

包裹吲哚菁绿的靶向相变型阳离子脂质纳米粒的制备及体外显像

邹宏密 黎 梦 周希媛 王志刚 简 嘉

摘 要 目的 制备一种包裹吲哚菁绿(ICG)的靶向相变型阳离子脂质纳米粒(INP),连接 CD105 抗体,检测其光热效应、体外相变、光声及超声显像规律。**方法** 采用双乳化法制备包裹 ICG 及液态氟碳的 INP;链霉亲和素法连接 CD105 抗体,流式细胞仪及激光共聚焦显微镜下观察 INP 与抗体结合情况;脉冲激光激发观察其光热效应及相变情况;体外低强度聚焦超声辐照,记录各时间点超声显影效果;光声成像仪检测其光声显像能力。**结果** 制备的 INP 平均粒径(354.20±93.85)nm,平均电位(25.20±3.29)mV,测得 ICG 包封率为(89.56±0.79)%;与 CD105 抗体结合率为 99.89%。纳米粒具有良好光热效应,其中在浓度 5 mg/ml、功率 2 W/cm² 激光辐照 180 s 时其温度可升至 63℃;可发生液气相变。体外低强度聚焦超声于 3 W 功率作用 0.5、2.5、5.0、7.5 min,B-mode 模式及 Contrast 模式均显示 5 min 时回声强度升至最高。光声信号随纳米粒浓度升高而增强,具有良好的线性关系。**结论** 成功制备了包裹 ICG 的靶向相变型阳离子 INP,其与 CD105 抗体结合率高,且光热效应好,光声及超声显影效果均佳。

关键词 阳离子;脂质纳米粒;吲哚菁绿;相变;靶向

[中图分类号] R445.1

[文献标识码] A

Preparation of targeted cationic nanoparticles incorporated with indocyanine green and imaging with the particles in vitro

ZOU Hongmi, LI Meng, ZHOU Xiyuan, WANG Zhigang, JIAN Jia

Department of Ophthalmology, the Second Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

ABSTRACT Objective To prepare a targeted phase change cationic lipid nanoparticle(INP) coated with indocyanine green(ICG), and CD105 antibody was attached to the particles. The photothermal effect, phase change, imaging laws of photoacoustic and ultrasonic imaging in vitro were studied. **Methods** INP coated with ICG and liquid fluorocarbon(PFP) was prepared by double emulsification method. Streptavidin method was used to connect CD105 antibody. Flow cytometry and laser confocal microscopy were used to observe antibody binding. The photothermal effect and phase change were observed by pulsed laser excitation. The effect of ultrasound imaging was recorded at different time after the phase change caused by low intensity focused ultrasound irradiation in vitro, and the photoacoustic imaging ability was detected by photoacoustic imager. **Results** The average size of the prepared INP was (354.20±93.85)nm, the average potential was (25.20±3.29)mV, the entrapment rate was (89.56±0.79)%, and the binding rate of CD105 antibody was 99.89%. The nanoparticles have good photothermal effect, and the temperature can rise to 63℃ with laser irradiation at a concentration of 5 mg/ml and a power of 2 W/cm² for 180 s, and liquid-gas phase change occurs. The echo intensity increased to the highest when irradiated with low intensity focused ultrasound with contrast mode for 5 min, and with B-mode at a power of 3 W for 0.5, 2.5, 5.0, and 7.5 min, respectively. The echo intensity increased with the increase of nanoparticle concentration, there was a good linear relationship between nanoparticle concentration and echo intensity. **Conclusion** The target phase variant cationic INP coated with ICG were successfully prepared, with good characteristics of light-thermal effect, photoacoustic imaging and ultrasound imaging, and high binding rate of nanoparticles to CD105 antibody.

KEY WORDS Cationic; Liposome; Indocyanine green; Phase variant; Target

基金项目:国家自然科学基金项目(81170858, 81501487)

作者单位:400010 重庆市,重庆医科大学附属第二医院眼科(邹宏密、黎梦、周希媛、简嘉);重庆医科大学超声影像学研究所(王志刚)

通信作者:简嘉, Email: cqxs@163.com

近年来纳米微粒对肿瘤靶向显像与药物定位递送成为研究热点,利用纳米粒在肿瘤组织中的高渗透和长滞留效应,可实现良好的造影效果,对肿瘤组织具有良好的靶向显影作用^[1]。液态氟碳(PFP)为含氟脂肪物一族,最初为血液替代品,具有良好的生物安全性;研究^[2]发现,将光吸收子与 PFP 结合对肿瘤具有良好的多模态显像效果及治疗效果,本实验选取的光吸收子吡啶菁绿(ICG),为美国食品与药品监督管理局批准的唯一可应用于临床的红外成像剂;血管内皮细胞表面为负电荷,带正电荷纳米粒子较中性离子具有更好的结合性^[1]。基于以上研究基础,本实验拟制备一种包裹 ICG 的 CD105 靶向相变型阳离子脂质纳米粒(INP),同时研究其与 CD105 抗体结合率,以及光热效应、体外相变、超声及光声显像规律。

材料与方 法

一、材料与仪器

1.实验试剂:二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC,美国 Sigma 公司),生物素化磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG2000-Biotin,美国 Nanocs 公司),DC 胆固醇(DC-chol,美国 Sigma 公司),三氯甲烷(上海生化),PBS 缓冲液(武汉博士德),链霉亲和素(美国 Sigma 公司),CD105 兔抗人抗体(美国 Abcam 公司),FITC 标记的山羊抗兔 IgG(上海碧云天公司),荧光染料 DiI(上海碧云天公司)。

2.实验仪器:旋转蒸发器(上海亚荣 RE-52B),超声声振仪(Vcy-500,美国 Sonics & Materials,频率 200 MHz),激光粒径测量仪(Zetasizer Nano ZS90,英国 Malvern 仪器有限公司),倒置荧光显微镜(TH4-200,日本 Olympus 公司),紫外分光光度计(uv-2550, Shimadzu),红外成像仪(FOTRIC 226,上海坚融实业有限公司),低强度聚焦超声治疗仪(重庆医科大学, CZG200,焦距:28 mm,功率:610~650 MHz),彩色多普勒超声诊断仪(百胜 MyLab 90, LA523 探头,频率 10 MHz),光声成像仪(Vevol LAZR,加拿大 Visual Sonics 公司),FACSVantageSE 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司),激光共聚焦显微镜(A1,日本 Nikon 公司)。

二、包裹 PFP 及 ICG 的 INP 制备

采用两步乳化法制备:①将总质量 10 mg 的 DPPC、DSPE-PEG 2000-Biotin 及 DC-chol 按照质量比 5:2:1 配制,加入 5 ml 三氯甲烷中充分溶解后置旋转蒸发器中 51℃减压蒸发 2 h,随后加入 2 ml PBS 水化备用;②将 200 μl ICG 溶液(10 mg/ml)与 200 μl PFP 混匀后

使用超声声振仪声振 2 min;③将溶液①②按体积比 1:1 混合后声振 6 min,PBS 离心洗涤 3 次后即得到包裹 PFP 及 ICG 的 INP。

三、INP 的一般特征评价及 ICG 包封率测定

取稀释后的 INP 溶液,使用激光粒径测量仪测定其粒径及 zeta 电位;在光学显微镜和透射电镜下观察其形态及分布情况;紫外分光光度计绘制 ICG 标准曲线并测定 ICG 包封率。

四、CD105 靶向纳米粒的制备

取 200 μl INP 置于 2 ml PBS 中重悬,加入 10 μl 链霉亲和素轻柔振荡,于 4℃孵育 30 min,PBS 离心洗涤 2 次去除过量链霉亲和素;加入 10 μl 生物素化 CD105 兔抗人抗体轻柔震荡,于 4℃孵育 30 min,PBS 离心洗涤 2 次,去除过量抗体,即得到 CD105 靶向纳米粒。将上述靶向纳米粒予以适量 DiI 染色,然后按 1:1 比例加入 FITC 标记的山羊抗兔 CD105-IgG,于激光共聚焦显微镜下观察抗体与微球结合情况并送流式细胞仪测定二者结合率。

五、光热效应检测

取 5、2.5、1.25、0.625 mg/ml INP 各 100 μl,置于 96 孔板内,予以 0.75、1、1.5、2 W/cm² 不同功率激光辐照 0、30、60、90、120、150、180 s,红外成像仪记录其温度及相应热图像。

六、体外显像实验

1.将 1.25 mg/ml INP 置于 1%浓度凝胶模块中,予以低强度聚焦超声治疗仪辐照,功率 3 W,分别辐照 0.5、2.5、5、7.5 min,记录并分析各时间点 B-mode 及 Contrast 模式图像。

2.将 0.1、0.2、0.3、0.5 mg/ml 的 INP 置于凝胶模块中,光声成像仪 PA-mode 模式下采集不同浓度纳米粒溶液光声显影图像。

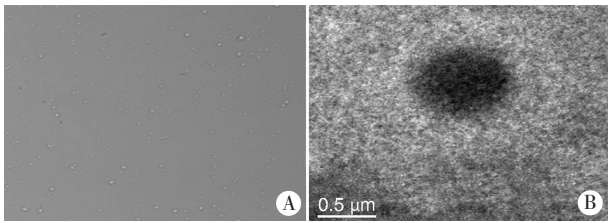
七、统计学处理

应用 GraphPad Prism 5 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较行独立样本 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、INP 的一般特性

在光学显微镜及透射电镜下 INP 形态均呈球形(图1),平均粒径(354.20±93.85)nm,平均电位(25.20±3.29)mV;紫外分光光度计绘制 ICG 标准曲线,回归方程为 $y=0.1935x-0.2476$, $R^2=0.9981$ (其中,*y* 为吸光度,*x* 为液体的浓度),测得 ICG 包封率为(89.56±0.79)%。



A: 光学显微镜下观(x1000); B: 透射电镜下观。

图 1 INP 的形态

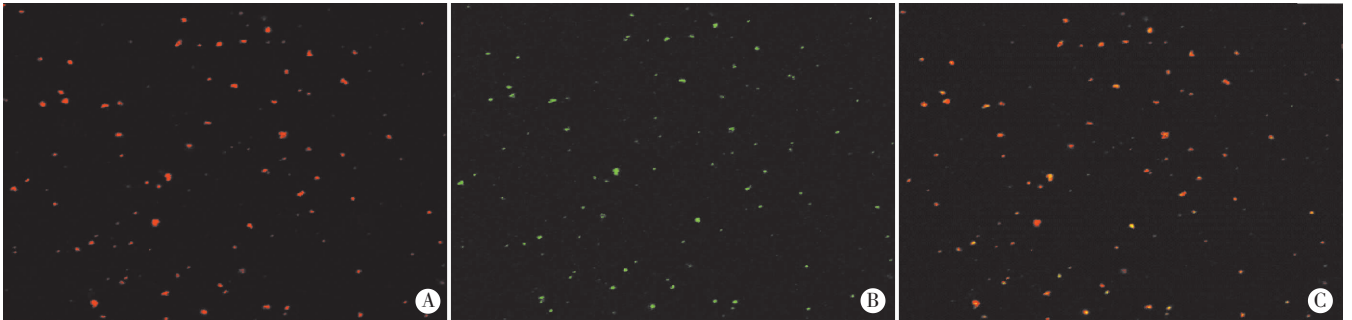
二、INP 与 CD105 兔抗人抗体结合情况

激光共聚焦显微镜下可见 DiI 染色的 INP 呈红色荧光, FITC 标记的 CD105-IgG 呈绿色荧光, 图像重组

合后可见红色荧光与绿色荧光基本重合(图 2), 说明 INP 与 CD105 抗体成功结合。流式细胞仪测得二者结合率为 99.89%。

三、INP 的光热效应及体外相变

INP 的具有良好光热效应, 一定浓度下不同功率激光辐照, 温度随功率增大升高(图 3), 其中, 在浓度 5 mg/ml、功率 2 W/cm² 激光辐照 180 s 时, 其温度可升至 63℃。在同一激光功率条件下, 辐照不同浓度 INP, 温度随浓度增加而升高(图 4); 激光辐照后可发生液气相变(图 5)。



A: DiI 染色的 INP 呈红色荧光; B: FITC 标记的 CD105-IgG 呈绿色荧光; C: 重组图像。

图 2 激光共聚焦显微镜观察抗体与 INP 结合情况

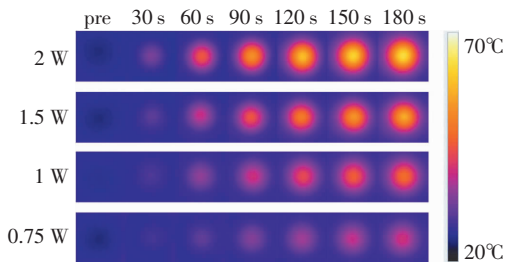


图 3 5 mg/ml INP 在不同功率激光激发下温度随时间变化情况

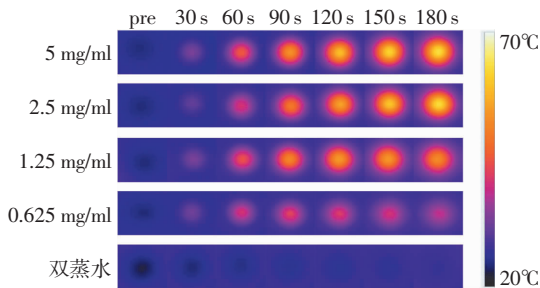
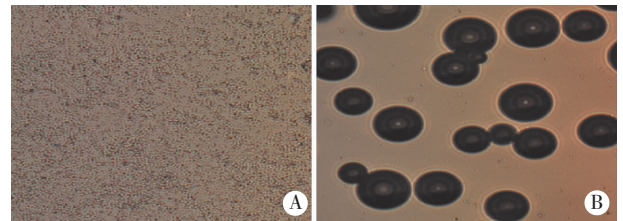


图 4 2 W/cm² 激光辐照不同浓度 INP 温度随时间变化情况



A: 激光辐照前; B: 激光辐照 60 s 后。

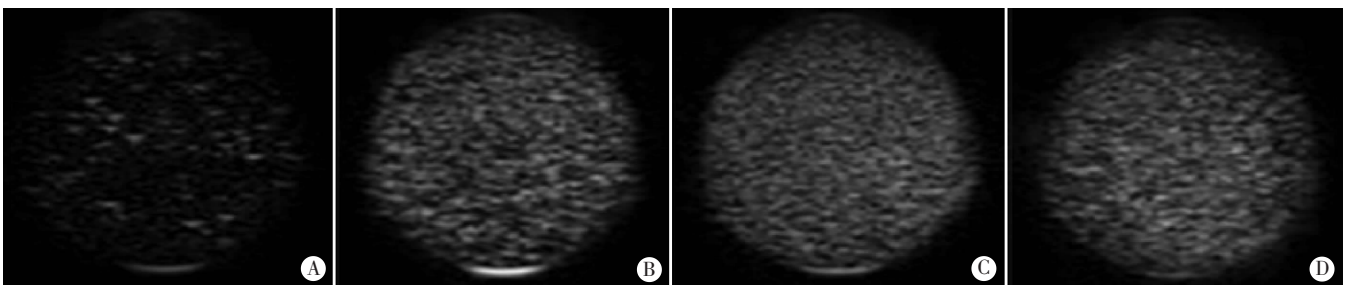
图 5 5 mg/ml INP 经 2 W/cm² 激光辐照前后电镜图(x600)

四、INP 的超声及光学显影规律

体外低强度聚焦超声 3 W 功率作用 0.5、2.5、5.0、7.5 min, B-mode 模式及 Contrast 模式下均显示作用 5.0 min 时回声强度升至最高。见图 6, 7。

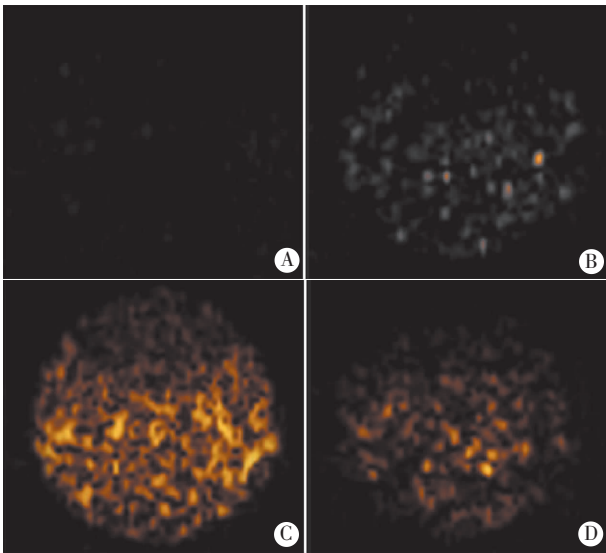
五、体外光声显影

光声信号随 INP 浓度升高而增强, 具有良好的线性关系(图 8), 且较低浓度 INP 仍具有很好的光声显像能力(图 9)。



A: 0.5 min; B: 2.5 min; C: 5.0 min; D: 7.5 min。

图 6 低强度聚焦超声辐照 INP 不同时间点 B-mode 模式下超声图像



A: 0.5 min; B: 2.5 min; C: 5.0 min; D: 7.5 min。

图 7 低强度聚焦超声辐照 INP 不同时间点 Contrast 模式下超声图像

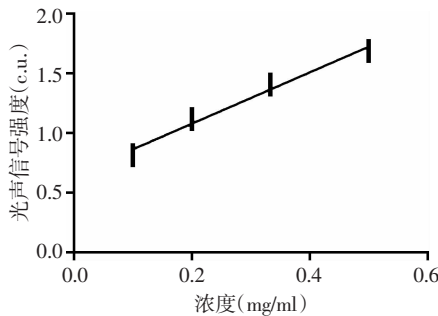
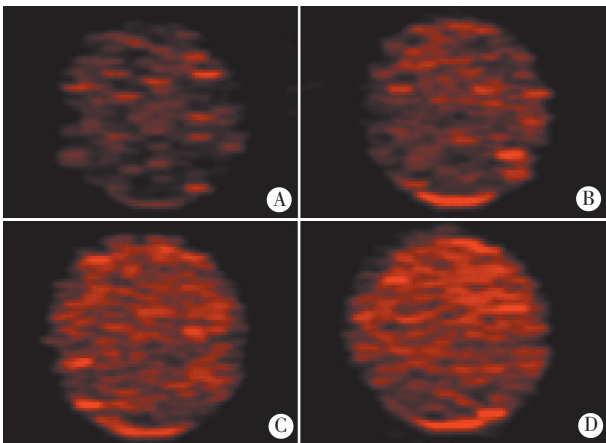


图 8 光声信号强度随 INP 浓度变化情况



A: 0.1 mg/ml; B: 0.2 mg/ml; C: 0.3 mg/ml; D: 0.5 mg/ml。

图 9 不同浓度 INP 的光声信号变化

讨 论

脂质体具有低毒、生物亲和性强及适合生物降解的特点,其虽不及高分子材料稳定、均一,但较高分子材料更易实现靶向连接,且具有良好的生物相容性,使其越来越广泛地应用于药物载体及纳米分子成像领域的研究。Partlow 等^[3]发现,脂质体包载的亲脂类药物可通

过脂质流动而不需要内吞即可进入靶细胞中,在药物传递及缓释方面具有优势。基于此原理,INP 传递药物理论上不需要完全爆破,释放药物效率较高分子纳米更高。阳离子 INP 因其可利用静电吸附作用提高基因转染率,且理论上较中性离子能更好地与血管内皮细胞结合,具有良好的研究前景。Zhou 等^[4]已成功制备阳离子 CD105 靶向纳米微泡,并验证其靶向 CD105 的能力及阳离子 INP 在基因转染方面的优势。

本实验成功制备的包裹 ICG 的 INP,其平均粒径 (354.20 ± 93.85)nm,平均电位 (25.20 ± 3.29)mV,利用其粒径及电位优势,微球通过长滞留效应及静电吸附蓄积于肿瘤组织,同时可通过肿瘤新生血管内皮间隙,进入肿瘤组织。ICG 具有较强的光吸收能力,在光声成像领域已得到广泛应用^[5],其既亲水又亲油的特性,使其在脂质体中可达到较高包封率,利用 ICG 及 PFP 为内核制备的 INP 集合了光热效应及 PFP 的液气相变效应。此前已有实验^[6-7]证明,该类型纳米粒可对肿瘤细胞和组织造成光热效应及物理伤害。同时,利用纳米粒液气相变的特性可增强肿瘤超声显影,实现多模态显像与治疗相结合。本实验中,INP 经激光激发有明显光热效应,且温度与激光功率及作用时间相关,显微镜下可观察到 INP 发生液气相变;同时 ICG 的成功包载,也使其具有良好的光声成像效果,说明 ICG 具有良好的光热及光声效应。生物亲和素系统的结合反应具有高度的特异性和亲和力,已应用于放射免疫及核磁共振免疫显像预定位技术,其中链霉亲和素较一般生物亲和素大大降低了免疫反应概率,故本实验选择生物亲和性更好且靶向特异性更高的脂质体及生物亲和素进行研究。流式细胞仪检测和激光共聚焦显微镜下观均显示 INP 与 CD105 抗体具有较高结合率,证实纳米粒与生物素亲和素及抗体连接成功,为此后寻靶实验奠定基础。本实验中利用低强度聚焦超声激发 INP,发现造影强度与纳米粒浓度、超声激发时间及超声激发强度均相关,在相同纳米粒浓度及超声激发强度下,随着时间增加,B-mode 及 Contrast 模式下回声强度均逐渐上升后下降,与周航等^[8]研究中体外超声造影显像趋势相似。分析原因为基于空化效应原理,随着微球逐渐相变产生气泡致超声造影回声强度逐渐增强,但由于凝胶模块中纳米粒数量有限,长时间低强度聚焦超声激发下,回声强度到达高峰期后随着纳米粒浓度及气泡逐渐减少而逐渐下降。

综上所述,本实验成功制备了包裹 ICG 的 CD105 靶向 INP,其具备光热效应、光声及超声显像能力,且经激光激发可发生液气相变,为下一步利用纳米粒实现对肿瘤的多模态显像及治疗奠定了基础。

参考文献

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

[2] Jian J, Liu C, Gong Y, et al. India ink incorporated multifunctional phase-transition nanodroplets for photoacoustic/ultrasound dual-modality imaging and photoacoustic effect based tumor therapy [J]. Theranostics, 2014, 4(10):1026-1038.

[3] Partlow KC, Lanza GM, Wickline SA. Exploiting lipid raft transport with membrane targeted nanoparticles: a strategy for cytosolic drug delivery [J]. Biomaterials, 2008, 29(23):3367-3375.

[4] Zhou Y, Gu H, Xu Y, et al. Targeted antiangiogenesis gene therapy using targeted cationic microbubbles conjugated with CD105 antibody

compared with untargeted cationic and neutral microbubbles [J]. Theranostics, 2015, 5(4):399-417.

[5] Sano K, Ohashi M, Kanazaki K, et al. Indocyanine green-labeled polysarcosine for in vivo photoacoustic tumor imaging [J]. Bioconjug Chem, 2017, 28(4):1024-1030.

[6] Deng L, Cai X, Sheng D, et al. A laser-activated biocompatible theranostic nanoagent for targeted multimodal imaging and photothermal therapy [J]. Theranostics, 2017, 7(18):4410-4423.

[7] Wu M, Xiong H, Zou H, et al. A laser-activated multifunctional targeted nanoagent for imaging and gene therapy in a mouse xenograft model with retinoblastoma Y79 cells [J]. Acta Biomater, 2018, 70(3):211-226.

[8] 周航, 黄晓玲, 过源, 等. 链霉亲和素化载紫杉醇相变型 PLGA 纳米粒的制备及体外超声显影 [J]. 中国介入影像与治疗学, 2016, 13(9):571-575.

(收稿日期: 2018-03-28)

• 病例报道 •

Ultrasonic manifestations of hepatic circular ligamentous cysts: a case report 肝圆韧带囊肿超声表现 1 例

刘青 曹乐 龚兰

[中图法分类号] R445.1

[文献标识码] B

患儿男, 2 岁, 因外院超声提示中上腹占位性病变入院。偶伴腹痛, 无恶心、呕吐、腹胀、腹泻、尿频及尿急等。体格检查: 脐上约两横指处可扪及一大一小 4.0 cm×4.0 cm 包块, 界限尚清, 质地稍硬, 无明显触痛。超声检查: 上腹部胰腺前方见一大小约 4.0 cm×3.2 cm 无回声区, 边界清, 紧邻腹壁, 内部可见不规则的点状弱回声(图 1); CDFI 示其内未见血流信号(图 2)。超声提示: 上腹部含液性病变, 建议进一步检查。腹部 CT 提示: 肝胃间隙胰腺前方占位性病变。血尿常规、肝肾功能及电解质等检查未见明显异常。后行腹腔镜探查术, 于脐与肝脏间肝圆韧带行程的腹壁上可见一大小约 4.0 cm×4.0 cm×3.5 cm 的卵圆形囊性包块, 紧贴腹壁, 基底部较宽, 突出于腹腔, 未与肝脏、肠管、胰腺等脏器相联系, 内为红褐色液体。术后病理诊断: 肝圆韧带囊肿。

讨论: 肝圆韧带是胎儿时期左脐静脉闭锁后的遗迹, 位于脐部和门静脉左支囊部之间, 可分为腹膜外位段和腹膜内位段两

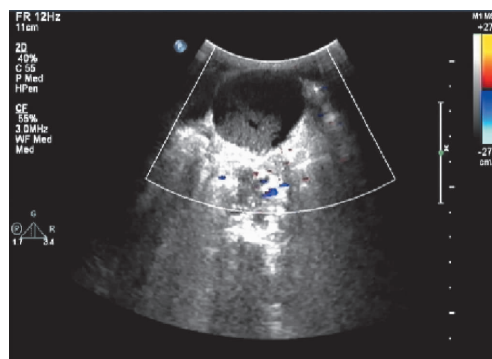


图 2 CDFI 示囊肿内部无血流信号

部分^[1]。肝圆韧带囊肿罕见, 国内文献^[2-3]仅见 2 例报道。由于肝圆韧带解剖位置特殊, 周围毗邻脏器复杂, 囊肿较大时, 超声很难准确定位, 当上腹部腹膜外囊肿且与周围各脏器无任何关联时应想到肝圆韧带来源的可能。本病例属于腹膜外位段肝圆韧带囊肿, 声像图表现囊肿紧邻腹壁, 为超声诊断该病提供了宝贵的经验。

参考文献

[1] 程刚, 徐安书, 孙志为, 等. 肝圆韧带的解剖学特点及临床应用 [J]. 山东医药, 2009, 49(26):113-114.

[2] 雷建明, 李晓华. 肝圆韧带囊肿一例 [J]. 中国超声医学杂志, 1993, 9(4):279.

[3] 汪定海. 巨大肝圆韧带囊肿一例 [J]. 浙江医学, 1988, 10(2):93.

(收稿日期: 2017-12-06)

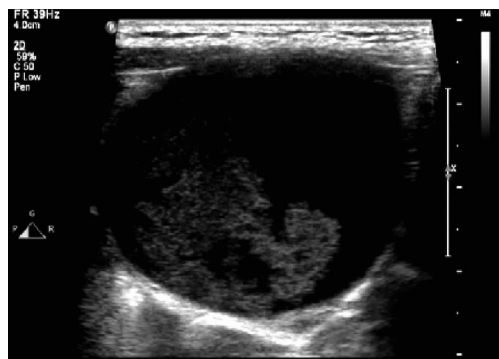


图 1 二维超声示囊肿紧邻腹壁, 边界清晰