

载自杀基因靶向超声分子探针制备及其超声显像的实验研究

杨大艳 陈其青 钟婷婷 张敏 陈艳 谢琳 王明华 景香香

摘要 **目的** 制备一种包裹液态氟碳及载肝癌治疗基因质粒,并具有叶酸分子靶向性的纳米级超声分子探针,研究其基本特性及超声显像能力。**方法** 通过碳乙亚胺法在聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)表面连接叶酸分子,制成靶向膜材料(FA-PLGA)后,采用双乳化法制备载有全氟戊烷(PFP)的纳米级靶向超声造影剂,将其与多聚赖氨酸孵育后,形成表面带正电荷的阳离子,利用正负电荷吸附作用,使纳米粒表面载上目标质粒S-HSV1-TK,得到S-HSV1-TK/PFP@FA-PLGA。使用低强度聚焦超声(LIFU)辐照的方式处理纳米粒,显微镜下观察其相变情况,于超声造影模式下观察其体外显像效果,流式细胞仪检测其连靶率;用PLGA代替FA-PLGA,使用相同方法制备无叶酸的靶向造影剂,将靶向造影剂和非靶向造影剂分别与肝癌细胞HepG2孵育,观察其体外寻靶能力。**结果** 成功制备了载有质粒及PFP的纳米级靶向超声造影剂S-HSV1-TK/PFP@FA-PLGA,该纳米粒大小均一,分散性好,平均粒径 (200.50 ± 66.34) nm,平均表面电位 (37.40 ± 7.08) mV。使用LIFU 5档辐照5 min后,显微镜下可见较多的纳米粒相变,超声造影模式下亦可见显像。流式细胞仪检测纳米粒连靶率约95%;体外细胞实验结果显示该靶向造影剂有明显的靶向作用。**结论** 本实验成功制备了一种载质粒及PFP的纳米级靶向超声造影剂S-HSV1-TK/PFP@FA-PLGA;该纳米粒可用于超声造影显像,并具有肿瘤靶向性,为研究质粒的转染及肿瘤的治疗奠定了良好基础。

关键词 超声;造影剂;叶酸;靶向;质粒

[中图分类号]R445.1

[文献标识码]A

Preparation and imaging of targeted ultrasound molecular probe carrying suicide gene

YANG Dayan, CHEN Qiqing, ZHONG Tingting, ZHANG Min, CHEN Yan, XIE Lin, WANG Minghua, JING Xiangxiang
Department of Ultrasound, Hainan People's Hospital, Hainan Medical College, Haikou 570311, China

ABSTRACT **Objective** To prepare a nanoscale ultrasound molecular probe carrying liver cancer therapeutic gene plasmid and folic acid (FA) targeting, and to study its basic characteristics and ultrasound imaging ability. **Methods** Pegylated imine was used to connect FA molecules on the surface of PLGA to prepare targeted membrane material (PLGA-FA), then PFP-loaded nanoscale targeted ultrasound contrast agent was prepared by double emulsification method, and positively charged cations were formed on the surface after incubation with polylysine, and S-HSV1-TK were loaded on the surface of nanoparticles by positive and negative charge adsorption, then S-HSV1-TK/PFP@FA-PLGA was obtained. The nanoparticles were treated by low intensity focused ultrasound (LIFU) irradiation. The phase change was observed under a microscope, and the image effect in vitro was observed under contrast-enhanced ultrasound mode. The connection rate was detected by flow cytometry. The non-targeted contrast agent without FA was prepared by PLGA instead of FA-PLGA by the same method. The targeted contrast agent and the non-targeted contrast agent were incubated with HepG2 of liver cancer cells respectively to observe their target-seeking ability in vitro. **Results** The nanoscale targeted ultrasound contrast agent S-HSV1-TK/PFP@FA-PLGA loaded with plasmid and PFP was successfully prepared. The nanoparticles were uniform in size, good in dispersion, with average particle size of (200.50 ± 66.34) nm and average surface potential of (37.40 ± 7.08) mV. After 5 min of LIFU irradiation, more nanoparticle

基金项目:国家自然科学基金项目(81760317、81871365);海南省自然科学基金项目(818MS126);海南省重点研发计划项目(ZDYF2019136)

作者单位:570311 海口市,海南省人民医院 海南医学院附属海南医院超声科

通讯作者:景香香, Email: ljxx2000@126.com

phase transitions were observed under the microscope, as well as contrast-enhanced ultrasound. The connection rate of nanoparticle was about 95% by flow cytometry, and the cell experiment results in vitro showed that the targeted contrast agent had an obvious targeting effect. **Conclusion** A nanoscale targeted ultrasound contrast agent S-HSV1-TK/PFP@FA-PLGA with plasmid and PFP was successfully prepared in this study. The nanoparticles can be used for ultrasound contrast imaging and have tumor targeting, which lays a good foundation for the study of plasmid transfection and tumor treatment.

KEY WORDS Ultrasound; Contrast agent; Folic acid; Target; Plasmid

研究^[1]表明,肝癌的形成与演变经历了长期复杂的过程,且受较多因素影响,其实质为多基因的病症。所以,基于基因层面考虑,利用载体将靶基因导入至机体内,在靶组织内特异性地以可调控的方式进行表达,不会对正常肝细胞的表达产生影响,以达到相应的治疗效果^[2]。基因治疗较传统治疗方法具有独特的优势^[3],在超声聚焦辐照的作用下,细胞膜会产生空化效应与声孔效应等物理变化^[4],可协助基因及药物进入肿瘤细胞内,低强度聚焦超声(LIFU)辐照可能成为最优的基因转染方法。本实验拟以叶酸(FA)进行表面修饰,构建一种载有Survivin启动子联合疱疹病毒I型胸苷激酶自杀基因^[5]的液态氟碳纳米粒,并观察其表征及靶向性,为进一步提高多功能全氟碳纳米粒在肿瘤诊断及治疗中的发展提供理论依据。

材料与与方法

一、实验材料与试剂

羧基端乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA,乳酸与羟基乙酸聚合比例 50:50,分子量 25 000,济南岱罡生物工程有限公司);FA(美国 Sigma 公司);pEGFP-N1(上海生工生物工程有限公司);S-HSV1-TK(上海生工生物工程有限公司合成);全氟戊烷(PFP,北京百灵威科技有限公司);多聚赖氨酸(美国 Sigma 公司);聚乙二醇(PEG,北京键凯科技有限公司);聚乙烯醇(PVA,美国阿拉丁试剂);二氯甲烷(重庆川东化工集团);琼脂糖(重庆惠利试剂公司);PBS缓冲液(美国 Sigma 公司);DiI 红色荧光探针(碧云天生物技术研究);FITC 标记的小鼠抗叶酸 IgG(英国 Abcam 公司);LB 培养基(美国 Sigma 公司);HepG2 细胞由重庆医科大学超声影像学研究所赠予;天根质粒抽提试剂盒(北京天根生化科技有限公司)。

二、实验仪器

超声声振仪(Vcx-130型,美国 Sonic 公司);超微量分光光度计(NanoDrop2000/2000C,美国 Thermo Scientific 公司);百胜 MyLab 90 彩色多普勒超声诊断仪;低温离心机(德国 Eppendorf 公司);磁力搅拌器(上

海安亭电子仪器厂);光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司);场发射扫描电镜(S 4800,日本日立公司);马尔文纳米粒度电位分析仪(Zetasizer Nano ZS 90,英国 Malvern 有限公司);流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司);共聚焦显微镜(日本 OLYMPUS 公司);双探头 LIFU 仪(重庆医科大学超声影像学研究所研制)。

三、实验方法

(一)构建目标质粒

在 NCBI 基因库中查询 Survivin Promoter 碱基序列号为 NC-000017.11, HSV1-TK 碱基序列号为 NC-001806.1,将两者结合后与质粒载体 pEGFP-N1 连接,得到所需目标质粒 S-HSV1-TK。

(二)质粒的提取

取带有 S-HSV1-TK 质粒的感受态菌接种于含卡那霉素的 LB 培养基中,37℃ 持续震荡,培养过夜(150 r/min),按照天根质粒抽提试剂盒说明进行质粒抽提,使用超微量分光光度计监测质粒浓度,调整质粒浓度为 600 ng/ μ l 备用。

(三)载质粒的可相变靶向纳米造影剂的制备及表征

1. 靶向膜材料 FA-PLGA 的制备:采用碳乙亚胺法先将 PEG 与 PLGA 相连,然后再将 FA 连接至 PEG-PLGA,得到靶向膜材料 FA-PLGA,用于后续微球的制备。

2. 包裹液态氟碳靶向多模态纳米级超声造影剂的制备:称取 50 mg FA-PLGA,加入 2 ml 二氯甲烷,水浴 2 min 促溶,冰浴降温待用。然后采用双乳法制备纳米粒,即加入 200 μ l PFP,超声声振仪输出功率 45%,间歇 5 s 模式,震荡 2.5 min,加入 4% PVA,继续震荡 2.5 min,加入 2% 异丙醇,放入磁珠后,冰浴条件下磁力搅拌 6 h,10~15 r/min。取出磁珠后将混合液低温离心,10 000 r/min,离心 5 min,双蒸水清洗 3 次,向沉淀内加少量双蒸水重悬备用。

3. 靶向阳离子纳米粒的制备:将靶向包裹液态氟碳的纳米粒与 0.1 mg/ml 浓度的多聚赖氨酸以 1:1 的体积比在冰浴条件下,摇床 120 r/min 共同孵育 4 h,离心(5000 r/min)3 min 后取沉淀,得到靶向阳离子纳米粒,将其置于光学显微镜和扫描电镜下观察外观、形态、

结构及分散度;使用马尔文纳米粒度电位分析仪和电位测量仪测定其平均粒径和表面电位。

4. 靶向阳离子纳米粒与质粒的连接:将上述制备的靶向阳离子纳米粒与质粒按照4:1体积比,在EP管内进行混合,常温环境下孵育15 min,然后低速离心5 min。下层为载质粒的纳米粒S-HSV1-TK/PFP@FA-PLGA,上层为游离DNA。取2 μ l载有质粒的靶向阳离子纳米粒溶液,置于超微量分光光度计中测定纳米粒内质粒的浓度。

(四)体外相变实验

1. 镜下观察LIFU辐照所致相变:在载玻片上加入100 μ l载基因液态氟碳靶向纳米粒S-HSV1-TK/PFP@FA-PLGA,选择厚度约15 mm的水囊,将其放置于盖玻片上,超声辐照功率5 W,于辐照时间点1 min、3 min、5 min在显微镜下观察S-HSV1-TK/PFP@FA-PLGA液气相变情况。

2. 超声造影观察LIFU辐照所致相变:制备4%琼脂糖凝胶模型,20 g琼脂糖凝胶粉加入500 ml双蒸水,将其放置于微波炉内加热,搅拌均匀后在凝胶内插入EP管,将其固定,直至冷却凝固得到带孔的凝胶模型。将纳米粒滴浓度调至50 mg/ml,加入凝胶孔内,使用LIFU辐照,采集辐照后1 min、3 min、5 min声像图。

(五)体外靶向性实验

1. 靶向纳米粒连靶效率的检测:在靶向膜材料FA-PLGA的制备过程中加入DiI染料,使PLGA发红色荧光。制备靶向纳米粒后,将小鼠抗叶酸IgG与靶向纳米粒浓度以1:500的比例在冰浴条件下,摇床120 r/min,孵育4 h,离心取沉淀后重悬,以1:100的浓度加入FITC,在同样冰浴条件下以120 r/min的速度置于摇床,继续孵育1 h,离心、洗涤,收集纳米粒。将收集的纳米粒取100 μ l送流式细胞仪双荧光检测,于共聚焦显微镜下观察连靶情况,流式细胞仪检测纳米粒连靶率。

2. 体外纳米粒与HepG2细胞寻靶实验:取对数生

长期的HepG2细胞,以每孔 1×10^5 个的密度接种于六孔板内,于孵育箱内培养24 h,分为靶向组和非靶向组,每组3个复孔,分别加入浓度为100 μ g/ml的靶向纳米粒和非靶向纳米粒与培养基混合液1 ml,继续培养2 h,PBS缓冲液反复冲洗3遍,于共聚焦显微镜下观察纳米粒与细胞的黏附情况。

结 果

一、纳米粒的表征

显微镜下见纳米粒大小均一,分散度好;DiI染色后荧光显微镜下见红色荧光;扫描电镜见纳米粒呈圆形,形态好;纳米粒平均粒径(200.50 ± 66.34)nm,平均表面电位(37.40 ± 7.08)mV。见图1~5。

二、靶向阳离子纳米粒载基因量检测

超微量分光光度计测量纳米粒内质粒浓度为5 ng/ μ l,即靶向阳离子纳米粒载基因浓度为5 ng/ μ l。将GEL-RED染色后的质粒与阳离子纳米粒孵育,共聚焦显微镜下观察可见纳米粒表面携带红色荧光的质粒,载质粒量满意(图6)。

三、LIFU对纳米粒辐照情况

光镜下观察显示,随着LIFU辐照时间增加,越来越多的纳米粒相变,体积由纳米级变成微米级(图7);超声造影亦可见超声造影信号随着时间增加而增加,回声由弱逐渐增强,LIFU辐照5 min时可采集到明显的造影成像(图8)。

四、纳米粒连靶率及体外寻靶能力

流式细胞仪双荧光检测显示同时发绿色荧光与红色荧光的纳米粒约占95%,即纳米粒的连靶率约为95%(图9)。共聚焦显微镜下观察示,带红色荧光的纳米粒与带绿色荧光的FA重合度较高,说明纳米粒有较高的连靶率(图10)。体外细胞实验中,共聚焦显微镜下观察示靶向纳米粒较非靶向纳米粒更多地黏附在HepG2细胞周边(图11),说明其对HepG2细胞靶向性明显。

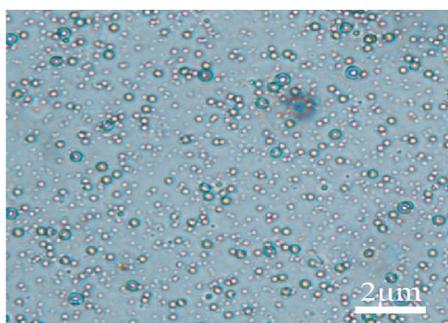


图1 纳米粒普通光镜图($\times 600$)

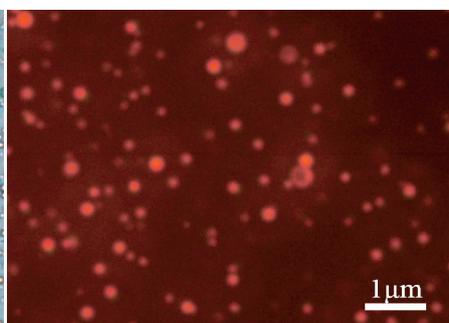


图2 纳米粒荧光显微镜图($\times 600$)

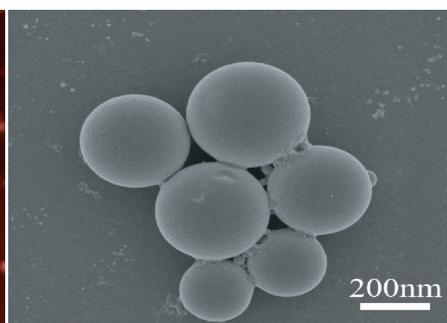


图3 纳米粒扫描电镜图($\times 5000$)

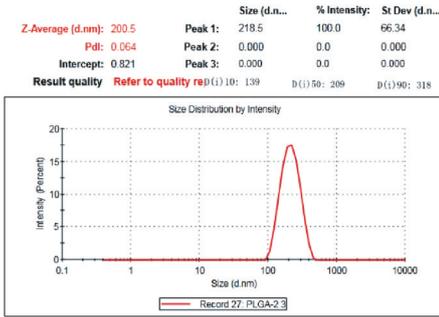


图4 纳米粒平均粒径为(200.50±66.34)nm

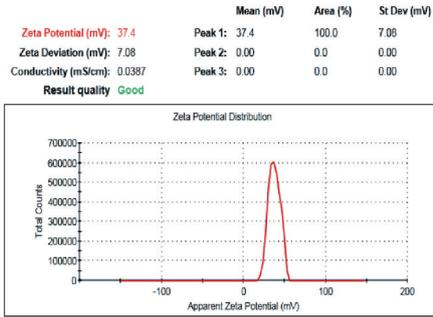


图5 纳米粒平均表面电位为(37.40±7.08)mV

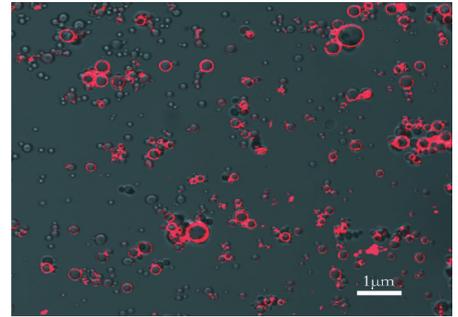
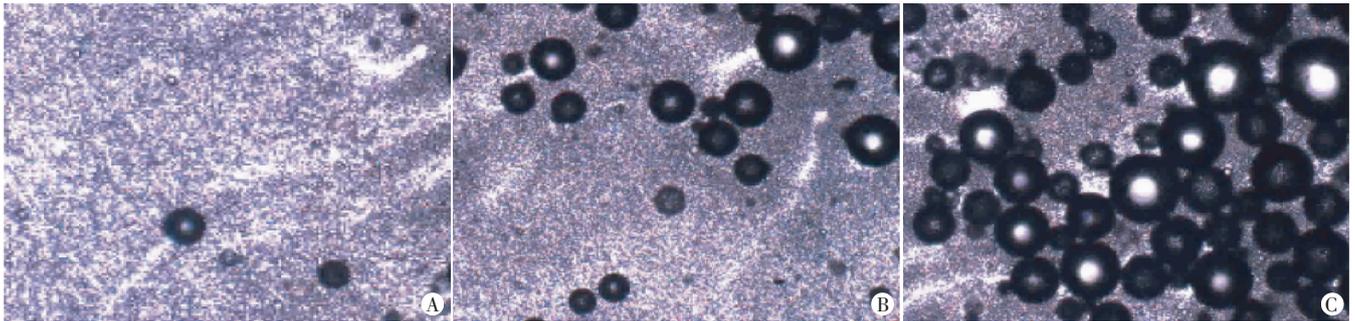
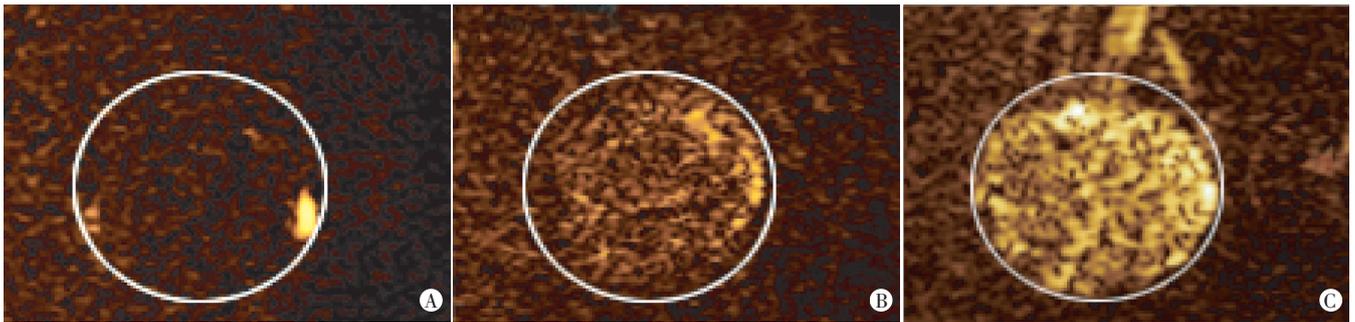


图6 共聚焦显微镜下观察可见发红色荧光的质粒包裹于纳米粒表面(×600)



A: 1 min; B: 3 min; C: 5 min

图7 光镜下观察不同时间LIFU辐照所致纳米粒相变(×100)



A: 1 min; B: 3 min; C: 5 min

图8 超声造影观察不同时间LIFU辐照所致纳米粒相变

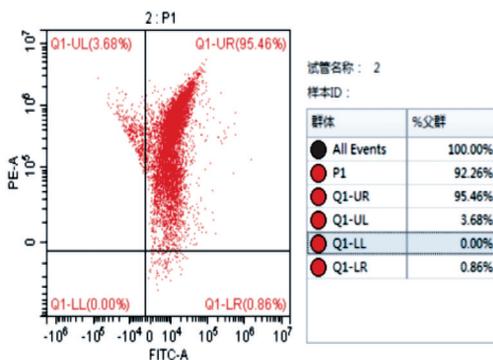


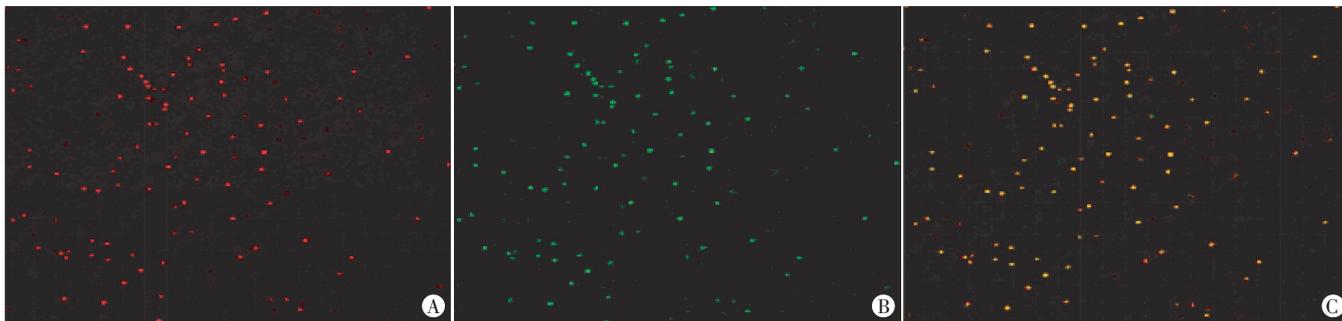
图9 流式细胞仪检测纳米粒的连靶率

讨论

肿瘤微血管管壁孔径最大值多为380~780 nm^[6]。目前常用的超声造影剂微泡直径平均为2~4 μm,可以

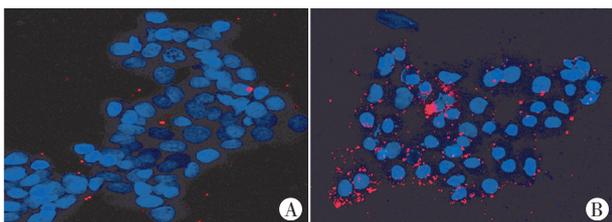
进行肺循环,但无法穿过血管内皮^[7],纳米级造影剂具有较强的穿透力,可以穿过血管内皮,达到血管外显影的目的^[8-9],且纳米粒作为载体能够改善治疗药物的亲水性及其在体内的稳定性,延长循环时间^[10]。此外,关于液态氟碳纳米粒作为靶向药物载体方面的研究不断深入,其可以通过液-气相转变,使造影剂从纳米级向微米级转变,起到增强超声显像的作用^[11],使纳米级造影剂能穿过肿瘤增大的血管内皮间隙,并在肿瘤细胞内成像^[12-13]。本实验制备的造影剂包裹液态氟碳 PFP,低温状态下粒径控制在纳米级,体外实验结果显示,纳米粒经 LIFU 辐照后,粒径变为微米级,可以增强超声造影显像。

靶点选择是分子影像学的研究重点,当前研究^[14]多集中于使用单克隆抗体或多肽等对药物或造影剂



A: DiI所染 PLGA, 发红色荧光; B: FITC 所染 FA, 发绿色荧光; C: 两者重合显示黄色荧光, 表示带有 FA 的 PLGA 球

图 10 共聚焦显微镜下观察纳米粒的连靶情况(×600)



A: 非靶向纳米粒与 HepG2 细胞黏附情况; B: 靶向纳米粒与 HepG2 细胞黏附情况

图 11 共聚焦显微镜下观察纳米粒体外寻靶能力(×400)

表面进行靶向修饰,但蛋白分子量大,组织穿透力弱,连接手段复杂且不稳定,因此在实际应用中受到限制。FA 是天然存在的小分子物质,几乎无免疫原性,且其受体在大部分恶性肿瘤组织,包括肝癌、卵巢癌、子宫内膜癌及乳腺癌等组织中高度表达。本实验将肿瘤细胞表面的 FA 受体作为靶点,在制备纳米粒时,先将 FA 连接在膜材料表面,再制备纳米球,提高了 FA 的利用率,也增加了纳米粒的连靶率,本实验结果显示纳米粒连靶率达 95%;体外细胞寻靶实验结果显示,自制的靶向纳米粒较非靶向纳米粒对肝癌细胞具有更明显的靶向功能。

肝癌实质为多基因的病症^[1],基因治疗具有独特的优势。超声聚焦辐照可使细胞膜产生物理变化,有助于基因及药物进入肿瘤细胞内,可能成为最具前景的基因转染方法。本实验成功将载有肝癌的自杀基因的质粒通过阳离子纳米粒的吸附作用,连接在了纳米粒表面。但该纳米粒在 LIFU 辐照下进行细胞转染的效率及效果仍需进一步探索。

综上所述,本实验制备的载自杀基因的靶向液态氟碳纳米粒,性质稳定,靶向性好,且表面成功携带了质粒,为今后研究质粒的转染及肿瘤的治疗奠定了良好基础。

参考文献

[1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics[J]. JAMA, 2013,

310(9):982-988.

[2] Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy [J]. Gene, 2013, 525(2):162-169.

[3] 杨六成, 吴凯, 黄宗海, 等. KDR 启动子驱动的 CD/TK 双自杀基因联合 Survivin 基因干扰抑制肝癌细胞生长的体内研究[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(1):57-61.

[4] 叶鸣, 王志刚, 周鸿, 等. 靶向 VEGFR-3 载阿霉素脂质微泡超声造影剂体外显影及寻靶能力的实验研究[J]. 中国临床医学影像杂志, 2015, 26(7):509-511.

[5] Yu BF, Wu J, Zhang Y, et al. Ultrasound-targeted HSVtk and Timp3 gene delivery for synergistically enhanced antitumor effects in hepatoma[J]. Cancer Gene Ther, 2013, 20(5):290-297.

[6] Varchi G, Foglietta F, Canaparo R, et al. Engineered porphyrin loaded core-shell nanoparticles for selective sonodynamic anticancer treatment[J]. Nanomedicine(Lond), 2015, 10(23):3483-3494.

[7] 丁璐, 陈云超, 刘晓玲, 等. 超声微泡破裂法联合阳离子脂质体介导基因转染的实验研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2013, 22(8):691-695.

[8] 宣吉晴, 陈瑜莉, 敖梦, 等. 携带 cRGD 肽的靶向纳米粒超声造影剂的制备以及体外寻靶实验研究[J]. 中国医学影像技术, 2017, 33(6):810-815.

[9] 刘建新, 尚婷婷, 徐芬芬, 等. 叶酸靶向液态氟碳脂质纳米粒的制备及其超声分子显像卵巢癌实验[J]. 中国医学影像技术, 2016, 32(12):1843-1847.

[10] 何燕琼, 刘双, 景坤, 等. 靶向 EGFRv III 包裹液态氟碳的高分子纳米球的制备及其体外靶向能力的评价[J]. 中国介入影像与治疗, 2017, 14(1):39-44.

[11] 景香香, 刘洁, 杨炳昂, 等. 超声介导击破微泡增强型绿色荧光蛋白转染正常大鼠关节滑膜组织[J]. 中国医学影像技术, 2011, 27(12):2407-2409.

[12] Abdalkader R, Kawakami S, Unge J. Evaluation of the potential of doxorubicin loaded microbubbles as a theranostic modality using a murine tumor model[J]. Acta Biomater, 2015, 19(1):112-118.

[13] 梁婵婵, 文华颖, 冯宇婷, 等. 叶酸修饰的聚乙烯亚胺-聚乙二醇共聚物载体在体内外转染效率的研究[J]. 西北药学杂志, 2017, 32(1):54-59.

[14] Xu MJ, Johnson DE, Grandis JR. EGFR-targeted therapies in the post-genomic era[J]. Cancer Metastasis Rev, 2017, 36(3):463-473.

(收稿日期:2020-03-17)