DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.06.004
第24卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 6
634 2002年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)06-0634-02

磁共振单克隆抗体免疫靶向对比剂 McAb-DMP 的制备

陈 伟[1],张绍祥[2], 雒义[1],任建敏[3] (第三军医大学:[1]附属西南医院放射科;[2]基础医学部解剖学教研室;[3]医学检验系分析化学教研室;重庆 400038)

提 要:目的 探讨磁共振单克隆抗体靶向对比剂McAb-DMP的制备方法。方法 以葡聚糖为载体,采用氧化法制备免疫靶向磁性微粒。结果 制备的磁性纳米微粒与单抗相比保持了较高的结合活性和免疫活性。结论 合成CEA单克隆抗体标记磁性微粒,保证了结合活性免疫活性,为活体动物实验奠定了基础。

关键词:磁共振;单抗;葡聚糖;磁性微粒
中图法分类号:R392.11;R817 文献标识码:A

Preparation of dextran-magnetite particles coated with CL-3 monoclonal antibody as targeting contrast agent for MRI

CHEN Wei, ZHANG Shao-xiang, DING Shi-yi, REN Jian-min (Department of Radiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore a preparing method for MRI target contrast agent, dextran-magnetite particles coated with CL-3 monoclonal antibody (McAb-DMP). Methods With dextran as carrier, McAb-DMP particles was prepared by periodate procedure. The immune activities of the prepared particles were determined with ELISA. Results McAb-DMP particles had a higher binding activity with periodate sodium at an amount of substance ratio of 1∶2, and kept better immune activity compared with unbound McAb. Conclusion McAb-DMP particles guarantee the binding and immune activity in compared with McAb, providing a basis for *in vivo* study on animals

Key words: magnetic resonance imaging; monoclonal antibody; dextran; magnetite particles

超顺磁性氧化铁纳米微粒已作为肝脾MRI对比剂[1,2],由于网状内皮系统的吞噬,微粒有效地从血液中清除,微粒大小和表面化学特性强烈影响微粒的生物分布。应用不同载体,磁性纳米微粒直接特异性到达靶组织,能够被肝细胞相应的受体识别[3,4]。作为生物和医用磁性纳米材料,磁性纳米材料可结合各种功能分子,如酶、抗体、细胞、DNA或RNA等。单克隆抗体与超顺磁性氧化铁微粒期望得到针对恶性肿瘤高度特异性的靶向对比剂。为获得单克隆抗体携带更多的氧化铁粒子,以少量的抗体能够得到发挥理想的MR增强效果的免疫磁性靶向对比剂,本实验采用常用载体葡聚糖,以结肠癌单克隆抗体CL-3标记磁性粒子制备纳米级免疫靶向磁性微粒。

1 材料与方法

1.1 葡聚糖靶向磁性纳米微粒的制备

葡聚糖磁性纳米微粒(Dextran-magnetite particles, DMP)的制备:称取一定量的$FeCl_3 \cdot 6H_2O$和$FeCl_2 \cdot 4H_2O$,用蒸馏水稀释至一定量,摇匀,加入适量的乳化剂聚乙烯醇(PVA),调节pH值至7.0,再加入葡聚糖(Dextran)。该混合液在磁力搅拌下充分搅拌,同时升温至70 ℃,保温30 min。搅拌下缓慢滴入NH_4OH,反应60 min,用乙酸调至中性,加入分散剂适量,摇匀,在超声中处理20 min,得到黑色胶体溶液[2],在小瓶内冷冻-20 ℃保存备用。称取DMP分成4份,每份加水20 ml冻干燥,溶解,然后依据高碘酸钠($NaIO_4$)与葡聚糖的摩尔比分别为1∶1、1∶2、1∶4、1∶8向4管中加入浓度为0.1 mol/L的$NaIO_4$,在室温下避光反应1 h。再用去离子水在半透膜中充分透析,分别装在小瓶中冷冻干燥,-20 ℃保存备用。

醛化程度的DMP10 mg,加入0.01 mol/L pH 7.2的PBS缓冲液1 ml充分溶解,每管再加入CL-3单克隆抗体1 ml(1 mg/ml),4 ℃反应24 h,反应混合物再与高碘酸钠等摩尔的硼氢化钠4 ℃还原2 h,离心,SePhacry S-300凝胶过柱,收集首峰。扫描电镜测量100个微粒观测微粒有效粒径。

1.2 免疫靶向磁性微粒体外试验

1.2.1 形态分析及粒径测量 靶向磁性微粒的形态在扫描电镜下观察,通过测量100个微粒估计McAb-PMP靶向微粒的直径。

1.2.2 McAb-PMP免疫活性 采用ELISA方法判定McAb-PMP、CEA、PMP、非特异性鼠IgG与LS-174T和QGY-7703细胞的免疫结合活性。

2 结果

2.1 McAb-DMP的粒径分布和形态

本实验采用扫描电镜和激光光散射系统对McAb-DMP微粒作了粒径和形态的检测。从检测结果看,粒径为223~332 nm,平均粒径为308 nm,粒径分布较窄。McAb-DMP微粒的形态呈圆形和椭圆球形,较规则。

2.2 McAb-DMP结合活性

在合成多醛基磁性纳米微粒时,分了4组,每组氧化剂$NaIO_4$与Dextran的不同摩尔比分别为1∶7、1∶4、1∶2和1∶1。检测结果分别为35%、42%、60%、49%,从中可以看出氧化剂与葡聚糖的比例为1∶2时,DMP所连接的抗体比例最高。

2.3 McAb-DMP免疫活性

McAb-DMP的免疫活性根据ELISA判定,McAb-DMP与LS-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39925022)
作者简介:陈 伟(1970-),男,四川省金堂县人,博士,主治医师,主要从事磁共振靶向对比剂研究,发表论文6篇。电话:(023)68754424
收稿日期:2002-03-11;修回日期:2002-05-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

174T 的免疫活性是 CEA 单抗与 LS-174T 的 75%, 而与 QGY-7703 的免疫活性 5.1%。DMP 与 LS-174T 及 QGY-7703 的免疫活性为 4.2%和 3.4%, 非特异性 IgG 与 LS-174T 及 QGY-7703 的免疫活性为 3.5%和 2.4%。说明在与葡聚糖磁性微粒结合后, 单克隆抗体的免疫活性仅下降 25%, 此方法保持了抗体的较高的免疫活性, 见图 1。

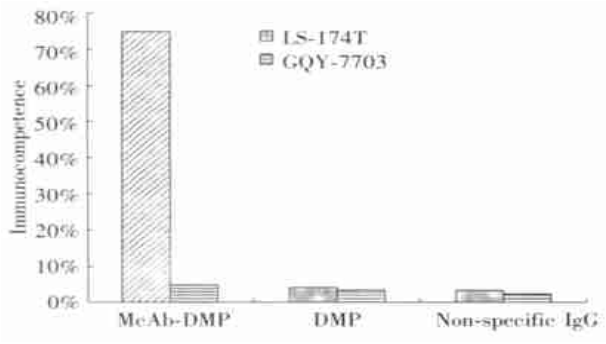


图 1　McAb-DMP 免疫活性

Fig 1　Immunocompetence of McAb-DMP

3　讨论

“纳米医学”(Nanomedicine)是纳米科技的一个新分支, 是运用纳米科技的理论与方法, 在传统医学和现代医学的基础上, 开展医学研究与实践的新兴边缘学科。纳米微粒粒径 1~1 000 nm, 作为理想的静脉注射药物载体是近年来药学研究的热点, 药物可以溶解或包裹于纳米微粒中, 纳米微粒可用作缓释、靶向注射剂或用于保护药物。在构建体内长循环纳米粒时较好的粒径范围为 1~300 nm。对纳米粒包衣, 可改变其表面性质, 如: 电荷、亲水性等。以往的研究多集中于非生物降解的纳米粒, 近年对可生物降解的纳米粒的表面修饰。Borchard 等[5] 分别用血浆蛋白和血清补体对聚甲基丙烯酸甲酯[Poly(methy methacrylate), PMMA] 纳米粒包衣, 研究包衣前后单核细胞吞噬系统(RES)对纳米粒的摄取情况。结果表明, 血浆蛋白包衣可被 RES 摄取。纳米粒表面修饰后可降低肝脏蓄积, 从而有利于非肝位病灶的导向诊断和治疗。本研究采用以单克隆抗体修饰磁性纳米粒后, 与肿瘤细胞的 CEA 抗原结合, 表现明显的特异性结合。在 MRI 诊断中, 磁性纳米微粒已被广泛应用[6], 静脉注射 SPIO 对比剂以后, 肝脏内的网状内皮细胞吞噬氧化铁颗粒, 而恶性肿瘤细胞仅含有极少量的库普弗细胞, 没有大量吸收氧化铁的作用, SPIO 对比剂就是利用正常细胞和恶性肿瘤细胞之间的这种功能差别, 显示出其对这些病灶诊断的特异性, SPIO 对比剂在正常细胞和肿瘤细胞的数量不同, 会造成信号强度的差别, 这种差别在磁共振图像中, 由于正常组织吸收 SPIO 对比剂表现为低信号, 而病灶不吸收纳米氧化铁表现为亮的高信号。这样, 病灶与正常组织在磁共振图像上会有较大的对比。本研究利用 CEA 单克隆抗体作为导向剂, 以结肠癌为靶向, 将磁性纳米氧化铁微粒引导到结肠癌所在的部位由于磁性纳米微粒的超顺磁性特性。有关纳米粒的制备方法较多[7~10], 依据纳米粒形成机制的不同可分为两种, 聚合反应法和聚合材料分散法。聚合反应法制备的纳米粒由聚合反应生成, 主要采用乳化聚合法和界面缩聚法。乳化聚合法获得的纳米粒, 粒径一般为 300 nm 左右, 当加有非离子表面活性剂时, 粒径可减小。该法的优点是制备工艺简单, 利于规模生产。与乳化聚合法相比, 界面聚合法适合包封脂溶性药物, 且载药量较高。聚合材料分散法制备的纳米粒由大分子或聚合物分散制得。在对纳米粒进行表面修饰而制备体内长循环纳米粒时多采用聚合材料分散法。其中“乳化-蒸发”法最为常用, 用这种方法制备长循环纳米粒时可以将起稳定作用的表面活性剂溶于水构成水相, 将聚合材料与起表面修饰作用的表面活性剂和药物溶于一定的有机溶媒构成有机相, 在高速搅拌或超声的条件下将二者混合形成 o/ω 的乳滴, 然后蒸发除去体系中的有机溶媒而得到表面修饰的纳米粒。本实验制备纳米微粒采用乳化聚合法, 制备工艺简单, 在常规的实验条件下可以完成合成。纳米粒载体之所以如此引人注目, 一个重要原因就是它可以改变药物的体内分布, 显示体内分布的靶向性, 这就是所谓的靶向释药。载药纳米粒大多经脉管给药, 以达到靶向释药的目的。将 McAb 共价交联或吸附到纳米粒表面形成具有免疫活性的纳米粒的研究也取得令人鼓舞的体外试验结果。本研究采用的方法合成 CEA 单克隆抗体标记磁性微粒, 将其有效粒径控制在纳米级, 这些微粒在溶液中呈悬浮状态, 保证其结合活性免疫活性, 为活体动物实验奠定了基础。

参考文献:

[1] Jung C W, Jacobs P. Physical and chemical properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil[J]. Magn Reson Imaging, 1995, 13(3): 661—674.

[2] Reimer P, Rummeny E J, Daldrup H E, *et al*. Clinical results with Resovist: a phase 2 clinical trial[J]. Radiology, 1995, 195(2): 489—496.

[3] Leander P. Liver-specific contrast media for MRI and CT experimental studies[J]. Acta Radiol, 1995, 396[Suppl]: 1—36.

[4] Reimer P, Bader A, Weissleder R. Preclinical assessment of hepatocyte-targeted MR contrast agents in stable human liver cell cultures[J]. J Magn Reson Imaging, 1998, 8(3): 687—689.

[5] Borchard G, Kreuter J. The role of serum complement on the organ distribution of intravenously administered poly(methyl methacrylate) nanoparticles: effects of pre-coating with plasma and with serum complement[J]. Pharm Res, 1996, 13(7): 1 055—1 058.

[6] Tiefenauer L X, Tschirky A, KKne G, *et al*. *In vivo* evaluation of magnetite nanoparticles for use as a tumor contrast agent in MRI[J]. Magn Reson Imaging, 1996, 14(4): 391—394.

[7] Allemann E. Drug-loaded nanoparticles—preparation methods and drug targe tingissues[J]. Eur J Pharm Biopharm, 1993, 39(5): 173—191.

[8] Fresta M, Cavallaro G, Giammona G, *et al*. Preparation and characteization of polyethyl-2-cyanoacrylate nanoparticles containing antiepileptic drugs[J]. Biomaterials, 1996, 17(8): 751—756.

[9] Ueda M, Kreuter J. Optmization of the preparation of loperamide-loaded poly(L-lactide) nanoparticles by high pressure emulsification-solvent evaporation[J]. J Microencapsul, 1997, 14(5): 593—595.

[10] Zambaux M F, Bonneaux F, Gref R, *et al*. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method[J]. J Controlled Release, 1998, 50(1): 31—33.

（编辑　郭健秀）

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net