论著

文章编号:1000-5404(2006)06-0562-03

携RGDS超声造影剂的制备及体外靶向血栓研究

杨钰楠,高云华,谭开彬,夏红梅,刘 政,李 馨 (第三军医大学新桥医院超声科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨制备携精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸(Arg-Gly-Asp-Ser,RGDS)靶向脂膜超声造影剂的制备,并对靶向微泡的特性及靶向作用进行初步鉴定。**方法** 分别采用酰胺键共价键合的方式和表面吸附法将脂膜超声造影剂与RGDS血栓靶向短肽片段进行结合;制备产物通过流式细胞仪进行携带率和稳定性的检测;对内源性凝血途径产生的血栓进行寻靶作用研究。**结果** 流式细胞仪显示共价键合RGDS脂膜超声造影剂其微泡外壳波长发生了明显变化,显示改变率达到82%,而表面吸附法制备的靶向超声造影剂改变率达到23%;激光共聚焦显微镜显示携带RGDS的脂膜超声造影剂在大量的PBS液清洗后,对离体血栓仍具有很强的靶向性和稳定性,而表面吸附法制备的靶向超声造影剂在大量PBS液清洗后,失去了其靶向性。**结论** 采用共价键合的化学修饰方法可以成功制备稳定性好的亲血栓靶向脂膜超声造影剂。

关键词:RGDS;血栓;靶向造影剂

中图法分类号:R445.1;R965;R981.1 **文献标识码**:A

Targeting RGDS-mediated liposome ultrasound contrast agent: preparation and preliminary *in vitro* study

YANG Yu-nan, GAO Yun-hua, TAN Kai-bin, XIA Hong-mei, LIU Zheng, LI Xin (Department of Ultrasound, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To discuss the preparation and preliminary *in vitro* study of the targeting RGDS-mediated liposome ultrasound contrast agent and investigate their biological properties. **Methods** Liposome ultrasound contrast agent combined with thrombus-targeted peptide RGDS through two methods, one is by amide linkage, the other one by surface bind. The conjunct ratio and stability were accessed by flow cytometer (FCM), the targeting effect of the targeted contrast agent on the thrombus was evaluated by intrinsic coagulation path. **Results** FCM demonstrated that the first method made the shell's wavelength of targeted liposome microbubbles changed greatly and its conjunct ratio achieved 82%, while the conjunct ratio achieved 23% by the second method. Confocal scanning laser microscopy showed the priority of RGDS-mediated liposome ultrasound contrast agent by amide linkage in targeting and stability on grafted thrombus after repeated wash, but the targeted microbubbles through surface binding lost its targeting after repeated wash. **Conclusion** The thrombus-targeted liposome microbubbles combined with peptide by amide linkage were prepared successfully.

Key words: RGDS; thrombus; targeted contrast agent

靶向超声造影是目前超声造影的前沿性课题,本实验在自制长效脂膜氟烷超声造影剂的基础上[1],分别采用共价键合法和表面吸附法,让微泡结合上血小板膜上GPIIb/IIIa受体拮抗剂精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸(Arg-Gly-Asp-Ser,RGDS)短肽片段,探讨靶向超声造影剂的制备方法,并对这2种方法制备的靶向微泡进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

荧光标记的RGDS:由杭州中肽生物制剂公司特约合成;桥连剂PEG-AT:由Hercules公司特约合成;激活剂碳化二亚胺盐酸盐:购自吉尔生化上海有限公司;Ⅰ型胶原蛋白和Ⅳ型胶原蛋白:购自Sigma公司;脂膜微泡造影剂("脂氟显")由本室自制。

1.2 共价键键合血栓靶向脂膜超声造影剂的制备

将磷脂二硬脂酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酸甘油与PEG-AT按一定比例水合成溶液,再经冻干处理,加入糖溶液及表面活性剂,摇匀。然后,将激活剂碳化二亚胺盐酸盐与带有荧光的短肽片段以一定比例混合,在pH 7.4, 4 ℃条件下反应30 min后,加入到制备好的脂质溶液中,并加以全氟丙烷气体。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30500478);重庆市科技计划项目(2004AC5040)
the National Natural Science Foundation of China (30500478) and the Sci & Tech Project Foundation of Chongqing (2004AC5040)

作者简介:杨钰楠(1980-),女,重庆市人,硕士研究生,主要从事超声造影方面的研究。电话:(023)68753498

通讯作者:高云华,电话:(023)68755631

收稿日期:2005-09-23;**修回日期**:2006-01-02

采用机械振荡仪，选择合适的功率和时间予以振荡后静置片刻，去下清液，即得到初始的靶向微泡造影剂。再通过浮选法用缓冲液（PBS）冲洗数次去掉游离的短肽片段，弃下清液，将得到的产物（亲血栓脂膜超声造影剂）进行下一步实验。

1.3　表面吸附法制备靶向超声造影剂

制备流程和材料基本同 2，不同的是制备材料中去掉桥连剂 PEG-AT，用 PEG（聚乙二醇）4 000（我科实验室自制的长效脂膜氟烷超声造影剂"脂氟显"中的膜材料）。

1.4　靶向脂膜微泡超声造影剂的鉴定方式

①普通光镜下观察微泡的粒径分布；②荧光显微镜下观察微泡的荧光标记情况；③流式细胞仪分析微泡 RGDS 携带率和稳定性。

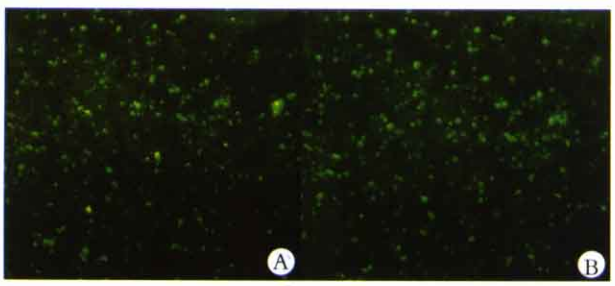
1.5　体外寻靶实验方法

新鲜血液直接涂片法[2]：采集人体外周静脉新鲜血液常温下涂片，分别加入 10 μl 表面吸附法靶向脂膜超声造影剂和共价键合短肽靶向脂膜超声造影剂，5 min 后 PBS 液冲洗涂片数次，放上盖玻片，放置于激光扫描共聚焦显微镜下，评价其对离体血栓的亲和性。

2　结果

2.1　微泡的外观及镜下所见

标记了异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）的靶向微泡外观呈浅黄色混悬液。光镜下共价键合短肽靶向脂膜微泡分布细密均匀，其粒径范围为 2～5 μm，其中 98% 在 5 μm 以下，主要为 3 μm，加入 PBS 液之后微泡均匀分散，与表面吸附法靶向脂膜微泡相似，无显著性差异。荧光显微镜下肉眼观察：可见共价键合短肽的靶向脂膜微泡外壳在清洗前后均发出明亮的黄绿色荧光（图 1），而表面吸附法靶向脂膜微泡经 PBS 液清洗后在荧光显微镜下不可见，或见有零星发出微弱荧光的未被洗净的底色（图 2）。

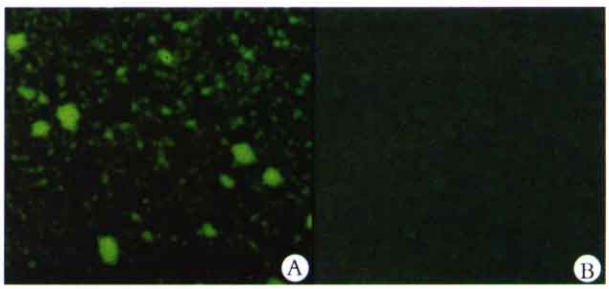


A：清洗前；B：清洗后

图 1　共价键键合制得的靶向微泡（FITC × 200）

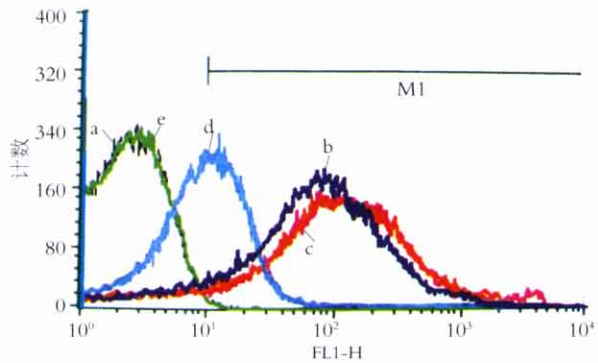
2.2　流式细胞仪测值

流式细胞仪结果分析表明（图 3）：与非靶向微泡（黑线）对照，采用共价键合法制得的靶向微泡即深蓝色曲线所表示的，结合了标记有荧光物质的短肽片段，其外壳波长较普通微泡发生改变，随机计数 50 000 个微泡，有 82.96% 的微泡不同于非靶向微泡，说明微泡达到 82.96% 的 RGDS 短肽片段结合率，且清洗后测试，结合率依然保持在 81.91%，与此同时，采用表面吸附法制备的靶向超声造影剂结合率只有 23%，清洗后降低至 0.22%。



A：清洗前；B：清洗后

图 2　表面吸附法制得的靶向微泡（FITC × 200）



File:yyn070718-1　Total Events:50000

Marker	Left,right	Events	% Total
All	1,9910	50000	100.00
M1	9,9910	41482	82.96

File:YYN070718-2　Total Events:50000

Marker	Left, tight	Events	% Total
All	1,9910	50000	100.00
M1	10,9910	40954	81.91

File:YYN070718-3　Total Events:50000

Marker	Left,right	Events	% Total
All	1,9910	50000	100.00
M1	10,9910	11506	23.01

File:YYN070718-4　Total Events:50000

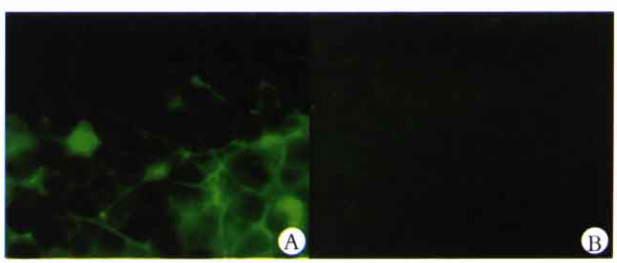
Marker	Left, tight	Events	% Total
All	1,9910	50000	100.00
M1	10,9910	112	0.22

a：非靶向脂膜造影剂；b：共价键合短肽的脂膜造影剂；c：清洗后的共价键合短肽脂膜造影剂；d：表面吸附靶向脂膜造影剂；e：清洗后的表面吸附靶向脂膜造影剂

图 3　流式细胞仪检测结果

2.3　共价键合法与表面吸附法制备的 RGDS 血栓靶向微泡的体外寻靶结果

激光共聚焦显微镜观察结果：共价键合法制得的血栓靶向微泡滴加在血块上，静置 5 min 后 PBS 液冲洗、采图，携带荧光标记的短肽片段分布于血栓表面及纤维分隔内（图 4A）；而表面吸附法制得的血栓靶向微泡经清洗后，不能观察到荧光样物质（图 4B）。



A：共价键合法；B：表面吸附法

图 4　靶向微泡体外靶向观察（CSLM × 600）

3 讨论

制备靶向超声造影剂的关键是将靶向配体(多为蛋白分子)连接到微泡上,连接方式主要有:①直接连接法,又称为共价的被动吸附、静电吸附法[3];② 偶联剂连接法;③桥连剂结合的方法(共价结合法);④非吸附性非共价键键合的免疫化学固定。本课题探讨了直接连接法(表面吸附方法)和桥连剂结合的方法(共价结合法)制备携带 RGDS 靶向超声造影剂。亲血栓的 RGDS 短肽,其为血小板膜糖蛋白 GPⅡb/Ⅲa 特异性配基,具有对血栓部位活化血小板的趋向性,能与血小板 Fg 片断特异性结合,粘附于血栓表面,携带有 RGDS 的血栓靶向超声造影剂,通过血循环积聚到附着有血栓的血管壁上,从而使血栓组织在超声影像中得到特异性的"标记"增强或局部靶向治疗作用,达到使用造影剂剂量小,而靶位与背景的对比率高的效果。

采用表面吸附方法时,脂质微泡本身不带有活性基团,通过其自身离子键、物理吸附等方法将靶向配体或靶向配体混合物直接粘附到微泡壁成分上,此法取决于微泡壁材料的化学组成和配体的性质以及溶液的 pH 值、离子强度、温度、时间的选择等[4]。在本方法中尽管采用了激活剂碳化二亚胺盐酸盐,由于膜材料中采用的是没有活化的 PEG,其作用仅限于降低免疫原性及延长修饰物半衰期不能增强携带短肽片段的能力[5]。流式细胞仪显示此方法制备出的靶向微泡短肽片段结合率低,只有 23% 左右的结合率,且经 PBS 液体冲洗后,短肽片段极易脱落,表明其稳定性差。桥连剂结合的方法(共价结合法)[6,7]是首先需要引入必要的化学基团对桥连剂进行结构修饰形成功能基团,而桥连剂本身属于微泡的构成成分,在微泡的构成成分中我们将自制长效脂膜氟烷超声造影剂"脂氟显"中的膜材料"未活化的聚乙二醇"换成活化的聚乙二醇(桥连剂 PEG - AT),使得磷脂亲水端带有氨基,在机械振荡制作微泡过程中利用碳二亚胺盐酸盐激活微泡表面的氨基就可与短肽片段的羧基结合[8],形成了以酰胺键为结合关键的化学键合,且由于短肽片段在微泡形成过程中已键合在成膜材料中,从理论上该造影剂进入人体循环后应保持其稳定性,短肽片段不会从微泡膜上分离。激光共聚焦显微镜显示携带 RGDS 的脂膜超声造影剂经 PBS 液清洗后,对离体血栓仍具有很强的靶向性和稳定性,而表面吸附法制备的靶向超声造影剂在大量 PBS 液清洗后,失去了其靶向性。

靶向超声造影剂的鉴定方面,通常将靶向片段标记荧光,然后通过荧光物质的检测,来初步进行定性配体与微泡是否结合,这只是一种初步的定性评价,靶向微泡的携带率及稳定性方面的评价目前尚缺少有效的方法。本研究采用荧光显微镜和流式细胞仪对产物进行检测。通过荧光显微镜定性观察,我们可以看到:采用共价键合短肽片段的靶向脂膜微泡经过反复冲洗后仍然带有强烈的绿色荧光;而表面吸附法制得的靶向脂膜微泡经 PBS 液清洗后仅有微弱荧光显示。由于靶向微泡的配体采用了荧光标记,理论上流式细胞仪可以对其进行定量评价。将造影剂配置成 1 mg/ml 浓度,放置于流式细胞仪检测管中,由仪器自动检测分析,通过微泡表面荧光的不同,随机计数 50 000 个微泡,分析得到结果。本研究表明通过流式细胞仪的检测,共价键合法制备的靶向微泡在清洗前后依然具有稳定性,定量随机计数 50 000 个微泡,其携带标记有荧光的短肽片段的百分率保持在 80% 以上,而表面吸附法制备的靶向微泡,在清洗前后其携带率由 23% 降低至 0.22%,接近于非靶向微泡。

因此我们也可以得出结论,使用流式细胞仪对于定量检测靶向微泡是一种有效的方法。

本实验通过制备携 RGDS 靶向超声造影剂的方法学研究和体外初步评价,表明采用共价键合的化学修饰方法可以成功制备稳定性好的亲血栓靶向脂膜超声造影剂,其在体内的应用价值还有待于下一步深入研究。

参考文献:

[1] 高云华, 谭开彬, 刘 平, 等. 一种新型长循环超声造影剂增强心脏显像的实验研究[J]. 中国超声医学杂志, 2004, 20(2): 81 - 84.

[2] 夏红梅, 高云华, 卞爱娜, 等. 亲血栓性靶向超声造影剂的鉴定及体外寻靶实验研究[J]. 中国超声医学杂志, 2004, 20(5): 321 - 323.

[3] 卞爱娜, 高云华, 谭开彬, 等. 人肝癌靶向脂质体微泡造影剂的鉴定及免疫学性质研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2004, 13(9): 696 - 699.

[4] ICHIKAWA K, HIKITA T, MAEDAN, *et al*. Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels[J]. Biochim Biophysica Acta, 2005, 1669(1): 69 - 74.

[5] MANAGIT C, KAWAKAMI S, NISHIKAWA M, *et al*. Targeted and sustained drug delivery using PEGylated galactosylated liposomes [J]. Int J Pharm, 2003, 266(1 - 2): 77 - 84.

[6] LATHIA J D, LEODORE L, WHEATLEY M A. Polymeric contrast agent with targeting potential[J]. Ultrasonics, 2004, 42(1 - 9): 763 - 768.

[7] MAEDA M, KIDA S, HOJO K, *et al*. Design and synthesis of a peptide-PEG transporter tool for carrying adenovirus vector into cells[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2005, 15(3): 621 - 624.

[8] HO M H, WANG D M, HSIEH H J, *et al*. Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds [J]. Biomaterials, 2005, 26(16): 3197 - 3206.

(编辑 张大春)