

携 IL-8 单抗靶向超声微泡对损伤心肌细胞的体外寻靶实验研究

孙 月 李鸿利 王禹雪 杨寒凝 朱桂敏 陆永萍

摘 要 **目的** 制备携 IL-8 单克隆抗体(以下简称单抗)靶向超声微泡,检测其基本特性,并探讨其对损伤心肌细胞的体外黏附能力。**方法** 采用共价偶联法制备携 IL-8 单抗靶向超声微泡,利用缺氧、缺糖方法制备损伤心肌细胞,通过靶向超声微泡与损伤心肌细胞的体外结合实验检测其寻靶能力,并与 SonoVue 微泡进行比较。**结果** 携 IL-8 单抗靶向微泡与轻度及重度损伤心肌细胞的黏附比分别为(61.9±18.9)%和(86.6±5.1)%,明显高于 SonoVue 微泡与轻度损伤及重度损伤心肌细胞的黏附比[(12.0±0.6)%和(11.8±1.0)%],差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);且随着损伤程度的加重,携 IL-8 单抗靶向超声微泡与心肌细胞的黏附作用逐渐加强($r = 0.945, P < 0.01$)。**结论** 携 IL-8 单抗靶向超声微泡对损伤心肌细胞具有较强的靶向性。

关键词 白细胞介素 8; 靶向; 超声微泡; 损伤心肌细胞

[中图分类号] R-33

[文献标识码] A

Experimental study on interleukin-8 monoclonal antibody-targeted ultrasound microbubbles targeting to injured cardiomyocytes in vitro

SUN Yue, LI Hongli, WANG Yuxue, YANG Hanning, ZHU Guimin, LU Yongping

Department of Ultrasound, the Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650021, China

ABSTRACT Objective To prepare interleukin-8 monoclonal antibody-targeted ultrasound microbubbles, determine the basic characteristics, and investigate their adhesion ability to injured cardiomyocytes in vitro. **Methods** IL-8 monoclonal antibody-targeted ultrasound microbubbles agent was prepared using covalent coupling method, and injured cardiomyocytes were prepared using cellular oxygen/glucose deficiency method. The targeting capacity of the microbubbles agent was assessed by combining targeted ultrasound microbubbles with injured cardiomyocytes in vitro, and the results was compared with SonoVue microbubbles. **Results** The adhesion ratio of IL-8 monoclonal antibody-targeted ultrasound microbubbles to early injured and injured cardiomyocytes was (61.9±18.9)% and (86.6±5.1)%, respectively. The effect was significantly higher than those of SonoVue microbubbles with the adhesion ratio of (12.0±0.6)% and (11.8±1.0)%, respectively, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). With the increase of injury severity, the adhesion of IL-8 monoclonal antibody-targeted ultrasound microbubbles and cardiomyocytes was gradually enhanced ($r = 0.945, P < 0.01$). **Conclusion** IL-8 monoclonal antibody-targeted ultrasound microbubbles has strong targeting performance to injured cardiomyocytes.

KEY WORDS Interleukin-8; Targeted; Ultrasound microbubbles; Injured cardiomyocytes

在我国,急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)已经逐渐成为死亡的最主要原因,致死率、致残率高。AMI 由于冠状动脉急性闭塞导致部分心肌缺血、坏死及炎细胞浸润。白细胞介素 8(IL-8)作为免疫和炎

症反应的重要调节因子,可通过介导中性粒细胞向内皮细胞迁移和释放氧自由基、蛋白分解酶等毒性产物损伤心肌细胞,在 AMI 中发挥重要作用。本实验采用交联剂将抗 IL-8 单克隆抗体(以下简称单抗)偶联至

基金项目:国家自然科学基金项目(81460062,81660084);云南省医学领军人才培养基金项目(L-201616)

作者单位:650021 昆明市,昆明医科大学第四附属医院 云南省第二人民医院超声科

通信作者:陆永萍,Email:luyongp@163.com

SonoVue 微泡表面,制备靶向超声微泡,并将其作用于损伤心肌细胞,探讨携 IL-8 单抗靶向超声微泡对损伤心肌细胞的体外寻靶能力,为 AMI 提供新的治疗靶点。

材料与方 法

一、主要试剂与仪器

鼠抗人 IL-8 单抗(英国剑桥 Abcam 公司); SonoVue(意大利 Bracco 公司);羊抗鼠 IgG 血清(美国 KPL 公司);荧光标记羊抗鼠 IgG 血清(IgG-FITC,美国 Invitrogen 公司);3-(2-吡啶二羧基)丙酸 N-羧基琥珀酰亚胺酯(SPDP,德国 Merck 公司);H9c2 新生大鼠原代心肌细胞(深圳白恩维生物科技有限公司)。IEC-Multi 型常温高速离心机(德国 Sigma 公司);倒置光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

二、靶向超声微泡的制备

将鼠抗人 IL-8 单抗溶于缓冲溶液,加入 SPDP 溶液反应,离心、洗涤得到带吡啶二硫基的单抗;加入 1 ml 的 DTT 醋酸溶液反应,离心、洗涤得到带巯基的抗体溶液。取 SonoVue 悬液加入 SPDP 交联剂,洗涤后与带巯基的抗体溶液混合,再次反应、洗涤,得到携 IL-8 单抗的超声微泡悬液^[1]。

三、基本特性检测及免疫荧光染色检验

取制备好的靶向超声微泡与 SonoVue 微泡各 20 μl , 分别经 PBS 缓冲液稀释成 1 ml 均匀分布的悬浮液,各取 10 μl 悬浮液滴于载玻片,压片后置于倒置光学显微镜下观察两种超声微泡的性状、大小、形态及分散度。另取 1 ml 靶向超声微泡与 SonoVue 微泡分别经 PBS 缓冲液稀释至 5 ml,各加入 10 μl 鼠抗人 IL-8 单抗,常温孵育 2 h,经 PBS 液 3 次洗涤、离心后,加入 10 μl 标记异硫氰荧光素的羊抗鼠 IgG,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,经 PBS 缓冲液洗涤、离心,荧光显微镜下观察两种超声微泡的免疫荧光染色情况。

四、体外细胞寻靶实验

1. 损伤心肌细胞模型的制备:体外培养新生大鼠 H9c2 原代心肌细胞,取对数生长期细胞接种于 40 个 35 mm 的培养皿中,每个培养皿接种 1×10^5 个心肌细胞。向培养皿中加入高糖培养基,放入无菌培养箱中适应 1 h 后取出。分为实验组(缺氧、缺糖)和对照组(有氧高糖),实验组再分为 A、B 组,对照组分为 C、D 组,每组 10 个培养皿。其中 A、B 组加入低糖培养基,C、D 组加入高糖培养基,放入无菌培养箱中适应 1 h 后,将 A、B 组培养皿放置于氮气的无氧袋中,使心肌细胞在纯氮气袋中缺氧、缺糖 6 h 后取出。倒置光学显微镜下

观察实验组和对照组心肌细胞形态结构的变化。

2. 心肌细胞损伤程度分级标准^[2]:①正常心肌细胞(-):饱满,呈圆形、梭形及锥形,折光性好;②轻度损伤心肌细胞(+):形态不规则,部分细胞膜破裂,部分可见胞浆颗粒,细胞间偶联破坏,折光性尚可;③重度损伤心肌细胞(++):细胞皱缩,细胞膜破裂,胞浆颗粒增加,细胞间偶联破坏,足突消失,折光性下降。

3. 超声微泡与心肌细胞相互作用的观察:实验组缺氧、缺糖损伤 6 h 后,同时取出 4 组培养皿,A、C 组加入 $6 \times 10^9/\text{ml}$ SonoVue 微泡 100 μl ,B、D 组加入 $6 \times 10^9/\text{ml}$ 自制的携 IL-8 单抗靶向超声微泡 100 μl ;室温静置 5 min,使微泡与心肌细胞表面充分接触;再将微泡悬液吸出,PBS 缓冲液清洗细胞 5 次,于倒置光学显微镜下观察各组培养皿中心肌细胞与超声微泡的黏附作用,并随机拍摄图片,每个培养皿 5 张。统计每张图片中黏附于超声微泡的各型心肌细胞数及各型心肌细胞的总数,计算超声微泡黏附各型心肌细胞数占各型心肌细胞总数的百分比即细胞黏附比。

五、统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验组和对照组超声微泡与心肌细胞黏附作用比较行独立样本 *t* 检验;两种超声微泡与各型心肌细胞的黏附作用与心肌细胞损伤程度的关系采用 Spearman 线性相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、两种超声微泡基本特性检测及免疫荧光染色检验结果

肉眼观察:所制备的携 IL-8 单抗靶向超声微泡外观呈均匀的凝乳状混悬液;倒置光学显微镜下观察微泡分布均匀,形态规则,90%以上的自制靶向超声微泡粒径约 2~4 μm ,微泡间无成簇及聚集现象,与普通 SonoVue 微泡比较无明显改变。未偶联 SonoVue 微泡平均浓度为 $(6.34 \pm 0.60) \times 10^9/\text{ml}$,偶联后携 IL-8 单抗靶向超声微泡平均浓度为 $(6.28 \pm 0.53) \times 10^9/\text{ml}$,二者比较差异无统计学意义。免疫荧光染色实验结果显示 SonoVue 微泡表面未见荧光显现,携 IL-8 单抗靶向超声微泡表面可见绿色荧光。见图 1。

二、实验组和对照组心肌细胞的分布

1. 实验组(A、B 组):重度损伤心肌细胞约占 52%,轻度损伤心肌细胞约占 35%,正常心肌细胞约占 13%。

2. 对照组(C、D 组):重度损伤心肌细胞约占 2%,轻度损伤心肌细胞约占 13%,正常心肌细胞约占 85%。

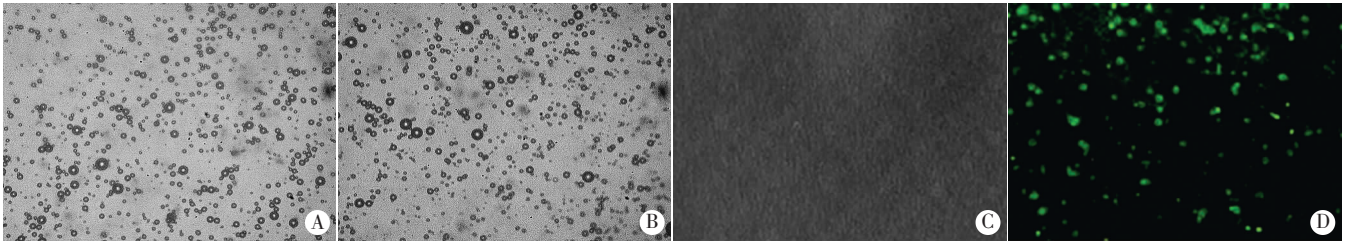


图 1 两种超声微泡形态、分布及免疫荧光染色效果图
A:倒置光学显微镜下 SonoVue 微泡($\times 400$);B:倒置光学显微镜下携 IL-8 单抗靶向超声微泡($\times 400$);C:荧光显微镜下 SonoVue 微泡表面未见荧光显现($\times 200$);D:荧光显微镜下携 IL-8 单抗靶向超声微泡表面可见绿色荧光($\times 200$)。

图 1 两种超声微泡形态、分布及免疫荧光染色效果图

三、两种微泡对心肌细胞的黏附作用

1.实验组中,A 组可见极少量 SonoVue 微泡黏附于损伤心肌细胞表面(图 2);B 组可见部分携 IL-8 单抗靶向超声微泡黏附于轻度损伤心肌细胞表面(图 3A),大量携 IL-8 单抗靶向超声微泡黏附于重度损伤心肌细胞表面(图 3B)。

2.对照组中,C 组可见极少量 SonoVue 微泡黏附于正常心肌细胞表面(图 4A);D 组可见极少量携 IL-8 单抗靶向超声微泡黏附于正常心肌细胞表面(图 4B)。

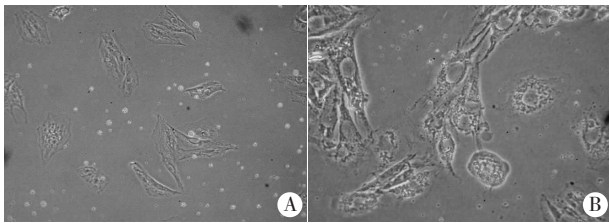


图 2 SonoVue 微泡与轻度损伤心肌细胞的黏附作用($\times 200$);B: SonoVue 微泡与重度损伤心肌细胞的黏附作用($\times 400$)。

图 2 实验 A 组 SonoVue 微泡与轻度及重度损伤心肌细胞的黏附作用

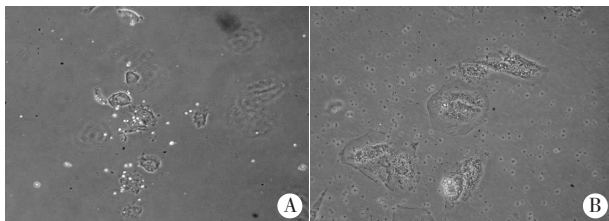


图 3 携 IL-8 单抗靶向超声微泡与轻度损伤心肌细胞的黏附作用($\times 200$);B:携 IL-8 单抗靶向超声微泡与重度损伤心肌细胞的黏附作用($\times 400$)。

图 3 实验 B 组携 IL-8 单抗靶向超声微泡与轻度及重度损伤心肌细胞的黏附作用

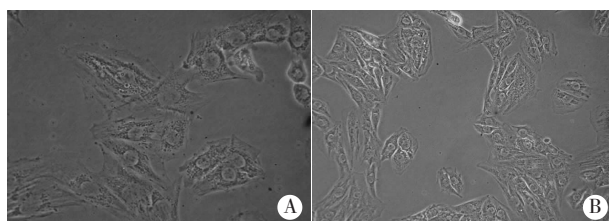


图 4 SonoVue 微泡与正常心肌细胞的黏附作用($\times 400$);B:携 IL-8 单抗靶向超声微泡与正常心肌细胞的黏附作用($\times 400$)。

图 4 对照组 SonoVue 及携 IL-8 单抗靶向超声微泡与正常心肌细胞的黏附作用

四、实验组两种超声微泡与各型心肌细胞黏附作用的定量分析

实验 B 组携 IL-8 单抗靶向超声微泡与轻度及重度心肌细胞黏附比明显高于实验 A 组 SonoVue 微泡与轻度及重度心肌细胞黏附比,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),见表 1;且随着损伤程度的加重,携 IL-8 单抗靶向超声微泡与心肌细胞的黏附作用逐渐加强($r = 0.945, P < 0.01$)。见图 5。

表 1 实验组两种超声微泡与各型心肌细胞黏附比比较($\bar{x} \pm s$) %

组别	正常心肌细胞	轻度损伤心肌细胞	重度损伤心肌细胞
A 组	11.3 \pm 1.1	12.0 \pm 0.6	11.8 \pm 1.0
B 组	12.6 \pm 0.6	61.9 \pm 18.9	86.6 \pm 5.1
t 值	-2.23	-56.62	-32.28
P 值	0.056	0.000	0.000

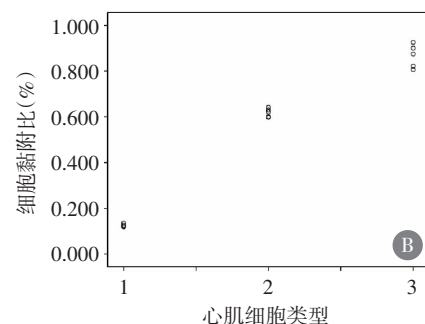
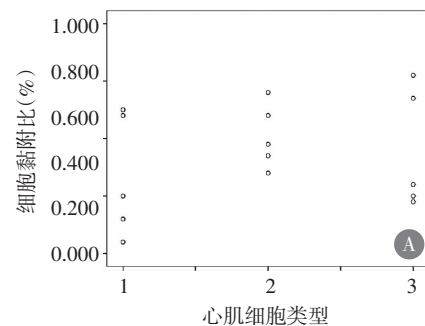


图 5 A: A 组; B: B 组。1: 正常心肌细胞; 2: 损伤初期心肌细胞; 3: 损伤心肌细胞。

图 5 实验组两种微泡与各型心肌细胞黏附比与心肌细胞损伤程度的相关性散点图

讨 论

随着靶向超声造影的发展,其在心血管疾病的诊断价值弥补了 CT、MRI 及常规超声检查的局限性,为疾病的靶向早期诊断提供了新的手段^[3]。“炎症、损伤”已成为心血管领域的一个研究热点,炎症反应可激活中性粒细胞和单核细胞,黏附及吞噬携带相关炎症因子的靶向超声微泡,通过靶向造影发现炎症发生的部位^[4]。IL-8 是参与 AMI 重要的炎症因子,具有强有力的趋化性和促炎作用,可介导激活的中性粒细胞黏附和运动^[5]。本实验将抗 IL-8 单抗作为靶向抗体偶联至 SonoVue 微泡表面,并通过体外实验验证了其良好的靶向作用和超声成像特性,为靶向超声造影早期诊断 AMI 奠定了基础。

本实验结果表明,经过 SPDP 交联后, SonoVue 微气泡大小、形态及形状无显著改变,即其物理、生物性状未发生改变,可作为造影剂作用于生物体内。羊抗鼠 IgG 血清作为二抗可以与一抗(鼠抗人 IL-8 单克隆抗体)发生凝集反应,从而证实微泡中存在鼠抗人 IL-8 单抗。免疫荧光检验结果显示:自制携 IL-8 单抗靶向超声微泡混悬液与二抗混合反应后发生了明显的凝集反应,未偶联的 Sono Vue 微泡无阳性结果,说明 IL-8 单抗已成功偶联到微泡外壳表面。

本实验采用缺氧、缺糖法建立损伤的心肌细胞模型, H9c2 心肌细胞从大鼠胚胎心肌组织分离,生长传代性质稳定,已广泛应用于与心肌细胞相关的实验研究^[6]。据文献^[7]报道,缺氧诱导 H9c2 心肌细胞,可使 IL-8 等炎症因子表达水平显著升高。于高倍显微镜下($\times 400$)直接观察普通及自制靶向微泡分别与正常、轻度及重度损伤心肌细胞的结合作用,并通过计数多个高倍视野下黏附微泡的心肌细胞数,对靶向黏附作用进行定量分析、比较。Spearman 相关性分析结果显示,携 IL-8 单抗靶向超声微泡黏附细胞数与心肌细胞损伤程度显著相关($r=0.945, P<0.01$),随着心肌细胞损伤

程度的加重,携 IL-8 单抗靶向超声微泡黏附心肌细胞的数量逐渐增加。其原因可能为损伤致使心肌细胞活化分泌 IL-8,损伤越重,则分泌的 IL-8 越多。同时也说明通过缺氧、缺糖处理可成功诱导损伤的心肌细胞分泌 IL-8。携 IL-8 单抗靶向超声微泡与损伤心肌细胞的黏附作用显著高于普通 SonoVue 微泡($P<0.01$),而与正常心肌细胞的黏附作用比较中,两种微泡间无明显差异。由此可见,靶向性超声微泡的特异性及敏感性明显高于普通超声微泡,为进一步的在体实验研究奠定了基础。

综上所述,本实验采用共价偶联法通过 SPDP 交联剂将 IL-8 单抗偶联至 SonoVue 微泡表面,制备出携特异性抗体的超声微泡;且体外实验观察发现其与轻度及重度损伤心肌细胞黏附作用强于普通 SonoVue 微泡,为靶向超声造影早期诊断 AMI 奠定了理论基础。

参考文献

- [1] 杨薇,陆永萍,邵庆华,等.IL-8 单抗靶向偶联 SonoVue 微气泡造影剂的方法学研究[J].中国超声医学杂志,2011,27(6):485-488.
- [2] Weerasinghe P, Hallock S, Brown RE, et al. A model for cardiomyocyte cell death: insights into mechanisms of oncosis[J]. Exp Mol Pathol, 2013, 94(1):289-300.
- [3] 郑海荣,严飞,邓志婷.超声探针是超声分子成像技术的关键[J].中华核医学与分子影像杂志,2013,33(1):1-3.
- [4] Lu Y, Wei J, Shao Q, et al. Assessment of atherosclerotic plaques in the rabbit abdominal aorta with interleukin -8 monoclonal antibody -targeted ultrasound microbubbles[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(4):3083-3092.
- [5] Kukiela GL, Smith CW, LaRosa GJ, et al. Interleukin -8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo [J]. J Clin Invest, 1995, 95(1):89-103.
- [6] Park EJ, Lee GH, Yoon C, et al. Biodistribution and toxicity of spherical aluminum oxide nanoparticles[J]. J Appl Toxicol, 2016, 36(3):424-433.
- [7] Yu J, Lu Y, Li Y, et al. Role of S100A1 in hypoxia -induced inflammatory response in cardiomyocytes via TLR4/ROS/NF - κ B pathway [J]. J Pharm Pharmacol, 2015, 67(9):1240-1250.

(收稿日期:2017-06-21)

《临床超声医学杂志》征订启事

《临床超声医学杂志》是经国家科委批准,集超声影像诊断、治疗、工程及基础研究为一体的科技刊物。国内外公开发行,月刊。为“中国科技论文统计源期刊”、“中国科技核心期刊”。设有临床研究、实验研究、综述、经验交流、临床报道、病例报道、述评、专家讲座、工程技术及译文等栏目。以各级超声医学工作者、相关临床专业医师及医学院校师生为主要读者对象。

本刊刊号:ISSN 1008-6978;CN 50-1116/R;邮发代号 78-116。

每期定价:16 元,全年 192 元(含邮寄费)。请到全国各地邮局订阅,也可直接向本刊编辑部订阅。

地址:重庆市渝中区临江路 74 号,重庆医科大学附属第二医院内,临床超声医学杂志编辑部。邮编:400010

电话:023-63811304 023-63693117 Email:lccscq@vip.163.com