

KGDS血栓靶向超声造影剂的制备及其初步评价

高峰^{1,2}, 一燕飞³, 盛小茜³, 王维¹, 梁琪¹, 罗卓琼², 周平², 李辉⁴

(中南大学 1. 湘雅三医院细胞移植与基因治疗中心, 长沙 410013; 2. 湘雅三医院超声科, 长沙 410013; 3. 药学院药剂学系, 长沙 410013; 4. 湘雅二医院麻醉科, 长沙 410011)

[摘要] 目的: 探讨制备靶向结合活化血小板的脂质超声造影剂的新方法, 评价制备的靶向超声造影剂体外与血栓靶向结合的能力。方法: 首先合成荧光标记的, 能与血小板膜糖蛋白 GPII b/III a受体特异性结合的赖氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸多肽-棕榈酸化合物 (KGDS-Palm)。采用“超声-高速剪切”法, 以带荧光 FITC 的 KGDS-Palm 为主要原料之, 制备靶向脂质超声造影剂。马尔文公司粒径测定仪检测微泡大小及分布; Coulter 计数仪分析浓度; 荧光显微镜下观察 KGDS 多肽与微泡的结合情况; 流式细胞仪评价多肽与微泡的结合效率; 观察靶向微泡在体外的稳定性; 采用体外血栓模型, 检测靶向微泡与血栓靶向结合的特异性。结果: KGDS 靶向超声造影剂呈淡黄色混悬液, 微泡浓度约为 1.5×10^9 / mL, 平均粒径为 $1.5 \mu\text{m}$, 98% 的微泡小于 $5 \mu\text{m}$ 。荧光显微镜显示靶向超声造影剂表面呈明亮的绿色荧光; 流式细胞仪检测 KGDS 结合效率为 90.04%; 体外 4℃ 保存 48 h 后微泡浓度及粒径无显著改变; 体外靶向及其拮抗实验证实, 靶向超声造影剂与血栓特异性结合。结论: 采用“超声-高速剪切法”制备靶向超声造影剂, 方法简单易行, 有利于靶向造影剂的制备及纯化; KGDS 靶向超声造影剂稳定性好、靶向结合特异性强。

[关键词] 靶向超声造影剂; 血栓; 分子影像学

[中图分类号] R445.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-7347(2009)12-1255-06

Preparation and preliminary evaluation of KGDS-targeted ultrasound contrast agent

GAO Feng^{1,2}, DING Yanfei³, SHENG Xiaoxi³, WANG Wei¹,
LIANG Qi¹, LUO Zhuoqiong², ZHOU Ping², LIHui⁴

(1. Institute of Cell Transplantation & Gene Therapy, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013; 2. Department of Ultrasound, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013; 3. Department of Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013; 4. Department of Anesthesiology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract Objective To prepare a thrombus-targeted ultrasonic contrast agent and to investigate its targeted ability to fresh blood clots. **Methods** We first synthesized FITC-KGDS-Palm compound, and then prepared thrombus-targeted microbubbles using “ultrasound & high speed shearing method”. Fluorescence labeling thrombus-specific peptides and KGDS, directed at the activated glycoprotein (GP) II b/III a receptor of platelets were attached to the surface of lipid microbubbles. The concentration and size of TUCA were measured by Malvern Zeta Sizer Nano-ZS590 and Coulter count-

收稿日期 (Date of reception) 2009-06-22

作者简介 (Biography) 高峰, 博士研究生, 主治医师, 主要从事胰岛移植及分子影像学方面的研究。

通讯作者 (Corresponding author) 王维, E-mail: wawe01cn@yahoo.com.cn

基金项目 (Foundation item) 湖南省自然科学基金 (09JJ3062)。 This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province, P. R. China (09JJ3062).

er Immunofluorescence was applied to confirm the conjugation. The conjugate ratio was assessed by flow cytometer (FCM). **Results** The KGDS-TUCA was straw yellow turbid liquor, and the concentration was 1.5×10^9 /mL, and the average size was 1.5 μ m. The targeted microbubbles conjugated with the thrombus-specific peptides showed bright green rings by fluorescence microscope. FCM demonstrated that the wavelength of shell of KGDS-TUCA changed greatly, and the conjugate ratio was 90.04%. In vitro study showed KGDS-TUCA remained stable for 48 h at 4 °C and target-attached to blood clots and showed good stability. **Conclusion** The ultrasound & high speed shearing method to prepare TUCA is easy and in favor of purification. KGDS-TUCA has high specific biological activity. The conjugate ratio and stability of KGDS-TUCA are excellent.

Key words targeted ultrasound contrast agent; thrombus; molecular imaging

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2009, 34(12): 1255-06]

分子影像学 (molecular imaging, MI) 是一门快速发展的交叉学科, 其目的是活体显示和定量分子及细胞水平变化。最新的研究表明, 利用 MI 能显示活体炎症、细胞凋亡及基因表达。特别吸引人的是, 其不仅是理想的发展中的生物成像探测器, 而且是药物或基因的载体。同一造影剂可以同时发挥诊断、靶向治疗和监测疾病情况等作用, 例如可以靶向显示血栓、释放溶栓药物及监测血栓的溶解情况。

超声分子成像技术利用靶向造影剂上的配体与靶向组织高亲和性的特性, 将超声造影剂浓集于靶组织, 并通过超声显像技术显示靶组织分子水平变化的病理过程。其中靶向造影剂的制备是目前制约超声分子影像技术发展的关键因素^[1]。本实验拟以赖氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸 (KGDS) 多肽为配体, 制备靶向结合活化血小板膜糖蛋白 GP II b/III a 受体的血栓靶向超声造影剂 (targeted ultrasound contrast agent, TUCA), 并检测其靶向结合血栓的特异性。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂

荧光标记的 KGDS-棕榈酸化合物 (FITC-KGDS-Palm) 购自北京中科亚光生物科技有限公司; DSPC 和 DPPA 购自上海东尚实业有限公司; 棕榈酸 (分析纯级) 购自天津市科密欧化学试剂开发中心; 聚乙二醇-4000 和无水乙醇 (均为分析纯级) 购自国药集团化学试剂有限公司; 泊洛沙姆 188 (药用级) 购自上海昌为; 全氟丙烷气体 (电子级产品, 纯度 99.999%) 购自北京欣明仁

医疗器械技术有限公司。

1.2 主要仪器

采用英国马尔文公司粒径测定仪 Nicomp380 Z3000 测量超声造影剂粒径大小及分布; 日本 Nikon 公司 TE 2000-S 荧光显微镜检测多肽与微泡结合情况; ALOKA α 10 彩色超声诊断仪购自日本 ALOKA 公司, 采用超声造影低机械指数实时灰阶造影匹配成像技术实时观察血凝块的回声, 并采用 Line 成像模式存储在仪器硬盘, 应用声学定量分析软件脱机分析增强强度。

1.3 TUCA 的制备及纯化

采用“超声-高速剪切”法制备 TUCA。称取 40 mg DSPC, 4 mg DPPA 和 5 mg 泊洛沙姆 188 置离心管中, 加入 5 mL 双蒸水得脂质混悬液 A; 将 5 mg FITC-KGDS-Palm 溶于 200 μ L 无水乙醇中, 制成溶液 B; 再将脂质混悬液 A 进行探头超声 6 min (开 3 s 关 3 s, 功率 30%), 并在超声过程中逐滴加入溶液 B, 使二者充分混匀, 直至变为澄清溶液 C。称取 5 mg PEG-4000 加入澄清液 C 中, 溶解完全并混匀; 以全氟丙烷气体充分饱和澄清液 C 同时将其进行高速机械剪切 (1×10^4 r/min) 2 min, 即得淡黄色的 TUCA。采用蒸馏水洗涤, 离心机低速离心的“浮选法”纯化 TUCA^[2-3], 4 °C 保存备用。

1.4 KGDS-TUCA 一般特性的检测

显微镜下观察 KGDS-TUCA 的形态及分布, Zeta Sizer Nano-ZS590 检测粒径大小及其分布, Coulter 计数仪分析浓度和大小。

1.5 KGDS-TUCA 靶向结合效率及靶向性检测

1.5.1 荧光显微镜检测法

将带有荧光的 KGDS-TUCA 滴于载玻片上,

采用蓝紫光滤光片观察 KGDS-TUCA 形态、分布及其表面发光情况,即时拍照并记录结果。固定荧光显微镜曝光时间和激光功率。

1.5.2 流式细胞仪检测探针与微泡的结合效率

随机计数 5×10^4 个微泡,以未结合 KGDS 的自制脂质超声造影剂作对照,与纯化后脂质 KGDS 靶向造影剂比较,检测其荧光度的差别,观察带有荧光 FITC 的 KGDS 与脂质微泡的结合效率^[4]。

1.5.3 KGDS-TUCA 体外靶向性的检测

1.5.3.1 制备血凝块

采集 5 名健康成人手肘静脉血各 10 mL 置于不加任何抗凝剂的试管中,37 °C 恒温水箱孵化 1.5 h,最后得到 15 块面积约为 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 的新鲜全血细胞凝块(即红色血栓)^[5]。

1.5.3.2 实验分组

A 组(靶向组)加入 0.05 mL KGDS-TUCA; B 组(对照组)加入 0.05 mL 自制非 TUCA; C 组(拮抗剂阻断组)先加入 KGDS 多肽,与血凝块充分共孵育后,再加入 0.05 mL KGDS-TUCA。

以上各组实验分别重复 5 次。采用日本 ALOKA 公司 ALOKA $\alpha 10$ 彩色超声诊断仪,浅表 5412 探头,频率 3.75 MHz,声场深度 4 cm、机械指数 0.11,实验过程中维持增益、取样深度、时间增益补偿、聚集范围不变。含 100 mL 无气水的水槽中加入血凝块、造影剂,采用超声造影低机械指数实时灰阶造影匹配成像技术实时观察血凝块的回声,并采用 Line 成像模式存储在仪器硬盘,应用声学定量分析软件脱机分析增强强度。

1.6 KGDS-TUCA 稳定性实验

根据观察时间点不同将 TUCA 分为 0, 6, 24 和 48 h 组共 4 组 ($n = 5$)。0 h 组为新鲜制备的 TUCA; 其余 3 组分别是 4 °C 保存 TUCA 6, 24 和 48 h,检测前再次混匀。光镜下观察各组微泡大小及分布, Coulter 计数仪分析各组微泡粒径大小及其浓度。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件包进行统计学分析。数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间的比较采用方差分析 q 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 KGDS-TUCA 的一般特性

KGDS-TUCA 呈淡黄色混悬液,微泡浓度约为 $1.5 \times 10^9 / \text{mL}$,平均粒径为 $(1.5 \pm 0.5) \mu\text{m}$,98% 的微泡小于 $5 \mu\text{m}$ (图 1)。

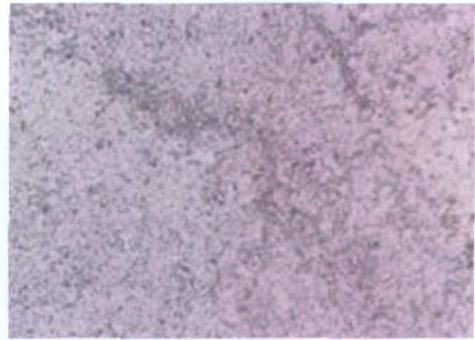


图 1 KGDS-TUCA 粒径均一 ($\times 400$)。

Fig 1 The size distribution of KGDS-TUCA is homogeneous ($\times 400$).

2.2 KGDS-TUCA 的靶向性

2.2.1 荧光显微镜检测结果

探针 KGDS 多肽带有 FITC 荧光,荧光显微镜观察 KGDS-TUCA,可见密集分布的表面呈绿色光环的微泡,其浓度密集,大小均一,形态规整(图 2),证实 KGDS 连于微泡表面。

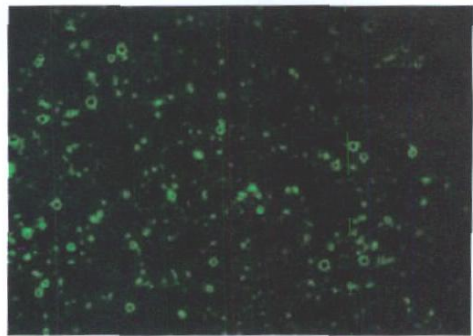


图 2 KGDS-TUCA 荧光图 ($\times 400$)。

Fig 2 Fluorescence image of KGDS-TUCA ($\times 400$).

2.2.2 流式细胞仪检测 KGDS 与微泡结合效率

靶向造影剂与普通造影剂比较,KGDS-TUCA 有 90.04% 的微泡荧光不同,因此配体 KGDS 与微泡的结合效率约为 90.04% (图 3)。

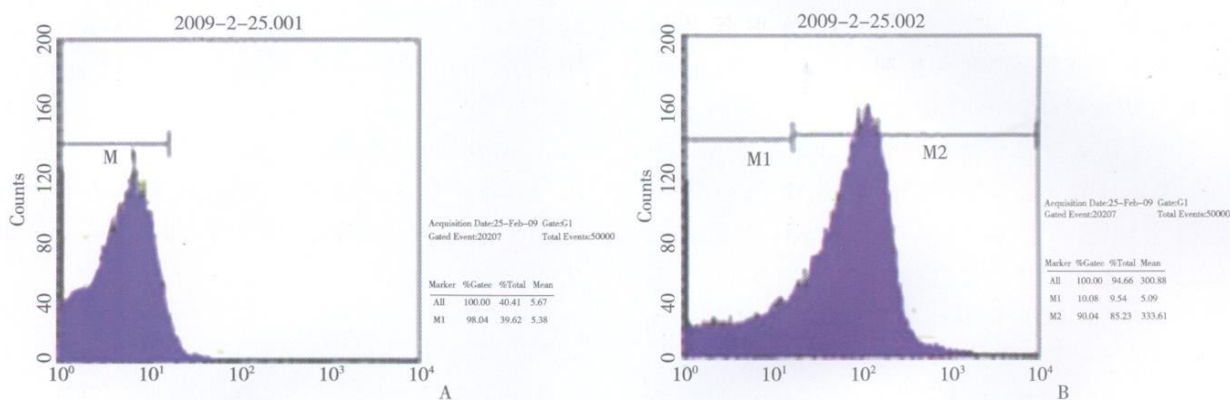


图 3 流式细胞仪检测配体与微泡结合效率图。A: 普通自制脂质超声造影剂流式细胞仪荧光图; B: KGDS-TUCA 流式细胞仪荧光图。

Fig 3 Image of conjunction ratio of ligand attached to microbubbles by flow cytometry analysis A: Flow cytometry analysis of non-targeted ultrasound contrast agent B: Flow cytometry analysis of KGDS-TUCA.

2.2.3 体外靶向性实验结果

A 组(靶向组): 血栓块与 KGDS-TUCA 共孵育后, 其表面呈环状高回声增强(图 4A), 采用无气水反复漂洗 3 次, 依然呈环状强回声(图 4B); B 组(对照组): 血栓块与普通造影剂共孵

育后, 血栓块无增强, 回声呈“充盈缺损”声像(图 4C); C 组(拮抗剂阻断组): 血栓块与 KGDS-TUCA 充分共孵育后, 再加入 KGDS-TUCA, 血栓块表面无增强, 回声呈“充盈缺损”声像(图 4D)。

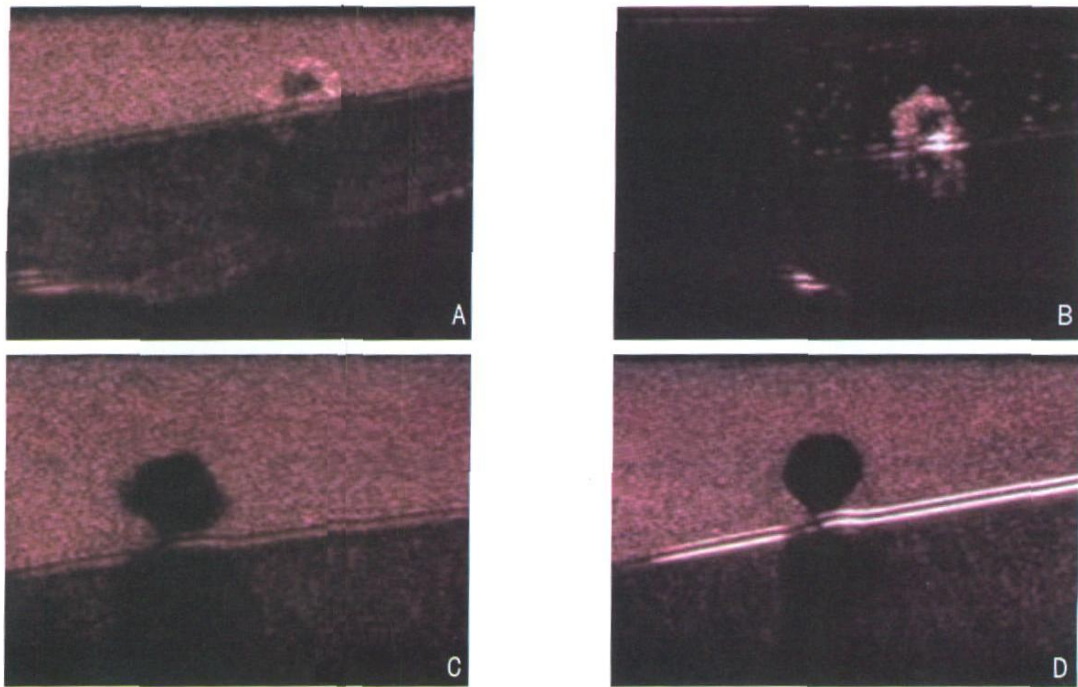


图 4 血栓靶向性检测。A: 靶向造影剂显示血栓周边环状增强; B: 血栓经无气水洗涤后, 其周边仍环状增强; C: 普通造影剂显示血栓无增强; D: 靶向拮抗抑制实验显示靶向造影剂不能增强血栓。

Fig 4 To verify the thrombus-targeted specificity A: Ring enhancement around thrombus by TUCA; B: Ring enhancement of thrombus binding with TUCA after washed by air-free water; C: Non-enhancement of thrombus by TUCA; D: Non-enhancement of thrombus incubated with blocking agent by TUCA.

A组和A组漂洗后超声回声灰阶值分别为 80.66 ± 5.2 和 76.65 ± 6.2 ,差异无统计学意义($P > 0.05$),其与B组和C组比较,增强强度显著增加($P < 0.05$);B组和C组超声回声灰阶值分别为 22.25 ± 3.2 和 18.78 ± 3.1 ,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 KGDS-TUCA 的稳定性

4组样品放置不同时间后,其粒径大小、浓度如表1所示。随时间延长,其粒径稍有增大,浓度稍降低,但微泡浓度、粒径大小各组之间差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

表1 靶向造影剂体外稳定性比较

Tab 1 Comparison of stability of TUCA in vitro

组别	粒径 (μm)	浓度 ($\times 10^9 \text{ mL}$)
A组 (0 h)	1.52 ± 0.50	1.58 ± 0.40
B组 (6 h)	1.63 ± 0.60	1.54 ± 0.40
C组 (24 h)	1.71 ± 0.40	1.49 ± 0.50
D组 (48 h)	1.75 ± 0.60	1.46 ± 0.60

3 讨 论

1999年美国哈佛大学Weissleder^[6]最早提出MI的概念,即应用影像学的方法对活体状态下的生物过程进行细胞和分子水平的定性和定量研究。分子特异性探针的构建是MI研究的核心内容^[1]。成像效果好的分子影像探针需符合以下要求^[7]:(1)分子探针对其靶生物分子具有高度特异性和亲和力;(2)分子探针能反映活体内靶生物分子的含量;(3)分子探针对细胞表面和细胞内的相同的靶生物分子的结合不存在倾向性差异;(4)分子探针具有一定的通透性,能顺利达到目的地;(5)分子探针不会引起机体明显的免疫反应或其他不良反应;(6)分子探针在活体内相对稳定;(7)分子探针在血液循环中有适当的清除期,以满足既能与靶生物分子充分结合又不会有高的血“本底”。分子探针是活体内分子影像成功的先决条件之一。用化学或生物物理方法优化探针,使之具有合理的体内生物学行为,包括稳定性、高信噪比等,是探针构建中必须考虑的重要课题。

本实验研究采用磷脂、棕榈酸、聚乙二醇、泊洛沙姆、全氟丙烷等作为原料,制备出安全、稳定、靶向性高的微泡超声造影剂。

首先采用磷脂作为制备TUCA主要原料:磷脂材料与组织相容性相当高^[8,9],不干扰人体正常的生理机能,不发生免疫原性反应,已有采用磷脂为材料的商品化超声造影剂应用于临床。此外,磷脂作为微泡膜材料,使微泡膜富有弹性,即增加了超声的反射,又使微泡具有柔韧性,不易破裂。第二,全氟丙烷惰性气体作为微泡的充填气体:与氧和氮相比较,其在水或血液中的溶解度和扩散率非常低;全氟丙烷气体中的氟-碳结合是自然状态下非常牢固的结合,在体内不易分解代谢,因此全氟丙烷在血液中非常稳定,增加了微泡的稳定性;第三,以棕榈酸为原料之一:棕榈酸能够作为表面活性剂并形成微泡外薄膜,微泡表面覆盖一层薄的棕榈酸壳,其作用在于将气液分开,减慢气体溶解,也增加微泡的稳定性。综上所述,从理论上讲,自制脂质超声造影剂具有安全无毒,性质稳定,在体内留存时间长,造影后可产生明显的造影增强效果的特点。本实验也证实了自制脂质超声造影剂具有良好的稳定性:造影剂混悬液体外放置48h后,微泡的粒径及浓度没有显著改变。

靶向造影剂的关键是将配体连于微泡表面,使之具有定向结合靶点的性质。将配体结合于微泡表面的方法有4种^[10]:(1)直接连接法:又称为共价的被动吸附、静电吸附法。缺点是制备得到的TUCA稳定性不强,极易受到溶液物理性质改变的影响,有研究表明体内寻靶效果不佳。(2)偶联剂连接法:缺点是靶向片段结合率不高,且多功能试剂的选择范围有限。(3)桥连剂连接的方法:又称共价结合法。此法产物靶向性稳定,化学基团选择范围非常广泛易得,可根据需要引入不同的基团,制备过程同普通超声造影剂。此法成为现今研究的热点。(4)非吸附性非共价键键结的免疫化学固定法:例如生物素亲和素(biotin-avidin system)法。

以上方法各有优缺点,本实验根据自制造影剂的材料特点,棕榈酸是其主要原料之一,不溶于水,在维护微泡稳定性发挥着重要作用。因此,设想以棕榈酸作为桥连剂,将配体结合于微泡表面。首先将KGDS多肽连于棕榈酸,制备出纯度达98%的KGDS-棕榈酸化合物。然后采用高速剪切分散装置对包含KGDS-棕榈酸化合物的脂质液进行高剪切分散处理形成微泡,制备出粒径合适、分布均匀,浓度较高的靶向造影剂。本实验靶向造影剂制备方法,不需要添加造影剂

制备原料以外的试剂材料,制备方法简单,与普通超声造影剂制备方法相同,对微泡本身特性干扰小,有利于纯化靶向造影剂。此外,理论上配体结合效率应该很高:棕榈酸是 KGDS-TUCA 微泡膜重要的组成成份,而使用的 KGDS-棕榈酸化合物又是纯度很高的原料,因此微泡膜上有棕榈酸存在,就应该有配体 KGDS 连接于微泡表面。本实验采用流式细胞仪检测证实靶向配体与微泡结合效率高达 90.04%。

配体的选择也是制备靶向性高、结合力强的 TUCA 的关键。多肽是一种主要的配体,其类似于抗体,作为探针制备靶向造影剂可以有很高的靶向特异性和很强的结合力。其大小可以是小片段多肽,约 5~10 个氨基酸(如识别血小板 GP II b/III a 受体的 RGD 多肽);也可以是较大的片段的生物活性荷尔蒙,如缩胆囊素。较小的多肽与抗体相比,免疫原性更小。本实验选择的是亲血栓 KGDS 多肽。以往血栓 TUCA 的配体多采用 RGD(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)多肽,作为识别活化血小板的配体^[4-11],但含有 RGD 的肽,除了识别血小板活化表达的 GP II b/III a 受体外,还识别其他细胞受体,不具有识别活化血小板 GP II b/III a 受体专一性。赖氨酸 K 代替精氨酸 R,对活化血小板 GP II b/III a 受体亲和力明显增强^[12],含 KGD(赖氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)序列的肽段仅作用于活化血小板 GP II b/III a 受体,不干扰其他细胞类型介导的生理反应,因而 KGDS 序列的肽是理想的血栓靶向造影剂配体^[13]。

本实验采用荧光显微镜、流式细胞仪的方法,证实 KGDS 连接在微泡表面,其结合效率高达 90.04%。体外靶向及其拮抗实验显示,KGDS-TUCA 可以靶向显示血栓,具有与血栓很强的结合能力。

本研究采用“超声-高速剪切法”制备出 KGDS-TUCA;通过体外实验,证实 KGDS 配体结合效率高,KGDS-TUCA 具有很高的稳定性和很强的血栓靶向性,为进一步研究其应用打下了坚实的基础。

参考文献:

[1] Kaufmann B A, Lindner J R. Molecular imaging with targeted contrast ultrasound [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(1): 11-16.
[2] Wilhelm JK, Paulhugan R, Chen K, et al. US imaging

of tumor angiogenesis with microbubbles targeted to vascular endothelial growth factor receptor type 2 in mice [J]. *Radiology*, 2008, 246(2): 508-518.
[3] 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 [J]. *临床超声医学杂志*, 2008, 10(5): 289-291.
WU Juefei, ZHA Daogang, YANG Li, et al. Assessment of biotinylated microbubbles targeted to streptavidin with parallel plate flow chamber [J]. *Journal of Ultrasound in Clinical Medicine*, 2008, 10(5): 289-291.
[4] 杨钰楠, 高云华, 谭开彬, 等. 携 RGDS 的靶向超声造影剂的制备及鉴定 [J]. *中国医学影像技术*, 2005, 21(11): 1677-1679.
YANG Yunan, GAO Yunhua, TAN Kaibin, et al. RGDS conjugated targeted liposome microbubbles: preparation and determination [J]. *Chinese Journal of Medical Imaging Technology*, 2005, 21(11): 1677-1679.
[5] Martin M J, Chung E M, Goodall A H, et al. Enhanced detection of thromboemboli with the use of targeted microbubbles [J]. *Stroke*, 2007, 38(10): 2726-2732.
[6] Weissleder R. Molecular imaging: exploring the next frontier [J]. *Radiology*, 1999, 212(3): 609-614.
[7] 张龙江, 祁吉. 分子影像学探针的研究与进展 [J]. *国外医学·临床放射学分册*, 2006, 21(5): 289-293.
ZHANG Longjiang, QI Ji. Research and progress of molecular imaging probe [J]. *Foreign Medical Sciences. Clinical Radiological Fascicle*, 2006, 21(5): 289-293.
[8] Unger E, Shen D, Fritz T, et al. Gas-filled lipid bilayers as ultrasound contrast agents [J]. *Invest Radiol*, 1994, 29(Suppl 2): S134-S136.
[9] 鲁莹, 刘英. 新型药物载体: 微乳 [J]. *国外医药·合成药·生化药·制剂分册*, 1999, 20(4): 253-258.
LU Ying, LIU Ying. New type of medicine carrier emulsion [J]. *World Pharmacy*, 1999, 20(4): 253-258.
[10] 杨钰楠, 高云华. 靶向超声造影剂制备的方法学研究 [J]. *中华超声影像学杂志*, 2006, 15(1): 65-67.
YANG Yunan, GAO Yunhua. Method research of preparation targeted ultrasound contrast agent [J]. *Chinese Journal of Ultrasonography*, 2006, 15(1): 65-67.
[11] Wright W H, McCreery T P, Knupinski E A, et al. Evaluation of new thrombus-specific ultrasound contrast agent [J]. *Acad Radiol*, 1998, 5(Suppl 1): S240-S242.
[12] Scarborough R M, Naughton M A, Teng W, et al. Design of potent and specific integrin antagonists, peptide antagonists with high specificity for glycoprotein GP II b/III a [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(2): 1066-1073.
[13] Lev E I, Osende J I, Richard M F, et al. Administration of abciximab to patients receiving tirofiban or eptifibatid: effect on platelet function [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 37(3): 847-855.

(本文编辑 郭征)