文章编号:1000-5404(2005)09-0895-03

论著

人前列腺癌靶向超声造影剂的制备及其体外实验研究

卓莉莎[1],李 锐[1],郭燕丽[1],华 兴[1],何 芸[1],刘 政[2],付赤学[2] (第三军医大学:[1]西南医院超声科,重庆 400038,[2]新桥医院超声科,重庆 400037)

提 要:目的 制备人前列腺细胞癌靶向超声造影剂,并对其进行鉴定,探讨其体外寻靶能力。**方法** 静电吸附法制备免疫脂质体微泡造影剂;免疫荧光染色试验证明抗体与脂质体微泡的结合,普通光镜和荧光显微下观察微泡与前列腺癌细胞的结合情况,探讨靶向脂质体微泡对癌细胞的体外寻靶能力;同时以普通微泡作为对照。**结果** 免疫脂质体微泡的荧光免疫染色试验为阳性;体外寻靶试验显示携带PSM(C-15)抗体的靶向脂质体微泡能较好地粘附于癌细胞周边;而对照组未见微泡与靶细胞的结合。**结论** 采用静电吸附法成功制备了具有良好免疫活性的的人前列腺癌靶向脂质体造影剂,该造影剂在体外能高效特异性地与人前列腺癌细胞结合。

关键词: 脂质体造影剂;前列腺癌;多克隆抗体
中图法分类号: R392.1; R737.25; R981.1 **文献标识码:** A

Preparation and immunological activity *in vitro* of human prostatic carcinoma-targeted liposome microbubbles

ZHUO Li-sha[1], LI Rui[1], GUO Yan-li[1], HUA Xing[1], HE Yun[1], LIU Zheng[2], FU Chi-xue[2] ([1]Department of Ultrasound, Southwest Hospital; [2]Department of Ultrasound, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To prepare human prostatic carcinoma-targeted ultrasound contrast agent and assess its targeted ability *in vitro*. **Methods** Human prostatic carcinoma-specific polyclonal antibody PSM(C-15) was attached to the surface of self-made liposome microbubbles by electrostatic attraction to prepare targeted microbubbles. Immunofluorescent staining assay was used to identify the combination of PSM(C-15) with liposome microbubbles and the targeted microbubbles were added to prostatic-carcinoma cells and then observed under the light and fluorescence microscope to evaluate the targeting ability of the targeted liposome microbubbles with prostatic carcinoma cells *in vitro*, while the common liposome microbubbles were controls. **Results** Targeted microbubbles were positive in immunofluorescent straining assay. *In vitro* study of the targeting ability showed the targeted microbubbles could actively adhere to LNCaP cell. While the control was negative. **Conclusion** The targeted liposome contrast agent with highly specific biological activity was prepared successfully. The contrast agent could bind to human prostatic carcinoma cells specially and effectively *in vitro*.

Key words: liposome contrast agent; prostate carcinoma; polyclonal antibody

近年来,随着各种超声造影剂的出现和发展,研制能够达到靶区特异显影或局部靶向治疗目的靶向超声造影剂已成为国内外研究的热点[1,2]。本研究选择抗人前列腺细胞癌多克隆抗体作为配体,制备人前列腺细胞癌靶向超声造影剂,对其进行鉴定,探讨其体外寻靶能力,为进一步的实验研究及临床应用创造条件。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

抗人前列腺细胞癌多克隆抗体PSM(C-15):美国Santa cruz公司产品;LNCaP人前列腺癌细胞株:第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科提供;脂质体微泡造影剂:第三军医大学新桥医院超声科实验室提供;异硫氰酸荧光素(FITC)标记的兔抗山羊IgG:北京中山生物技术有限公司产品。

1.2 靶向脂质体微泡造影剂的制备

将脂质体微泡与抗人前列腺癌多克隆抗体PSM(C-15)按一定比例混合,在pH 4.5、4 ℃条件下孵化2 h,低速离心,分层后弃下清,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,-20 ℃保存。

1.3 靶向脂质体微泡造影剂的鉴定

取制备好的靶向脂质体微泡1 ml,加入稀释后的兔抗山羊FITC-IgG充分混匀。避光室温反应30 min,低速离心分层后弃下清,PBS洗涤3次,于光镜和荧光显微镜下观察微泡的大小,分布及染色情况[3]。

1.4 靶向脂质体微泡造影剂对人前列腺癌细胞的靶向结合实验

将靶向脂质体微泡和普通脂质体微泡分别与LNCaP细胞

基金项目:重庆市科技计划项目(2002-7513)
Supported by the Foundation for Sci & Tech Research Project of Chongqing (2002-7513)
作者简介:卓莉莎(1975-),女,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事超声造影剂方面的研究。电话:(023)68765444
通讯作者:李 锐,(023)68754427
收稿日期:2005-01-03;修回日期:2005-03-27

悬液等体积混合，充分混匀，室温反应 30 min 后加入 FITC-IgG，避光室温反应 30 min，取少许混悬液于载玻片上，在光镜和倒置荧光显微镜下观察微泡与细胞的结合情况。

2 结果

2.1 靶向脂质体微泡造影剂的制备结果

肉眼观察：所制备的靶向超声造影剂外观呈白色凝乳状的混悬液；光镜下观察：微泡分布均匀，平均直径 2～6 μm，浓度约 6×10^8/ml。其大小、形态与普通微泡对照无明显改变(图 1)。

2.2 靶向脂质体微泡造影剂的鉴定结果

经 FITC 标记的兔抗山羊 IgG 染色后光镜下观察，微泡分布基本均匀，与普通微泡相比，微泡间略有聚集现象；荧光显微镜下可见靶向脂质体微泡壳发出明亮的绿色荧光(图 2)。

2.3 靶向脂质体微泡造影剂对人前列腺癌细胞的体靶向结合实验结果

光镜下观察，靶向微泡与细胞紧密结合，多个靶向微泡粘附在细胞周围(图 3)，倒置荧光显微镜下观察，靶向脂质体微泡包围在靶细胞的周围，发出明亮的绿色荧光(图 4)，而对照组未见普通微泡与靶细胞的结合。

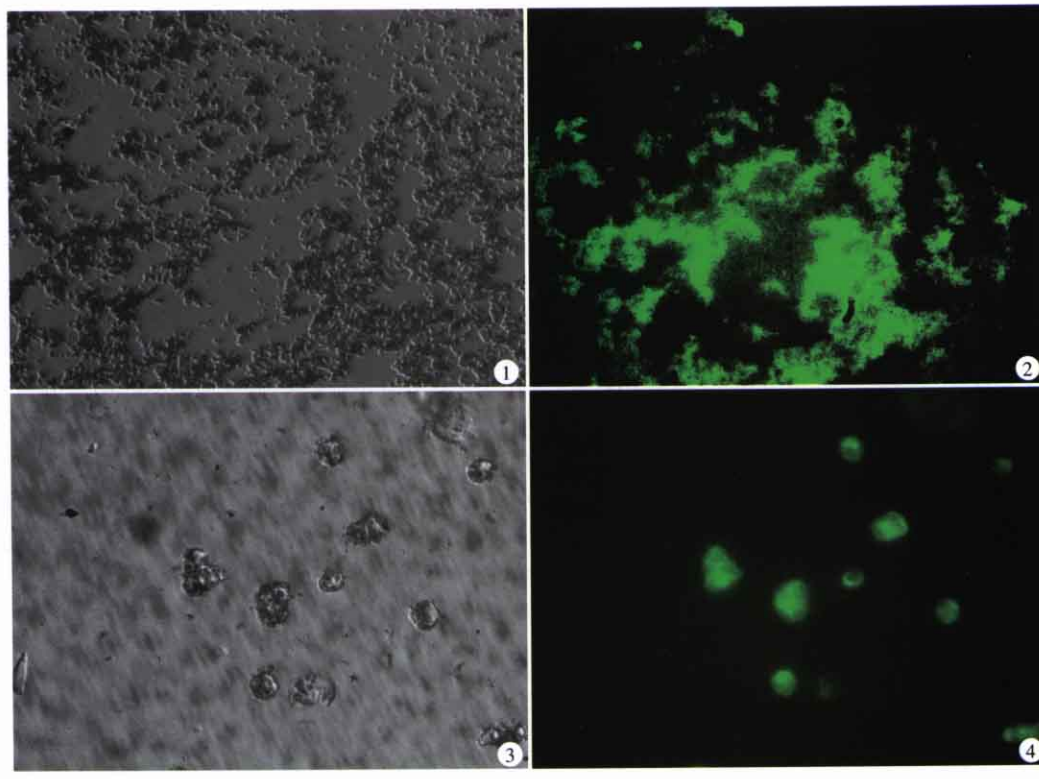


图 1 靶向脂质体微泡光镜观察 (LM ×200)

Fig 1 Targeted lipsome microbuble under light microscope (LM × 200)

图 2 靶向脂质体微泡的免疫荧光染色观察 (FITC × 200)

Fig 2 Immunofluorescent straining of targeted lipsome microbuble (FITC × 200)

图 3 靶向脂质体微泡与 LNCaP 细胞结合的光镜观察 (LM × 200)

Fig 3 Targeted lisposome microbubble binding to LNCaP cells under light microscope (LM × 200)

图 4 靶向脂质体微泡与 LNCaP 细胞结合的免疫荧光染色观察 (FITC × 200)

Fig 4 Immunofluorescent staining of targeted lipsome microbuble binding to PC-3 cells (FITC × 200)

3 讨论

近年来，新型超声造影剂不断兴起，超声造影新技术也在飞速发展，国内外研究显示二者结合可明显提高超声诊断的敏感性和特异性。前列腺特异性膜抗原 PSMA 是一种 Ⅱ 型跨膜蛋白，在前列腺癌组织中呈明显高表达，是较 PSA 具有更好前列腺组织特异性的新型肿瘤标志物。同时，有研究[4,5]表明，多种非前列腺来源的恶性肿瘤组织血管内皮细胞的表达 PSMA，正常组织血管内皮细胞则不能表达 PSMA，认为 PSMA 可以由于检测富含血管组织的恶性肿瘤，这意味着 PSMA 除了有前列腺特异性，可能还具有肿瘤血管内皮细胞特异性。另外，国内外学者对超声波与微泡造影剂相互作用所产生的生物学效应进行了研究，证实超声波介导微气泡的破裂可破坏毛细血管的完整性，使直径 < 7 μm 的微毛细血管破裂，从而使经静脉输注的微泡得以穿过血管到达组织[6]。因而我们认为在超声照射下，携带抗体的超声造影剂可穿过破裂的微血管

而与靶组织特异性结合。

前列腺癌是西方国家最常见的恶性肿瘤之一，是美国男性癌症死亡的第二大原因，我国前列腺癌的发病率也呈逐年上升的趋势，因此早期诊断对前列腺癌的治疗与预后有重要的价值[7]。目前所有的影像学检查，都不能敏感地区分慢性前列腺炎、前列腺肥大与早期前列腺癌，其早期定性定位诊断仍然非常困难，仍依赖于有创的前列腺多点穿刺活检。靶向超声造影的相关研究为这一问题的解决提供了一种新的思路。研究表明，原发性前列腺癌都有 PSMA 的高表达，抗人前列腺特异性膜抗原(PSMA)抗体对前列腺癌组织有很高的特异性，能选择性定位于癌组织。以该抗体为导向载体制备靶向造影剂，可能使前列腺癌局部组织由于较高的 PSMA 含量而特异地显影增强，达到定性和早期诊断前列腺癌的目的。

在本实验中，对采用静电吸附法制备的免疫脂质体微泡造影剂进行了鉴定。实验结果表明，用静电吸附法将 PSM(C-15)抗体可牢固地结合到脂质体微泡表面，而一旦结合后，无论用 PBS 冲洗还是改变 pH 值，都不能使抗体从微泡表面脱离。

综上所述，静电吸附法制备靶向超声造影剂是可行的，并且此方法操作简便快捷，成本低，实验条件容易达到，不影响抗体的活性。另外，体外寻靶试验表明，靶向脂质体微泡能有效特异地结合人前列腺癌细胞 LNCaP。此结果的获得为进一步开展前列腺癌靶向超声造影剂的体内实验研究奠定了基础。

参考文献：

[1] Lindner J R. Evolving applications for contrast ultrasound[J]. Am J Cardiol, 2002, 90(10A): 72J-82J.

[2] Gregory M, Lanza G Mm, Wallace K Dm, *et al*. High-freqnquency ultrasonic detection of thrombi with a targeted contrast system[J]. Ultrasound Med Biol, 1997, 23(6): 863 - 870.

[3] 布 卡，盛 洁，谢蜀生，等. 抗人膀胱癌免疫毫微球的制备及活性检测[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，19996, 16(1): 54 - 57.

[4] Halin C, Zardi L, Neri D. Antibody-based targeting of angiogenesis[J]. News Physiol Sci, 2001, 16(4): 191 - 194.

[5] Chang S S, Reuter V E, Heston W D, *et al*. Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature[J]. Cancer Res, 1999, 59(13): 3192 - 3198.

[6] Price R J, Skyba D M, Kaul S, *et al*. Delivery of colloidal particles and red blood cells to tissue through microvessel ruptures created by targeted microbubble destruction with ultrasound[J]. Circulation, 19998, 98(13): 1264 - 1267.

[7] 刘耀庭，李秀霞，程 伟. 泌尿外科肿瘤发病情况的变化[J]. 临床泌尿外科杂志，19997, 12(1): 47 - 48.

(编辑 汪勤俭)

文章编号：1000-5404(2005)09-0897-01

个案与短篇

右纵隔巨大淋巴结增殖症 1 例

A case report of giant lymph node hyperplasia of right mediastinum

曾锤利，周向东，谢才德，邹华兰 (第三军医大学西南医院呼吸内科，重庆 400038)

患者，男性，25 岁。因阵发性右胸痛 2 d 入院。患者 2 d 前无明显诱因出现右胸痛，持续 0.5 min 后减轻，2 h 后完全缓解，未再复发。无放射痛，无咳嗽、咳痰、气促，无咯血，无潮热、盗汗。在当地医院就诊，行胸片检查发现右上肺块影；胸部 CT 示右上肺陈旧性肺结核、右后纵隔占位性病变，考虑神经源性肿瘤。未行任何治疗。既往史无。查体：生命体征平稳，心肺腹部体检无异常。实验室检查：结核抗体弱阳性。三大常规、肝、肾功、心电图正常。肺功能提示气道阻力略增高。腹部 B 超未见异常。初步诊断为右后纵隔肿瘤。行 CT 引导下经皮肺穿刺活检术，术后病检结果提示：(右上肺)肉芽组织。7 d 后转胸外科手术治疗，术前行 PET/CT 检查示：①右后上纵隔胸椎旁占位，考虑良性或低度恶性肿瘤或肿瘤样病变；②全身(包括脑)PET/CT 显像未见 FDG 代谢及形态明显异常。手术所见：右上纵隔、脊柱旁处有一肿块，与脊柱、肺组织、气管相邻，无侵犯粘连。完整游离切除肿瘤。病理检查：巨检灰白色肿块一个，大小 8 cm × 6 cm × 5 cm，表面包膜完整，切面灰白呈鱼肉状。免疫组化染色：CK 阴性，LCA 强阳性。病理诊断：(右纵隔)巨大淋巴结增殖症。术后患者恢复良好，痊愈出院，现在随访观察之中。

讨论

巨大淋巴结增殖症临床较罕见，也有人命名为血管瘤性淋巴结样错构瘤，良性淋巴瘤等。1954 年 Castle man 首次报道纵隔淋巴样滤泡为主的局限性肿块，其后发现伴有全身性表现，1956 年以独立疾病报道，称为 Castle man disease (CD)[1]。本病的病因及发病机制尚无定论，可能与病毒感染有关，尤其是人疱疹病毒 8(HHV-8)[1]。病毒作为一种抗原，可引起人体淋巴结

(下转 903 页)

作者简介：曾锤利(1973 -)，女，重庆市荣昌县人，医师，主要从事呼吸内科临床方面的研究。电话：(023)68765680

通讯作者：周向东，电话：(023)68765679，E-mail: xdzhou@mail.tmmu.com.cn

收稿日期：2005-01-05；修回日期：2005-04-06