, EI收录19篇, SCI他引160余次。