

## 靶向 MAdCAM-1 超声造影剂的制备及其体外寻靶实验研究

陈文颖,郑凯,黄敏\*

(南京医科大学附属苏州医院超声科,江苏 苏州 215001)

**[摘要]** 目的:制备适用于炎症性肠病超声诊断并靶向 MAdCAM-1 的长循环脂膜超声造影剂,并鉴定其物理性状及体外寻靶能力。方法:采用超声破碎法制备长循环脂膜超声微泡,通过“生物素-亲和素”法桥接超声微泡与抗 MAdCAM-1 单克隆抗体(MECA-367)。对制备出的靶向微泡造影剂进行物理性状检测;通过光镜和激光共聚焦显微镜观察该靶向造影剂对 TNF- $\alpha$  诱导的炎症性肠病细胞模型的结合能力。同法制备携同型对照抗体 IgG2a 微泡作对照。结果:制备的靶向超声微泡形态好且粒径较均匀,平均粒径( $464.5 \pm 85.7$ )nm,Zeta 电位( $-19.3 \pm 2.5$ )mV。SVEC4-10 细胞 MAdCAM-1 的表达与 TNF- $\alpha$  刺激时间成正相关。并且,当 TNF- $\alpha$  浓度达到 20 ng/ml 时,MAdCAM-1 的表达达到峰值。体外寻靶试验表明,该靶向造影剂较多并牢固地黏附到表达 MAdCAM-1 的细胞周围;携 IgG2a 的同型对照组未见明显结合。结论:成功制备出桥连 MECA-367 的靶向长循环脂膜超声造影剂,该造影剂在体外对高表达 MAdCAM-1 的炎性细胞模型有较强的特异性亲和力;TNF- $\alpha$  诱导 SVEC4-10 细胞建立炎症性肠病细胞模型的方法简便易行。

**[关键词]** 靶向;超声造影剂;MAdCAM-1;炎症性肠病;细胞模型

**[中图分类号]** R445.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)06-745-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20140610

## Preparation of targeted MAdCAM-1 ultrasound contrast agent and targeting study *in vitro*

Chen Wenying,Zheng Kai,Huang Min\*

(Department of Ultrasound,the Affiliated Suzhou Hospital of NJMU,Suzhou 215001,China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare long-circulating lipid membrane ultrasound contrast agent suitable for the ultrasonic diagnosis of inflammatory bowel disease (IBD) and targeted mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1),and determine the physical characteristics of the microbubbles and investigate their affinity for SVEC4-10 cells *in vitro*. **Methods:** The long-circulating lipid membrane microbubbles were prepared by sonic dispersion,and bridged the microbubbles and anti-murine MAdCAM-1 monoclonal antibody (MECA-367) by “biotin-avidin”. The physical traits of prepared targeted microbubble contrast agent were detected. Its ability to target to IBD cell model induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) was determined under light microscope and confocal laser scanning microscope,and isotype control antibody IgG2a microbubbles were used as control. **Results:** The targeted ultrasound microbubbles had a good shape and uniform particle size,with the average diameter of ( $464.5 \pm 85.7$ )nm,and the surface Zeta potential was ( $-19.3 \pm 2.5$ )mV. MAdCAM-1 expression on cultured SVEC4-10 cells was positively correlated with the time of TNF stimulation. In addition,when the concentration of TNF-a was 20 ng/ml,MAdCAM-1 expression reached its peak. The targeting study *in vitro* showed that many targeted ultrasound contrast agents adhered more firmly to the surrounding cells expressing MAdCAM-1,while the control group had no significant binding. **Conclusion:** Bridging MECA-367 long-circulating lipid membrane ultrasound contrast agents were successfully prepared. The targeted ultrasound contrast agents can bind to the cell model of high expression MAdCAM-1 effectively *in vitro*,and the method of establishing IBD cell model on TNF-stimulated SVEC4-10 cells is simple and feasible.

**[Key words]** targeted;ultrasound contrast agent;MAdCAM-1;inflammatory bowel disease;cell model

[Acta Univ Med Nanjing,2014,34(06):745-749]

**[基金项目]** 江苏省自然科学基金(BK20131150);苏州市科技发展计划(SYS201148)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:szhuangmin@163.com

超声分子成像技术通过显影剂靶向结合于病变组织内的生物分子来使病变部位及病变范围得以显影,从而提高影像诊断的敏感性,达到早期诊断、观察病变进展的目的<sup>[1-2]</sup>。

近年来,炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的发病率逐年升高,其发病机制尚未清楚,至今诊断及治疗均较困难,早期诊断与早期治疗是提高患者生存质量的重要措施<sup>[3]</sup>。黏膜寻址素细胞黏附分子(mucosal addressin cell adhesion molecule-1, MAdCAM-1)选择性表达于肠道黏膜及其相关淋巴组织血管内皮细胞表面,在IBD发生、发展过程中起着重要作用<sup>[4-6]</sup>。本研究采用抗鼠MAdCAM-1单克隆抗体(MECA-367)为配体,长循环磷脂为成膜材料,制备出靶向超声微泡造影剂,检测其基本性质,并在体外用TNF- $\alpha$ 诱导小鼠淋巴结血管内皮样细胞(SVEC4-10)表达MAdCAM-1,鉴定该造影剂的体外寻靶能力。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

全氟丙烷气体(C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>,天津核工业理化工程研究所);生物素化MECA-367、生物素化同型对照抗体大鼠IgG2a(Biolegend公司,加拿大);链亲和素(Sigma公司,美国);SVEC4-10细胞株(ATCC公司,美国);DSPE-PEG(2000)-biotin(Avanti公司,美国);DPPA(Sigma公司,美国);DPPC(Lipoid公司,德国);ELISA试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司);Malvern激光粒径测量仪(Zetasizer公司,美国);冷场发射扫描电子显微镜(Hitachi公司,日本)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞模型的建立

体外培养SVEC4-10细胞。取处于对数生长期SVEC4-10细胞,以 $1 \times 10^6$ 个/ml接种于6孔板。培养24 h后,用不同浓度的TNF- $\alpha$ (0、2.5、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 ng/ml)刺激细胞,24 h后用ELISA方法检测各样品上清液中MAdCAM-1表达水平;采用RT-PCR法扩增各孔细胞中目的因子MAdCAM-1,PCR反应引物使用Primer 3软件设计,引物序列为上游5'-GGGCAGGTGACCAATCTGTATG-3',下游5'-AGCTGGTCACTCTCTGCCTCCT-3',其大小为223 bp。然后,根据上述实验结果选择最佳TNF- $\alpha$ 浓度建立炎症性肠病细胞模型。

#### 1.2.2 细胞培养及细胞爬片的制作

SVEC4-10细胞传代培养2~3代。以 $1 \times 10^4$ 个/孔

的密度制备TNF- $\alpha$ 诱导组细胞爬片和正常组细胞爬片。

#### 1.2.3 靶向造影剂的制备

将一定比例的磷脂混合,氯仿滴溶,待其完全溶解后通风厨及真空干燥除去氯仿,脱气重悬,60℃水浴3 h,取出加入适量甘油,充入一定流量C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>气体60 s,超声破碎60 s,成乳白色乳化液。静置浮集上层微泡,每 $1 \times 10^7$ 个抗体分子加入3  $\mu$ g链亲和素,冰上孵育30 min,低速离心浮集、纯化所得微泡,即制成生物素-亲和素化微泡。取一定量上述微泡,分别与生物素化的MECA-367及IgG2a冰上孵育30 min,低速离心浮集、纯化所得微泡,即得携带MECA-367的靶向微泡(AMb)和携带IgG2a的超声微泡(IMb)。

#### 1.2.4 靶向造影剂的性状测定

取制备好的AMb 10  $\mu$ l以脱气PBS缓冲液稀释成1 ml混匀,然后取10  $\mu$ l滴于计数板上盖玻片一端紧邻的侧槽内,待盖玻片下液区分布完全时在光镜下观察并拍照。取10  $\mu$ l AMb经戊二醛固定、脱水、干燥等步骤制备扫描电镜样品,观察电镜下微泡的结构特点。

#### 1.2.5 光镜及激光共聚焦镜下观察靶向造影剂体外寻靶能力

在成膜材料里加微量DiI、DiO,同上述方法制备红色荧光AMb及绿色荧光IMb。爬片细胞预先用DAPI标记,将两种荧光造影剂分别加入TNF- $\alpha$ 诱导组细胞爬片和正常组细胞爬片。与细胞孵育1 h后,在光镜和激光共聚焦镜下观察结合情况。

## 2 结果

### 2.1 细胞模型鉴定

#### 2.1.1 ELISA检测MAdCAM-1的表达

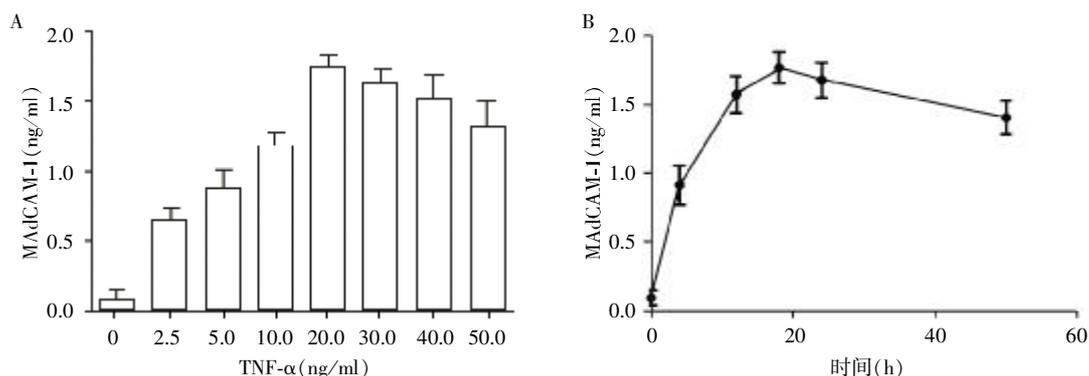
TNF- $\alpha$ 刺激SVEC4-10细胞,MAdCAM-1表达与TNF- $\alpha$ 浓度成正比,当TNF- $\alpha$ 浓度达到20 ng/ml时,MAdCAM-1表达达到峰值。同时,MAdCAM-1表达与TNF- $\alpha$ 刺激时间成正相关,于18 h左右分泌达峰值,48 h后其浓度仍处于较高水平(图1)。

#### 2.1.2 RT-PCR检测MAdCAM-1的表达

图2显示不同浓度TNF- $\alpha$ 诱导SVEC4-10细胞MAdCAM-1 mRNA表达的电泳条带,计算其相对表达量,结果表明:TNF- $\alpha$ 浓度为20 ng/ml时,SVEC4-10细胞MAdCAM-1 mRNA表达量最高(图2)。

### 2.2 AMb的一般特性检测结果

采用本方法制备的AMb,平均粒径( $464.5 \pm 85.7$ )nm,Zeta电位( $-19.3 \pm 2.5$ )mV。该造影剂经普通



A: 不同TNF-α诱导浓度下MAdCAM-1的表达;B: TNF-α 20 ng/ml 作用,不同诱导时间下MAdCAM-1的表达

图 1 不同 TNF-α 诱导浓度和不同诱导时间下 SVEC4-10 细胞中 MAdCAM-1 的表达

Figure 1 MAdCAM-1 expression of SVEC4-10 cells induced by TNF-α at different concentrations and different induction times

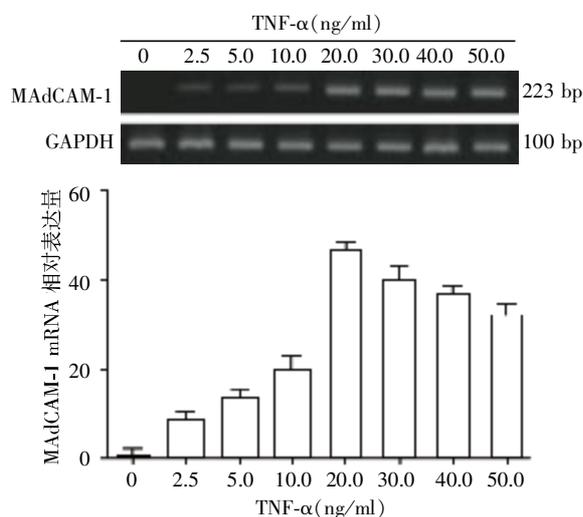
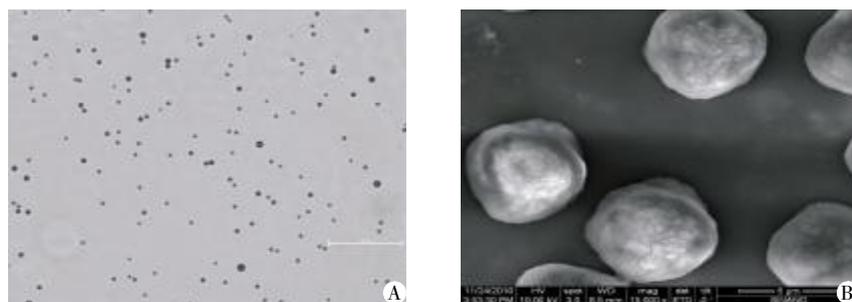


图 2 不同浓度 TNF-α 诱导 SVEC4-10 细胞 MAdCAM-1 mRNA 的相对表达量

Figure 2 MAdCAM-1 mRNA expression of SVEC4-10 cells induced by different concentrations of TNF-α

光学显微镜观察,形态规则,大小均匀,稳定,分散度好;电镜下膜结构完整,形态饱满,粒径均匀(图 3)。



A: 光镜下微泡粒径均匀(标尺为 50 μm, ×200);B: 扫描电镜下见微泡膜结构完整,形态饱满,大小均匀(标尺为 5 μm, ×15 000)。

图 3 电镜观察靶向造影剂的形态

Figure 3 The target microbubbles morphology observed by electron microscope

### 2.3 光镜下观察靶向超声造影剂对 SVEC4-10 细胞的靶向结合情况

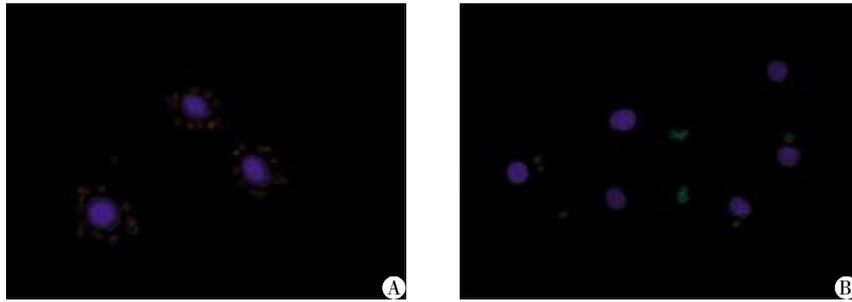
400 倍光镜下观察:①TNF-α 诱导组细胞爬片:较多量 AMb 与细胞紧密结合,主要分布在细胞周边以及细胞壁游离面,而只有极少量 IMb 游离或结合在细胞周围;②正常组细胞爬片:AMb 及 IMb 均未见或仅见极少量微泡与细胞黏附。

### 2.4 激光共聚焦观察 AMb 体外寻靶能力

在激光共聚焦显微镜视野下,发蓝光的细胞核与发红光的 AMb、发绿光的 IMb 对比鲜明,可以更清晰准确显示造影剂与 SVEC4-10 细胞的结合情况。结果显示:①TNF-α 诱导组细胞爬片:较多量 AMb 如花环般围绕在细胞周边(图 4A),而细胞周边 IMb 稀少(图 4B);②正常组细胞爬片:观察不到或仅有极少量造影剂与细胞结合。

## 3 讨论

近年来发展迅速的超声分子成像技术,是通过携带病变组织内生物分子的特异性抗体或配体的超声造影剂,从细胞或亚细胞水平突出增强病变组



A: 激光共聚焦显微镜下观察 AMb 与细胞结合情况( $\times 400$ ), SVEC4-10 细胞核发蓝光(DAPI 染色), 微泡发红光(DiI 染色), 可见较多量 AMb 聚集在 SVEC4-10 细胞周围。B: 激光共聚焦显微镜下观察 IMb 与细胞结合情况( $\times 400$ ), SVEC4-10 细胞核发蓝光(DAPI 染色), 微泡发绿光(DiO 染色), 极少数 IMb 与 SVEC4-10 细胞结合。

图4 激光共聚焦观察 AMb 体外寻靶能力

Figure 4 AMb target effect *in vitro* observed by laser confocal microscope

织的超声显影, 从而提高影像诊断的敏感性和准确性<sup>[7]</sup>, 而该生物分子的表达多与病变严重程度成正比, 据此可以监测疾病病程进展<sup>[8]</sup>。

IBD 好发于年轻人, 终身性病程并且并发症多, 目前诊断和治疗均较困难, 临床迫切需要一种准确、无创且可重复的检查方法<sup>[9-10]</sup>。目前研究认为, MAdCAM-1/ $\alpha 4\beta 7$  通道参与了淋巴细胞附壁、滚动、活化与黏附, 介导特定淋巴细胞亚群向肠道黏膜淋巴组织如派伊尔结及固有层的归巢, 诱导并维持肠道的慢性炎症<sup>[11-12]</sup>。在 IBD 炎症机制的众多炎性分子中, MAdCAM-1 具有较高的特异性, 属于免疫球蛋白超家族, 正常情况下低水平特异性表达于肠 Peyer 结、肠系膜淋巴结, 肠道炎症时受 IL-1 及 TNF 刺激表达增加<sup>[13]</sup>。多个对 IBD 患者及动物模型的研究中, 均发现在活动性 IBD 中 MAdCAM-1 的表达明显增高, MAdCAM-1 表达量可反映肠道炎症程度<sup>[14-15]</sup>。本研究采用不同浓度 TNF- $\alpha$  诱导 SVEC4-10 细胞, 也发现该细胞高表达 MAdCAM-1, 并且在 20 ng/ml 浓度 TNF- $\alpha$  时 MAdCAM-1 的表达达到峰值。据此, 可以认为 MAdCAM-1 可能是 IBD 一个较好的成像和治疗靶分子。

本研究制备携带抗 MAdCAM-1 抗体(MECA-367)的靶向超声微泡, 与经 TNF- $\alpha$  诱导的 SVEC4-10 细胞进行寻靶实验, 结果证明, 所制备的靶向超声微泡可以高浓度、主动结合到表达 MAdCAM-1 的细胞表面, 而与正常细胞则无明显结合。与此同时发现, 制备的携带 MECA-367 同型对照抗体的超声微泡与 TNF- $\alpha$  诱导组细胞和正常组细胞均极少结合。本研究结果进一步证实, MAdCAM-1 是一个有效的成像靶分子。与 Bachmann 等<sup>[16]</sup>研究相比, 本研究的优势在于成膜材料中采用了长循环磷脂材料

DSPE-PEG2000, 使得造影剂静脉注射后不易被单核吞噬细胞识别吞噬, 从而有更长的血浆半衰期, 有利于延长超声成像时间窗; 而带有负电极性的 DPPA 在微循环中易通过补体 C3b 介导的免疫黏附, 更多黏附滞留于微血管壁, 在后续在体实验中有可能获得更佳的小病变显示率和显示范围。此外, 本研究采用目前非共价连接中连接力最强的生物素-亲和素系统桥接抗体和微泡, 可以将抗体牢固地结合于微泡表面不易脱落。

综上所述, TNF- $\alpha$  诱导 SVEC4-10 细胞表达 MAdCAM-1, 是一种简便易行的制作炎症性肠病细胞模型的方法; 携抗 MAdCAM-1 抗体的靶向长循环脂质微泡造影剂具有较强的体外寻靶能力。本研究所用方法原理简单, 反应条件要求较低, 但步骤繁多, 对操作精细度要求较高; 同时, 由于微泡粒径大, 长期稳定性有待进一步提高。此外, 虽然本研究中体外寻靶实验结果较为理想, 由于使用的配体是单克隆抗体, 存在免疫原性等问题, 加之生物体内环境极其复杂, 因此, 靶向造影剂在生物体内如何实现特异性靶向显影, 这还有待进一步的研究。

#### [参考文献]

- [1] Deshpande N, Needles A, Willmann JK. Molecular ultrasound imaging: current status and future directions [J]. Clin Radiol, 2010, 65(7): 567-581
- [2] Li YH, Du LF. Research of monoclonal antibody in ultrasound molecular imaging of tumor vasculature [J]. Chin J Ultrasonogr, 2011, 20(7): 628-630
- [3] Wong DD, Forbes GM, Zelesco M, et al. Crohn's disease activity: quantitative contrast-enhanced ultrasound assessment [J]. Abdom Imaging, 2012, 37(3): 369-376
- [4] Thomas S, Baumgart DC. Targeting leukocyte migration and adhesion in Crohn's disease and ulcerative colitis

- [J]. *Inflammopharmacology*, 2012, 20(1): 1-18
- [5] Eksteen B, Liaskou E, Adams DH. Lymphocyte homing and its role in the pathogenesis of IBD[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2008, 14(9): 1298-1312
- [6] Kellermayer Z, Mihalj M, Balogh P. MAdCAM-1 independent lymphocyte homing to GALT of Nkx2.3(-/-) mice [J]. *Immunology*, 2012, 137(3): 390-397
- [7] Tlaxca JL, Rychak JJ, Ernst PB, et al. Ultrasound-based molecular imaging and specific gene delivery to mesenteric vasculature by endothelial adhesion molecule targeted microbubbles in a mouse model of Crohn's disease[J]. *J Control Release*, 2013, 165(3): 216-225
- [8] Eckelman WC, Reba RC, Kelloff GJ. Targeted imaging: an important biomarker for understanding disease progression in the era of personalized medicine [J]. *Drug Discov Today*, 2008, 13(17): 748-759
- [9] Khanicheh E, Mitterhuber M, Xu L, et al. Noninvasive Ultrasound molecular imaging of the effect of statins on endothelial inflammatory phenotype in early atherosclerosis [J]. *Plos one*, 2013, 8(3): 315-321
- [10] Vande Castele N, Feagan BG, Gils A, et al. Therapeutic drug monitoring in inflammatory bowel disease: current state and future perspectives [J]. *Curr gastroenterol Rep*, 2014, 16(4): 378-389
- [11] Deban L, Correale C, Vetrano S, et al. Multiple pathogenic roles of microvasculature in inflammatory bowel disease: a Jack of all trades [J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(6): 1457-1466
- [12] Neurath MF. New targets for mucosal healing and therapy in inflammatory bowel diseases [J]. *Mucosal Immunology*, 2014, 7(1): 6-19
- [13] Lobaton T, Vermeire S. Review article: anti-adhesion therapies for inflammatory bowel disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014, 39(6): 579-594
- [14] Di SA, Roveditti L, Rosado MM, et al. Increased expression of mucosal addressin cell adhesion molecule 1 in the duodenum of patients with active celiac disease is associated with depletion of integrin alpha4 beta7-positive T cells in blood [J]. *Hum Pathol*, 2009, 40(5): 699-704
- [15] Nobile S, Gionchetti P, Rizzello F, et al. Mucosal healing in pediatric Crohn's disease after anti-TNF therapy: a long-term experience at a single center [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 26(4): 458-465
- [16] Bachmann C, Klibanov AL, Olson TS, et al. Targeting mucosal addressin cellular adhesion molecule (MAdCAM)-1 to noninvasively image experimental Crohn's disease [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(1): 8-16

[收稿日期] 2014-03-17

(上接第 744 页)

- 隆抗体的制备与鉴定 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2012, 32(6): 739-744
- [6] 李琛, 林红, 刘新建, 等. 人源抗狂犬病毒免疫型抗体库的构建及特异性抗体筛选与鉴定 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2010, 30(5): 575-578
- [7] Li C, Zhang F, Lin H, et al. Generation and characterization of the human neutralizing antibody fragment Fab091 against rabies virus [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(3): 329-337
- [8] 汪楠, 唐小军, 熊四平, 等. 重组豹蛙酶的制备及其生物学特性分析 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(8): 1034-1038
- [9] World Health Organization. WHO expert consultation on rabies [J]. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 2005, 931: 1-88
- [10] 张倩倩, 赵茜, 张晓, 等. 全人源抗狂犬病病毒 G 蛋白单链抗体制备及中和活性鉴定 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(7): 927-931
- [11] 冯晓敏, 卞颖华, 徐伟, 等. 狂犬病毒 G 蛋白基因的克隆、表达及生物活性鉴定 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(7): 986-990
- [12] Ray K, Embleton MJ, Jaikhani BL, et al. Selection of single chain variable fragments (scFv) against the glycoprotein antigen of the rabies virus from a human synthetic scFv phage display library and their fusion with the Fc region of human IgG1 [J]. *Clin Exp Immunol*, 2001, 125(1): 94-101
- [13] Repp R, Kellner C, Muskulus A, et al. Combined Fc-protein- and Fc-glyco-engineering of scFv-Fc fusion proteins synergistically enhances CD16a binding but does not further enhance NK-cell mediated ADCC [J]. *J Immunol Methods*, 2011, 373(1-2): 67-78
- [14] Xu LD, Jin XF, Rainey GJ, et al. A mammalian expression system for high throughput antibody screening [J]. *J Immunol Methods*, 2013, 395(1-2): 45-53
- [15] Meng SL, Sun Y, Wu XF, et al. Evolutionary dynamics of rabies viruses highlights the importance of China rabies transmission in Asia [J]. *Virology*, 2011, 410(2): 403-409

[收稿日期] 2014-01-16