

## ❖ 实验研究

## Preparation of liposome ultrasonic contrast agent with ligand peptide K237

HE Jie<sup>1</sup>, YANG Li<sup>2</sup>, LI Ying-jia<sup>1\*</sup>, SUN Xue-gang<sup>3</sup>, DIAO Jian-xin<sup>3</sup>,  
LI Chuan-gang<sup>4</sup>, BIN Jian-ping<sup>4</sup>, GONG Wei-bing<sup>1</sup>

(1. Department of Ultrasound, 4. Department of Cardiology, Nanfang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Pharmaceutical College, 3. Traditional Chinese Medical College, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China)

**[Abstract]** **Objective** To assess preparation method of a new kind of targeted liposome ultrasonic contrast agent with small peptide K237 as the ligand which can combine specifically with KDR as the main receptor of VEGF. **Methods** Targeted bubbles (P-Bio-Av-Bio-Mbs) were formed through "biotin-avidin" bridge grafting. Flow cytometry screening was performed to explore the best dose of the ligands, then targeted-bubbles were incubated respectively with LOVO and LS174T which were KDR expressed in different cells. Meanwhile, rosette formation rate was calculated. **Results** The bubble surface's avidin-carrying rates were significant different ( $P < 0.05$ ) on different dosages of avidin (0, 2, 6, 10, 30  $\mu\text{g}$ ). When  $M_{\text{avidin}} = 6 \mu\text{g}$ , the avidin labelling ratio reached plateau. There were significant differences in the ratio of peptide K237 labelling ( $P < 0.05$ ) as different peptide dosages (0, 30, 40, 50, 60, 70, 100  $\mu\text{g}$ ). When  $M_{\text{K237}} = 50 \mu\text{g}$ , the peptide labelling ratio reached plateau. In KDR sharply positive expressed LOVO cells, the surrounding rosette formation rate was as high as 90.52% with strong fluorescence intensity. Targeted microbubbles decreased as the water velocity increased. When the velocity reached 99 ml/h, rosette formation still could be seen surrounding the targeted cells. **Conclusion** KDR-targeted liposome contrast agent with small peptide liganded has been successfully prepared through biotin-avidin mediation, and showed special targeting ability and stability in vitro. Flow cytometry can quantitatively analyze the best dose of ligands carrying targeted microbubbles.

**[Key words]** Microbubbles; Flow cytometry

## 以短肽 K237 为配体的靶向脂质体超声造影剂构建方法

何 洁<sup>1</sup>, 杨 莉<sup>2</sup>, 李颖嘉<sup>1\*</sup>, 孙学刚<sup>3</sup>, 刁建新<sup>3</sup>, 李传刚<sup>4</sup>, 宾建平<sup>4</sup>, 龚渭冰<sup>1</sup>

(1. 南方医科大学南方医院超声科, 4. 心内科, 广东 广州 510515; 2. 南方医科大学药学部,  
3. 中医学院, 广东 广州 510515)

**[摘要]** **目的** 探讨以与血管内皮生长因子(VEGF)的主要受体 KDR 特异性结合的短肽 K237(P)为配体制备靶向脂质体超声造影剂(P-Bio-Av-Bio-Mbs)的方法。**方法** 采用生物素-亲和素桥接法构建 P-Bio-Av-Bio-Mbs, 流式细胞术筛选最佳配体适配剂量, 光镜及荧光显微镜观察靶向微泡与 KDR 强阳性表达的人大肠癌 LOVO 细胞结合情况, 计算花环形成率。分别以 5、50、99 ml/h 速率水流冲刷, 光镜观察靶向微泡与 LOVO 细胞结合情况。**结果** 不同亲和素剂量下(0、2、6、10、30  $\mu\text{g}$ ), 微泡表面亲和素携带率差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。当  $M_{\text{avidin}} = 6 \mu\text{g}$  时, 携带率增长达平台期; 不同短肽剂量下(0、30、40、50、60、70、100  $\mu\text{g}$ ), 微泡表面短肽携带率差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 当  $M_{\text{K237}} = 50 \mu\text{g}$  时, 微泡表面短肽

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助面上项目(30670580)、广东省博士启动基金(9451051501003761)。

**[作者简介]** 何洁(1981—), 女, 湖南衡阳人, 硕士, 医师。研究方向: 靶向超声分子影像。现工作于佛山市第一人民医院。

E-mail: hejie157@126.com

**[通讯作者]** 李颖嘉, 南方医科大学南方医院超声科, 510515。E-mail: wen\_ge37@yahoo.com.cn

**[收稿日期]** 2010-04-07 **[修回日期]** 2010-06-29

携带率增长达平台期。光镜下 KDR 强阳性表达的 LOVO 细胞周围花环形成率高达 90.52%, 荧光显微镜下微泡外壳发出明亮绿色荧光。随冲刷速度增加, 靶细胞周围黏附的靶向微泡减少, 在 99 ml/h 冲刷速度下, 靶细胞周围仍可见花环结构。**结论** 通过生物素-亲和素桥连作用, 短肽 K237 被有效装配在 P-Bio-Av-Bio-Mbs 表面, 体外具有靶向特异性及一定稳定性。流式细胞术是筛选靶向微泡配体适配剂量的可靠方法。

[关键词] 微泡; 流式细胞术

[中图分类号] Q784 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2011)01-0003-05

靶向超声微泡技术的出现拓展了传统超声微泡技术的应用范围<sup>[1]</sup>。随着超声成像技术的发展, 靶向微泡已应用于各种病变组织和器官的分子成像及治疗, 如血管内皮损伤/炎症、血栓、动脉粥样硬化、肿瘤新生血管等<sup>[2-7]</sup>。前期研究证实血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体 KDR 的表达异常可能是乳腺单纯增生-非典型增生-原位癌-浸润性癌这一转化过程中血管生成异常的主要始动因素。VEGF 及其主要受体在原位癌即浸润性癌血管内皮细胞呈持续高表达, 在乳腺良性病变几乎不表达, 提示 VEGF 及其主要受体 KDR 可能成为乳腺癌新生血管的特异性分子显像靶标<sup>[8-9]</sup>。本研究在自制生物素化脂质体超声造影剂的基础上, 借助生物素-亲和素桥的高亲和力, 制备以肿瘤血管内皮细胞特异性受体 KDR 为靶点、携带有从噬菌体肽库中筛选到的与 KDR 有高度结合活性的短肽的靶向造影剂, 采用流式细胞术筛选配体最佳适配条件, 以期建立一种性能稳定、敏感性好的靶向微泡制备方法。

## 1 材料与方法

1.1 材料 人大肠癌 LOVO 细胞(由南方医院中医系实验室提供), 二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC, 美国 Sigma)、聚乙二醇(PEG, 美国 Sigma)、生物素化脂质(DSPE-PEG4000-Biotin, 美国 Avanti)、亲和素(Avidin, 美国 Invitrogen)、异硫氰酸荧光素标记亲和素(FITC-Avidin, 美国 Invitrogen)、荧光标记的生物素化十二肽(FITC-P-Bio, 杭州中肽公司)。

1.2 仪器 荧光显微镜(日本 Olympus)、显微镜下成像系统(日本 JVC)、流式细胞仪, 库尔特颗粒粒度分析仪(MutisizerII, 美国)。

1.3 荧光标记生物素化十二肽的合成 参照文献<sup>[10]</sup>方法合成荧光标记的与 KDR 有高亲和活性的氨基酸序列为(HTMYYYHHYQHHL)的生物素化十二肽(FITC-P-Bio, 杭州中肽公司合成), 分子量为 2523.6 D。

1.4 生物素化脂质体微泡(Bio-Mbs)的制备 DPPC、PEG、DSPE-PEG-Biotin、蒸馏水等按一定比例混合在

容器里, 通入全氟丙烷(C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>)气体, 机械振荡法振荡至形成乳白色液体; 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, 生物素化脂质体微泡制备完毕。取微泡溶液以 1:10 000 比例稀释, 库尔特颗粒粒度分析仪测定微球粒径、浓度、粒径分布。

1.5 亲和素(avidin)剂量筛选 将 Bio-Mbs 分为 5 组(约 10<sup>8</sup> 个/ml), 每组分别加入 0、2、6、10、30 μg 荧光标记的亲和素, 常温下孵育 30 min 制备亲和素-生物素化脂质体微泡(FITC-AV-Bio-Mbs), 浮集法纯化微泡 3 次, 流式细胞仪上检测不同亲和素剂量下微泡与亲和素的结合率。

1.6 FITC-P-Biotin 剂量筛选 在上一步筛选出亲和素最佳适配剂量基础之上, 固定亲和素剂量, 制备携带短肽的靶向脂质体微泡(P-Bio-Av-Bio-Mbs)。将无荧光标记的亲和素-生物素化脂质体微泡(AV-Bio-Mbs)分成 7 组(约 10<sup>8</sup> 个/ml), 每组样本中分别加入 0、30、40、50、60、70、100 μg 的荧光标记的生物素化肽(FITC-P-Biotin), 常温下孵育 30 min, 浮集法纯化微泡 3 次。流式细胞仪检测不同剂量下短肽与微泡结合率, 筛选短肽最佳适配剂量。库尔特颗粒粒度分析仪测定微球粒径、浓度、粒径分布。光镜及荧光显微镜下观察微泡物理特征。

1.7 免疫组化实验 人大肠癌 LOVO 细胞, 行常规 KDR 免疫组化染色(SP 法)。

1.8 体外结合实验 将荧光标记 P-Bio-Av-Bio-Mbs 与人大肠癌 LOVO 细胞常温下孵育 30 min, 轻柔冲洗掉游离微泡, 光镜及荧光显微镜下观察 P-Bio-Av-Bio-Mbs 与细胞的结合情况, 计算花环形成率。

1.9 体外冲刷实验 将荧光标记 P-Bio-Av-Bio-Mbs 与大肠癌 LOVO 细胞常温孵育 30 min, 设置微量注射泵速度, 分别以 5、50、99 ml/h 的速率冲刷, 光镜下观察黏附于靶细胞周围的微泡花环形成情况。

1.10 结果判定 以细胞膜或胞浆出现棕黄色颗粒为阳性细胞判定标准。取 10 个随机视野的细胞总数, 每个细胞结合 5 个或以上的微泡视为花环形成阳性, 计算花环形成率。统计学处理采用 SPSS 13.0 软件, 计

数资料均以百分率表示,采用 *Kruskal-Wills H* 非参数秩和检验,并采用 *Games-Howell* 法进行多重比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 生物素化脂质体造影剂 (Bio-Mbs) 物理性质**  
 Bio-Mbs 外观呈乳白色,微泡浓度约  $(2.0 \sim 6.3) \times 10^8 / \text{ml}$ ,其粒径范围为  $2.0 \sim 8.3 \mu\text{m}$ ,直径  $< 5 \mu\text{m}$  的微泡不少于 94.60%。在 200 倍光学显微镜下观察,微泡径分布均匀,无聚集现象,单个微泡外观圆整。

**2.2 亲和素适配剂量的筛选** 荧光显微镜下,经过洗涤的微泡外壳发出明亮绿色荧光。5 组微泡与亲和素结合率差异均有统计学意义 ( $\chi^2 = 12.78, P < 0.05$ ),微泡与亲和素的结合呈剂量依赖性,随着加入亲和素剂量的增加,结合率逐渐升高,0、2、6  $\mu\text{g}$  组结合率差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),其余各组间结合率差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。对于亲和素-生物素-微泡系统 ( $10^8$  个/ml),加入  $M_{\text{avidin}} < 6 \mu\text{g}$  时,随着亲和素剂量的增加,结合率逐渐增加,且结合率曲线上升快;  $M_{\text{avidin}} = 6 \mu\text{g}$  时,结合率曲线进入平台期。加入亲和素剂量  $M_{\text{avidin}} = 2 \mu\text{g}$  时,微泡表面亲和素的携带率平均达 89.73%,加入  $M_{\text{avidin}} \geq 6 \mu\text{g}$  时,微泡表面携带率平均达 99.26% 以上 (图 1)。

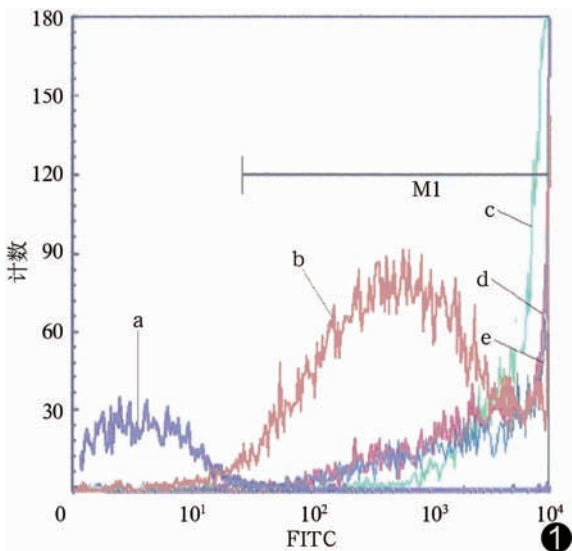


图 1 微泡表面亲和素标记率的流式分析结果 当亲和素的量达 6  $\mu\text{g}$  时,微泡表面亲和素携带率基本达到平台期,携带率均达 99.26% 以上 (a: 0  $\mu\text{g}$ , b: 2  $\mu\text{g}$ , c: 6  $\mu\text{g}$ , d: 10  $\mu\text{g}$ , e: 30  $\mu\text{g}$ )

**2.3 携与 KDR 有高亲和活性肽 K237 适配剂量的筛选** 在上述结果基础上,选用  $M_{\text{avidin}} = 6 \mu\text{g}$  进入第三

步连接。荧光显微镜下可见微泡外壳发出明亮的绿色荧光。随着 FITC-P-Bio 剂量增加,各组结合率有不同程度增加。7 组微泡与 FITC-P-Bio 结合率差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 18.11, P < 0.05$ ),进一步多重比较示连接率较高的 50、70、100  $\mu\text{g}$  组任意两组间结合率差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。  $M_{\text{avidin}} = 6 \mu\text{g}$ , 加入 KDR 高亲和力短肽量  $M_p < 50 \mu\text{g}$  时,微泡上短肽携带率随着短肽剂量的增加而增高,结合率曲线上升快;  $M_p > 50 \mu\text{g}$  时,微泡短肽携带率达到平台期。加入 KDR 高亲和力短肽  $M_p = 50 \mu\text{g}$ , 可使  $(83.46 \pm 1.58)\%$  的微泡表面带有荧光信号 (图 2)。

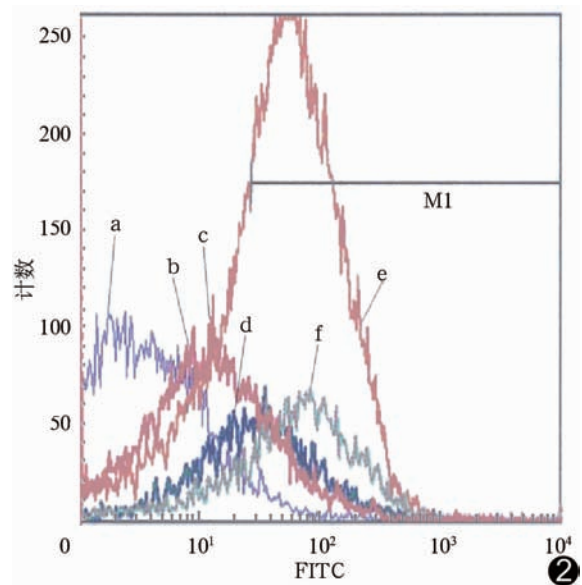


图 2 微泡表面的短肽标记的流式分析结果 当肽量达 50  $\mu\text{g}$  时,微泡表面短肽携带率基本达到平台期,再增加肽量携带率改变无统计学意义 (a: 0  $\mu\text{g}$ , b: 30  $\mu\text{g}$ , c: 40  $\mu\text{g}$ , d: 50  $\mu\text{g}$ , e: 70  $\mu\text{g}$ , f: 100  $\mu\text{g}$ )

**2.4 P-Bio-Av-Bio-Mbs 物理性质** 标记了异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 的 P-Bio-Av-Bio-Mbs 外观呈浅黄色混悬液,靶向微泡浓度约  $(3.0 \sim 8.4) \times 10^8 / \text{ml}$ ,粒径范围为  $2.6 \sim 8.0 \mu\text{m}$ 。直径  $< 5 \mu\text{m}$  的微泡不少于 90.30%。在 200 倍光学显微镜下观察,微泡粒径分布均匀,无聚集现象,单个微泡外观圆整,荧光显微镜下,靶向微泡外壳激发出明亮的黄绿色荧光。

**2.5 细胞免疫化学** 大肠癌 LOVO 细胞 KDR 表达呈强阳性,阳性物质定位于细胞膜或胞浆内 (图 3)。

**2.6 体外结合实验结果** 光镜下 LOVO 细胞周围可见 P-Bio-Av-Bio-Mbs 围绕细胞或黏附于细胞之上,形

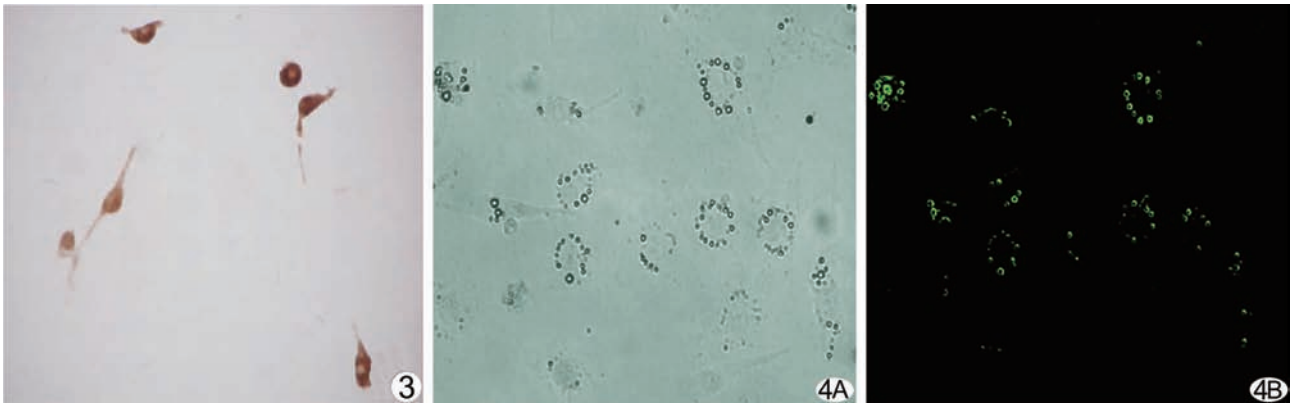


图3 免疫组化染色结果 LOVO 细胞 KDR 表达呈强阳性 图4 日本 JVC TK-C1381 成像系统下所见 靶向微泡围绕 LOVO 细胞排列,花环形成实验呈阳性。A. 光镜(×400); B. 荧光显微镜(×400)

成“花环样”结构,花环形成率平均为 90.52%,荧光镜下黏附于细胞周围的微泡外壳发出明亮的绿色荧光(图 4)。

2.7 冲刷实验结果 随微量注射泵冲刷速度增加,光镜下黏附于细胞周围的微泡逐渐减少,但在 99 ml/h 的冲刷速度下,靶细胞周围仍可见微泡黏附形成的花环结构(图 5)。

### 3 讨论

靶向超声对比增强技术的关键是构建靶向微泡。目前靶向微泡造影剂处于实验研究阶段,实际应用中均存在敏感性低的问题,其中配体与微泡外壳的稳定性不够、微泡在体内高速血流环境下不能实现有效浓聚是导致造影成像敏感性低的主要原因。要提高成像敏感性,造影剂、配体与微泡的连接方式以及配体剂量的选择十分重要。

本研究采用自制脂质体微泡。与白蛋白类微泡相比,该微泡制备不受温度的严格限制,具有良好活性,

更易于连接抗体和肽片段等多种配体,在制备靶向微泡方面有其独特优越性。在心肌显影效果方面,研究证明自制的脂质体造影剂具有与白蛋白造影剂(全氟显)相同的良好显影效果,也可用于定量评估心肌灌注显影。构建过程中,在连接方式上,本实验选择生物素-亲和素-生物素(BAB)结合系统<sup>[11]</sup>,该系统具有高敏感性、高特异性和高稳定性的特点<sup>[12-14]</sup>。此法反应非常灵敏,在靶向微泡制备的每个步骤中都必须去除该次反应中未结合的游离反应物,避免其与下次反应中加入的配体相互作用而干扰实验结果。此外,为减少非特异性吸附,反应时间不宜过长,一般以 37℃ 下孵育 30 min 为宜。本实验通过荧光显微镜对靶向微泡进行初步定性分析,微泡在经过洗涤后仍发出明亮的绿色荧光,证明通过 BAB 结合系统的桥连作用,配体被有效、稳定地装备在微泡外壳表面。在体外结合实验中,通过该方法制备成功的携有与 KDR 有高亲和活性短肽的靶向微泡能与 KDR 阳性表达的 LOVO

细胞发生特异性结合,形成花环样结构,再次证明了靶向微泡的构建成功及其靶向活性。以此法构建靶向微泡,配体剂量的筛选(配体携带率)是很关键的步骤。目前国内外对于评价靶向微泡的携带率尚缺乏有效方法。本实验运用流式细胞术对靶向微泡配体携带率进行定量分析,发现微泡与亲和素、短肽的结合首先均呈剂量依赖性,当结合率达到平台期后,再增加剂量而结合率基本不复增加,据此可筛选出微泡与

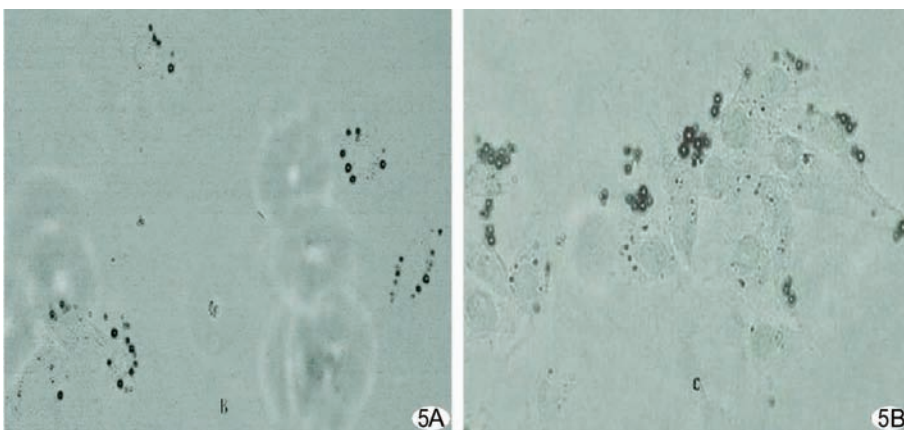


图5 以 50 ml/h(A)和 99 ml/h(B)速度冲刷靶细胞周围微泡黏附情况

配体的最佳适配剂量,同时也证明流式细胞术是定量检测靶向微泡的有效方法。

综上,通过生物素-亲和素桥连作用,短肽 K237 被有效装配在微泡表面,制备得到的 P-Bio-Av-Bio-Mbs 能在体外与 KDR 阳性表达的靶细胞特异地结合,具有一定稳定性。流式细胞术是定量筛选靶向微泡配体适配剂量的可靠方法:对于  $10^8$ /ml 微泡,  $M_{\text{avidin}} = 6 \mu\text{g}$ ,  $M_{\text{p}} = 50 \mu\text{g}$  ( $200 \mu\text{M}$ ) 时,能使  $(83.46 \pm 1.58)\%$  的微泡稳定携带有配体分子,且剂量组合最优化。

### [参考文献]

- [1] Voigt JU. Ultrasound molecular imaging. *Methods Enzymol*, 2009, 48(2):92-97.
- [2] Behm CZ, Kaufmann BA, Carr C, et al. Molecular imaging of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression and inflammatory cell recruitment during vasculogenesis and ischemia-mediated arteriogenesis. *Circulation*, 2008, 117(22):2902-2911.
- [3] Kaufmann BA, Sanders JM, Davis C, et al. Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis with targeted Ultrasound detection of vascular cell adhesion molecule-1. *Circulation*, 2007, 116(3):276-284.
- [4] Wheatlev MA, Lathia JD, Oum KL. Polymeric ultrasound contrast agents targeted to integrins: importance of process methods and surface density of ligands. *Biomacromolecules*, 2007, 8(2):516-522.
- [5] Weller GE, Wong MK, Modzelewski RA, et al. Ultrasonic imaging of tumor angiogenesis using contrast microbubbles targeted via the tumor-binding peptide arginine-arginine-leucine. *Cancer Res*, 2005, 15, 65(2):533-539.
- [6] Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*, 2005, 23(5):1011-1027.
- [7] Villanueva FS. Molecular imaging of cardiovascular disease using ultrasound. *J Nucl Cardiol*, 2008, 15(4):576-585.
- [8] 李颖佳,邓永键,文戈,等.乳腺癌发生与演进过程中血管生成的评价.中华外科杂志,2009,47(7):1-4.
- [9] 李颖佳,文戈,杨莉,等.乳腺良恶性肿瘤微血管构筑的异质性及其血流动力学的功能变化.中华肿瘤杂志,2009,31(1):24-27.
- [10] Hetian L, Ping A, Shumei S, et al. A novel peptide isolated from a phage display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to its kinase domain receptor. *J Biol Chem*, 2002, 277(45):43137-43142.
- [11] AviviLevi S, Gedanken A. The preparation of avidin microspheres using the sonochemical method and interaction of the microspheres with biotin. *Ultrason Sonochem*, 2005, 12(5):405-409.
- [12] Bekeredian R, Chen S, Frenkel PA, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart. *Circulation*, 2003, 108(8):1022-1026.
- [13] Ozawa CR, Banfi A, Alazer NL, et al. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *J Clin Invest*, 2004, 113(4):516-527.
- [14] Shih SC, Robinson GS, Perruzzi CA, et al. Molecular profiling of angiogenesis marker. *Am J Pathol*, 2002, 161(1):35-41.

## 《医学影像技术》荣获华东地区大学优秀教材一等奖

由南京军区南京总医院医学影像研究所王骏与江苏大学甘泉主任组织 10 余所高等院校从事医学影像技术的 30 余位一线专家编写的《医学影像技术》荣获华东地区大学优秀教材一等奖。

这次评选活动是由中国大学出版社协会主办,《医学影像技术》在 500 余部参评专著中脱颖而出。该书是江苏大学出版社出版的大学教材,分为对比剂、传统 X 线摄影、数字 X 线摄影、计算机断层扫描、磁共振成像、数字减影血管造影及介入影像学、图像显示与记录、图像处理与计算机辅助诊断、图像存档与通信系统、医学影像质量管理与成像防护、医学影像检查技术的临床应用等 11 篇、100 余万字,涵盖了医学影像技术的所有领域。

本书可供医学影像技术专业的学生及临床各科医师参考,也能帮助和指导专业人员提高检查质量和解决工作中的实际问题。

邮购地址 南京三牌楼新门口 4 号 7 幢 402 室 王骏 邮编 210003

邮购价格 78 元(含包装费、邮费、挂号费)