

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.36.005

携白细胞介素-8 单克隆抗体靶向造影剂对兔急性心肌梗死模型的超声评估^{*}

陈建福,张容亮,孙月,陆永萍[△]
(云南省第二人民医院超声科,昆明 650021)

[摘要] **目的** 探讨一种及时、快捷的诊断心肌梗死的检查方法,为急性心肌梗死(AMI)的早期临床诊断及治疗提供相关依据。**方法** 32 只日本大耳兔随机分为假手术对照组(Sham 组, $n=16$)和心肌梗死组(AMI 组, $n=16$)。两组兔分别于开胸前,术后 30 min、2 h 及 6 h 行常规心脏超声检查,再分别用 SonoVue 造影剂和携白细胞介素-8(IL-8)单克隆抗体靶向造影剂行心肌声学造影(MCE)检查,根据显影情况,对视频强度进行评估。**结果** SonoVue 造影剂:AMI 组术后两造模节段前壁、前间隔的显影视频强度均低于非梗死节段下壁及后间隔,AMI 组造模节段心肌显影视频强度均低于 Sham 组。携 IL-8 单克隆抗体靶向造影剂:AMI 组术后两造模节段前壁、前间隔的显影视频强度均高于非梗死节段下壁及后间隔,AMI 组造模节段心肌显影视频强度均高于 Sham 组。**结论** 携 IL-8 单克隆抗体靶向造影剂 MCE 检查能更准确、及时地诊断兔心肌梗死;通过靶向造影剂的显影能敏感地评估心肌梗死区域。

[关键词] 心肌梗死;兔;心肌声学造影;白细胞介素 8;视觉评估
[中图法分类号] R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)36-4580-04

Ultrasonic evaluation of targeted contrast agent carrying interleukin-8 monoclonal antibody on rabbit acute myocardial infarction model^{*}

CHEN Jianfu, ZHANG Rongliang, SUN Yue, LU Yongping[△]
(Department of Ultrasonography, Yunnan Provincial Second People's
Hospital, Kunming, Yunnan 650021, China)

[Abstract] **Objective** To explore a timely and quick examination method for diagnosing acute myocardial infarction (AMI), and in order to provide references for its early clinical diagnosis and treatment. **Methods** Thirty-two Japanese rabbits were randomly divided into the sham operation control group (Sham group, $n=16$) and AMI group ($n=16$). The two groups conducted the routine cardiac ultrasound examination before thoracotomy, at 30 min, 2 and 6 h after operation, then conducted myocardial contrast echocardiography (MCE) examination by using the SonoVue contrast agent and monoclonal antibody-targeted contrast agent carrying interleukin-8. The video intensity was evaluated according to the development situation. **Results** The SonoVue contrast agent; the video intensity of anterior wall and anterior septum in the two modeling segments in the AMI group was lower than that in inferior wall and posterior septum, and the myocardial video intensity of all modeling segments in the AMI group was lower than that in the Sham group. The targeted contrast agent carrying interleukin-8 monoclonal antibody; the postoperative video intensity of the anterior wall and anterior septum of the two modeling segments in the AMI group was higher than that in the inferior wall and posterior septum, and the myocardial video intensity of all modeling segments in the AMI group was higher than that in the Sham group. **Conclusion** The MCE examination by using the targeted contrast agent carrying interleukin-8 monoclonal antibody can diagnose rabbit AMI more accurately and timely; the myocardial infarction area can be sensitively evaluated by the development of targeted contrast agent.

[Key words] myocardial infarction; rabbits; myocardial contrast echocardiography; interleukin-8; visual evaluation

冠心病(coronary heart disease, CHD)亦称缺血性心脏病,是当今危害人类健康和生命最主要的疾病

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81460062、81660084);云南省医学领军人才培养基金项目(L-201616)。 作者简介:陈建福(1992—),在读硕士,主要从事心血管超声方面研究。 [△] 通信作者, E-mail: luyongp@163.com。

之一,其中以急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)的影响最大^[1],全世界每年至少有 1 700 万人死于 AMI 及其并发症,位列死亡原因之首。如何快速、准确地诊断出 AMI 及确定梗死区域是目前研究的重点。研究表明,白细胞介素-8(IL-8)是参与心肌梗死重要的炎性因子^[2],也是一种趋化因子。本实验拟开胸结扎兔左冠状动脉前降支(left anterior descending,LAD)建立兔 AMI 模型,应用临床上常用的 SonoVue 造影剂偶联 IL-8 单克隆抗体(简称“IL-8 单抗”)制备靶向超声造影剂^[3],对实验动物行心肌声学造影(MCE)检查,并根据显影情况,第一时间进行视觉评估,从而快速、精确地判断梗死区域,为临床进一步研究 AMI 奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年日本大耳兔 32 只,体重(3.0±0.5)kg,随机分为两组:AMI 模型组和假手术(Sham)对照组,每组 16 只。

1.1.2 实验仪器 Philips iE33 超声诊断仪,S5-1 探头,频率 1.8/3.6 MHz。

1.2 方法

1.2.1 模型的建立 AMI 组:3%戊巴比妥钠注射液(1 mL/kg)经兔耳缘静脉缓慢注射麻醉后,消毒、铺巾,于兔胸骨左缘 3、4 肋骨水平作长 3~4 cm 的纵形切口,依次切开皮肤、皮下组织,分离肌肉层,充分暴露心包,剪开心包暴露心脏的手术视野,用 5-0 Prolene 带针缝线连同心大静脉一起结扎左冠状动脉。肉眼观察结扎远端局部心肌颜色出现暗红色,再变成暗紫色且搏动减弱,动态监测兔心电图波形出现 ST 段上抬、压低或病理性 Q 波,初步判断模型成功建立^[4]。Sham 组:同一结扎点只穿线不结扎。AMI 组和 Sham 组兔均行四肢电极连接 MEDLAB-4C501H 型生物信号采集处理系统,行心电图监护。

1.2.2 靶向造影剂的制备

1.2.2.1 造影剂制备 采用共价偶联法通过异型双功能交联剂(SPDP)将 IL-8 单抗偶联于 SonoVue 微泡表面,获得携 IL-8 单抗的微泡悬液^[5],制备靶向超声造影剂。

1.2.2.2 微泡悬液的鉴定 (1)玻片凝集实验鉴定:携 IL-8 单抗的偶联造影剂微泡悬液与羊抗鼠 IgG 血清混合,倒置显微镜下可观察到凝集反应^[6];单纯 SonoVue 造影剂微泡悬液与羊抗鼠 IgG 血清混合液倒置显微镜下未观察到凝集反应。(2)荧光染色实验鉴定:携 IL-8 单抗的偶联造影剂微泡悬液表面可见荧光,单纯 SonoVue 造影剂微泡未见荧光。

1.3 超声心动图及 MCE 检查 各实验兔分别于术前,术后 30 min、2 h、6 h 行常规心脏超声检查,先行

SonoVue 造影剂 MCE 检查,间隔 10 min,行携 IL-8 单抗靶向造影剂 MCE 检查。两种造影剂(SonoVue 造影剂、IL-8 单抗+SonoVue 偶联造影剂)使用前摇匀,每次均抽取 0.2 mL 微泡悬液(约 0.05 mL/kg),经兔耳缘静脉 10 s 内匀速推注完,并用 2 mL 生理盐水冲注。取左室短轴乳头肌水平切面观察心肌各节段显影,检查过程中的动静态图像全部存储用于视觉分析评估。全分析过程采用盲法,实验动物只用编号,不标明分组。

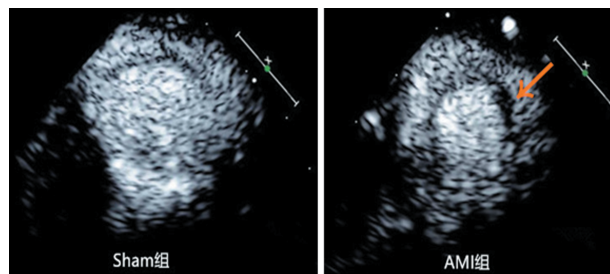
1.4 心肌造影剂充盈视觉评估 +++:心肌造影剂显影明显,视频强度明显增强,接近左心腔内造影剂强度;++:心肌造影剂显影一般,视频强度低于左心腔内造影剂强度;+:心肌造影剂显影暗淡,视频强度明显低于左心腔内造影剂强度;-:心肌不显影。

2 结果

2.1 模型建立情况 Sham 组 3 只死亡,其中 1 只开胸后即死,可能与麻醉剂量不当有关,另 2 只于术中胸膜破裂死亡。AMI 组 4 只死亡,其中 2 只于冠状动脉结扎约 1、3 h 后死亡,可能与麻醉剂量不当、AMI 面积过大等有关,另 2 只于术中胸膜破裂死亡。最后纳入实验分析的模型有 25 只,Sham 组 13 只,AMI 组 12 只。

2.2 视觉评估

2.2.1 SonoVue 造影剂心肌造影视觉评估 AMI 组的造影剂显影程度明显低于 Sham 组,见图 1。



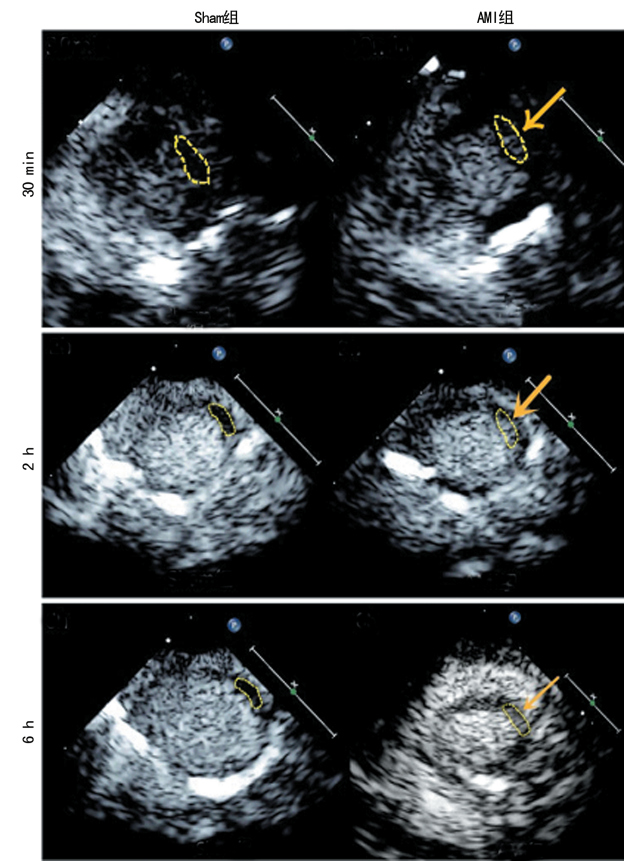
橙色箭头所示:AMI 组造模节段前壁心肌显影的充盈缺损区

图 1 Sham 组和 AMI 组术后 6 h 心肌声学造影图

2.2.2 携 IL-8 单抗的靶向造影剂行心肌造影视觉评估 携 IL-8 单抗靶向造影剂行 MCE 检查,AMI 组各节段心肌造影剂充盈情况的视觉评估术前各节段造影剂充盈均一致,视频强度整体偏低(与偶联造影剂的微泡密度相对偏低有关);AMI 组术后 30 min,两造模节段前壁、前间隔充盈初期即可见造影剂充盈,中期即达峰值,中期至峰值期表现为平台;全部充盈过程,视频强度均强于术前,前间隔与前壁强于后间隔与下壁。术后 2、6 h 视觉评估与术后 30 min 相似,见表 1。AMI 组携 IL-8 单抗靶向造影剂及 SonoVue 造影剂行 MCE 检查造影剂显影情况比较,术前两种造影剂造模节段呈相似均匀一致充填;术后 30 min,两个造模节段携 IL-8 单抗靶向造影剂显影视频强度

均强于 SonoVue 造影剂;术后 2、6 h 视觉评估与术后 30 min 相似,见表 2。术后 30 min,Sham 组心肌前壁未见明显造影剂充盈,AMI 组可见造影剂充盈;术后 2、6 h 视觉评估与术后 30 min 相似,见图 2。术后 30 min,Sham 组心肌前间隔未见明显造影剂充盈,AMI 组可见造影剂充盈。术后 2、6 h 视觉评估与术后 30 min 相似,见图 3。

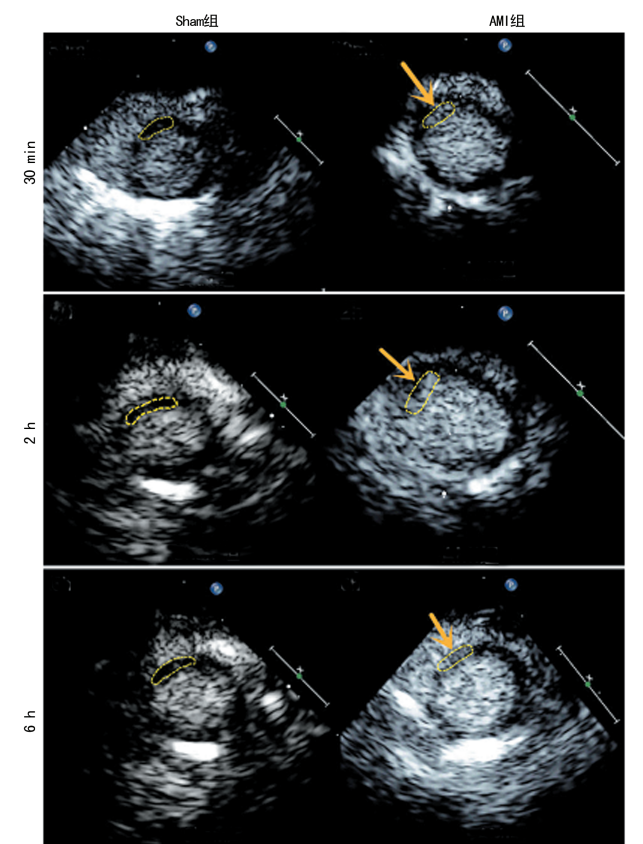
表 1 AMI 组各节段心肌造影剂充盈情况的视觉评估						
时间	n	心肌充盈时期	前壁	前间隔	后间隔	下壁
术前	16	充盈初期	—~+	—~+	—~+	—~+
	16	充盈中期	—~+	—~+	—~+	—~+
	16	充盈峰值期	+	+	+	+
术后 30 min	15	充盈初期	+	+	—~+	—~+
	15	充盈中期	++	++	—~+	—~+
	15	充盈峰值期	++	++	+	+
术后 2 h	14	充盈初期	+	+	—~+	—~+
	14	充盈中期	++	++	—~+	—~+
	14	充盈峰值期	++	++	+	+
术后 6 h	12	充盈初期	+	+	—~+	—~+
	12	充盈中期	+~+++	+~+++	—~+	—~+
	12	充盈峰值期	+~+++	+~+++	+	+



黄色虚线区:造模节段前壁心肌充盈初期

图 2 Sham 组和 AMI 组携 IL-8 单抗靶向造影剂 心肌前壁术后声学造影图

表 2 AMI 组两种造影剂造模节段充盈情况的视觉评估					
时间	n	心肌充盈 时期	携 IL-8 单抗靶向造影剂		SonoVue 造影剂
			前壁	前间隔	前壁 前间隔
术前	16	充盈初期	—~+	—~+	—~+ —~+
	16	充盈中期	—~+	—~+	+ —~+
	16	充盈峰值期	+	+	+ +
术后 30 min	15	充盈初期	+	+	— —
	15	充盈中期	++	++	—~+ —
	15	充盈峰值期	++	++	—~+ +
术后 2 h	14	充盈初期	+	+	— —
	14	充盈中期	++	++	— —~+
	14	充盈峰值期	++	++	+ —~+
术后 6 h	12	充盈初期	+	+	— —
	12	充盈中期	+~+++	+~+++	—~+ —~+
	12	充盈峰值期	+~+++	+~+++	—~+ +



黄色虚线区:造模节段前间隔心肌充盈初期

图 3 Sham 组和 AMI 组携 IL-8 单抗靶向造影剂 心肌前间隔术后声学造影图

3 讨 论

AMI 是由于冠状动脉急性闭塞而导致部分心肌缺血性坏死的过程,常发生在冠状动脉粥样硬化病变的基础上^[7]。心肌缺血、梗死部位常释放出多种炎症因子。研究证明,AMI 后会出现血清 IL-8 水平升高,IL-8 是参与心肌梗死的重要炎症因子^[8-9]。本研究通过将 IL-8 单抗连接到声学造影剂表面构筑成靶向声学造影剂,使造影剂快速、主动结合到靶区,从而进行特异性的超声分子成像,以期准确、及时地判断局部

室壁运动异常区域内有无存活心肌,为临床选择治疗措施、疗效预测和预后评估提供重要的依据^[10]。

传统二维超声心动图可以显示出心室壁各部分的运动,检出心肌梗死所致的室壁运动异常^[11],但是无法在第一时间精确地诊断出心肌梗死的具体区域。行心肌超声造影检查时,某一区域心肌的视频密度代表了该区域即时造影剂的浓度,因此可用 MCE 检查判断心肌血供情况^[12]。当心肌微循环尚未受损时,心肌内可见声学造影剂均匀充盈;当心肌梗死时,由于血供不足或中断,局部节段心肌出现造影剂灌注缺损,显影视频强度明显减弱^[13]。

本实验研究发现,同一实验兔,单用 SonoVue 造影剂行 MCE 检查时,AMI 组造模节段的心肌显影视频强度均低于术前,均低于 Sham 组;AMI 组造模节段的心肌显影视频强度均低于非造模节段。而用携 IL-8 单克隆抗体的靶向造影剂行 MCE 检查时,AMI 组造模节段的心肌显影视频强度均高于术前,均高于 Sham 组;AMI 组造模节段的心肌显影视频强度均高于非造模节段。在造影剂单因素不同,其他实验因素都相同的情况下,可说明 IL-8 单克隆抗体与缺血心肌释放的炎性因子 IL-8 之间的补体效应所致的趋化性和靶向作用。

用携 IL-8 单抗的靶向造影剂行心肌声学造影时,AMI 组术后 30 min 即表现为造模节段造影剂充盈明显强于非造模节段,充盈速度快于非造模节段。但从心肌微循环的角度来看,AMI 组术后 30 min 造模节段的微循环受损并减少^[14],而侧支循环尚未完全建立,MCE 本应表现为充盈缺损或充盈程度低于非梗死区,而实际却相反,由此分析得出炎性因子 IL-8 在 AMI 早期(术后 30 min)增高即很明显。携 IL-8 单抗的靶向造影剂的 MCE 检查对于心肌缺血的敏感性和特异性均优于常规超声造影剂,优于传统二维超声心动图,能更早期、更快速、更精准地诊断出缺血性心脏病。

本实验研究在实际操作过程中尚存在某些不足,采用共价偶联法制备的靶向超声造影剂密度偏低,显影强度不够,可能与造影剂制备过程中操作手法不当,相关技巧、工艺尚未完全成熟有关。

综上所述,携 IL-8 单抗靶向声学造影剂与缺血心肌所释放的炎性因子 IL-8 之间存在靶向作用,携带 IL-8 单抗靶向造影剂的 MCE 检查对缺血心肌诊断更准确,可早期定位诊断,是目前较为理想的检查方法,有着广阔的研究应用前景,靶向性心肌声学造影技术将为人类缺血性心脏病的诊疗开辟一个新途径。

参考文献

[1] ANAND S S, YUSUF S. Stemming the global tsunami of

cardiovascular disease[J]. Lancet, 2011, 377 (9765): 529-532.

[2] VELÁSQUEZ I M, FRUMENTO P, JOHANSSON K, et al. Association of interleukin 8 with myocardial infarction: results from the Stockholm Heart Epidemiology Program[J]. Int J Cardiol, 2014, 172(1): 173-178.

[3] 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.

[4] 杨道玲, 梁红敏, 孙月, 等. 兔急性心肌梗死模型制备的超声造影研究[J]. 中国超声医学杂志, 2015, 31(9): 830-833.

[5] 杨薇, 陆永萍, 邵庆华, 等. IL-8 单克隆抗体靶向偶联 SonoVue 微气泡造影剂的方法学研究[J]. 中国超声医学杂志, 2011, 27(6): 485-488.

[6] LU Y P, SHAO Q H, YANG W, et al. Interactions between targeted ultrasound contrast agents with anti-human interleukin 8 monoclonal antibody and activated endothelial cells[J]. Ultrasound Q, 2015, 31(3): 154-158.

[7] FAUST O, ACHARYA U R, SUDARSHAN V K, et al. Computer aided diagnosis of coronary artery disease, myocardial infarction and carotid atherosclerosis using ultrasound images: a review[J]. Phys Med, 2017, 33: 1-15.

[8] FANG L, DART A M. Immune and inflammatory responses in subjects with stable angina and acute myocardial infarction[J]. J Geriatr Cardiol, 2015, 12(3): 202-203.

[9] 梁瀛, 王新宇, 牛杰, 等. 急性心肌梗死患者血清炎症因子的动态变化及相互关系[J]. 中华医学杂志, 2011, 91(12): 819-823.

[10] RAN H, ZHANG P Y, ZHANG Y X, et al. Assessment of Left ventricular myocardial viability by 3-dimensional speckle-tracking echocardiography in patients with myocardial infarction[J]. J Ultrasound Med, 2016, 35(8): 1631-1638.

[11] ALAM M. The role of echocardiography in acute myocardial infarction[J]. Henry Ford Hosp Med J, 1999, 39(3/4): 165-169.

[12] ESKANDARI M, MONAGHAN M. Contrast echocardiography in daily clinical practice[J]. Herz, 2017, 42(3): 271-278.

[13] BALCELLS E, POWERS E R, LEPPER W, et al. Detection of myocardial viability by contrast echocardiography in acute infarction predicts recovery of resting function and contractile reserve[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 41(5): 827-833.

[14] FUKUOKA Y, NAKANO A, TAMA N, et al. Impaired myocardial microcirculation in the flow-glucose metabolism mismatch regions in revascularized acute myocardial infarction[J]. J Nucl Cardiol, 2017, 24(5): 1641-1650.