

P-选择素为靶标磁共振分子成像在 血栓早期诊断中的应用研究

赵亚鹏[#] 金佩佩^{1#} 周同^{*} 王学锋¹ 钟高仁² 李晓 张明钧 陈楠 王鸿利¹

(上海交通大学医学院瑞金医院肾内科,¹临床输血科,上海血液学研究所,上海 200025;

²复旦大学放射药理学研究所,上海 200032)

摘要 血栓性疾病是临床常见疾病,涉及全身各脏器,其发生与血管损伤、血液成分变化及局部血流淤滞等改变有关。P-选择素作为血小板/内皮细胞活化标志及黏附受体,参与血栓形成起始过程,并是连接炎症与血栓的重要介质和靶分子。为此,进行了以P-选择素为靶标的分子磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)在血栓早期诊断中的应用研究。利用自制的抗P-选择素单抗(PsL-EGFmAb),制备了具有P-选择素靶特异性的MR对比剂(Gd-DTPA)n-BSA-PsL-EGFmAb,并在体外MR成像基础上,进行了犬静脉血栓模型活体观察。结果显示,该对比剂可明显增强体外模拟血小板血栓和全血血栓的显像信号。进一步发现,相应于P-选择素在建模后即刻犬受损静脉血管内膜及形成的血栓部位表达,模型犬在损伤局部注射对比剂后30 min, MR成像即显示高于周围肌肉显影的血管信号,1 h可见附壁血栓增强信号,至3 h随血栓形成增大而持续强化,显示了与P-选择素表达一致的信号强化效果。另从股静脉损伤部位的远心端注射对比剂后30 min至1 h,也显示上述成像效果,2 h至4 h血栓信号强度由明显上升渐见趋缓,延迟24 h信号强度减弱。此外,该对比剂对实验犬的生命体征及心、肺、肝、肾等理化指标均无明显影响。研究结果提示,研制的MR对比剂对P-选择素具有靶向特异性,可活体内早期定位显像及反映血栓形成状态,且对机体重要脏器功能无影响,这为早期诊断血栓性疾病提供了一种可行的方法。

关键词 磁共振; 分子成像; 靶向性; P-选择素; 血栓性疾病

血栓性疾病是一类严重危害人类生命健康的血管栓塞性疾病,涉及临床各科尤见心、脑血管血栓性栓塞、深静脉血栓形成、肺栓塞并发症以及外周动脉闭塞性疾病等,并具高发、高致死与致残性特点^[1-3]。目前血栓性疾病诊断主要依据临床表现和多种影像学检查^[4],血管造影或血管超声等技术虽能准确反映血管狭窄程度,然而对早期附壁血栓仍缺乏特异和敏感性,加之患者血栓前或早期症状一般较隐匿临床不易察觉。因此在血栓得到确诊时,受累器官或组织已往往发生器质性不可逆损伤,故临床上迄今尚缺乏早期、特异的诊断方法。

磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)是一种完全无创的影像学诊断方法。在此基础上,近年基于细胞与分子水平的MR靶向成像已成为分子影像学的研究热点,其中利用单克隆抗体活体内分子成像研究也被人们推崇^[5-7]。作为单抗型MR对比剂,是将单克隆抗体与MR顺磁性或超顺磁性粒子结合,从而使新形成的螯合物既具靶向功能即特异性,又具常规MR对比剂(造影剂)作用。其不仅能与某些

器官、组织及病变灶靶分子特异结合,且能改变或增强其MR信号强度,从而达到靶向诊断目的^[6,7]。

鉴于P-选择素(P-selectin)作为血小板/内皮细胞活化标志及黏附受体,参与血栓形成起始过程,并是连接炎症与血栓的重要介质和靶分子^[8-10]。为此,本研究拟以P-选择素为靶标,进行MR分子成像的血栓早期诊断应用研究。利用自制的抗P-选择素单抗(anti-P-selectin lectin-EGF domain monoclonal antibody, PsL-EGFmAb),制备具有P-选择素靶特异性单抗型MR对比剂(Gd-DTPA)n-BSA-PsL-EGFmAb,并以此进行了体外模拟血栓及犬血栓模型活体MR成像观察。拟通过直接显示局部P-选择素表达,评价该对比剂及成像技术对血栓的诊断价值,以期建立更具特异性的血栓早期诊断技术和方法。

收稿日期: 2008-01-03 接受日期: 2008-03-01

国家自然科学基金(No.39970340, No.30570865)、上海市科委基础研究重点项目基金(No.05JC14039)和上海交通大学医学院科技创业基金(No.JYCJ0503)资助项目

[#]共同第一作者

^{*}通讯作者。Tel: 021-64370045, E-mail: zhouotong_cn@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂与仪器

成年健康毕格犬 12 只, 雄性, 体重 12~15 kg, 普通级, 上海交通大学医学院实验动物科学部提供; PsL-EGFmAb, 本科室自制^[11]; 牛血清白蛋白(BSA), GdCl₃, EDC, Avidin-HRPO, Sepharose CL-4B 层析柱 (1 cm×25 cm), 购自 Sigma 公司; DTPA 双酸酐(CaDTPA), 复旦大学放射药理学研究所提供; 二乙三胺五乙酸钆(Gd-DTPA), 凝血酶, 购自 Schering 公司; P-选择素标准蛋白, 购自 R&D 公司; P-选择素免疫组化试剂盒, 购自华美生物公司; 高效液相色谱仪(HPLC), 购自日本岛津公司; MR 成像设备采用美国 GE Excite HD1.5T MR 仪及 3 英寸(7.62 cm)表面线圈。

1.2 抗 P-选择素单抗制备

将已研制 PsL-EGFmAb 的杂交瘤细胞株, 进行 Babl/c 小鼠腹腔免疫注射, 10~14 天后收集小鼠腹水取上清液; 然后对粗提腹水进行纯化及免疫活性鉴定。ELISA 法结果显示, 制备的 PsL-EGFmAb 其抗体效价达 1:204 800。

1.3 对比剂(Gd-DTPA)n-BSA-PsL-EGFmAb 制备

将 10 g 二乙三胺五酸(DTPA)制成 CaDTPA。取含有 50 mg BSA 的溶液, 在一定条件下与 CaDTPA 双酸酐反应, 生成 DTPA-BSA; 加 GdCl₃ 溶液至减压浓缩的 DTPA-BSA 溶液中, 搅拌反应生成 Gd-DTPA-BSA。采用高频电感耦合等离子体发射光谱法(ICP-AES)测量样品 Gd 含量, 计算所得 Gd-DTPA-BSA 每分子含 20~30 个 Gd³⁺; 再将上述 PsL-EGFmAb 溶解于 0.1 mol/L NaH₂CO₃/Na₂HCO₃ 缓冲液(pH 9.6), 然后加入偶联剂 ECD 和 Gd-DTPA-BSA, 室温下搅拌反应 24~30 h, 用 Sepharose CL-4B 层析柱(1 cm×25 cm)除去未连接的抗体, 收集抗体与 Gd-DTPA-BSA 的连接体, 制得 (Gd-DTPA)_n-BSA-PsL-EGFmAb, 经冷冻浓缩及 0.22 mm 除菌过滤后, 4 °C 保存。另行对比剂检测, HPLC 分析其纯度>98%, ICP-AES 测量 Gd 含量为 44 mg/kg, 并计算得每分子抗体可连接 70~100 个 Gd³⁺, 且 ELISA 检测显示抗体的免疫活性基本不受影响。

1.4 犬静脉血栓模型制作

参照文献^[12]建立犬股静脉血栓模型。犬经适应性饲养后, 称重后全身麻醉(0.25% 戊巴比妥钠腹腔注射, 1 ml/kg 体重), 固定、备皮、消毒, 于腹股沟区沿股动、静脉走行切开皮肤 8 cm 左右, 钝性分离皮下及肌肉组织, 充分暴露股静脉, 于静脉两端放置血管夹后切开股静脉, 向心方向采用表面刮出毛刺

导管反复抽拉, 使静脉血管内膜充分损伤。然后取出导管, 缝合股静脉, 撤除两端血管夹, 使血液恢复流动。另按时间点取出损伤节段静脉血管, 4% 多聚甲醛固定, 行组织病理学观察及 P-选择素表达检测, 确定静脉损伤及血栓形成状况。

1.5 犬静脉血管组织学及 P-选择素表达检测

采用 HE 染色和免疫组化方法, 分别检测静脉血管组织学改变和 P-选择素表达。将上述血管段石蜡包埋, 3 mm 厚切片、染色, 镜下观察血管组织病理变化; 另对切片标本行 P-选择素检测, 将组织切片常规脱蜡至水, 用 3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶, 随后用正常兔血清封闭非特异性抗原。加一抗 1:100 的鼠抗人 P-选择素单抗, 4 °C 过夜。再加 1:400 生物素标记的兔抗鼠二抗, 室温 30 min; 加 1:400 的生物素化过氧化物酶-链霉卵蛋白复合物, 室温 30 min, DAB 染色 2 min, 最后苏木素复染。脱水, 透明, 封片, 镜检, 同时用 PBS 代替一抗作阴性对照。结果判断采用半定量分析方法。

1.6 体外血小板血栓、全血血栓及 MR 成像

采集 10 ml 正常人抗凝血, 800 r/min 离心 10 min, 制得富含血小板血浆(PRP)。另取抗凝血与上述 PRP 分别置于 Eppendorf 管 (1.0 ml/管), 于每管加 70 μl 7.5 U/ml 凝血酶, 37 °C 置 30 min, 分别致血小板聚集成团或血液成模拟血栓状。再各加入 40 μl、60 μl、80 μl 1.5 mg/ml (Gd-DTPA)_n-BSA-PsL-EGFmAb, 并于对照管加相同 Gd³⁺ 浓度的常规 Gd-DTPA, 另设 PBS 空白管。上述实验管和对照管经 PBS 反复洗涤后, 分别悬于 500 μl PBS 中行 MR 成像。采用 GE Excite HD1.5T MR 仪及 3 英寸表面线圈, 先平扫后增强。MR 成像条件为: 平扫采用横断位和冠状位 SE T₁WI (TR/TE 500/20 ms); 增强扫描选用横断位和冠状位 SE T₁WI (TR/TE 500/20 ms)。层厚/间距: 1/0 mm (横断位); 2/1 mm (冠状位), 矩阵 314×256, FOV (视野) 6 cm×6 cm, NEX=3。测量方法为: 每次测量分别选择 5 个大小一致的感兴趣区(ROI), 测量信号强度(SI)。测量时每个 ROI 不小于 4 mm², 并尽量采集强化明显且均匀的区域, 取其均值, 然后计算对比度噪声比(CNR)。

1.7 模型犬活体内 MR 成像

按上述造模技术和步骤制备犬股静脉血栓模型, 随机分为实验组和对照组。于造模结束尚未撤除血管夹恢复血流前, 实验组犬注射 500 μl 1.5 mg/ml (Gd-DTPA)_n-BSA-PsL-EGFmAb; 对照组则注射 500 μl 相

同 Gd^{3+} 浓度的常规对比剂 Gd-DTPA, 20 min 后撤除血管夹, 使血流通畅, 创面开放, 便于观察血栓形成状况。同时将实验犬下肢采用绷带和胶布固定于 MR 移动床面, 且线圈与犬下肢表面平行, MR 先平扫后增强。对比剂注射方法分为受损静脉局部和远心端注射。局部注射分别于注射后 30 min、1 h、3 h 行 T_1WI 增强成像; 远心端注射分别于注射后 30 min、1 h、2 h、4 h、24 h 行 T_1WI 增强成像。MR 成像条件为: 平扫采用横断位和冠状位 SE T_1WI (TR/TE 500/20 ms); 增强扫描选用横断位和冠状位 SE T_1WI (TR/TE 500/20 ms)。层厚 / 间距: 1/0 mm (横断位); 2/1 mm (冠状位), 矩阵 256×256 , FOV $12 \text{ cm} \times 12 \text{ cm}$, NEX=3, 余测量方法同上。

此外, 实验犬注射对比剂行 MR 成像同时, 监护仪条件下相应观察呼吸、心率、血压、体温等生命体征, 实验完毕后 1 h 内处死动物取组织标本, 行心、肺、肝、肾等病理学检测。

1.8 数据处理与统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 13.0 统计软件包进行数据分析, 实验组和对照组比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 犬静脉血管组织病理学及 P-选择素表达变化

组织学检查显示, 犬受损股静脉血管内皮细胞和血管内膜均出现不同程度损害, 并伴炎症细胞浸润。形成的血栓则充满静脉管腔, 与管壁黏连; 另血栓组成成份以红细胞及纤维素为主, 散在分布血小板及白细胞, 上述改变与临床急性深静脉血栓的病理变化基本一致。此外免疫组化检测显示, 与正常犬基本不表达 P-选择素相比, 在建模后即刻犬股静脉损伤至血栓形成后 3 h, P-选择素均于受损血管内膜及血栓部位明显表达, 与犬静脉损伤组织病理学改变相符 (图 1)。

2.2 体外血小板血栓、全血血栓的 MR 成像变化

MR 成像显示, 实验组血小板血栓经 (Gd-DTPA)n-BSA-PsL-EGFmAb 增强后, 在 MR 图像上可清晰显影, 并可准确显示血栓团状位置, 且其信号强度随上述对比剂 (40、60、80 μl) 增量而增强; 而对照组在注入常规 Gd-DTPA 后, 同于空白组均未出现血栓显像。CNR 值于实验组 (3.12 ± 0.35) 与对照组 (0.93 ± 0.42) 间有明显差异, $P < 0.01$ 。另实验组全血血栓经 (Gd-DTPA)n-BSA-PsL-EGFmAb 增强后, 也较对照组对血栓信号强度有明显强化作用, 且亦随对比剂浓度增加, 其信号强度明显增强, CNR 值于实验组 ($2.15 \pm$

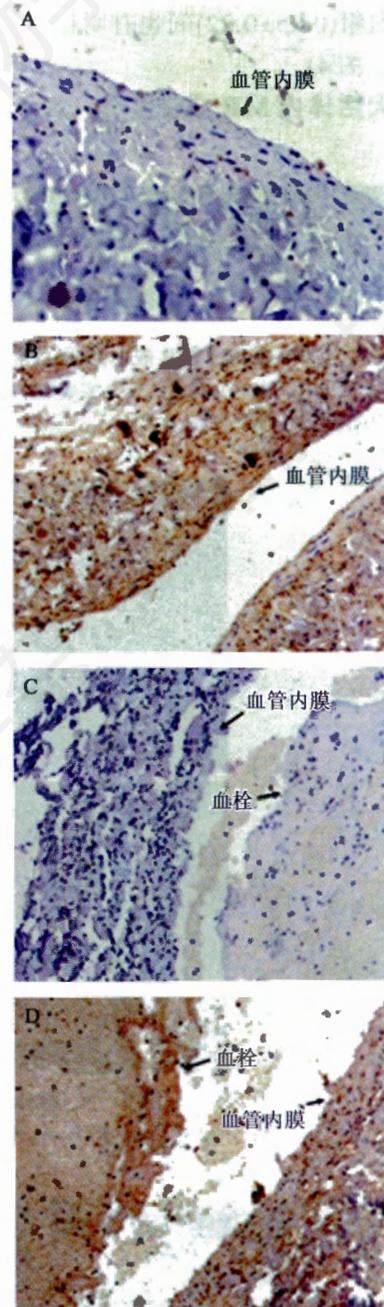


图 1 免疫组化检测犬股静脉血管内膜及血栓部位 P-选择素表达结果(200 \times)

A: 建模后即刻(对照); B: 建模后即刻; C: 建模后 3 h(对照); D: 建模后 3 h。

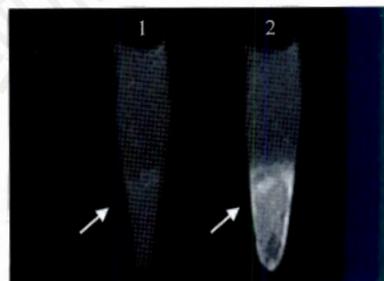


图 2 体外模拟血栓试管内 MR 成像结果(冠状位成像)

1: 对照组(Gd-DTPA); 2: 实验组[(Gd-DTPA)n-BSA-PsL-EGFmAb]。

0.17)与对照组(0.85±0.22)间也有明显差异, $P < 0.01$ (图2, 图3, 图4)。

2.3 模型犬活体内 MR 成像变化

MR 成像显示, 实验组犬在股静脉损伤局部注射 (Gd-DTPA)n-BSA-PsL-EGFmAb 后 30 min, MR 成像即显示高于周围肌肉显影的血管特异信号, 1 h 可见



图3 体外模拟血小板血栓 MR 成像结果(横断位成像)
1: 空白组(PBS); 2: 对照组(Gd-DTPA); 3~5: 实验组 [40 μ l、60 μ l、80 μ l (Gd-DTPA)n-BSA-PsL-EGFmAb]。

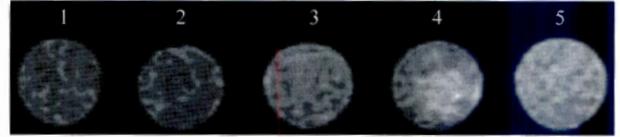


图4 体外模拟全血血栓 MR 成像结果(横断位成像)
1: 空白组(PBS); 2: 对照组(Gd-DTPA); 3~5: 实验组 [40 μ l、60 μ l、80 μ l (Gd-DTPA)n-BSA-PsL-EGFmAb]。

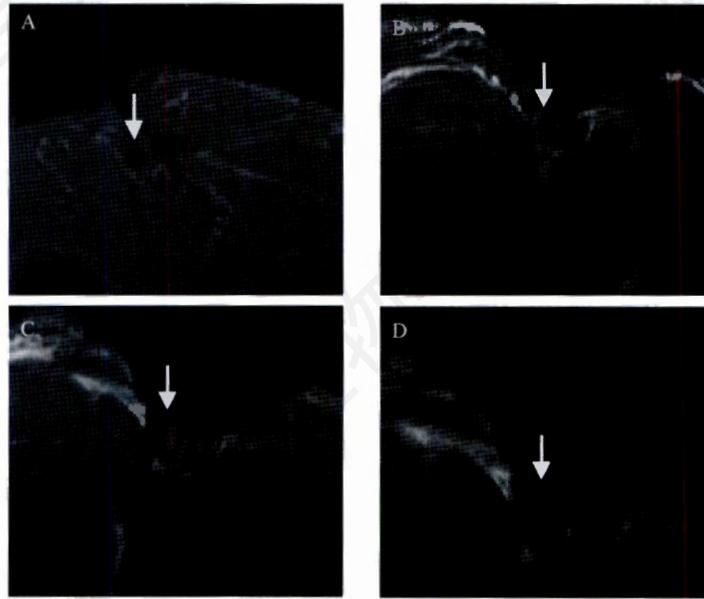


图5 犬股静脉血栓局部注射对比剂的体内 MR 成像结果
A: 对照组 Gd-DTPA; B~D: 实验组注射(Gd-DTPA)n-BSA-PsL-EGFmAb 后 30 min、1 h、3 h。

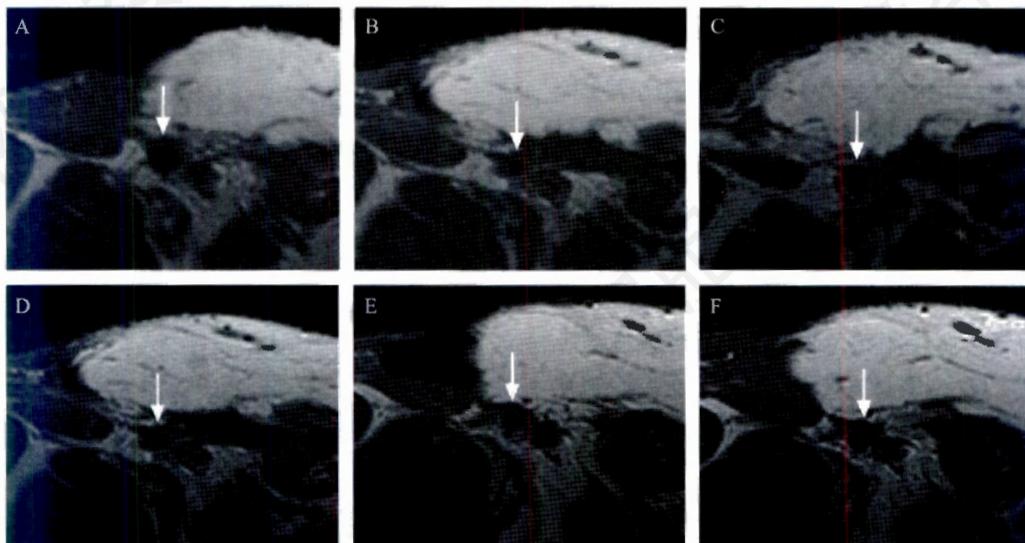


图6 犬股静脉血栓远心端注射对比剂的体内 MR 成像结果
A: 对照组 Gd-DTPA; B~G: 实验组注射(Gd-DTPA)n-BSA-PsL-EGFmAb 后 30 min、1 h、2 h、4 h、24 h。

附壁血栓增强信号升高,至3 h随血栓形成范围增大仍持续强化;另从股静脉损伤部位的远心端注射对比剂后30 min至1 h,也显示上述成像效果,2 h至4 h血栓信号强度由明显上升渐见趋缓,延迟24 h信号强度减弱。对照组犬则在注射常规Gd-DTPA后的上述时段内,均未见血管与血栓信号强化。CNR值于实验组与对照组间均有明显差异, $P < 0.01$ (图5,图6)。

2.4 对比剂动物安全性试验结果

经观察,实验犬在注射(Gd-DTPA)n-BSA-PsL-EGFmAb后行MR成像过程中,一般情况良好,且犬上述呼吸、心率、血压、体温等各项生命体征均未出现明显变化。另实验完毕处死动物后的组织学观察,也基本未见心、肺、肝、肾等重要脏器的病理损害。

3 讨论

血栓性疾病主要包括动、静脉血栓性疾病,并具高发、高致死及致残性特点^[1-3]。动脉血栓以心脑血管疾病为主,与血管损伤和血小板活化等有关;静脉血栓以深静脉血栓形成为主,与血液成分变化及血液淤滞等有关。血栓形成以静脉血栓为例,血管内因血管壁损伤、高凝及血流淤滞等多种原因,均可致血液发生凝固或其有形成成分互相黏集析出,形成固体团块或附壁血栓,从而阻塞血液回流并引起血管壁炎性改变,最终导致血栓形成和血管栓塞^[2]。因血栓尤其静脉血栓形成通常初始症状隐匿且缺乏早期诊断方法,易漏诊而致严重后果,故早期诊断与及时治疗尤显重要。目前血栓性疾病诊断可借助非创伤性影像学检查^[1,4],如血管多普勒超声、螺旋CT血管造影、MR血管造影以及计算机断层扫描等方法。上述检查虽能准确反映血管狭窄程度并予以明确诊断,然而对早期附壁血栓仍缺乏特异性和敏感性,故临床上尚缺乏血栓性疾病早期、特异的诊断方法。

近年,在传统影像学基础上形成的分子影像学引起关注。已知传统影像学主要依赖非特异性成像手段进行疾病检查,且只有当机体发生明显的病理或解剖结构改变时才能检出异常。而分子影像学可从细胞和分子水平进行活体状态下生物过程研究,并可在机体未发生明显改变时显示分子水平变化,达到“疾病前诊断”(predisease diagnosis),以期实现早期诊断与治疗^[5-7]。目前利用MR成像具有的良好空间及组织分辨率,已成为分子影像学的研究热

点^[6,7,13]。在此基础上的分子成像,即是通过MR成像技术对分子探针与靶分子相互作用进行显像,而合适的分子探针及生物信号放大系统等是活体内成像的关键。因此,选择适当的分子靶标及制备高亲和力探针,是实现MR分子成像的必要条件^[5]。

P-选择素是黏附分子选择素家族的重要成员,其主要表达在活化的血小板/内皮细胞表面,通过介导上述细胞间以及与白细胞初始黏附,启动参与了血栓形成、炎症反应等病理生理过程^[8-10]。研究表明,P-选择素介导参与的血小板、内皮细胞黏附及血管壁炎症状态,是导致包括动、静脉血栓形成新的发病机制^[8-10]。Myers等^[14]利用静脉血栓动物模型,发现循环中P-选择素水平增高,微颗粒增多,伴随着血栓形成,受损血管壁炎细胞浸润增多,抑制P-选择素可明显减少血栓形成及炎细胞浸润。Falati等^[15]利用共聚焦和宽视野显微镜,实时观察活体小鼠微循环中血栓形成,发现P-选择素在血栓形成初始即明显表达,并介导白细胞黏附及血栓部位的聚集。另证实,P-选择素基因剔除小鼠其纤维蛋白形成和血凝块均明显减少和减小^[16]。这些均表明P-选择素是血栓/炎症的重要介质和靶分子。

为此本研究以P-选择素为靶分子,利用自制的抗P-选择素单抗,采用BSA放大系统及对比剂连接技术,研制成了具有高特异性的靶向对比剂(Gd-DTPA)n-BSA-PsL-EGFmAb,并将其应用于血栓的活体MR分子成像研究。我们首先利用该单抗对比剂,进行体外模拟血栓的MR成像观察,发现通过分别标记血小板血栓和全血血栓,在同等条件下,上述对比剂可剂量依赖地增强血栓的MR成像,且其显像信号明显强于常规对比剂Gd-DTPA,并可准确显示血栓团状位置。表明(Gd-DTPA)n-BSA-PsL-EGFmAb能与P-选择素靶向结合,且在MR图像上显示出特异的增强信号。在此基础上,进一步利用静脉内膜损伤和血流淤滞方法建立犬股静脉血栓模型,采用受损静脉局部和远心端注射对比剂的两种方法,进行MR成像观察,犬活体成像结果也显示了单抗对比剂对血栓尤其附壁血栓的靶向显影及信号强化效果。研究发现,相应于P-选择素在建模后即刻犬受损静脉血管内膜及形成的血栓部位表达,模型犬在损伤局部注射对比剂后30 min,MR成像即显示高于周围肌肉显影的血管信号,1 h可见附壁血栓增强信号升高,至3 h随血栓形成范围增大仍见持续强化,显示了与P-选择素表达一致的信号强化效果;在此基础上,从股静脉损

伤部位的远心端注射对比剂后 30 min 至 1 h, 也显示上述成像效果, 2 h 至 4 h 后血栓信号强度由明显上升渐见趋缓, 延迟 24 h 信号强度减弱。另对经分离的模型犬离体静脉血管进行 MR 成像, 同样取得相同处理条件下强于 Gd-DTPA 的成像效果 (资料未显示)。

由上述结果进一步发现, 本研究模型犬自静脉血管内膜损伤后 30 min 至 1 h 即可出现附壁血栓, 2 h 至 4 h 后血栓由明显增大转而减缩, 至 24 h 时血栓缩小, 显示了血栓由形成增大至逐渐缩小的趋势。推测可能与 P-选择素单抗靶向结合时, 抑制 P-选择素表达并相应阻抑血栓进一步形成有关, 这也与相关报道的利用 P-选择素抑制手段起早期抗栓效应相符^[17,18]。当然也不排除对比剂随时间推移靶向结合逐渐消减至信号强化减弱有关。结合我们以往对 P-选择素单抗具有的抗黏附治疗作用研究结果^[11,19], 进一步提示本研究研制的 P-选择素单抗靶向对比剂不仅具有诊断价值, 且有望具有诊断及治疗双重作用, 并可通过发挥抗黏附即抗栓/抗炎效应, 早期干预血栓形成并影响疾病转归。故从这个意义上说, 分子影像学研究不仅能够早期诊断疾病, 提供更多可选择的治疗措施, 更重要的是能进行真正意义上的疾病预防, 这也是围绕此目标本研究的意义所在, 值得进一步探讨。

总之, 在上述研究中, 我们进行了犬活体静脉血

栓形成早期的 MR 分子成像, 取得了初步成功。研究结果提示, 研制的单抗型 MR 对比剂对 P-选择素具有靶向特异性, 可在活体内早期定位显像并反映血管损伤及血栓形成状况, 且对机体生命体征及重要脏器功能基本无影响, 这可能为早期诊断血栓性疾病提供了一种可行的方法。此外, 利用该技术平台也可望拓展至 P-选择素相关的炎症性疾病等研究, 尚有待继续探索予以完善。

参考文献 (References)

- [1] Tapson VF. *N Engl J Med*, 2008, **358**: 1037
- [2] Schafer AI et al. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2003: 520
- [3] Martinelli I. *Thromb Haemost*, 2001, **86**: 395
- [4] 王鸿利等. *中华医学杂志*, 2004, **84**: 350
- [5] Delikatny EJ et al. *Radiol Clin North Am*, 2005, **43**: 205
- [6] Otsuji E et al. *Cancer Immunol Immunother*, 2006, **55**: 728
- [7] Kuriu Y et al. *J Surg Oncol*, 2006, **94**: 144
- [8] 周同等。见: 王鸿利主编, *血栓病临床新技术*, 北京: 人民军医出版社, 2002, 67
- [9] 赵亚鹏等. *细胞生物学杂志*, 2007, **29**: 22
- [10] Vandendries ER et al. *Thromb Haemost*, 2004, **92**: 459
- [11] 周同等. *生物化学与生物物理学报*, 2003, **35**: 172
- [12] Dorffler-Melly J et al. *Basic Res Cardiol*, 2000, **95**: 503
- [13] Stracke CP et al. *Stroke*, 2007, **38**: 1476~
- [14] Myers DD et al. *J Vasc Surg*, 2003, **38**: 1075
- [15] Falati S et al. *J Exp Med*, 2003, **197**: 1585
- [16] Sullivan VV et al. *J Surg Res*, 2003, **109**: 1
- [17] Myers DD Jr et al. *Thromb Haemost*, 2007, **97**: 400
- [18] Wakefield TW et al. *J Vasc Surg*, 2000, **31**: 309
- [19] Zhou T et al. *World J Gastroenterol*, 2005, **11**: 1005

Exploratory Development of Molecular Magnetic Resonance Imaging Targeting P-selectin in Early Diagnosis of Thrombosis

Ya-Peng Zhao[#], Pei-Pei Jin^{1#}, Tong Zhou^{*}, Xue-Feng Wang¹, Gao-Ren Zhong², Xiao Li,
Ming-Jung Zhang, Nan Chen, Hong-Li Wang¹

(Department of Nephrology, ¹Department of Clinical Transfusion, Shanghai Institute of Hematology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; ²Department of Radiopharmacy, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract Thrombotic disease is a clinically common disease involving various organs that is associated with vessel injury, blood constituent alteration and the local stasis of blood flow. P-selectin, an activation marker and adhesive receptor of platelets and endothelial cells, takes part in the initiation of thrombosis, and links inflammation with thrombosis as an important mediator and target molecule. Accordingly, we tried to use molecular magnetic resonance imaging (MRI) with a P-selectin targeted contrast agent to diagnose thrombosis in the early phase. The P-selectin-targeted contrast agent was developed by conjugating anti-P-selectin lectin-EGF domain monoclonal antibody (PsL-EGFmAb) which was prepared by our lab. We investigated the potential of this contrast agent using *in vitro* molecular imaging experiment as well as *in vivo* experiment in a dog model of venous thrombosis. The results

indicated that the imaging signals were enhanced by the P-selectin-targeted contrast agent both in platelet-thrombosis and whole blood-thrombosis *in vitro*. Further study showed that, P-selectin was expressed immediately in tunica intima of injured vein and subsequently in thrombus after the model established. Correspondingly, mural thrombus showed higher signal visualization than surrounding muscle 30 min after contrast agent injection. These enhanced signals exhibited P-selectin specificity and persisted from the initiation of intima lesions to 3 h after development of thrombosis. The same results were derived from 30 min to 4 h after contrast agent being injected in distal to heart part of the injured vessel, and the signal decreased 24 h later. Moreover, the contrast agent did not affect the vital signs of the dog and the heart, lung, liver and kidney functions remained normal after contrast administration. In conclusion, our results suggested that the new prepared MR contrast agent exhibited high specific binding to P-selectin, and can be used to locate thrombus and reflect the status of thrombosis in the early stage *in vivo*. In addition, this contrast agent did not compromise the function of the important organs. Our study established a new feasible method for early diagnosis of thrombosis.

Key words magnetic resonance imaging; molecular imaging; organ selectivity; P-selectin; thrombotic disease

Received: January 3, 2008 Accepted: March 1, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.39970340, No.30570865), the Key Basic Research Foundation of Shanghai Municipal Science & Technology Commission (No.05JC14039) and the Science and Technology Foundation of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (No.JYCJ0503)

*These authors contribute equally to this work

*Corresponding author. Tel: 86-21-64370045, E-mail: zhoutong_cn@hotmail.com

第二届中国医学细胞生物学学术大会暨医学细胞生物学 教学改革会议通知

第二届全国医学细胞生物学学术大会暨医学细胞生物学教学改革会议定于2008年11月6~9日在浙江省台州市椒江区台州方远大酒店(四星)举行。会议由中国细胞生物学学会医学细胞生物学分会、细胞生物学教学分会和浙江省细胞生物学学会主办,台州学院、台州市立医院承办。会议将以特邀报告、大会报告和分组报告形式进行学术交流。会议期间将召开中国细胞生物学学会医学细胞生物学分会第一届理事会、全国细胞生物学教研室/系主任会议和浙江省细胞生物学学会20周年庆祝大会。本次大会为医学细胞生物学领域的国内外与会学者提供互相交流的学术平台。

会议征集以下方面文章:

(一)医学细胞生物学

1) 疾病的细胞生物学研究; 2) 染色体、基因、蛋白质组学研究; 3) 细胞结构与功能研究; 4) 干细胞、细胞分化和发育生物学; 5) 细胞信号转导和细胞通讯; 6) 免疫细胞生物学; 7) 肿瘤细胞生物学; 8) 细胞工程和转基因生物; 9) 细胞生物学新技术新方法; 10) 医学检验和病理学中的细胞生物学问题。

(二)细胞生物学教学

1) 细胞生物学教学研究; 2) 细胞生物学教学改革。

联系方式:

(1)医学细胞生物学: 论文摘要通过电子邮件的附件形式发送至下列 e-mail 地址: xfzhou@zju.edu.cn, zengql@zju.edu.cn。

(2)细胞生物学教学: 论文摘要通过电子邮件的附件形式发送至下列 e-mail 地址: xinhua@sdu.edu.cn, dinggf2007@163.com。

投稿截止日期: 2008年10月10日。

详情请见: <http://www.zjscb.org>, <http://www.cscb.org.cn/news.asp?id=680>。