

❖ 实验研究

## Preparation of LHRHa-targeted microbubbles contrast agent and targeting study in vitro

GUO Juan<sup>1</sup>, CHANG Shu-fang<sup>1\*</sup>, SUN Jiang-chuan<sup>1</sup>, YAN Yu<sup>1</sup>,  
LIAO Yong-ling<sup>1</sup>, WANG Zhi-gang<sup>2</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**[Abstract]** **Objective** To prepare targeted microbubbles targeting ovarian cancer cells, and to assess its targeting ability in vitro. **Methods** The biotinylated luteinizing hormone releasing hormone analog (LHRHa) peptides were conjugated to the biotinylated microbubbles via streptavidin, and then were observed with fluorescence microscope. The LHRHa carrying microbubbles were added into A2780/DDP cells to observe the adherence of the targeted microbubbles to the cells, and normal microbubbles were used as control. **Results** Fluorescence was expressed on the targeted microbubbles shell in vitro. The LHRHa carrying microbubbles could adhere to the A2780/DDP cells specifically, whereas there was no adherence of normal microbubbles to the A2780/DDP cells. **Conclusion** The LHRHa carrying microbubbles having targeting ability in vitro can be successfully constructed via biotin-streptavidin binding.

**[Key words]** Microbubbles; Biotin-streptavidin complex; Gonadotropin-releasing hormone; Ovarian neoplasms

## LHRHa 靶向微泡造影剂的制备及体外寻靶实验

郭娟<sup>1</sup>, 常淑芳<sup>1\*</sup>, 孙江川<sup>1</sup>, 严宇<sup>1</sup>,  
廖永玲<sup>1</sup>, 王志刚<sup>2</sup>

(1. 重庆医科大学附属第二医院妇产科, 重庆 400010;  
2. 重庆医科大学超声影像研究所, 重庆 400010)

**[摘要]** **目的** 制备人卵巢癌靶向超声造影剂, 观察其体外寻靶能力。 **方法** 采用生物素-链霉亲和素法制备促黄体生成素释放激素类似物(LHRHa)靶向脂质微泡, 以免疫荧光染色验证 LHRHa 与脂质微泡的结合情况, 并以普通脂质微泡作为对照, 在倒置显微镜下观察 LHRHa 靶向脂质微泡对人卵巢癌 A2780/DDP 的体外寻靶能力。 **结果** LHRHa 靶向脂质微泡免疫荧光阳性; 体外寻靶实验显示 LHRHa 靶向脂质微泡能够与表面存在 LHRH 受体的 A2780/DDP 细胞特异性结合, 而普通脂质微泡则不能结合。 **结论** 利用生物素-链霉亲和素方法可成功制备 LHRHa 靶向脂质微泡造影剂, 该靶向造影剂具有体外寻靶能力。

**[关键词]** 微泡; 生物素-链霉亲和素复合体; 促性腺激素释放激素; 卵巢肿瘤

**[中图分类号]** R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2011)03-0466-04

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30801228)、重庆市自然科学基金(CSTC, 2008BB5405)、重庆市卫生局项目(07-2-098)。

**[作者简介]** 郭娟(1983—), 女, 江西萍乡人, 在读硕士。研究方向: 妇科肿瘤研究。E-mail: guojuan19830420@163.com

**[通讯作者]** 常淑芳, 重庆医科大学附属第二医院妇产科, 400010。E-mail: shfch2004@163.com

**[收稿日期]** 2010-11-01 **[修回日期]** 2010-12-04

卵巢癌是妇科常见的三大恶性肿瘤之一,早期诊断困难,死亡率居三大恶性肿瘤之首位。早期诊断卵巢癌在改善其预后中十分重要。近年来,靶向超声造影剂成为研究热点。在微泡造影剂表壳通过共价或非共价方式连接特异性肽链或抗体,与靶组织及细胞表面的特异性受体或抗原结合,达到靶向显影目的,是一种具有巨大发展潜力的肿瘤诊断技术。本研究以表面存在 LHRH 受体的卵巢癌细胞 A2780/DDP 为靶细胞,采用生物素-链霉亲和素非共价结合方式制备靶向促黄体生成素释放激素类似物(luteinizing hormone releasing hormone analog, LHRHa)脂质微泡,观察其体外寻靶能力,为卵巢癌的诊治提供新的思路。

## 1 材料与方 法

1.1 主要材料 普通脂质微泡造影剂、生物素化脂质微泡(重庆医科大学附属第二医院超声影像研究所提供),卵巢癌 A2780/DDP 细胞(华中科技大学同济医学院协和医院王泽华教授馈赠),生物素化 LHRH 类似物,序列 pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-leu-leu-Arg-Pro-NH<sub>2</sub>(北京中科亚光生物科技有限公司),链霉亲和素(北京博奥森生物技术有限公司),兔抗人 LHRH 多

克隆抗体(Chemicon International, Inc),罗丹明标记山羊抗兔 IgG(北京博奥森),新生小牛血清(哈森),RPMI1640 培养液(Hyclone)。

1.2 卵巢癌 A2780/DDP 细胞培养 卵巢癌 A2780/DDP 细胞用含 10% 灭活的小牛血清的 RPMI1640 培养,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养,每 2~3 天传代一次,实验取对数生长期细胞。

1.3 LHRHa 生物学活性鉴定 取对数生长期的 A2780/DDP 细胞消化离心后,加含 10% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养液制成细胞悬液,调整细胞浓度为  $5 \times 10^4$  /ml,接种于 96 孔板,每孔 200  $\mu$ l,于孵箱内培养过夜后取出,PBS 洗涤 3 次,用多聚甲醛固定 30 min 后,PBS 洗涤 3 次,加入 4% BSA 封闭 30 min,加入生物素化 LHRHa 反应 30 min,PBS 洗涤 3 次,再加入抗 LHRH 多克隆抗体,4℃ 过夜,PBS 洗涤 3 次,加入罗丹明标记的山羊抗兔 IgG 室温避光反应 30 min,PBS 洗涤 3 次,在荧光显微镜下观察生物素化 LHRHa 与细胞的结合。实验中以生物素化 LHRHa 与 LHRH 受体阴性的 Skov3 细胞反应,作阴性对照。

1.4 靶向微泡的制备 ①取  $1 \times 10^8$  /ml 的生物素化

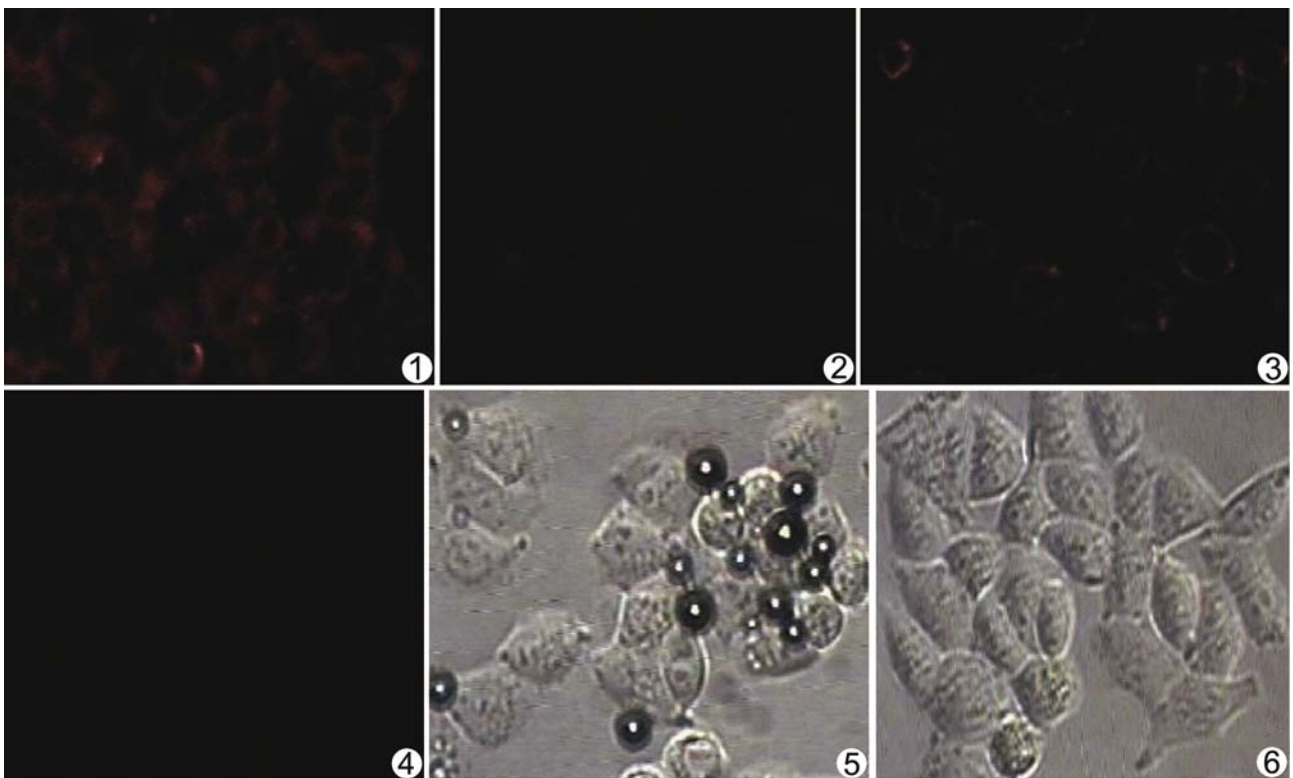


图 1 生物素化 LHRHa 与 A2780/DDP 细胞反应( $\times 200$ ) 图 2 生物素化 LHRHa 与 Skov3 细胞反应( $\times 200$ ) 图 3 生物素化微泡与生物素化 LHRHa, 抗 LHRH 抗体与相应荧光二抗反应( $\times 200$ ) 图 4 普通微泡与生物素化 LHRHa, 抗 LHRH 抗体与相应荧光二抗反应( $\times 200$ ) 图 5 A2780/DDP 与 LHRHa-脂质微泡反应( $\times 200$ ) 图 6 A2780/DDP 细胞与普通微泡反应( $\times 200$ )

脂质微泡以及普通脂质微泡各 1 ml 分别与 1 mg 链霉亲和素振荡反应 30 min, 800 rpm 离心 5 min 去下清液, PBS 洗涤 3 次, 收集上层微泡。②将所收集的上层微泡与 50  $\mu\text{g}$  生物素化 LHRHa 振荡反应 30 min, 800 rpm 离心 5 min 去下清液, PBS 洗涤 3 次, 收集上层微泡。

1.5 靶向微泡的鉴定 将制备好的 LHRHa 靶向脂质微泡及普通脂质微泡分别与适量的兔抗人 LHRH 多克隆抗体 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 以 PBS 洗涤 3 次, 去除游离的多克隆抗体, 收集上层微泡, 再加入相应的 TRITC 标记的山羊抗兔 IgG, 室温下避光孵育 30 min, 再用 PBS 洗涤 3 次, 在荧光显微镜下观察两种微泡形态。

1.6 LHRHa 靶向脂质微泡与 A2780/DDP 细胞的结合实验 取对数生长期的 A2780/DDP 消化离心后, 加入含 10% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养液制成细胞悬液, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^4/\text{ml}$ , 接种于 96 孔板, 每孔 200  $\mu\text{l}$ , 于孵箱内培养过夜后取出, 分别加入 LHRHa 靶向脂质微泡及普通脂质微泡, 反应 30 min, PBS 洗涤 3 次, 加入 100  $\mu\text{l}$  培养液, 显微镜下观察两种微泡与细胞的结合情况。

## 2 结果

2.1 普通微泡与 LHRHa 靶向微泡特性 采用 Zetasizer 3000HS 激光粒径仪测定微泡。普通脂质微泡粒径为  $(1542.1 \pm 428.8)\text{nm}$ , 电位最大值为 15.9 mV, 最小值为 -22.2 mV, 中位数为 -3.8 mV。LHRHa 靶向微泡粒径为  $(2626.8 \pm 202.0)\text{nm}$ , 电位最大值为 9.5 mV, 最小值为 -22.2 mV, 中位数为 -5.3 mV。

2.2 生物素化 LHRHa 生物学活性鉴定 荧光显微镜下见 LHRH 受体阳性的 A2780/DDP 细胞表面呈红色荧光(图 1), 而 LHRH 受体阴性的 Skov3 细胞表面无荧光(图 2), 提示人工合成生物素化 LHRHa 可与 LHRH 受体阳性的 A2780/DDP 细胞特异性结合, 并能与 TRITC 标记的相应二抗反应。

2.3 靶向微泡的鉴定 荧光显微镜下见 LHRHa 靶向脂质微泡表面呈红色荧光(图 3), 而普通脂质微泡表面无荧光(图 4), 提示本实验构建的 LHRHa 脂质微泡表面存在 LHRHa 肽链, 且能与相应的二抗结合。普通微泡表面不存在 LHRHa 肽链, 故不能与荧光标记的二抗结合。

2.4 靶向微泡与 A2780/DDP 细胞的结合试验 光镜下见 LHRHa 靶向脂质微泡结合于 A2780/DDP 细胞表面(图 5), 而非靶向普通脂质微泡则不能与其结合(图 6), 提示本实验构建的 LHRHa-脂质微泡具有与

LHRH 受体阳性的 A2780/DDP 细胞靶向结合特性。

## 3 讨论

随着对肿瘤表面特异性抗原研究的深入及超声微泡造影剂合成技术的发展, 将肿瘤特异性抗原连接于超声微泡造影剂表面达到对肿瘤靶向诊断及治疗成为研究热点<sup>[1-5]</sup>。LHRH 是一种小分子多肽抗原, 文献<sup>[6]</sup>报道大部分卵巢癌细胞表面过度表达 LHRH 受体, 而在正常组织或细胞几乎不表达。贺娟等<sup>[4]</sup>采用共价结合法合成 LHRH 靶向脂质微泡造影剂, 主要利用微泡表面的活性基团与配体的活性基团发生化学反应形成共价键, 连接紧密, 但化学基团发生反应的条件不易控制。采用生物素亲和素方法进行靶向脂质微泡连接实验条件相对易于控制, 是国内外应用较多的一种靶向微泡制备方法<sup>[2-3, 5, 7]</sup>, 但利用生物素亲和素合成 LHRHa 靶向脂质微泡造影剂目前国内外鲜见报道。本研究采用生物素-链霉亲和素方法合成 LHRHa 靶向脂质微泡造影剂, 将生物素化的微泡与抗生物素蛋白孵育结合, 再将生物素化的靶向配体结合于抗生物素蛋白上, 从而构建出配有特定配体的主动靶向超声微泡造影剂; 脂质特性<sup>[8]</sup>使其表面能够更好地修饰, 有利于其与配体的结合。研究<sup>[9-10]</sup>指出生物素化的脂质微泡表壳所含有的 PEG(2000)biotin 对于构建靶向微泡起着非常重要的作用, 其伸出微泡表面在微泡与配体之间起连接带的作用, 形成更多的活动空间以减少空间位阻, 更加有利于微泡与配体的结合。本实验通过生物素-链霉亲和素非共价结合的方式, 成功地将生物素化 LHRHa 连接于生物素化脂质微泡的表壳, 提示人工合成生物素化 LHRHa 脂质微泡可与 LHRH 受体阳性的 A2780/DDP 细胞特异性结合, 并能与相应二抗反应, 使微泡外壳发出红色荧光, 这也证明该靶向微泡在体外保持良好的生物学活性, 为进一步的实验奠定良好的基础。普通脂质微泡表面不存在 LHRHa 肽链, 无法与相应的荧光标记的二抗结合。

天然的 LHRH 为十肽, 在体内半衰期非常短, 约为 2~4 min。为得到长效 LHRH, 本实验设计将天然 LHRH 序列第 6 位及第 10 位氨基酸进行修饰, 得到 LHRH 类似物(LHRHa), 加强其在体内的稳定性, 为进一步实验做准备。实验表明生物素化 LHRHa 能够与过度表达 LHRH 受体的 A2780/DDP 细胞<sup>[6]</sup>特异性结合, 而对于 LHRH 受体阴性的 Skov3 细胞<sup>[11-12]</sup>则未能结合, 证实其具有特异性。选择配体 LHRHa 制成的 LHRHa 脂质微泡是用于卵巢癌治疗的比较

理想的靶向制剂。

普通超声微泡造影剂因缺乏对病变组织的特殊亲和力,不能有效驻留靶组织。卵巢肿瘤表面存在与正常细胞相区别的抗原及受体,可以作为靶向结合位点,将特异性配体连接到微泡造影剂表面,使其能主动结合到靶组织或靶器官相应的受体,以达到靶向诊断及治疗的目的。通过体外寻靶实验证明,LHRHa 靶向微泡能够主动结合到卵巢癌 A2780/DDP 细胞表面,而且结合牢固,经 PBS 反复洗涤 3 次后不脱落;而普通微泡表面无 LHRHa 肽链,无法结合到 A2780/DDP 细胞表面。

LHRHa 靶向超声造影剂具有高度特异性、敏感性、无创、无辐射等优点。但目前仍有许多问题,如靶向微泡的稳定性、与靶组织的结合效率以及潜在的免疫反应等,有待进一步研究解决。

#### [参考文献]

- [1] Dayton PA, Pearson D, Clark J, et al. Ultrasonic analysis of peptide-and antibody-targeted microbubble contrast agents for molecular imaging of  $\alpha_v\beta_3$ -expressing cells. *Mol Imaging*, 2004, 3(2):125-134.
- [2] Willmann JK, Paulmurugan R, Chen K, et al. US imaging of tumor angiogenesis with microbubbles targeted to vascular endothelial growth factor receptor type 2 in mice. *Radiology*, 2008, 246(2):508-518.
- [3] Weller GE, Wong MI, Modzelewski RA, et al. Ultrasonic imaging of tumor angiogenesis using contrast microbubbles targeted via the tumor-binding peptide arginine-arginine-leucine. *Cancer Res*, 2005, 65(2):533-539.
- [4] 贺娟,孙江川,常淑芳,等.人卵巢癌靶向超声造影剂的制备及其体外寻靶能力观察. *中国医学影像技术*, 2009, 25(6):929-931.
- [5] 周力学,朱军,丁红,等.绒癌细胞靶向微泡造影剂结合特性研究. *南方医科大学学报*, 2007, 27(11):1706-1708.
- [6] Dharap SS, Wang Y, Chandna P, et al. Tumor-specific targeting of an anticancer drug delivery system by LHRH peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(36):12962-12967.
- [7] Rychak JJ, Lindner JR, Ley K, et al. Deformable gas-filled microbubbles targeted to P-selection. *J Control Release*, 2006, 114(3):288-299.
- [8] Ferrara KW, Borden MA, Zhang H. Lipid-shelled vehicles: engineering for ultrasound molecular imaging and drug delivery. *Acc Chem Res*, 2009, 42(7):881-892.
- [9] Klibanov AL. Ligand-carrying gas-filled microbubbles: ultrasound contrast agents for targeted molecular imaging. *Bioconjug Chem*, 2005, 16(1):9-17.
- [10] Kheirrolomoom A, Dayton PA, Lum AF, et al. Acoustically-active microbubbles conjugated to liposomes: characterization of a proposed drug delivery vehicle. *J Control Release*, 2007, 118(3):275-284.
- [11] Dharap SS, Minko T. Targeted proapoptotic LHRH-BH3 peptide. *Pham Res*, 2003, 20(6):889-896.
- [12] Nagy A, Schally AV. Targeting of cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analogs to breast, ovarian, endometrial and prostate cancers. *Biol Reprod*, 2005, 73(5):851-859.

## 消 息

《中国医学影像技术》编辑部于 2010 年 5 月 4 日开始启用远程编辑系统办公,作者投稿请登录本刊网站([www.cjmit.com](http://www.cjmit.com))主页,点击左上角“作者登录”进入,第一次投稿需完成作者注册;专家审稿请点击“审稿登录”进入。

为了便于广大作者、读者查阅本刊文献,本站提供从 2000 年起的过刊全文检索,现刊摘要检索。