文章编号:1000-5404(2013)23-2551-04

论著

靶向卵巢癌的纳米超声微泡造影剂的制备及其体外寻靶研究

张劲宜[1], 张丽平[1],朱元方[1],李文娟[1],黄舒颖[1],赵雅静[2],李 攀[2],王志刚[2] (330006 南昌,南昌大学第一附属医院妇产科[1];400010 重庆,重庆医科大学超声影像研究所[2])

[摘要] **目的** 制备靶向卵巢癌的纳米超声微泡造影剂,鉴定其理化特性并观察其体外寻靶能力。**方法** 采用冷冻干燥超声法制备非靶向纳米超声微泡造影剂(N-N-Mb),通过生物素-亲和素桥连法,将生物素化的促黄体生成素释放激素(luteinzing hormone-releasing hormone, LHRH)与N-N-Mb连接,制备靶向卵巢癌的纳米超声微泡造影剂(LHRH-N-Mb)。观察微泡镜下形态以及室温下保存时间。zeta检测仪检测粒径范围、表面电位,流式细胞术检测二抗分别与LHRH-N-Mb、N-N-Mb结合率,光镜下观察LHRH-N-Mb与LHRH受体过表达的人卵巢癌OVCAR-3细胞结合情况。**结果** N-N-Mb、LHRH-N-Mb两种微泡成功制备,两者外观圆整,分布均匀,粒径大小分别为(372±45)、(511±64)nm,集中于360 nm与508 nm,两者粒径大小比较有统计学差异($P<0.05$)。两种微泡电位分别为(-14.5±0.5)、(-14.6±0.8)mV。室温下保存16 d后,LHRH-N-Mb理化特性与刚制备时无统计学差异($P>0.05$)。二抗与LHRH-N-Mb、N-N-Mb结合率分别为75.6%、0.83%,两者比较有统计学差异($P<0.05$)。光镜下OVCAR-3细胞周围可见LHRH-N-Mb围绕或粘附,呈花环样结构,这种靶向结合能被生物素化的LHRH抗体预先阻断。**结论** 通过冷冻干燥超声法和生物素-亲和素桥连法,可成功制备靶向卵巢癌的纳米超声微泡造影剂,此微泡粒径小、稳定性高,且能体外靶向高效结合人卵巢癌OVCAR-3细胞。

[关键词] 促黄体生成素释放激素;纳米脂质体;超声造影剂;靶向性;卵巢癌
[中图法分类号] R737.31; R934; R981.9 [文献标志码] A

Preparation and characterization of luteinising-hormone releasing hormone nanoliposomal microbubbles specifically targeting ovarian cancer cells *in vitro*

Zhang Jinyi[1], Zhang Liping[1], Zhu Yuanfang[1], Li Wenjuan[1], Huang Shuying[1], Zhao Yajing[2], Li Pan[2], Wang Zhigang[2] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi Province, 330006; [2]Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To prepare luteinising-hormone releasing hormone (LHRH) nanoliposomal microbubbles specifically targeting ovarian cancer cells and characterize their physiochemical properties and *in vitro* targeting ability. **Methods** Lyophilization/sonication method was used to prepare non-targeting nanoliposomal microbubble (N-N-Mb). By using the biotin-avidin bridge method, conjugated biotinylated LHRH antibodies to N-N-Mb generated biotinylated LHRH nanoliposomal microbubble (LHRH-N-Mb) targeting specifically ovarian cancer cells. The morphology and shelf life of microbubbles was detected by light microscopy, and the particle size range and the surface potential were measured by zeta detector. The binding affinity of the secondary antibody with LHRH-N-Mb or N-N-Mb was determined by flow cytometry. The binding of LHRH-N-Mb to human OVCAR-3 ovarian cancer cells was detected by light microscopy. **Results** The rounded and uniformly distributed N-N-Mb and LHRH-N-Mb were successfully generated. The particle size was 372±45 nm with a mean of 360 nm for N-N-Mb, and 511±64 nm with a mean of 508 nm for LHRH-N-Mb. There was significant difference in the size between the 2 groups ($P<0.05$), while the surface potential of the 2 microbubbles remained no significant difference (-14.5±0.5 and -14.6±0.8 mV, $P>0.05$). After being kept at room temperature for 16 d, no significant difference of the LHRH-N-Mb's physiochemical properties

[基金项目] 国家自然科学基金(81060217,81130025);江西省科技支撑计划基金(2010BSA15000)
[通信作者] 朱元方,E-mail: zhuyf1027@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131104.0953.001.html(2013-11-04)

was detected compared with that of freshly prepared microbubbles. The secondary antibody binding rate of LHRH-N-Mb or N-N-Mb was 75.6% or 0.83% respectively, with significant difference ($P < 0.05$). Moreover, the rosette formation surrounding OVCAR-3 cells was observed under light microscope after cells were incubated with LHRH-N-Mb while pre-incubated biotinylated LHRH antibody blocked the rosette formation. **Conclusion** The LHRH nanoliposomal microbubbles specifically targeting ovarian cancer cells are successfully prepared through biotin-avidin mediation and lyophilization/sonication method. The key feature of LHRH nanoliposomal microbubbles are smaller size, stability and high efficiency of targeting human OVCAR-3 ovarian cancer cells *in vitro*.

[**Key words**] luteinizing-hormone releasing hormone; nanoliposomal ultrasound contrast agent; targeting; ovarian cancer

Supported by the National Natural Science Foundation (81060217, 81130025) and the Supporting Project of Science and Technology of Jiangxi Province (2010BSA15000). Corresponding author: Zhu Yuanfang, E-mail: zhuyf1027@163.com

卵巢癌死亡率居妇科恶性肿瘤之首[1],因其发病隐匿,80%的患者就诊时已属中晚期[2],因此如何早期定性、定位诊断卵巢癌是提高患者生存率的关键。目前应用的CA125和最新研究的人附睾分泌蛋白-4等血清学指标有助于提高卵巢癌的诊断,但其特异性低限制了它们在临床上的进一步应用[3-5]。随着超声造影技术的发展,人们开始把早期发现卵巢癌的目光投向了无创的超声分子显像[6]。超声分子显像的关键是制备纳米级、靶向性微泡造影剂。纳米级微泡造影剂具有血管穿透力强和聚集显像特点[7],回声反射极低的细微散射体穿透血管后大量聚集于病灶,在靶区产生明显增强信号,从而在增强靶区显影的同时保持了尽可能低的背景干扰。将特异性抗体或配体连接到微泡表面,构建出肿瘤靶向性微泡造影剂,为超声靶向显像肿瘤提供了新的思路。研究表明,促黄体生成素释放激素(luteinzing hormone-releasing hormone, LHRH)受体在卵巢癌细胞中过表达,而在正常组织中几乎不表达[8-9]。基于以上认识,如果将LHRH抗体链接到纳米级微泡表面,血管穿透力极强的纳米微泡到达靶区后,通过微泡表面连接的抗体与卵巢癌细胞表面过表达的LHRH受体结合,能选择性聚集并较长时间驻留于靶组织和器官,从而产生分子水平显像,显著提高超声对早期病变组织的检测能力。本研究主要探讨靶向卵巢癌的纳米超声微泡造影剂(LHRH-N-Mb)的制备,并验证其在体外对卵巢癌细胞的主动寻靶能力,为超声早期特异性显像卵巢癌提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、生物素化二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG2000-Biotin,美国Avanti),生物素化LHRH抗体、罗丹明羊抗兔-IgG(北京博奥森生物技术有限公司),全氟丙烷(C_3F_8,重庆医科大学超声影像学研究所),亲和素、人卵巢癌OVCAR-3细胞、McCoys 5A培养基(武汉博士德公司)。

1.2 细胞培养

OVCAR-3细胞用含10%灭活小牛血清的McCoys5A培养基培养,置于37 ℃、5% CO_2孵箱培养,每4~6天传代1次,实验取对数生长期细胞。

1.3 LHRH-N-Mb的制备

DPPC、DSPE-PEG-Biotin混合在容器里形成混悬液,经冷冻干燥法于西林瓶中冷冻干燥,待冻干处理后加入1 mL配制好的水合液(甘油,PBS)重新水合,然后缓慢注入全氟丙烷气体以置换西林瓶头部的空气,最后采用水平往复式超声机械振荡,振荡90 s,形成乳白色液体,4 ℃静置分层,弃去下清液。纯化微泡3次,收集上层乳白色液体加入1 mL PBS中,非靶向生物素化脂质纳米微泡(N-N-Mb)制备完毕。^{60}Co γ射线灭菌后,光学显微镜观察微泡形态、分布,zeta检测仪测定粒径分布、电位。取上述制备的100 μL N-N-Mb与饱和量的100 μg亲和素超声振荡反应30 min, 800 r/min离心5 min去下清液,PBS冲洗3次收集上层微泡。将所收集的上层微泡与饱和量的5 μg生物素化LHRH抗体超声振荡反应30 min,800 r/min离心5 min去下清液, PBS洗涤3次,收集上层微泡,靶向卵巢癌的纳米微泡造影剂制备完毕。灭菌后同法检测LHRH-N-Mb理化特性及室温下保存时间。

1.4 LHRH-N-Mb与二抗结合率测定

将罗丹明标记的二抗加入100 μL的LHRH-N-Mb,对照组将罗丹明标记的二抗加入含有亲和素的100 μL N-N-Mb,两组均37 ℃避光孵育30 min,洗涤后荧光显微镜下观察,流式细胞检测仪检测结合率。

1.5 体外寻靶与阻断实验

将OVCAR-3细胞与LHRH-N-Mb常温下孵育30 min,冲洗掉游离微泡,光镜下观察LHRH-N-Mb与细胞结合情况。预先将生物素化LHRH抗体与OVCAR-3细胞常温下共孵育30 min,再加入LHRH-N-Mb微泡常温下共孵育30 min,光学显微镜下观察LHRH-N-Mb与细胞结合情况。

1.6 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SAS 10.0 统计软件进行两独立样本比较 t 检验。

2 结果

2.1 N-N-Mb、LHRH-N-Mb 的理化性质

两种微泡理化性质见表 1。LHRH-N-Mb 外观圆整，分布均匀，无聚集，见图 1。室温下保存 16 d，粒径、电位与刚制备时无统计学差异（$P>0.05$）；17 d 后微泡开始变形，大小不一，有聚集现象，分布不均。

表 1 N-N-Mb、LHRH-N-Mb 的理化性质

微泡	颜色	分布与形态	粒径（nm）	电位（mV）
N-N-Mb	乳白色	均匀，外观圆整	372 ±45（集中于 360）	−14.5 ±0.5
LHRH-N-Mb				
新鲜制备	乳白色	均匀，外观圆整	511 ±64（集中于 508）[a]	−14.6 ±0.8
室温 16 d 后	乳白色	均匀，外观圆整	518 ±66（集中于 508）[a]	−14.8 ±0.7

a：$P<0.05$，与微泡 N-N-Mb 比较

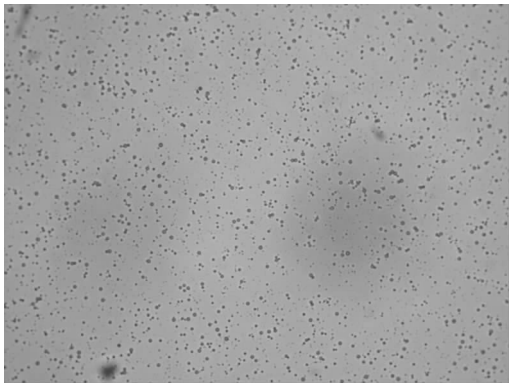
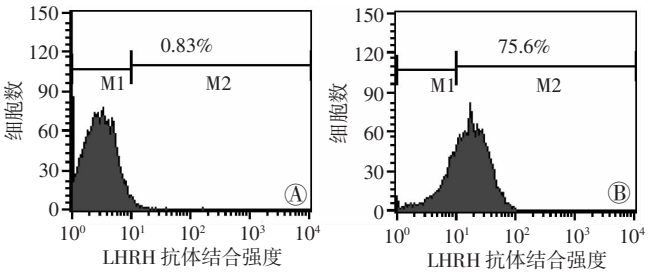


图 1 光镜下观察 LHRH-N-Mb 的分布 （×400）

2.2 LHRH-N-Mb 与二抗结合率

生物素化 LHRH 抗体通过亲和素与 N-N-Mb 连接，连续洗涤 4 次后，在荧光显微镜下仍然可观察到明亮的荧光，流式细胞检测显示 LHRH-N-Mb 与二抗结合率为 75.6%，见图 2A。而 N-N-Mb 与二抗结合极少，荧光显微镜下几乎无荧光亮度，流式细胞检测结合率仅为 0.83%，见图 2B，结合率比较有统计学差异（$P<0.05$）。



M1：阴性对照；M2：特异性结合

图 2 流式细胞仪检测纳米微泡 N-N-Mb（A）与 LHRH-N-Mb（B）与二抗结合率

2.3 体外寻靶与阻断实验

光镜下可见 LHRH-N-Mb 环绕或粘附于 OVCAR-3 细胞周围，呈花环样结构，见图 3。预先将生物素化 LHRH 抗体与 OVCAR-3 细胞共孵育后，细胞周围无 LHRH-N-Mb 环绕或粘附，未见花环形成，见图 4。

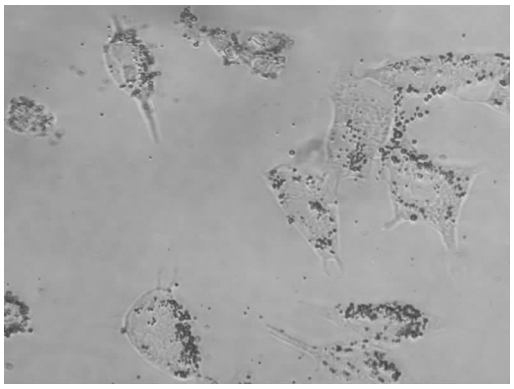


图 3 纳米微泡 LHRH-N-Mb 环绕 OVCAR-3 细胞周围形成花环样结构 （光镜 ×200）

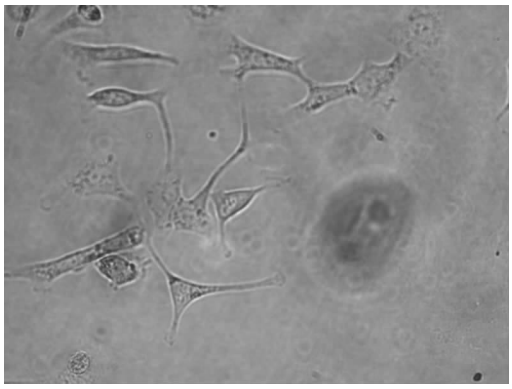


图 4 预先将生物素化 LHRH 阻断后，LHRH-N-Mb 与 OVCAR-3 不能结合 （光镜 ×200）

3 讨论

80% 的卵巢癌患者确诊时已属中晚期[2]，这是造成患者死亡率较高的重要原因。靶向超声分子显像技术为早期定性、定位诊断卵巢癌提供了可能。本研究对靶向超声分子显像中的关键技术——制备纳米级、靶向性微泡进行了探讨。

本实验通过冷冻干燥超声法和生物素-亲和素桥连法[10]制备出的 N-N-Mb 和 LHRH-N-Mb 粒径分别为（372 ±45）、（511 ±64）nm，集中于 360、508 nm。推测，LHRH-N-Mb 较 N-N-Mb 粒径偏大可能是生物素化 LHRH 抗体占据了空间。体外寻靶试验显示，过表达 LHRH 受体的人卵巢癌 OVCAR-3 细胞能与 LHRH-N-Mb 充分结合，形成花环，而预先用生物素化 LHRH 抗

体对 OVCAR-3 细胞表面受体进行饱和结合。细胞周围无 LHRH-N-Mb 环绕或粘附,未见花环形成,充分说明 LHRH-N-Mb 通过其表面链接的生物素化 LHRH 抗体与卵巢癌细胞表面上的受体实现了靶向结合。尽管本研究制备的 LHRH-N-Mb 粒径稍大,但还是处于纳米水平,在血管内皮间隙范围之内[11],血管穿透力极强的纳米微泡超声造影剂到达靶区后,通过表面链接的 LHRH 抗体与卵巢癌细胞表面高表达的 LHRH 受体结合,就能选择性聚集并较长时间驻留于靶组织和器官,回声反射极低的纳米细微散射体在靶区产生明显增强信号的同时又保持了尽可能低的背景噪声,因而 LHRH-N-Mb 是一种理想的分子显像造影剂。基于这种靶向造影剂介导的分子水平显像,理论上极大地提高了超声对早期卵巢癌的检测、分辨能力。另外,LHRH-N-Mb 性质稳定,常温下保存半个月其理化性质无改变,为 LHRH-N-Mb 用于下一步的体内实验提供了可能。

体外实验环境单一、干扰因素少。体内试验时,循环中的造影剂首先受到血液稀释浓度降低,还要克服在高速血流中强大的血管剪切力、机体的吞噬免疫反应等诸多破坏其稳定性的因素[12],因此,要想 LHRH-N-Mb 在体内实验中实现高效、靶向性,很大程度上要依赖生物素化 LHRH 抗体在纳米微泡表面的含量以及它与微泡的结合牢固程度。

生物素与亲和素间具有极高的亲和力,其反应呈高度专一。生物素化抗体与亲和素能快速结合,反应不受外界干扰且有高度特异性和稳定性,也不影响抗体的活性,不会在孵育和各种洗涤过程中脱落,而且在有机溶剂或变性剂较大的变化范围内均能稳定存在[10]。本实验以亲和素为中介,将生物素化 LHRH 抗体和 N-N-Mb 链接,制备出 LHRH-N-Mb,尽管多次冲洗,流式细胞仪检测结果显示二抗与微泡结合率仍有 75.6%,而 N-N-Mb 和二抗结合率仅为 0.83%。本研究在对照组中也添加了等剂量的亲和素,目的是排除在 LHRH-N-Mb 制备过程中添加的亲和素所致结合率增加,实验结果充分说明生物素化 LHRH 抗体能高效、牢固结合在纳米微泡表面,而这种高效、牢固结合正是 LHRH-N-Mb 在体内应用的前提条件。

尽管靶向性纳米微泡还存在较多问题,如其制备技术复杂,在血液中稳定性有待提高,还要克服抗体产生的免疫反应,但是,随着技术的改进和认识的深入,我们有理由相信靶向超声分子显像作为一种无创检测手段将在肿瘤的早期诊断中具有极大的研究价值和应用潜力。

参考文献:

[1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10 - 29.

[2] Bast R C Jr, Skates S, Lokshin A, *et al*. Differential diagnosis of a pelvic mass: improved algorithms and novel biomarkers[J]. Int J Gynecol Cancer, 2012, 22(Suppl 1): S5 - S8.

[3] Azzam A Z, Hashad D I, Kamel N A. Evaluation of HE4 as an extra-biomarker to CA125 to improve detection of ovarian carcinoma: is it time for a step forward? [J]. Arch Gynecol Obstet, 2013, 288(1): 167 - 172.

[4] Varga D, Deniz M, Schwentner L, *et al*. Ovarian cancer: in search of better marker systems based on DNA repair defects[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(1): 640 - 673.

[5] Arits A H, Stool J E, Botterweck A A, *et al*. Preoperative serum CA125 levels do not predict suboptimal cytoreductive surgery in epithelial ovarian cancer[J]. Int J Gynecol Cancer, 2008, 18(4): 621 - 628.

[6] Willmann J K, Kimura R H, Deshpande N, *et al*. Targeted contrast-enhanced ultrasound imaging of tumor angiogenesis with contrast microbubbles conjugated to integrin-binding knottin peptides[J]. J Nucl Med, 2010, 51(3): 433 - 440.

[7] Rapoport N Y, Nam K H, Gao Z, *et al*. Application of ultrasound for targeted nanotherapy of malignant tumors[J]. Acoust Phys, 2009, 55(4/5): 594 - 601.

[8] Volker P, Grundker C, Schmidt O, *et al*. Expression of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in human ovarian and endometrial cancers: frequency, autoregulation, and correlation with direct antiproliferative activity of luteinizing hormone-releasing hormone analogues [J]. Am J Obstet Gynecol, 2002, 186(2): 171 - 179.

[9] Engel J B, Schally A V, Buchholz S, *et al*. Targeted chemotherapy of endometrial, ovarian and breast cancers with cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)[J]. Arch Gynecol Obstet, 2012, 286(2): 437 - 442.

[10] Reches M, Gazit E. Biological and chemical decoration of peptide nanostructures *via* biotin-avidin interactions [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2007, 7(7): 2239 - 2245.

[11] Oeffinger B E, Wheatley M A. Development and characterization of a nano-scale contrast agent [J]. Ultrasonics, 2004, 42(1/9): 343 - 347.

[12] Diaz-Lopez R, Tsapis N, Santin M, *et al*. The performance of PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as an ultrasound contrast agent[J]. Biomaterials, 2010, 31(7): 1723 - 1731.

(**收稿**:2013-06-09;**修回**:2013-08-15)

(编辑 郭建秀)