

❖ 实验研究

N-palmitoyl chitosan: In vitro and in vivo characterizations and targeting of the folate-targeted ultrasound contrast microbubbles

XIAO Yun-bin¹, LI Mei-yu¹, BIN Jian-guo¹, LIAO Wang-jun¹, LIU Yi-li¹,
JIANG Gang-biao², BIN Jian-ping^{1*}

(1. Department of Cardiology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;
2. Department of Pharmaceutical Engineering, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

[Abstract] **Objective** To develop a novel folate-targeted ultrasound contrast microbubbles with N-palmitoyl chitosan, and to evaluate its characterizations and specific-site targeting in vitro and in vivo. **Methods** Folate-targeted microbubbles (MBF) and control microbubbles (MBC) were prepared using high-shear homogenization. The morphology, size and folate molecular fluorescence of microbubbles were characterized. Renal contrast-enhanced imaging with MBF and MBC was performed in 6 mice. MBF and MBC were tested for binding specificity on cells expressing folate receptors and control cells. **Results** MBF had a good shape, uniform size-distribution and folate-distribution. The mean diameter and concentration was $(1.32 \pm 0.20) \mu\text{m}$ and $(1.93 \pm 0.01) \times 10^9 / \text{ml}$. Significant enhancement on kidneys was noted in contrast ultrasound imaging with MBF. The video intensity of renal tissue was $(30.35 \pm 5.01) \text{GU}$ and $(17.41 \pm 3.15) \text{GU}$ at 1 and 7 min after bolus injection, respectively. The duration time of visual enhancement was $(10.00 \pm 3.00) \text{min}$. The binding number of MBF in group of the over-expression folate receptors cells was higher than those of MBF in group of the low-expression folate receptors cells and MBC groups ($P < 0.01$). **Conclusion** The novel ultrasound contrast microbubbles with N-palmitoyl chitosan can specifically and effectively bind to folate receptors. It may be used to evaluate the over-expression folate receptors' tumors or other pathological changes noninvasively with ultrasound imaging.

[Key words] Chitosan; Folic acid; Contrast media; Microbubbles

N-软脂酰基壳聚糖叶酸靶向微泡的 体内外特性和靶向效果

肖云彬¹, 李美瑜¹, 宾建国¹, 廖旺军¹, 刘伊丽¹, 蒋刚彪², 宾建平^{1*}

(1. 南方医科大学南方医院心内科, 广东 广州 510515;
2. 华南农业大学制药工程系, 广东 广州 510642)

[摘要] **目的** 应用 N-软脂酰基壳聚糖制备叶酸靶向微泡, 评价其基本特征、体外靶向性及体内超声显影效果。 **方法** 以高速剪切法制备叶酸靶向微泡和对照微泡, 观察叶酸靶向微泡的大小、形态和叶酸分子在微泡的分布及对昆明鼠肾脏的超声显影效果和体外靶向效果, 并与对照微泡比较。 **结果** 叶酸靶向微泡呈空心球形结构, 形态规则, 分散均匀, 平均粒径 $(1.32 \pm 0.20) \mu\text{m}$, 浓度 $(1.93 \pm 0.01) \times 10^9 / \text{ml}$; 鼠肾对比显影明显增强, 1 min、7 min 视频强度分别为 $(30.35 \pm 5.01) \text{GU}$ 、 $(17.41 \pm 3.15) \text{GU}$, 可视性对比增强持续时间 $(10.00 \pm 3.00) \text{min}$; 与叶酸受体高表达细胞结合数明显大于叶酸受体低表达细胞组和对照微泡组 ($P < 0.01$)。 **结论** N-软脂酰基壳聚糖构建的叶酸靶向微泡可与叶酸受体有效结合, 可用其作为分子探针, 对叶酸受体高表达的肿瘤进行超声分子成像。

[关键词] 壳聚糖; 叶酸; 造影剂; 微泡

[中图分类号] R981.2; R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2010)07-1201-04

[基金项目] 国家 863 计划项目(2006AA02Z478)、广东省科技计划项目(2007B030704012)。

[作者简介] 肖云彬(1979—), 女, 湖南临武人, 在读博士, 医师。研究方向: 声学造影。E-mail: xiaoyunbin_student@sina.com

[通讯作者] 宾建平, 南方医科大学南方医院心内科, 510515。E-mail: jianpingbin@126.com

[收稿日期] 2010-02-08 **[修回日期]** 2010-03-20

目前靶向超声造影剂仍处于体外及动物实验阶段^[1],在靶向造影剂制备过程中尚有一些未解决的技术难点:①配体与超声造影剂生物连接的反应产率及制作成本;②配体活性的保持;③靶向造影剂的安全性(包括免疫原性)。本实验拟采用生物相容性较好的叶酸 N-软脂酰基壳聚糖(N-palmitoyl chitosan, PLCS)共价连接新型聚合物制备新型叶酸靶向超声造影剂,并测试其体外基本参数和靶向效果。

1 材料与方法

1.1 实验材料 主要试剂:N-软脂酰基壳聚糖(N-palmitoyl chitosan, PLCS)、叶酸-N-软脂酰基壳聚糖(华南农业大学资源环境学院提供),全氟丙烷(广东佛山捷和气体有限公司),无叶酸 1640 培养液和 1640 完全培养液(Gibco 公司),胎牛血清(Gibco 公司)。实验细胞:人卵巢癌细胞株 A2780、人肺腺癌细胞株 A549(南方医科大学南方医院药理学部赠送)。实验仪器:TB-215D 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),DK-S22 型恒温水浴箱(上海精宏实验设备有限公司),T25 型剪切仪(IKA 公司),BX51 型生物显微镜(Olympus 公司),马尔文粒度分析仪(Malvern 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 叶酸靶向微泡及对照微泡的制备 叶酸靶向微泡:蒸馏水 15 ml,加入适量比例叶酸-N-软脂酰基壳聚糖、PLCS,于 50℃ 水浴箱中水浴 60 min,定容至 20 ml,倒入三颈瓶,连接剪切仪,通入全氟丙烷气体 5 min,17000 r/min 剪切 40 s,21000 r/min 剪切 80 s,制得淡黄色混悬液体,分装、密封,4℃ 保存备用。对照微泡:蒸馏水 15 ml 中加入 PLCS,余步骤同上。

1.2.2 叶酸靶向微泡基本特征的测定 将叶酸靶向微泡轻轻摇匀,取一小滴滴加至载玻片上,普通光学显微镜和荧光显微镜观察其表现形态。然后用马尔文粒度分析仪检测叶酸靶向微泡的大小和浓度。具体方法:100 μl 叶酸靶向微泡混悬液稀释至 5 ml,倒入检测池中,以 532 nm 激光垂直照射样品池,检测器与入射光的角度为 90°。以细胞计数板计数叶酸靶

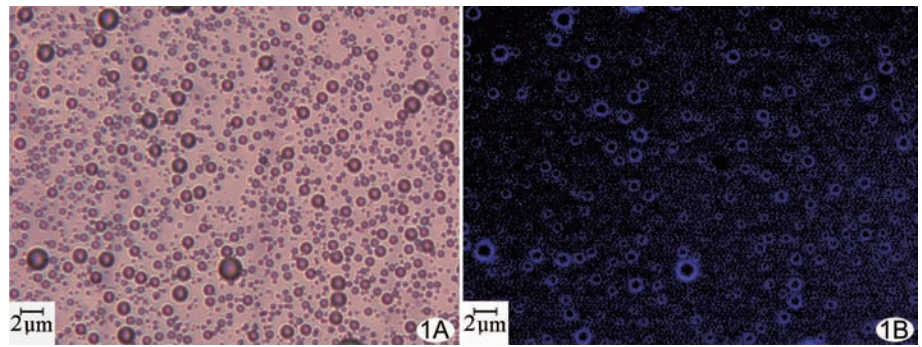


图 1 叶酸靶向微泡的光镜图(×400) A. 普通光学显微镜图; B. 荧光显微镜图

向微泡浓度。

1.2.3 叶酸靶向微泡造影性能测定 取 7~8 周龄、体质量 20 g 的昆明鼠 6 只(购自南方医科大学动物实验中心),腹腔注射戊巴比妥钠 25 mg/kg 进行麻醉,尾静脉插留置针,然后将小鼠俯位保定于蛙板上,备皮,涂超声耦合剂,用自制支架固定超声探头于背部,调整探头位置,获得良好肾脏显像后保持不变,仪器的各项参数在实验过程中不变。每只小鼠用微量进样器经尾静脉以弹丸式随机注射叶酸靶向微泡或对照微泡,体积 20 μl,微泡注射间隔 30 min,注射后用少量生理盐水冲管,对比超声(contrast-enhance ultrasound, CEU)成像采用二次谐波成像技术,探头发射频率为 7.0 MHz,接收频率为 14 MHz,机械指数(mechanical index, MI)为 0.18,超声发射间隔时间设定为 10 s,连续观察 30 min,给予高 MI(1.9)的连续超声发射 2~3 s 破坏微泡,继续存储本底图像 5 帧,将全部声学造影图像存盘。应用 MCE 2.7 软件对图像进行分析,并测量肾脏显影的视频强度(video intensity, VI)。

1.2.4 叶酸靶向微泡的靶向结合试验 体外培养人卵巢癌 A2780 细胞、人肺腺癌 A549 细胞,取对数生长期细胞以 2×10^4 /孔的密度接种于 35 mm×10 mm 的培养皿中,继续用无叶酸 1640 培养液加 10% 胎牛血清培养 24 h,并分别分成叶酸靶向微泡组和对照微泡组,连接平行板流动腔^[2],分别注入生理盐水稀释的叶酸靶向微泡微泡约 5×10^6 个及对照微泡约 5×10^6 个,流动 5 min 后 PBS 液洗 3 遍,苏木素复染 15 s, PBS 再洗 3 遍,显微镜下计数 20 个高倍视野的细胞结合微泡数和细胞数,并计算单个细胞结合的平均微泡数,比较所得结果。

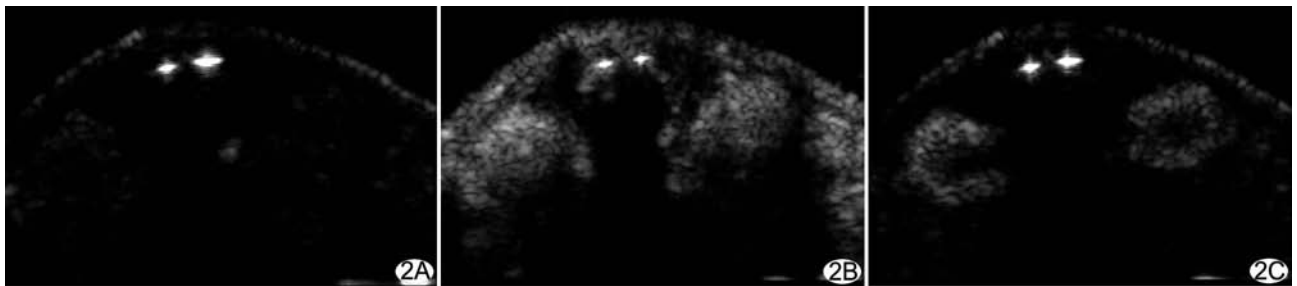


图 2 注入叶酸靶向微泡后鼠肾显影图 A. 鼠肾造影前超声显影图; B. 鼠肾注入造影剂 1 min 后超声显影图; C. 鼠肾注入造影剂 7 min 后超声显影图

1.3 统计学分析 使用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用 AVONA 分析, 两组数据间的比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 叶酸靶向微泡的形态和体外参数 叶酸靶向微泡静置 24 h 后轻轻摇匀, 外观呈淡黄色混悬状; 普通光镜下可见细小密集、大小较均匀的微泡, 无聚集现象(图 1A), 荧光显微镜下可见分散蓝色圆圈状微泡(图 1B)。马尔文粒度分析仪检测, 微泡平均粒径 $(1.32 \pm 0.20) \mu\text{m}$, 浓度 $(1.93 \pm 0.01) \times 10^9/\text{ml}$ 。

对照微泡静置 24 h 后摇匀, 外观呈白色混悬状, 普通显微镜下可见细小密集、大小均匀的微泡。

2.2 叶酸靶向微泡在动物体内显影效果 从鼠尾静脉团注入叶酸靶向微泡或对照微泡后, 肾脏超声显影效果得到明显增强, 回声点细小、均匀, 无明显声衰减, 注入叶酸靶向微泡后 1 min、7 min 最大视频强度分别为 $(30.35 \pm 5.01)\text{GU}$ 、 $(17.41 \pm 3.15)\text{GU}$, 持续增强 $(10.00 \pm 3.00)\text{min}$ (图 2)。

2.3 叶酸靶向微泡靶向结合效能 叶酸靶向微泡与叶酸受体过表达的人卵巢癌 A2780 细胞结合数量较多(图 3A), 为 (8.61 ± 1.34) 个微泡/细胞, 与叶酸受体低表达的人肺腺癌 A549 细胞结合量少(图 3C), 为 (0.82 ± 0.21) 个微泡/细胞; 对照微泡与人卵巢癌 A2780 细胞、人肺腺癌 A549 细胞结合极少(图 3B、3D), 分别为 (0.40 ± 0.11) 个微泡/细胞、 (1.14 ± 0.12) 个微泡/细胞。叶酸靶向微泡与人卵巢癌 A2780 细胞结合数明显大于叶酸靶向微泡与人肺腺癌 A549 细胞结合

数、对照微泡与人肺腺癌 A549 细胞的结合数及对照微泡与人卵巢癌 A2780 细胞的结合数 ($P < 0.01$), 且分别是其 21、11 和 8 倍(图 4)。

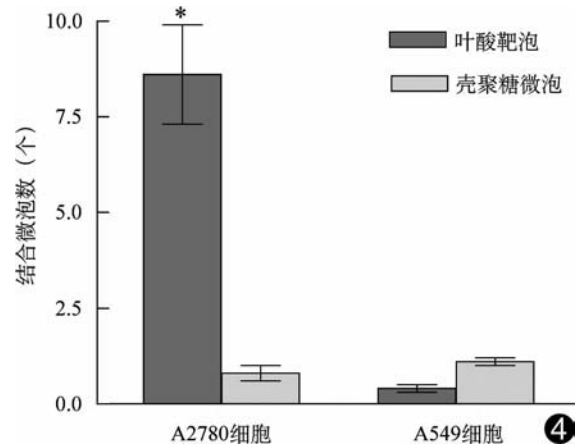


图 4 人卵巢癌 A2780 细胞、人肺腺癌 A549 细胞单个细胞结合微泡数 ($n=20$; * : 与其他三组比较 $P < 0.01$)

3 讨论

本研究采用叶酸和壳聚糖成功制备一种新型超声靶向造影剂, 粒径均匀, 体内显影增强效果好, 靶向性可靠, 且叶酸分子与 PLCS 共价结合产率高、成本低、无免疫原性。

叶酸、壳聚糖生物来源丰富, 无免疫原性, 且二者生物相容性、可降解性好^[3]。叶酸可特异地与细胞表面的叶酸受体(folate receptor, FR)结合形成复合物, 目前已被用作抗癌药物的靶向分子而受到广泛重视^[4], 也有壳聚糖微泡和叶酸壳聚糖共聚物纳米粒研究的文献报道^[5-7]。因此, 本实验将叶酸分子共价连接到壳聚糖链上制备叶酸靶向超声造影剂。Jiang 等^[8]通过在壳聚糖的氨基上连接软脂酰基, 将其改性为两亲性的高分子表面活性剂 N-软脂酰基壳聚糖, 具有良好的成膜性, N-软脂酰基壳聚糖接枝率约为 10%~20%, 在壳聚糖链和软脂酰侧链上均含有丰富的自由氨基和羟基等活性基团, 易与药物、配体共价连接。本实验将叶酸共价接枝到 N-软脂酰基壳聚糖上, 结合稳定, N-软脂酰基壳聚糖与叶酸-N-软脂酰基壳聚糖按一定比例混合, 在制备叶酸靶向微泡的过程中, 叶酸不会丢失和(或)改变构象, 可解决靶向造影剂生物连接中配体产率和配体靶向活性低的问题, 且实验材料叶酸、壳聚糖、软脂酸来源丰富、价格便宜, 制作成本低廉。

本实验制备的叶酸靶向微泡大小

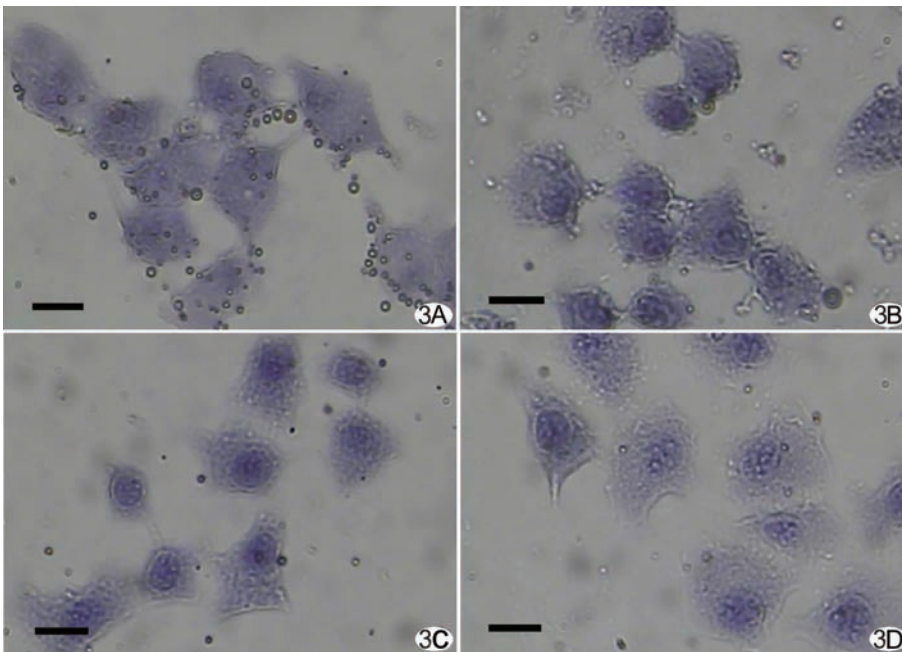


图 3 叶酸靶向微泡与人卵巢癌 A2780 细胞、人肺腺癌 A549 细胞的靶向结合图($\times 400$, 标尺 = $20 \mu\text{m}$) A. 叶酸靶向微泡与人卵巢癌 A2780 细胞结合图; B. 对照微泡与人卵巢癌 A2780 细胞结合图; C. 叶酸靶向微泡与人肺腺癌 A549 细胞结合图; D. 对照微泡与人肺腺癌 A549 细胞结合图

较均匀,平均粒径偏小,浓度高。由于叶酸结构中具有吡嗪-嘧啶环,在紫外线的照射下产生强的蓝色荧光,其荧光强度与叶酸的含量成正比,可用于微泡上叶酸的定量分析^[9-10]。本实验发现叶酸靶向微泡在紫外光下呈明亮的蓝色荧光圈,证明叶酸靶向微泡上叶酸分布均匀。

体外实验发现在平行板流动腔中叶酸靶向微泡与叶酸受体过表达的卵巢癌细胞结合较多,与叶酸受体表达极低肺腺癌细胞结合少,普通壳聚糖微泡与二者结合均少,证实叶酸靶向的选择性较高,而非特异性结合的可能性较小。叶酸靶向微泡在平行板流动腔中流动时,结合活细胞的过程与体内微泡通过血液循环到达靶细胞的过程相似,进一步说明靶向结合的有效性。体内显影试验证实本研究制备的 N-软脂酰基壳聚糖叶酸靶向微泡具有较佳的造影增强效果,实验鼠双肾血管和实质显影明显增强,回声点细小均匀,无明显声衰减,低 MI 显像模式即可获得较好成像,持续(10.00±3.00)min 时间,N-软脂酰基壳聚糖叶酸靶向微泡体内循环时间长可能与其自聚集能力强、不易破裂、聚合物胶束两端均为疏水链、不易被吞噬有关。

多种肿瘤细胞过表达叶酸受体(如卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、乳腺癌、肺癌、肝癌、神经内分泌癌和脑转移癌等),靶向造影剂需通过血管内皮屏障方可到达组织间隙与细胞结合,因此必须对肿瘤血管特性进行分析。研究发现,肿瘤血管内皮间隙在不同部位和类型的肿瘤之间存在较大差异,大部分肿瘤血管只允许 380~1200 nm 的示踪物通过^[11]。超声波介导微泡破裂所产生的生物学效应可以破坏毛细血管的完整性^[12-13],允许更大粒径的物质通过血管间隙,因此,在超声结合微泡的作用下,可使血液循环中的靶向微泡通过穿过通透性大或破裂的内皮进入血管外靶组织,产生特异性增强显像。本实验制备的叶酸靶向微泡粒径 400~1900 nm,平均(1.32±0.20) μm,纳米级的靶向微泡可直接通过肿瘤血管内皮细胞,微米级的靶向微泡透过超声介导局部微泡破裂所致的破裂毛细血管到达靶部位,均可有效地与靶细胞结合进行分子成像。因此,N-软脂酰基壳聚糖叶酸靶向微泡在肿瘤的超声分子成像中值得进一步开发。

综上所述,叶酸靶向微泡能与叶酸受体有效特异结合,可

作为分子探针,对叶酸受体高表达的肿瘤进行超声分子成像。

[参考文献]

- [1] 刘学兵,王志刚,许川山.载药脂质超声微泡造影剂的制备及应用研究.中国介入影像与治疗学,2008,5(2):156-159.
- [2] 吴爵非,查道刚,杨莉,等.平行板流动腔法评价生物素化脂质微泡制备效果.临床超声医学杂志,2008,10(5):289-291.
- [3] Leamon CP, Jackman AL. Exploitation of the folate receptor in the management of cancer and inflammatory disease. Vitam Horm, 2008,79:203-233.
- [4] Hilgenbrink AR, Low PS. Folate receptor-mediated drug targeting: from therapeutics to diagnostics. J Pharm Sci, 2005,94(10):2135-2146.
- [5] 陈素霞,吕丰,刘天军.壳聚糖超声造影剂的制备及初步实验研究.生物医学工程与临床,2006,(S1):5.
- [6] 金鑫,张阳德,赵劲风,等.叶酸-壳聚糖介导 survivin shRNA 基因纳米载体的制备.中国组织工程研究与临床康复,2009,13(25):4817-4820.
- [7] 柳时,徐喆,罗智,等.叶酸偶联壳聚糖纳米粒的制备.医药导报,2006,25(6):561-563.
- [8] Jiang GB, Quan D, Liao K, et al. Novel polymer micelles prepared from chitosan grafted hydrophobic palmitoyl groups for drug delivery. Mol Pharm, 2006,3(2):152-160.
- [9] 汪锦邦,顾鹏.叶酸分析方法的研究进展.中国食品添加剂,2000,(3):49-54.
- [10] 郑道文,杨莉,宾建平,等.亲和素桥连构建携抗 p-选择素单抗靶向超声微泡及体外荧光鉴定.中国医学影像技术,2008,24(8):1182-1185.
- [11] Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. Proc Natl Acad Sci USA, 1998,95(8):4607-4612.
- [12] Vancraeynest D, Havaux X, Pouleur AC, et al. Myocardial delivery of colloid nanoparticles using ultrasound-targeted microbubble destruction. Eur Heart J, 2006,27(2):237-245.
- [13] 李佩惊,左松,刘政,等.间歇式发射对微泡超声空化损伤小血管的增强作用.临床超声医学杂志,2007,9(10):577-580.