

# 携 MAGE 靶向金纳米粒光声及超声显像 黑色素瘤的实验研究

李雪霖 冉海涛 李攀 郝兰 曹阳 敖梦 张楠 宋娇 张亮 易衡静 王志刚

**摘要** 目的 制备抗黑色素瘤相关抗原(MAGE)抗体偶联的载金纳米棒靶向纳米分子探针,探讨其对体外恶性黑色素瘤细胞的靶向性,观察其体外光声成像效果。方法 采用双乳化法制备包裹金纳米棒和液态氟碳的聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)纳米粒,碳二亚胺法连接靶向 MAGE 的单克隆抗体,制备高分子多功能靶向 PLGA 纳米分子探针,检测其一般物理特性、MAGE 抗体与纳米粒的连接情况及其体外寻靶能力,并观察体外光声成像效果。结果 成功制备的靶向载金纳米棒多功能纳米分子探针平均粒径( $336.40\pm 27.46$ )nm,平均 Zeta 电位( $-4.34\pm 4.9$ )mV。MAGE 抗体与纳米粒有效连接。体外寻靶能力实验显示黑色素瘤 B16 细胞株周围有大量靶向纳米探针环绕;光声成像显示随金纳米粒含量增加,其光声信号逐渐增强。结论 MAGE 抗体偶联金纳米棒纳米分子探针制备成功,对体外恶性黑色素瘤细胞具有较好的生物活性,细胞靶向性较好,且体外光声成像有明显增强信号,可作为光声成像造影剂,进一步行肿瘤靶向光热治疗。

**关键词** 光声技术;金纳米棒;靶向纳米探针;恶性黑色素瘤

[中图分类号]R-331;R445.1

[文献标识码]A

## MAGE-targeted gold nanoparticles for enhancing photoacoustic and ultrasound imaging on melanoma

LI Xuelin, RAN Haitao, LI Pan, HAO Lan, CAO Yang, AO Meng, ZHANG Nan, SONG Jiao, ZHANG Liang,

YI Hengjing, WANG Zhigang

Department of Geriatrics, Chongqing General Hospital, Chongqing 400014, China

**ABSTRACT Objective** To investigate the ability of targeting in vitro melanoma of nanoparticle probe loaded with gold nanorod and its consequence of photoacoustic imaging in vitro. **Methods** The polymeric multifunctional nanoparticles probe loaded with gold nanorod and liquid perfluorocarbon, and connected with MAGE-antibody targeting melanoma was prepared by double emulsion method and carbodiimide method. General physical property, the condition of MAGE-antibody connected with nanoparticles and the ability of targeting of the probe were tested. The different concentration of nanoparticles was imaged by photoacoustic. **Results** The targeting polymeric multifunctional nanoparticles probes loaded with gold nanorod were prepared successfully with average particle diameter of ( $336.40\pm 27.46$ )nm and Zeta potential of ( $-4.34\pm 4.90$ )mV. MAGE-antibody was successfully connected with the nano probes. There were massive targeting nano probes surrounded the melanoma cell strains B16 in the targeting group in vitro. The photoacoustic signal of the nano probes was enhanced with the increase of gold nanorod concentration in photoacoustic experiment in vitro. **Conclusion** The prepared polymeric multifunctional nanoparticles probe loaded with gold nanorod and connected with MAGE-antibody targeting melanoma can be used as a photoacoustic contrast agent, which can inhibit the proliferation of melanoma by targeting photothermal therapy.

**KEY WORDS** Photoacoustic imaging; Gold nanorod; Targeted nano probe; Melanoma

基金项目:国家自然科学基金重点项目(31630026、81630047);国家自然科学基金青年基金项目(81501482)

作者单位:400014 重庆市人民医院老年科(李雪霖);重庆医科大学超声影像学研究所(冉海涛、李攀、郝兰、曹阳、敖梦、张楠、宋娇、张亮、易衡静、王志刚)

通信作者:王志刚, Email: wzg62942443@163.com

随着影像学发展,分子影像技术成为研究的热点,其中光声成像作为一种非侵入式和非电离式的新生物医学成像方法,其原理是当脉冲激光照射到生物组织中时,组织的光吸收域将产生超声信号。这种光声信号携带了组织的光吸收特征信息,使光声成像能够得到功能成像及分子水平的影像信息<sup>[1-2]</sup>。纳米级的生物材料在影像学研究中能达到分子水平的疾病诊断及精准治疗<sup>[3-4]</sup>。其中,金纳米棒具有独特的可调节表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)光学特性,其光吸收系数高,能够从分子学水平检测肿瘤的病理学特征<sup>[5]</sup>。研究<sup>[6]</sup>表明金纳米粒子的吸收和散射强度明显强于大部分有机染料分子,在成像中具有显著优势。黑色素瘤相关抗原(melanomas associated antigen, MAGE)为黑色素瘤特异性抗原,在恶性黑色素瘤细胞中呈高表达。本实验拟制备一种载金纳米棒的高分子纳米分子探针,其包裹相变材料液态全氟己烷(perfluorohexane, PFH),同时能连接 MAGE 抗体特异性靶向恶性黑色素瘤细胞,旨在探讨纳米分子探针的体外光声成像效果,为肿瘤的早期诊断和靶向精准治疗开拓新的思路。

## 材料与方 法

### 一、主要实验材料及仪器

金纳米棒(香港 Nanoseedz 公司);PFH;聚乳酸-羟基乙酸-羧基(PLGA-COOH, 50:50 聚合比,分子量 12 000 kDa, 济南岱罡生物工程有限公司);二氯甲烷;聚乙烯醇(Sigma);异丙醇;1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, Sigma);荧光染料 DiI、DAPI;MES 缓冲液;Gibco 1640 培养液;胎牛血清(PAN-biotech, 德国)。小鼠黑色素瘤细胞 B16 株(武汉普诺赛);抗 MAGE-1 抗体(Bioeye, 中国);四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)标记的山羊抗鼠 IgG 抗体(Abcam, 英国)。

声振仪(Sonic, 美国);电子天平(Mettler Toledo, XS 104, 瑞士);超声清洗机(VCY-500, 上海);高速分散均质机(XHF-D, 宁波);磁力搅拌器;Malvern 激光粒径及电位检测仪(Malvern Zetasizer, 美国);紫外分光光度计(FEI Nova 450, 美国);高速冷冻离心机(Eppendorf, 美国);激光共聚焦显微镜(LEICATCSSP2 型);奥林巴斯倒置荧光显微镜;光声成像系统(Vevo LAZR, 美国)。

### 二、实验方法

#### 1. 靶向载金纳米棒的 PLGA 液态氟碳纳米粒的制

备:采用双乳化法制备非靶向纳米探针,200  $\mu$ l 金纳米棒溶液加入 200  $\mu$ l PFH;冰浴条件下使用声振仪声振 1 min(占空比 5:5, 103 W),得到白色初乳液。将 50 mg PLGA-COOH 加入 2 ml 二氯甲烷,充分混匀并予超声清洗机振荡完全溶解,再将上述初乳液加入到 PLGA 二氯甲烷溶液中,继续声振 4 min,得到乳色复乳液。向复乳液中加入 4%聚乙烯醇 5 ml,以均质机均质 5 min;然后加入 2%异丙醇 10 ml,使纳米粒表面固化;使用磁力搅拌器搅拌 3 h 使二氯甲烷充分挥发;使用高速冷冻离心机离心 3 次(10 000 r/min, 8 min),双蒸水洗涤,收集得到非靶向 GNR-PFH-PLGA 纳米粒。采用碳二亚胺法靶向修饰纳米探针,将上述非靶向纳米粒溶解于 1 ml MES 缓冲液(0.1 mol/L, pH 值 5.5)中,加入耦联活化剂 EDC 和 NHS(EDC:NHS 摩尔比为 1:3, PLGA:EDC 摩尔比为 1:10),冰浴振荡孵育 1 h,离心、PBS 洗涤 3 次后,复溶于 MES 缓冲液(0.1 mol/L, pH 值 8)中,然后加入 10  $\mu$ l 抗 MAGE 抗体(抗 MAGE 抗体与 PLGA 摩尔比为 1:1),冰浴振荡孵育过夜,再次离心、PBS 洗涤 3 次,得到靶向 GNR-PFH-PLGA 纳米粒,加入 10  $\mu$ l 的 TRITC 山羊抗鼠二抗,冰浴振荡孵育 4 h,离心、洗涤 3 次,溶于 2 ml 双蒸水中,4 $^{\circ}$ C 保存。在第一步声振前加入适量 DiI 荧光染料用于免疫荧光实验。

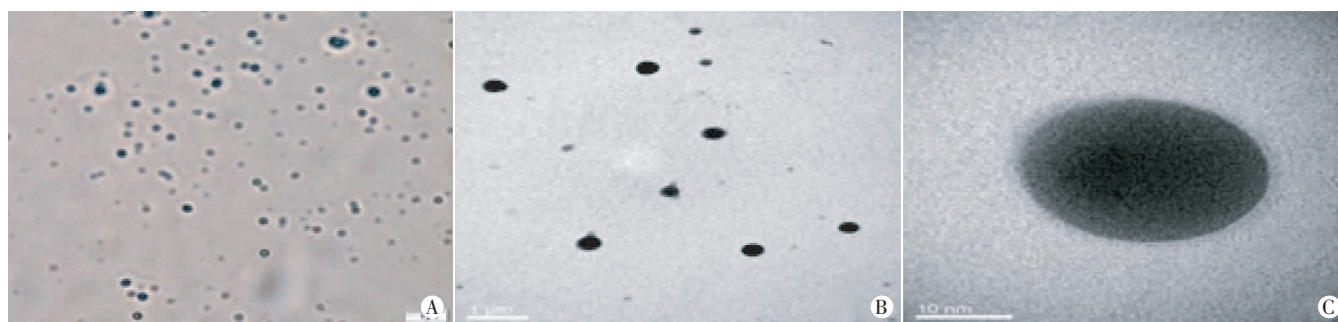
2. 靶向多功能纳米分子探针的物理性质检测:光学显微镜观察纳米分子探针大小及均一度;Malvern 激光粒径检测仪检测其粒径;Zeta 电位检测仪检测其表面电位;透射电镜观察其表面形态及内部结构;紫外分光光度计计算纳米粒中金纳米棒的包封率。取一定量纳米粒经低温离心分离上清液,于 780 nm 波长处测定上清液吸光度,计算包封率<sup>[7]</sup>:包封率=(金纳米棒投入量-上清液中金纳米棒量)/金纳米棒总投入量。

3. 细胞培养:小鼠黑色素瘤 B16 细胞培养于 1640 培养液中,均添加 10%胎牛血清,1%青霉素-链霉素双抗,在 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳条件下常规培养。

4. 免疫荧光法检测靶向纳米探针表面抗 MAGE 及分组抗体连接情况及体外寻靶能力:各取 1 ml 靶向 GNR-PFH-PLGA 纳米粒(靶向组),与非靶向 GNR-PFH-PLGA 纳米粒(非靶向组),分别加入两个 EP 管中,并用 MES 缓冲液(0.1 mol/L, pH 值 8)稀释至 2 ml;避光条件下向两个 EP 管中加入适量标记 TRITC 的山羊抗鼠 IgG;冰浴下振荡孵育 4 h,3 次洗涤、离心;各取少量纳米粒滴于激光共聚焦培养皿上,激光共聚焦显微镜观察两组对标记 TRITC 的山羊抗鼠 IgG 的连接情况。常规培养的小鼠黑色素瘤 B16 细胞分为两份,

取对数生长期以适当密度接种于激光共聚焦培养皿中,将带有 DiI 的靶向纳米粒及非靶向纳米粒分别加入细胞,37℃ 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次; 使用 4% 多聚甲醛固定细胞,加入 50 μl 细胞核染料 DAPI, 染色 15 min, PBS 洗涤 3 次; 于激光共聚焦显微镜下观察。

5. 体外光声成像实验: 制备浓度为 1.570 mg/ml、3.125 mg/ml、6.250 mg/ml、12.500 mg/ml 及 25.000 mg/ml 的纳米粒, 各取 100 μl 分别置于琼脂糖凝胶模型(3%) 中。激光触发不同浓度纳米粒, 采用光声成像仪(波长 780 nm, 重复频率 10 Hz, 脉冲宽度 5 ns, 超声探头频率 10 MHz) 进行光声信号的采集并生成二维图像, 并记录光声信号的变化。



A: 光镜下观察(x600); B: 透射电镜下观察(x50 000); C: 透射电镜下观察(x200 000)。

图 1 纳米粒物理性质检测

### 抗体连接情况及体外寻靶能力

激光共聚焦显微镜下白光通道见两组纳米粒呈圆球形透明状, 分散均匀。靶向组纳米粒组荧光通道可见 TRITC 标记的纳米粒呈红色, 融合后见纳米粒图像重合良好; 而非靶向组荧光通道未见荧光显色, 融合图像无变化。见图 2。

经 DAPI 染色的小鼠黑色素瘤 B16 细胞核呈蓝色, 经 DiI 染色的纳米粒呈红色。融合图像见靶向组纳米粒在黑色素瘤细胞膜上大量富集环绕, 细胞株周围可见纳米粒圈网状团聚围绕; 而非靶向组未见纳米粒在黑色素瘤细胞的富集。见图 3。

### 三、体外光声成像结果

光声仪显示浓度为 1.570 mg/ml、3.125 mg/ml、6.250 mg/ml、12.500 mg/ml、25.000 mg/ml 的纳米粒光声值分别为 0.254、0.267、0.497、0.833、1.226。随着纳米粒浓度的增加, 其光声信号呈逐渐增强趋势, 且不同浓度纳米粒信号强度比较, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ), 见图 4。

## 讨 论

光声成像技术的基本原理是光敏物质吸收的光能量转换为热能, 致组织发生热膨胀效应, 从而激发组织

### 三、统计学处理

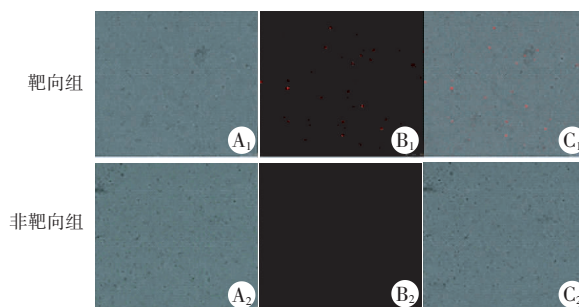
应用 SPSS 17.0 统计软件, 组间两两比较采用 SNK 法。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、靶向多功能纳米分子探针的物理性质检测

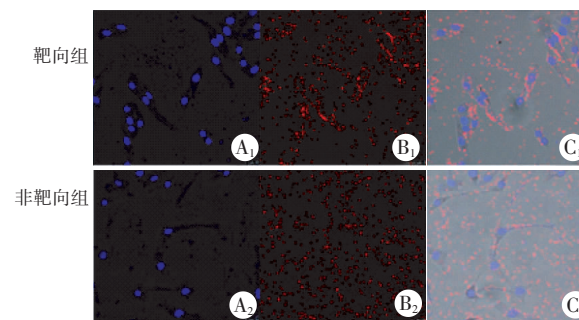
成功制备的纳米粒溶液呈乳白色悬浊液, 粒径为  $(336.40 \pm 27.46) \text{ nm}$ , Zeta 电位为  $(-4.34 \pm 4.9) \text{ mV}$ ; 光镜下成圆球形, 形态规则, 表面光滑(图 1A); 透射电镜下可见纳米粒呈球形, 大小分布均匀(图 1B), 纳米粒表面有金纳米棒附着(图 1C); 包封率为  $(53.74 \pm 6.31) \%$ 。

### 二、免疫荧光法检测靶向纳米探针表面抗 MAGE



A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>: 白光下; B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>: 荧光下; C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>: 融合图像。

图 2 免疫荧光检测抗 MAGE 抗体连接情况

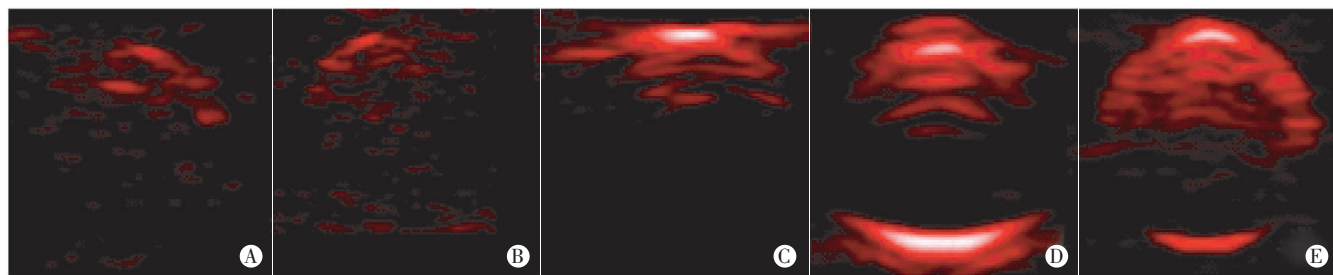


A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>: DAPI 染色; B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>: DiI 染色; C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>: 融合图像。

图 3 激光共聚焦显微镜检测体外寻靶情况

产生超声频谱信号<sup>[1]</sup>, 其成像分辨率高即源于激光激发和超声探测的双重聚焦<sup>[8]</sup>。近红外光谱为非可见光, 适用于人体及动物研究, 对特定部位或组织显像, 如肿





A: 1.563 mg/ml; B: 3.125 mg/ml; C: 6.250 mg/ml; D: 12.500 mg/ml; E: 25.000 mg/ml.

图 4 不同浓度纳米粒的光声成像二维图像

瘤组织可以采用光声成像对比剂结合近红外光谱进行显影。金纳米棒拥有随长宽比变化连续可调的表面等离子体共振波长,生物相容性好,且具有低毒性,能连接生物分子用于靶向研究<sup>[9]</sup>,具有强烈的光学消光特性及良好的光热转换效率,且稳定性好,不易发生淬灭,在生物医学领域应用广泛<sup>[10]</sup>。

本实验中研制的包裹金纳米棒及液态氟碳 PLGA 靶向纳米粒粒径均一,分散度可。免疫荧光检测显示抗 MAGE 抗体和纳米粒连接率高。体外寻靶实验显示靶向纳米粒在黑色素瘤细胞株有明显富集环绕;而非靶向组纳米粒均匀分布于细胞株之间无团聚,结果证实靶向纳米粒对恶性黑色素瘤细胞有较好的生物活性,可为后续肿瘤的靶向治疗提供有利条件。光声成像实验结果显示,随着不同浓度组金纳米棒含量的增加,光声信号呈逐渐增强趋势,证实该纳米粒可作为适用于近红外光谱范围内良好的光声成像对比剂。研究<sup>[11-12]</sup>结果提示,相变型纳米粒可利用声致相变及光致相变作用杀伤肿瘤细胞。故笔者在本研究后续实验中,将对纳米粒的光致相变联合光热治疗抑制肿瘤细胞生长行进一步研究。

综上所述,本实验成功制备抗 MAGE 抗体偶联金纳米棒纳米分子探针,其对体外恶性黑色素瘤细胞具有较好的生物活性,细胞靶向性较好,且体外光声有明显增强信号,可作为光声成像造影剂,进一步行肿瘤靶向光热治疗。

#### 参考文献

[1] Bayer CL, Joshi PP, Emelianov SY. Photoacoustic imaging: a potential tool to detect early indicators of metastasis [J]. *Exp Rev Med Dev*, 2013, 10(1): 125-134.

[2] Xu G, Xue Y, Slimani N, et al. Photoacoustic imaging features of intraocular tumors: retinoblastoma and uveal melanoma [J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(2): 1-15.

[3] Ma T, Sun X, Cui L, et al. Molecular imaging reveals trastuzumab induced epidermal growth factor receptor down regulation in vivo [J]. *J Nucl Med*, 2014, 55(6): 1002-1007.

[4] Fan Q, Cheng K, Hu X, et al. Transferring biomarker into molecular probe: melanin nanoparticle as a naturally active platform for multimodality imaging [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(43): 15185-15194.

[5] Nakagawa T, Gonad K, Kamei T, et al. X-ray computed tomography imaging of a tumor with high sensitivity using gold nanoparticles conjugated to a cancer-specific antibody via polyethylene glycol chains on their surface [J]. *Sci Technol Adv Mater*, 2016, 17(1): 387-397.

[6] Sun Y, Wang YJ, Niu CC, et al. Laser-activatable PLGA microparticles for image-guided cancer therapy in vivo [J]. *Adv Funct Mater*, 2014, 24(48): 7674-7680.

[7] 汪小乐, 邓燕芬, 庞廷媛. 叶酸偶联载多西紫杉醇壳聚糖纳米粒封装率的测定 [J]. *现代医院*, 2014, 14(2): 77-79.

[8] An HW, Qiao SL, Hou CY, et al. Self-assembled NIR nanovesicles for long-term photoacoustic imaging in vivo [J]. *Chem Commun*, 2015, 51(70): 13488-13491.

[9] 李茂萍. 叶酸靶向相变载金高分子超声及光声造影剂的基础研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.

[10] 陆耀红, 傅深. 金纳米微粒的光热治疗及放疗增敏研究 [J]. *天津医药*, 2011, 39(11): 1080-1083.

[11] Zhou Y, Wang Z, Chen Y, et al. Microbubbles from gas-generating perfluorohexane nanoemulsions for targeted temperature-sensitive ultrasonography and synergistic HIFU ablation of tumors [J]. *Adv Mater*, 2013, 25(30): 4123-4130.

[12] Wang YH, Liao AH, Chen JH, et al. Photoacoustic/ultrasound dual-modality contrast agent and its application to thermotherapy [J]. *J Biomed Opt*, 2012, 17(4): 045001.

(收稿日期: 2017-09-07)