

❖ 实验研究

Preparation of Integrin $\alpha_v\beta_3$ targeted ultrasound microbubbles and targeting study in vitro

LIU Yingying¹, XU Jinfeng^{1*}, YAN Fei², ZENG Xinxin¹,
WEI Zhanghong¹, LIU Huiyu¹, ZHENG Jing¹, ZHOU Yuli¹

(1. Department of Ultrasonography, Shenzhen People's Hospital, Jinan University, Shenzhen 518020, China;

2. Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

[Abstract] **Objective** To prepare Integrin $\alpha_v\beta_3$ targeted microbubbles, test physical-chemical properties and targeting study in vitro. **Methods** Integrin $\alpha_v\beta_3$ targeted microbubbles (MB_{Integrin $\alpha_v\beta_3$}) with FITC labeled iRGD peptide were prepared by sh- maleic imide connection method. Then control microbubbles (MB_{control}) was prepared. Physical and chemical properties were test, fluorescent were displayed under fluorescent microscope and the contents of FITC fluorescence by flow cytometry technique of 2 groups of microbubbles were detected. The affinity of MB_{Integrin $\alpha_v\beta_3$} and MB_{control} for bEnd. 3 cells was investigated with light and fluorescent microscope. **Results** ① The particle size of MB_{Integrin $\alpha_v\beta_3$} was $(0.84 \pm 0.26) \mu\text{m}$, and had no statistically significant difference compared with MB_{control} ($P > 0.05$). ② Under fluorescent microscope, MB_{control} displayed without fluorescent, while MB_{Integrin $\alpha_v\beta_3$} showed clear green light. ③ The contents of FITC of MB_{Integrin $\alpha_v\beta_3$} was 98.4%, however, the contents of FITC of MB_{control} was 2.5%. ④ It showed that MB_{Integrin $\alpha_v\beta_3$} adhered to bEnd. 3 cells in vitro experiment. **Conclusion** Integrin $\alpha_v\beta_3$ targeted microbubbles with iRGD is successfully prepared and proves good targeting ability in vitro.

[Key words] Integrin $\alpha_v\beta_3$; Contrast media; Ultrasonography; Targeted; Microbubbles

DOI:10.13929/j.1003-3289.2016.02.004

Integrin $\alpha_v\beta_3$ 靶向超声微泡的制备及体外寻靶实验

刘莹莹¹, 徐金锋^{1*}, 严 飞², 曾欣欣¹, 魏章洪¹, 刘慧玉¹, 郑 静¹, 周玉丽¹

(1. 深圳市人民医院超声科 暨南大学第二临床医学院, 广东 深圳 518020;

2. 中国科学院深圳先进技术研究院, 广东 深圳 518055)

[摘要] **目的** 制备 Integrin $\alpha_v\beta_3$ 靶向超声微泡, 对其一般理化性质及体外寻靶能力进行检测。 **方法** 采用巯基-马来酰亚胺连接法制备携 FITC 标记 iRGD 肽的 Integrin $\alpha_v\beta_3$ 靶向微泡 (MB_{Integrin $\alpha_v\beta_3$}), 并制备空白微泡 (MB_{control})。检测两组微泡的一般理化性质, 在荧光显微镜下观察两组微泡荧光显像, 流式细胞仪检测两组微泡 FITC 荧光含量。于光学显微镜及荧光显微镜下观察两组微泡与小鼠脑微血管内皮细胞 (bEnd. 3) 的黏附情况。 **结果** ① MB_{Integrin $\alpha_v\beta_3$} 粒径为 $(0.84 \pm 0.26) \mu\text{m}$, 与 MB_{control} 粒径 $(0.79 \pm 0.19) \mu\text{m}$ 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); ② 荧光显微镜下观察, MB_{control} 组微泡无荧光显示, MB_{Integrin $\alpha_v\beta_3$} 组微泡表面显示绿色荧光; ③ 流式细胞仪测得 MB_{Integrin $\alpha_v\beta_3$} 组微泡 FITC 荧光含量为 98.4%, MB_{control} 组微泡 FITC 荧光含量为 2.5%; ④ 体外寻靶实验显示, MB_{Integrin $\alpha_v\beta_3$} 组微泡能聚集结合于 bEnd. 3 细胞表面。 **结论** 成功制备了携 iRGD 肽的 Integrin $\alpha_v\beta_3$ 靶向微泡, 其具有良好的体外寻靶能力。

[关键词] 整合素 $\alpha_v\beta_3$; 造影剂; 超声检查; 靶向; 微泡

[中图分类号] R445.1; R981 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2016)02-0175-04

[基金项目] 广东省自然科学基金项目 (2014A030313760)、深圳市科技创新委员会重大项目 (JCYJ20130402092657773)。

[第一作者] 刘莹莹 (1981—), 女, 河南洛阳人, 博士, 副主任医师。研究方向: 分子影像与基因治疗。E-mail: maggielyy21064@163.com

[通信作者] 徐金锋, 深圳市人民医院超声科 暨南大学第二临床医学院, 518020。E-mail: xujinfeng@yahoo.com

[收稿日期] 2015-07-13 **[修回日期]** 2015-12-07

分子生物学的发展给医学带来了巨大的变革,让我们从细胞分子水平对疾病过程有了全新的理解。与正常细胞相比,肿瘤细胞表面存在一些特异性高表达的位点,整合素 $\alpha_v\beta_3$ (Integrin $\alpha_v\beta_3$) 正是其中之一,本研究以 Integrin $\alpha_v\beta_3$ 作为靶点,制备出靶向超声造影剂,并对其一般理化性质及体外寻靶能力进行评价。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 倒置荧光显微镜 (Leica DMI3009B 德国), 流式细胞仪 (Accuri C6 美国), 粒径分析仪 (颗粒计数分析仪, 780A, 美国), Marlven 电位分析仪 (ZETASIZER NANO ZS 英国)。二硬脂酸磷酸酯胆碱 (DSPC, Avanti, 美国), 二硬脂酸磷酸酯乙醇胺聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG2000, Avanti, 美国), 生物素-聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE-PEG2000-maleimide, Avanti, 美国), FITC 标记的 iRGD 肽 (吉尔生化, 中国), DAPI (Sigma, 美国), 小鼠脑微血管内皮细胞 (bEnd. 3, 中国科学院深圳先进技术研究院影像中心提供)。

1.2 方法

1.2.1 两组微泡的制备 将 DSPE-PEG2000-maleimide 和 FITC 标记的 iRGD 肽以摩尔比 1:1 溶解后磁性搅拌 24 h, 透析后冷冻干燥制得 DSPE-PEG2000-iRGD-FITC。将 9:0.5:0.5 的 DSPC、DSPE-PEG2000、DSPE-PEG2000-Irgd-FITC 溶解在三氯甲烷中。在 N_2 气流作用下除去三氯甲烷, 使磷脂在试管壁上形成均匀薄膜, 加入适量 0.1 M Tris 缓冲溶液后置于水浴式超声振荡器中振荡至透明, 分装于洁净西林瓶中密封, 用全氟丙烷置换瓶内空气, 置于机械振

荡器振荡 30 s 后制得携 FITC-iRGD 肽的 Integrin $\alpha_v\beta_3$ 靶向微泡 ($MB_{Integrin \alpha_v\beta_3}$), 制备过程中注意避光。以 9:1 的 DSPC、DSPE-PEG2000 制备非靶向空白微泡 ($MB_{control}$), 方法同前。

1.2.2 微泡基本性质的检测及荧光鉴定 光学显微镜下观察两组微泡的形态, 粒度仪检测各组微泡粒径和表面电位。将洗涤纯化后的荧光微泡置于倒置荧光显微镜下观察, 并用流式细胞仪检测微泡 FITC 荧光含量。

1.2.3 细胞培养及微泡体外黏附实验 采用含 15% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液, 37℃、5% CO_2 饱和湿度传代培养 bEnd. 3。取对数生长期的细胞按 4×10^4 /孔接种于 24 孔板中, 待细胞贴壁后, 以 4×10^4 /ml 浓度将靶向微泡和非靶向空白微泡加入 24 孔板中, 每一组实验各设 3 个复孔。细胞培养箱中孵育 15 min, PBS 洗涤数次, 洗去未黏附的微泡。加入 DAPI 进行细胞核染色, 于光学显微镜及荧光显微镜下观察 $MB_{Integrin \alpha_v\beta_3}$ 及 $MB_{control}$ 两组微泡与细胞的黏附情况。

1.3 统计学分析 应用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组微泡的基本理化性质测定 $MB_{Integrin \alpha_v\beta_3}$ 与 $MB_{control}$ 微泡在光镜下均显示为大小、分布较均匀的球形气泡, 用粒径仪测得 $MB_{Integrin \alpha_v\beta_3}$ 粒径为 $(0.84 \pm 0.26) \mu m$, 与 $MB_{control}$ 粒径 $[(0.79 \pm 0.19) \mu m]$ 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1。两组微泡表面电位见图 2。

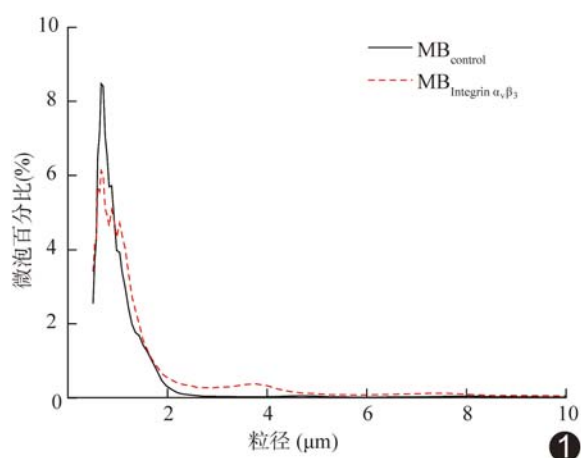


图 1 两组微泡粒径分布图

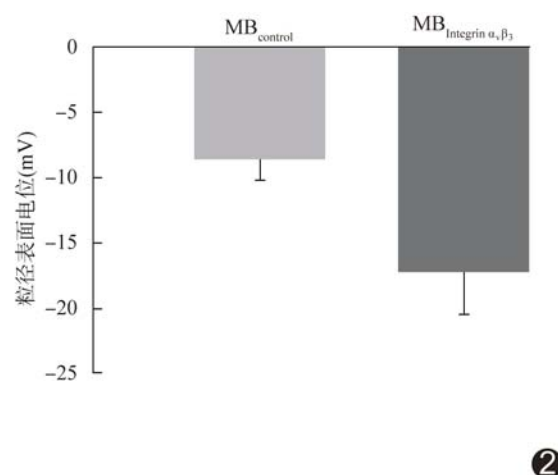


图 2 两组微泡表面电位比较

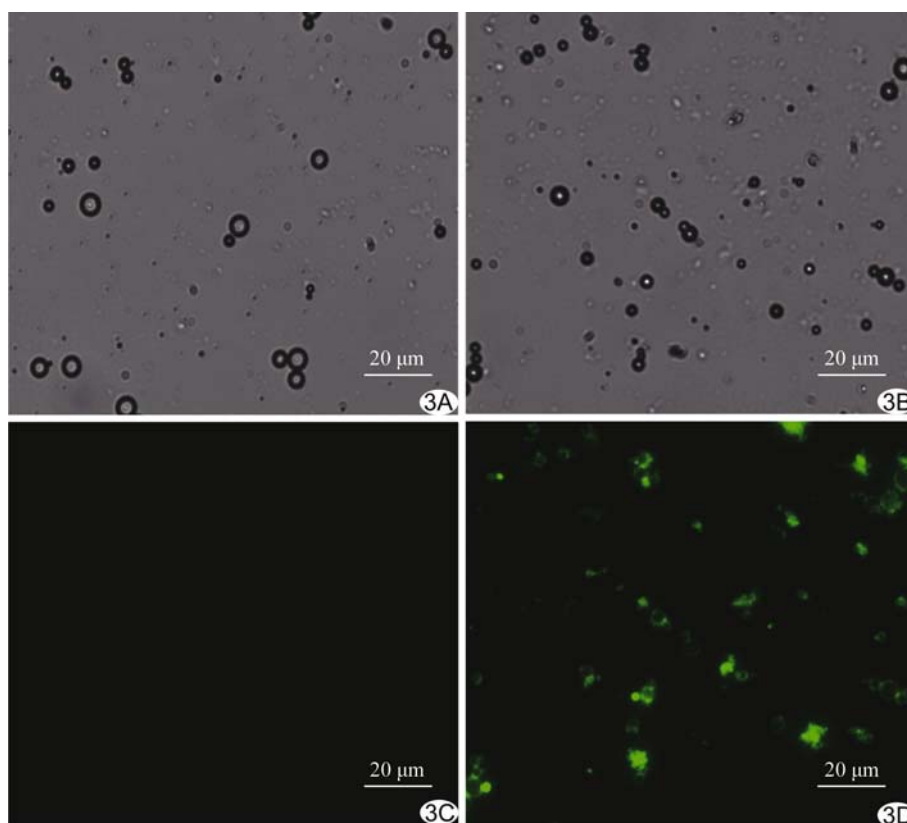


图 3 两组微泡荧光显示情况 A、B. $MB_{control}$ 、 $MB_{Integrin \alpha_v\beta_3}$ 组光镜图；C. $MB_{control}$ 组微泡无荧光显示；D. $MB_{Integrin \alpha_v\beta_3}$ 组微泡表面显示为绿色荧光

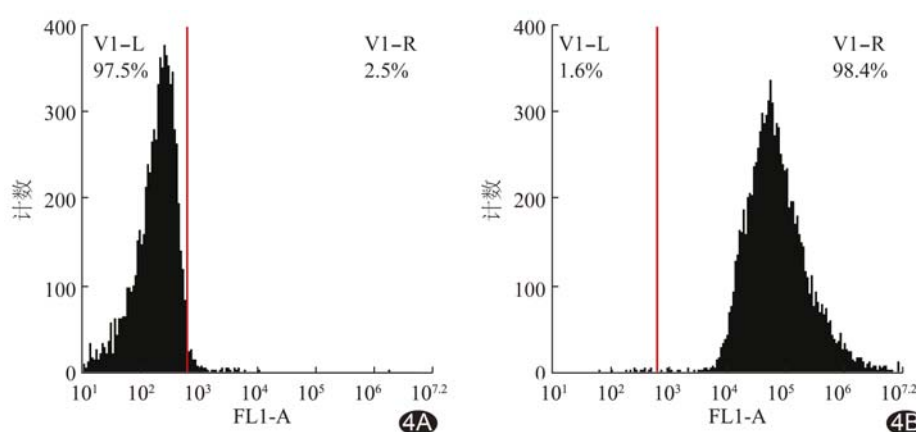


图 4 流式细胞仪检测两组微泡 FITC 荧光含量 A. $MB_{control}$ 组微泡；B. $MB_{Integrin \alpha_v\beta_3}$ 组微泡

2.2 两组微泡荧光鉴定 荧光显微镜下观察发现， $MB_{control}$ 组微泡无荧光显示(图 3A)， $MB_{Integrin \alpha_v\beta_3}$ 组微泡表面显示绿色荧光(图 3B)。

2.3 流式细胞仪检测结果 $MB_{control}$ 组微泡 FITC 荧光含量为 2.5%(图 4A)； $MB_{Integrin \alpha_v\beta_3}$ 组微泡 FITC 荧光含量为 98.4%(图 4B)。

2.4 荧光显微镜下观察两组微泡与 bEnd.3 细胞体外

黏附效果 被 DAPI 荧光染料染色的 bEnd.3 细胞核呈现蓝色， $MB_{control}$ 未能与 bEnd.3 细胞发生黏附(图 5A)；而 $MB_{Integrin \alpha_v\beta_3}$ 能较多地聚集、结合在 bEnd.3 细胞周围(图 5B)。

3 讨论

近年来，超声定向微泡破坏 (ultrasound-targeted microbubble destruction, UTMD) 作为一种新型的基因传输方法及靶向给药系统^[1]，引起了国内外研究者的广泛关注。其介导药物、基因等大分子传输的机制，主要与超声破坏微泡时产生的空化效应有关，不仅能够引起血管内皮细胞间隙增宽，还可导致短暂可逆细胞膜微孔的产生，从而使细胞膜通透性增加，将基因传递入细胞内实现转染。但是传统的 UTMD 技术只是采取超声聚焦的宏观靶向，不能做到直接对靶细胞的精确定位，限制了其在肿瘤早期的应用，且对周围正常组织可能造成损伤^[2]。分子影像技术的发展让精确定位靶细胞、真正实现基因靶向传输成为可能。

在造影剂微泡表面连接针对某种肿瘤的特异性抗体(配体)，使其能够特异性识别靶细胞，靶向聚集至病灶内，不仅可以实现基因在靶细胞富集，为实现基因高效转染提供必要的先决条件，同时，也大大降低微泡(空化核)在正常组织的浓度，极大地减少了对正常组织产生副作用的

可能。

目前，关于靶向超声造影剂制备，国内外已有不少研究成果^[3-6]。靶点的选择是靶向造影剂构建的关键，也是其发挥靶向作用的决定因素。血管的生成在肿瘤的发生、发展过程中起着至关重要的作用。因此，与肿瘤血管生成过程相关的因子为靶向造影提供了相应靶点。整合素是细胞黏附分子家族中的一类生物大分子，

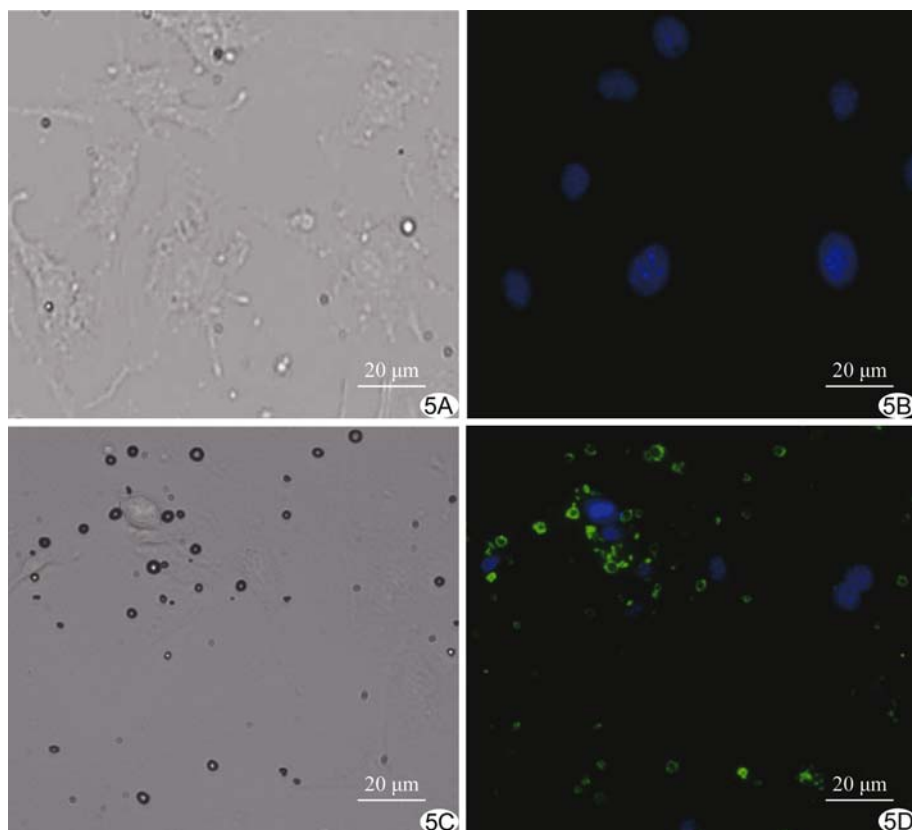


图 5 两组微泡与 bEnd.3 细胞黏附情况 A、B. MB_{control} 组微泡未与 bEnd.3 细胞黏附; C、D. MB_{Integrin $\alpha_v\beta_3$} 组微泡较多地聚集、结合在 bEnd.3 细胞周围

由 α 和 β 两个亚基形成跨膜异二聚体。整合素 $\alpha_v\beta_3$ (Integrin $\alpha_v\beta_3$) 是整合素家族中的重要成员,在肿瘤血管内皮细胞及部分肿瘤细胞上均呈高表达^[7]。近年来,多肽在主动靶向输送系统中的应用受到了广泛的关注。根据其效应的不同大致分为 3 类:①单纯靶向肽,仅具有靶向作用,而不具细胞穿透功能;②细胞穿膜肽,本身不具靶向功能,但具有细胞膜穿透效应;③靶向穿膜肽,既具有靶向效应,并且能够介导细胞膜穿透效应递送药物或基因^[8]。iRGD 肽属于靶向穿膜肽,其序列为 CRG-DRGPDC,其 RGD 序列具有整合素靶向的功能,能够靶向到整合素高表达的肿瘤组织,而经过肿瘤附近特定酶切割之后的 R 残基片段,则能够与肿瘤细胞表面的 NRP-1 受体相互作用,介导发生细胞膜穿透效应,实现药物或基因的输送^[9]。因此,本研究选择在癌细胞中高表达的 Integrin $\alpha_v\beta_3$ 作为靶点,尝试使用巯基-马来酰亚胺连接法将 iRGD 肽连接至微泡表面,构建出一种 Integrin $\alpha_v\beta_3$ 靶向微泡作为基因输送的载体。

本研究使用 FICT 标记 iRGD 肽,制备出的微泡在荧光显微镜下显示为明亮的绿色,流式细胞仪检测

结果也证实我们已成功将 iRGD 肽装配至微泡表面,制备出 Integrin $\alpha_v\beta_3$ 靶向微泡。随后在体外 bEnd.3 细胞黏附实验中,证实了 MB_{Integrin $\alpha_v\beta_3$} 微泡能够与内皮细胞表面的 Integrin $\alpha_v\beta_3$ 结合,具有较强的 Integrin $\alpha_v\beta_3$ 靶向能力。

综上所述,本研究成功制备了一种携 iRGD 肽的 Integrin $\alpha_v\beta_3$ 的靶向微泡,并在体外实现了造影剂微泡的靶向结合,有望在下一步基因传递中实现基因的高效、靶向传递。

[参考文献]

- [1] Mayer CR, Bekeredjian R. Ultrasonic gene and drug delivery to the cardiovascular system. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(10):1177-1192.
- [2] Liu Y, Uno H, Takatsuki H, et al. Interrelation between HeLa-S3 cell transfection and hemolysis in red blood cell suspension using pulsed ultrasound of various duty cycles. *Eur Biophys J*, 2005, 34(2):163-169.
- [3] Anderson CR, Hu X, Zhang H, et al. Ultrasound molecular imaging of tumor angiogenesis with an integrin targeted microbubble contrast agent. *Invest Radiol*, 2011, 46(4):215-224.
- [4] Chan ES, Patel AR, Larchian WA, et al. In vivo targeted contrast enhanced micro-ultrasound to measure intratumor perfusion and vascular endothelial growth factor receptor 2 expression in a mouse orthotopic bladder cancer model. *J Urol*, 2011, 185(6):2359-2365.
- [5] 王星,冉海涛,王志刚,等.携 RGD 肽靶向高分子造影剂的制备及体外靶向实验. *中国医学影像技术*, 2011, 27(12):2403-2406.
- [6] Pillai R, Marinelli ER, Fan H, et al. A phospholipid-PEG2000 conjugate of a vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)-targeting heterodimer peptide for contrast-enhanced ultrasound imaging of angiogenesis. *Bioconjug Chem*, 2010, 21(3):556-562.
- [7] Cai WB, Gambhir SS, Chen XY. Molecular imaging of tumor vasculature. *Methods Enzymol*, 2008, 445(8):141-176.
- [8] Svensen N, Walton JG, Bradley M. Peptides for cell-selective drug delivery. *Trends Pharmacol Sci*, 2012, 33(4):186-192.
- [9] 赵波,范侯辰,王学清,等.iRGD 修饰的阿霉素主动靶向脂质体的细胞毒与抗肿瘤效果评价. *药学报*, 2013, 48(3):417-422.