

论 著

血管内皮生长因子MR靶向对比剂的制备及其在乳腺癌裸鼠模型的MR实验研究*

南方医科大学南方医院医学影像系
(广东 广州 510515)

刘民英

【摘要】目的 制备靶向血管内皮生长因子(VEGF)受体的Gd-DTPA脂质体及其对裸鼠乳腺癌移植瘤的靶向性实验研究。**方法** 制备出VEGF抗体标记的Gd-DTPA脂质体,检测其理化性质。将16只乳腺癌移植瘤的裸鼠分为2组(n=8),分别经鼠尾静脉注射Gd-DTPA、抗VEGF-Gd-DTPA脂质体后0.5h、2h、4h、6h、12h、24h行磁共振成像扫描,计算肿瘤强化值。**结果** 所制备的抗VEGF-Gd-DTPA脂质体具有纳米颗粒的特征,在动物实验研究上Gd-DTPA组强化峰值出现在0.5h,相对强化值为 1.34 ± 0.46 ;抗VEGF-Gd-DTPA脂质体组强化峰值均出现在2h,相对强化值为 2.15 ± 0.52 。2组乳腺癌移植瘤2h、4h、8h、24h扫描时间点相对强化值比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),抗VEGF-Gd-DTPA组增强值高。**结论** VEGF抗体修饰的Gd-DTPA脂质体能与肿瘤体内血管内皮因子受体结合,为肿瘤血管生成的影像诊断提供了新的思路。

【关键词】 血管内皮生长因子; 磁共振; 对比剂

【中图分类号】 R445.2; R737.9

【文献标识码】 A

【基金支持】 广东省医学科研基金
(A2013376)

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5131.2015.12.001

通讯作者: 刘民英

Preparation of MR Contrast Agent of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-targeted and its Experimental Study in MR Imaging in the Mice Model Implanted with Breast Cancer*

LIU Min-ying, Department of Medical Imaging, Nanfang Hospital Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

[Abstract] Objective To prepare target Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor gadopentetate dimeglumine liposome and study in MR imaging in the Mice Model implanted with breast Cancer. **Methods** Anti-VEGF-Gd-DTPA liposome was prepared, and the physical and chemical properties were detected. The Breast cancer transplanted nude mice were divided into 2 groups (n=8). Anti-VEGF-Gd-DTPA liposome and Gd-DTPA were injected into the nude mice. After 30min, 2h, 4h, 8h, 24h, The tumor enhancement rate was calculated. **Results** The prepared Anti-VEGF-Gd-DTPA liposomes were characterized as nanoparticles. In vivo MRI, The group of Gd-DTPA resulted in a maximum tumor REV of 1.34 ± 0.46 at 30min, The group of anti-VEGF-Gd-DTPA liposome resulted in a maximum tumor REV of 2.15 ± 0.52 at 2h. In 2 groups of breast cancer, 2, 4, 8h, 24h scan time points were compared, the difference was statistically significant ($P < 0.05$), the anti-VEGF-Gd-DTPA group was the highest REV. **Conclusion** VEGF antibody modified Gd-DTPA liposome can target the tumor vascular endothelial growth factor-receptor, which provides a new way of the tumor angiogenesis imaging diagnosis.

[Key words] Vascular Endothelial Growth Factor; Magnetic Resonance Imaging; Contrast Media

肿瘤是导致人类死亡的主要病因,如何提高对早期肿瘤检出是目前分子影像学研究的热点和重点^[1]。分子影像学一直着重于研究无创性的影像学手段来鉴别正常细胞与异常细胞的差别,特别是希望能检测出恶性肿瘤早期的病理特点,通过标志物和结构改变来为诊疗提供依据^[2]。磁共振靶向对比剂能够一定程度上反映出肿瘤的生物学及病理学特征,提高疾病诊断率,还能够为药物的疗效评价提供依据,因此该领域已经成为了分子影像学研究的热点。肿瘤血管的生长是病理改变的重要基础,在恶性程度较高的肿瘤血管中能够观察到血管内皮生长因子(VEGF)的高度表达^[3]。VEGF受体是目前重要的分子标志物,由于只在增生血管内表达,在正常组织内几乎没有,因此检验特异性高,为以VEGF受体检验为基础的肿瘤靶向性MRI成像研究奠定了基础。本研究拟构建一种具有亲水特征在体内具有长循环特征的脂质体将Gd-DTPA包裹于其中,并将其与VEGF抗体相连,制备VEGF抗体修饰的Gd-DTPA脂质体,研究其对裸鼠乳腺癌移植瘤靶向成像效果。

1 材料与方法

1.1 材料 雌性裸鼠16只,体重约20~35g;人乳腺癌细胞(MDA-MB-435S);Gd-DTPA注射液(康臣公司);二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)

(德国Lipoid公司);亲和素化-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇, (美国Sigma公司);胆固醇(广州化学试剂有限公司);生物素化VEGF抗体(美国NOVUS公司);CL-2型恒温磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂);超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);透射电镜(日本日立公司);Zetasizer 3000HS激光粒度分析仪(英国Malvern instruments);Philips Achieva 3.0T MR全身磁共振成像仪。

1.2 ①按DSPG:胆固醇:DSPE-PEG2000-亲和素摩尔比3:2:0.4溶于氯仿,置于恒温磁力搅拌器搅拌约4h,于旋转蒸发仪上旋转蒸发,形成附壁薄膜,加入TES缓冲液于超声波清洗器中分散30min,离心取上层溶液,可得到空白的亲和素-PEG脂质体纳米微粒。②取所得空白脂质体与Gd-DTPA混合后,放入透析袋,与TES缓冲液透析72h,可形成包裹Gd-DTPA的脂质体;③将一定比例的生物素化的VEGF抗体与Gd-DTPA脂质体孵育形成抗VEGF-Gd-DTPA脂质体混悬液。

1.3 抗VEGF-Gd-DTPA脂质体电镜下观察形状及粒径大小 取一滴空白脂质体及抗VEGF-Gd-DTPA脂质体置于附有支撑膜的铜网上,静置约5min后,用滤纸小片从铜网边缘吸干多余液体,用1%的磷钨酸染色,用滤纸吸干周围液体并静置30min,之后用透射电镜进行观察。

1.4 抗VEGF-Gd-DTPA脂质体在激光粒度分析仪检测其流体粒径及分散度 取上述纳米微粒悬浊液1ml,稀释后置于Zetasizer 3000HS激光散射粒度分析仪中测试。

1.5 抗VEGF-Gd-DTPA脂质体

包封率的测定 取5ml上述悬浊液离心后所得上清液,用包封量除以加入的脂质含量即得载药量。

1.6 荷瘤鼠制备 雌性小鼠右侧乳腺皮下接种MDA-MB-435S人乳腺癌细胞悬液,待肿瘤直径达0.8~1.5cm时,采用随机分成2组,Gd-DTPA组、抗VEGF-Gd-DTPA组。MRI扫描方法:使用Philips Achieva 3.0T MR超导型磁共振,小鼠专用线圈内,腹腔注射戊巴比妥钠(60mg/kg)麻醉,使用俯卧位采集T1WI图像,扫描参数为:TR: 500ms, TE: 10ms, FOV: 100×100×17mm, 层数: 8, 层厚: 2mm, 层间距: 0mm, NSA: 2。Gd-DTPA组、抗VEGF-Gd-DTPA脂质体组分别先行T1WI冠状位平扫,平扫后经鼠尾静脉分别注入Gd-DTPA、抗VEGF-Gd-DTPA脂质体,剂量为Gd-DTPA 1.25mol/kg,注药后30min、2h、4h、8h、24h重复扫描T1WI序列。测定各时间点瘤体的信号值。

计算相对增强值:相对增强值=(增强后的信号值-增强前的信号值)/增强前的信号值。

1.7 统计学方法 所有数据录入SPSS 19.0软件包进行处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间对比用t检验, $P < 0.05$ 视为对比具有统计学意义。

2 结果

2.1 空白脂质体与抗VEGF-Gd-DTPA脂质体形态、粒径 透射电镜下可见两种脂质体均呈类圆形,大小较为均匀,仅有轻度聚积现象,抗VEGF-Gd-DTPA脂质体呈壳核结构。空白脂质体的粒径大小为 (30.2 ± 4.13) nm;抗VEGF-Gd-DTPA脂质体的粒径大小为 (35.4 ± 5.13) nm。

2.2 激光粒度分析仪测定抗VEGF-Gd-DTPA 脂质体的粒径和多分散系数分别为135nm和0.20,证明所制备纳米粒径小,分散性好。

2.3 包封率和载药量测定 按照上述方法测定抗VEGF-Gd-DTPA的包封量和载药量,其包封量为35.2%,载药量为49.7%。

2.4 MRI靶向成像结果 2组乳腺癌移植瘤组内比较各扫描时间点相对增强值差异有统计学意义($P < 0.05$)。Gd-DTPA组强化峰值出现在30min,相对增强值为 1.34 ± 0.46 ;抗VEGF-Gd-DTPA脂质体出现在2h,相对增强值为 2.15 ± 0.52 。2组乳腺癌移植瘤组间比较,30min扫描时间点相对增强值差异有统计学意义($P < 0.05$),Gd-DTPA组强化高于抗VEGF-Gd-DTPA脂质体组;2、4、8h、24h扫描时间点相对增强值差异有统计学意义($P < 0.05$),抗VEGF-Gd-DTPA脂质体组相对增强值均高于Gd-DTPA组。

3 讨论

靶向诊断是利用组织细胞特异性或过度表达的分子而实现靶向已越来越受关注,其中,以MRI靶向成像技术是研究热点^[4]。从目前已有的研究来看,靶向诊断存在一个严峻挑战是要携带足够量的对比剂到兴趣区而产生足够诊断MRI信号。Unger等^[5]一项研究就是由于聚集于肿瘤局部的靶向对比剂浓度太低而不能产生明显瘤体强化效果。本研究旨在制备靶向对比剂靶向特定的组织或结构,并利用可以容纳大量钆螯合物的脂质体,提高MRI信号的敏感性。脂质体作为MRI靶向对比剂的优势在于^[6]脂质体纳米微

粒循环时间长,免疫原性较小,可以和各种配体结合,结合后不会影响其药物代谢动力学,所以脂质体纳米微粒是目前公认的较好的MRI分子成像载体。由于脂质体进入机体内后会被网状内皮系统(RES)所识别,往往难以达到靶区发挥作用,因此本次试验中将亲水型长链聚乙二醇(PEG)与脂质体膜相结合,形成水化层来确保不被RES所识别和清除^[7],但由于PEG也可能与导向蛋白发生作用妨碍脂质体的寻靶功能,因此本次试验中将VEGF受体与PEG相连,避免了PEG对靶部位的干扰。改造形成后的脂质体不但能够在机体内长时间滞留,更能够主动接近靶向的肿瘤血管,这些特性为其在机体内寻找靶点提供了必要条件。本实验证明了其具有纳米颗粒的特征,其电镜粒径约 $35.4 \pm 5.13 \text{ nm}$,流体粒径为 135 nm ,达到了纳米微粒的条件。根据免疫学原理,以VEGF为靶点,通过抗原、抗体的特异性结合特点,实现VEGF受体向探针靶向聚集的效果^[8]。本实验使用的抗VEGF-Gd-DTPA脂质体经静脉给药后,随着血液可循环至肿瘤处,并与肿瘤上表达的VEGF受体结合,使得Gd-DTPA标志到肿瘤上,使其特异性在MRI上显影。本研究制备的抗VEGF-Gd-DTPA脂质体经PEG修饰可以躲避活体内皮网状细胞吞噬,起到长循环的作用,因此可高效特异性靶向VEGF受体高表达的部位。本研究结果

亦表明,由于抗VEGF-Gd-DTPA脂质体能显著缩短T1值,是一种T1对比剂,所以当抗VEGF-Gd-DTPA在肿瘤组织蓄积时,可缩短其T1值,T1WI上肿瘤信号呈高信号改变;而Gd-DTPA由于其在体内半衰期短,循环时间短,很快就通过肾脏排出体外,同时由于其是全身的血池分布,仅有少部分Gd-DTPA蓄积于肿瘤组织内,所以其强化程度及强化时间低于靶向组。本次研究表明,利用脂质体包裹Gd-DTPA并用PEG修饰,能有效的增加Gd-DTPA在体内的滞留时间,并利用VEGF的抗原特性使其迅速、准确的达到靶位置,为临床肿瘤影像检查提供了参考,为以后特异性靶向肿瘤对比剂开拓了新的思路。

参考文献

- [1] Kennedy DC, Duguay DR, Tay LL, et al. SERS detection and boron delivery to cancer cells using carborane labelled nanoparticles [J]. Chem Commun (Camb), 2009, 28(44): 6750-6752.
- [2] Medarova Z, Rashkovetsky L, Pantazopoulos P. Multiparametric monitoring of tumor response to chemotherapy by noninvasive imaging [J]. Cancer Res, 2009, 69(3): 1182-1189.
- [3] Li S, Prjevic M, Koller E, et al. Characterization of 123I-vascular endothelial growth factor-binding sites expressed

on human tumour cells: possible implication for tumour scintigraphy [J]. Int J Cancer, 2001, 91(6): 789-796.

- [4] Aime S, Dastru W, Crichton SG, et al. Innovative magnetic resonance imaging diagnostic agents based on paramagnetic Gd(III) complexes [J]. Biopolymers, 2002, 66(6): 419-428.
- [5] Unger EC, Totty WG, Neufeld DM, et al. Magnetic resonance imaging using gadolinium labeled monoclonal antibody [J]. Invest Radiol, 1985, 20(7): 693-700.
- [6] Lciani A, Olivier JC, Clement O, et al. Glucose-receptor MR imaging of tumors: study in mice with PEGylated paramagnetic niosomes. Radiology [J], 2004, 231(1): 135-142.
- [7] Woodle MC, Lasic DD. Sterically stabilized liposomes [J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1113(2): 171-199.
- [8] Fukumura D, Xavier R, Sugiyama T, et al. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells [J]. Cell, 1998, 94(6): 715-725.

(本文编辑: 汪兵)

【收稿日期】2015-11-10