

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.01277

• 论 著 •

胰腺癌靶向的纳米级超声造影剂的制备及体外评价

胡楚玲¹, 陈中健^{1,2}, 台宗光¹, 高原¹, 高申^{1*}, 张敏敏^{3*}

1. 第二军医大学长海医院药学部, 上海 200433

2. 上海皮肤病医院药材科, 上海 200443

3. 第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433

[摘要] **目的** 制备一种胰腺癌靶向的纳米级超声造影剂并评价其体外靶向性效果。**方法** 用聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、聚乙二醇(PEG)合成高分子聚合物 PLGA-PEG-NHS 并利用核磁共振氢谱检测;用 PLGA-PEG-NHS 和全氟溴辛烷(PFOB)以乳化挥发法制备包裹 PFOB 的 PLGA 纳米造影剂,然后连接 Hedgehog 抗体。透射电镜观察纳米造影剂的形态,动态光散射法测定其粒径、电位;气相色谱-质谱法测定纳米造影剂的包封率及载药量;透析法测定纳米造影剂的体外释放特性。用添加了纳米造影剂的培养液培养人胰腺癌细胞株 SW1990 和 CFPAC-1,利用荧光显微镜和流式细胞仪定性和定量验证纳米造影剂的体外靶向能力。**结果** 所制得的胰腺癌靶向纳米超声造影剂平均粒径为 198.9 nm, Zeta 电位为 -31.8 mV, 包封率(63.7±3.9)%, 载药量(14.3±0.9)%, 48 h 释药量为 85.3%;体外细胞实验显示靶向造影剂与高表达 Hedgehog 抗原的 SW1990 细胞大量结合,而与不表达 Hedgehog 抗原的 CFPAC-1 细胞未见特异性结合。**结论** 通过乳化挥发法制备的胰腺癌靶向纳米超声造影剂各项表征符合要求,并能特异性靶向 Hedgehog 高表达的胰腺癌细胞,有望成为胰腺癌诊断的超声造影剂。

[关键词] 纳米级超声造影剂;胰腺肿瘤;靶向疗法;聚乳酸-羟基乙酸共聚物;全氟溴辛烷**[中图分类号]** R 445.1; R 735.9**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2015)12-1277-07

Preparation and *in vitro* evaluation of pancreatic cancer-targeted nano-scale ultrasound contrast agent

HU Chu-ling¹, CHEN Zhong-jian^{1,2}, TAI Zong-guang¹, GAO Yuan¹, GAO Shen^{1*}, ZHANG Min-min^{3*}

1. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Pharmacy, Shanghai Dermatology Hospital, Shanghai 200443, China

3. Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To prepare a pancreatic cancer-targeted nano-scale ultrasound contrast agent (T-UCA) and to evaluate its *in vitro* targeting effect. **Methods** PLGA-PEG-NHS was synthesized with poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), N-hydroxysuccinimide (NHS) and polyethylene glycol (PEG). The construction of PLGA-PEG-NHS was characterized by ¹H-NMR. Perfluorooctyl bromide (PFOB)-loaded PLGA nanoparticle contrast agent was prepared using emulsion evaporation technique with PLGA-PEG-NHS and PFOB, and the products were further conjugated with Hedgehog antibody. The morphology of T-UCA were characterized by transmission electron microscopy, and the size distribution and Zeta potential of T-UCA were characterized by dynamic light scattering method. Furthermore, the drug entrapment efficiency and loading capacity of T-UCA were determined by GC-MS, and the release rate of T-UCA *in vitro* was examined by dialysis method. Finally, the *in vitro* targeting performance was quantitatively verified by fluorescence microscopy and flow cytometry with human pancreatic cancer lines SW1990 and CFPAC-1. **Results** The average diameter and the Zeta potential of T-UCA were 198.9 nm and -31.8 mV, respectively. Moreover, the encapsulation efficiency and drug loading of T-UCA was (63.7 ± 3.9)% and (14.3 ± 0.9)%, respectively. Nearly 85.3% liquid perfluorocarbon was released from the T-UCA within 48 h. *In vitro* cell experiments showed that the targeted contrast agent could bind to SW1990 cells which had high expression of Hedgehog antigen, while not to the CFPAC-1 cells without expression of Hedgehog antigen. **Conclusion** The emulsion evaporation technique can be used to

[收稿日期] 2015-05-16 **[接受日期]** 2015-07-23**[基金项目]** 国家自然科学基金(81172309, 81172514, 81372762). Supported by National Natural Science Foundation of China(81172309, 81172514, 81372762).**[作者简介]** 胡楚玲, 硕士生, 主管药师. E-mail: chuchu20112@163.com

* 通信作者 (Corresponding authors). Tel: 021-81873715, E-mail: ggss99@126.com; Tel: 021-31161345, E-mail: minminzhang2002@126.com

prepare T-UCA with desirable characteristics, and the prepared T-UCA can specifically target the pancreatic cancer cells with high expression of Hedgehog, making it a promising pancreatic cancer-targeted nanoscale ultrasound contrast agent.

[Key words] nano-scale ultrasound contrast agent; pancreatic neoplasms; targeting therapy; polylactic-co-glycolic acid; perfluorooctyl bromide

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(12): 1277-1283]

胰腺癌起病隐匿, 进展快速, 治疗难度和死亡率都很高, 并且近年来其发病率呈明显上升趋势^[1]。胰腺癌治疗中最有效的手段是早期根治性手术切除^[2], 但目前受诊断水平的限制, 胰腺癌的手术切除率只有 10%~20%, 5 年生存率仅为 0.4%~3.4%^[1,3]。因此, 早期诊断从而早期治疗是改善胰腺癌预后的关键。超声造影增强 (contrast-enhanced endoscopic ultrasound, CE-EUS) 技术是一种能够对各种病灶进行“血池成像”的新技术^[4-5], 与其他影像技术 (如 CT、MRI 等) 相比, 具有安全、无辐射、操作简单、观察实时和价格低廉等优势。CE-EUS 通过静脉注射微泡造影剂, 扫查界面回声声阻抗差, 将病灶从组织中凸显出来, 可以作为胰腺癌筛查的常规手段, 已成为胰腺疾病诊断的研究热点之一^[6-7]。由于普通的造影剂在胰腺组织中浓度整体偏低, 半衰期短, 较小的病灶会出现漏诊^[8]等, 使得这项技术具有一定的局限性。

近年来, 随着分子影像学的高度发展, 靶向分子成像技术越来越受到研究者的重视。Hedgehog 蛋白几乎在所有胰腺癌中高度表达, 且高度表达状态在肿瘤病变早期已出现^[9-10], 而 Hedgehog 蛋白在正常组织中分布有限, 故制备一种能够靶向 Hedgehog 蛋白的超声造影剂对胰腺癌早期诊断具有重要的意义。聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly (lactic-co-glycolic acid), PLGA] 是经过美国 FDA 认证可以体内应用的生物降解材料, 具有良好的生物相容性, 可制备成多种药物的纳米级微粒载体^[11-13]。液态氟碳具有以靶向聚集为基础的超声增强显影性能, 当液态氟碳造影剂微粒处于分散状态时, 对超声敏感性非常弱, 只有当微粒聚集到靶组织或细胞时, 才在超声下显影, 可作为纳米造影剂中的包裹药物^[14]。全氟溴辛烷 (perfluorooctyl bromide, PFOB) 是液态氟碳造影剂中的代表性化合物^[15]。本研究利用聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 修饰的 PLGA 作为液态 PFOB 的纳米级微粒载体, 连接能够靶向早期胰腺癌细胞膜表面 Hedgehog 蛋白的单抗 (Hedgehog mAb), 制备胰腺癌靶向的纳米级超声造影剂, 并探讨其体外细胞靶向能力, 旨在寻找一种

理想的胰腺癌早期诊断的超声造影剂。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 真空干燥箱 (Binder 公司, 德国); Mercury Plus 600 MHz 超导核磁共振谱仪 (Varian 公司, 美国); 超声乳化仪 (新芝生物科技有限公司, 宁波); 高速离心机 (Eppendorf 公司, 德国); 冷冻干燥机 (Virtis 公司, 美国); Zeta sizer ZS90 电位粒径分析仪 (Malvern 公司, 英国); 透射电镜 (JEM-2010, JEOL 公司, 日本); 全自动酶标仪 (Thermo 公司, 美国); 气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS, 由 GC6890 气相色谱仪和 5973N 质谱检测仪组成, Agilent 公司, 美国); 荧光显微镜 (Leica 公司, 德国); FACSCalibur 流式细胞仪 (BD 公司, 美国); 聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA-COOH, 乳酸: 羟基乙酸=50:50, LAKESHORE 公司, 美国); 双功能聚乙二醇 (NH₂-PEG-COOH, 平均相对分子质量 5 000, 嘉兴博美生物技术有限公司); Hedgehog mAb (Abcam 公司, 英国); 香豆素-6 (coumarin-6, Sigma-Aldrich 公司, 美国); DMEM 培养液、胎牛血清 (FBS; Gibco 公司, 美国), 其他试剂均为分析纯。胰腺癌细胞株 SW1990 和 CFPAC-1 均购自美国 ATCC 公司。

1.2 PLGA-PEG-NHS 的合成 将 2 000 mg PLGA-COOH 溶解在 5 mL 二氯甲烷中, 向溶液中加入 50 mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、100 mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC·HCl), 避光搅拌反应 12 h, 氮气吹干二氯甲烷, 加入乙醚沉淀并洗涤, 真空干燥得到 PLGA-NHS。称取合成的 PLGA-NHS 1 000 mg 溶解在 2 mL 三氯甲烷中, 加入 300 mg NH₂-PEG-COOH, 反应 12 h 后在甲醇中沉淀并氮气吹干得到 PLGA-PEG-COOH。将 500 mg PLGA-PEG-COOH 溶解在 2 mL 二氯甲烷中, 向溶液中加入 15 mg NHS 和 25 mg EDC·HCl, 充分反应后乙醚沉淀, 并用乙醚洗去 NHS 和 EDC, 真空干燥得到制备纳米造影剂的材料 PLGA-PEG-NHS。合成产物溶解于氘代氯仿 (CDCl₃) 中, 利用 300 MHz 核磁鉴定。

1.3 包裹 PFOB 的 PLGA 靶向纳米造影剂的制备 利用乳化挥发法制备包裹 PFOB 的 PLGA 纳米粒, 具体方法如下: 称取 50 mg PLGA-PEG-NHS 溶解于 2 mL 二氯甲烷中作为分散相, 加入 5 μ L PFOB(约 9.7 mg)和 1 mg 荧光染料香豆素-6, 充分混匀后倒入 10 mL 1%的胆酸钠溶液中, 冰水浴下 400 W 超声乳化 30 s, 间隔 10 s, 重复 3 次。将所得纳米乳液倒入盛有 10 mL 水的烧杯中, 在室温下开口搅拌约 3 h 使二氯甲烷挥发, 高速离心收集纳米粒。之后将纳米粒分散于 5 mL PBS, 加入 1 000 μ g Hedgehog mAb, 避光搅拌反应 6 h, 高速离心收集纳米粒, 洗涤 3 次后冻干即可得固态纳米粒(图 1)。抗体连接比例利用酶标仪以 BCA 法测定抗体蛋白的含量后计算得到。

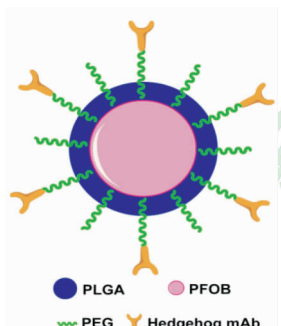


图 1 胰腺癌靶向纳米造影剂示意图

Fig 1 Diagrammatic sketch of pancreatic cancer-targeted nano-scale ultrasound contrast agent

PLGA: Poly(lactic-co-glycolic acid); PFOB: Perfluoroethyl-bromide; PEG: Polyethylene glycol; Hedgehog mAb: Hedgehog monoclonal antibody

1.4 纳米造影剂的形态观察和粒径、电位的测定 将适量的靶向纳米造影剂溶液滴到覆盖有碳膜的铜网上, 用滤纸吸干多余水分, 白炽灯下进一步干燥后, 利用透射电镜观察形态。另外分别取纳米造影剂溶液 20 μ L, 加入 PBS 溶液稀释成 1 mL, 利用电位粒径分析仪测定纳米粒的粒径和电位, 测定条件为 25 $^{\circ}$ C、固定角 90 $^{\circ}$ 。

1.5 纳米造影剂的载药量和包封率的测定 取纳米粒 10 mg, 加入 5 mL 水复溶, 将纳米粒溶液置于超滤管(滤过相对分子质量为 5 000)中 5 000 \times g 超滤离心 20 min, 再向超滤管中加入 5 mL 水后离心 20 min, 重复 2 次合并滤液, 利用 GC-MS 法测定滤液中游离 PFOB 的含量。另取纳米粒 10 mg, 加入 5 mL 甲醇超声 3 min 破坏掉纳米粒, 高速离心 5 min 后, 取上清液利用 GC-MS 法测定纳米粒中总 PFOB

的含量。气相色谱条件为: DB-5MS UI 色谱柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m), 起始柱温 60 $^{\circ}$ C, 以 8 $^{\circ}$ C/min 的速率升至 180 $^{\circ}$ C, 然后再以 20 $^{\circ}$ C/min 的速率升至 250 $^{\circ}$ C, 保持 2 min, 以排尽样品, 进样口温度 250 $^{\circ}$ C, 检测器温度 280 $^{\circ}$ C, 载气为氦气, 进样量 1 μ L。质谱条件为: EI 离子源, 离子源温度 230 $^{\circ}$ C, 流量 1.0 mL/min。进样之后溶剂的延迟运行时间为 3.5 min。纳米造影剂的载药量和包封率按照以下公式计算: 载药量(%)=(纳米粒中总 PFOB 量-游离 PFOB 量)/纳米粒总量 \times 100%, 包封率(%)=(纳米粒中总 PFOB 量-游离 PFOB 量)/投入的 PFOB 量 \times 100%。

1.6 纳米造影剂体外释放度的测定 取 20 mg 纳米粒, 加入 2 mL PBS 溶解, 装入透析袋中(MWCO 3 500)并封住袋口, 透析袋随后放入 100 mL 的恒温(37 $^{\circ}$ C)PBS 中, PBS 中加入 1 mol/L 的水杨酸钠溶液(由于 PFOB 在水中溶解度较低, 加入水杨酸钠后可以增加 PFOB 的溶解度, 以使释放满足漏槽条件), 在搅拌速率为 100 r/min 的条件下进行释放度测定。分别于 0.5、1、2、3、6、9、12、18、24、36、48 h 吸取 1 mL PBS 测定 PFOB 的释放量, 并补加 1 mL PBS。

1.7 纳米造影剂对胰腺癌细胞的体外靶向性评价 采用 Hedgehog 高表达的人胰腺癌 SW1990 细胞株和 Hedgehog 低表达的人胰腺癌 CFPAC-1 细胞株对包裹 PFOB 纳米粒的体外靶向性进行评价, 细胞培养液为添加 10% FBS 的 DMEM 培养液, 培养环境为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的孵箱。取对数生长期细胞按照每孔 2 \times 10⁵ 个的密度接种于 6 孔板, 培养 24 h 使细胞贴壁。之后每孔加入 100 μ L 纳米造影剂溶液(500 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后, PBS 润洗 3 次, 利用荧光显微镜观察纳米造影剂的细胞摄取情况。之后利用胰酶将细胞消化, 离心重悬至 500 μ L, 利用流式细胞仪定量分析细胞对纳米造影剂的摄取。为进一步评价靶向 Hedgehog 抗体对纳米造影剂入胞的作用, 细胞预先加入过量的 Hedgehog mAb(10 μ g)孵育 30 min, 封闭 Hedgehog 蛋白受体, 然后每孔加入 100 μ L 纳米造影剂溶液(500 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后, 分别通过荧光显微镜和流式细胞仪进行观察和检测。

2 结果

2.1 合成材料的核磁共振谱图 取合成的产物 PLGA-PEG-NHS 溶于 CDCl₃, 利用 300 MHz 核磁

共振成像,图2显示的是合成的 PLGA-PEG-NHS 的谱图,其中峰 1、2、5 为 PLGA 的特征峰,峰 4 为 PEG 的特征峰,峰 3 为 NHS 的特征峰。核磁共振图谱表明所合成的材料为制备纳米粒所需的目标产物 PLGA-PEG-NHS。

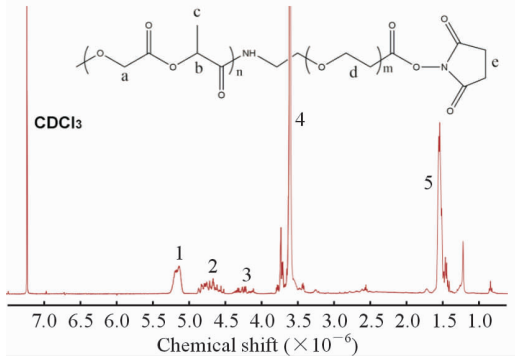


图2 PLGA-PEG-NHS 的核磁共振氢谱图

Fig 2 ¹H-NMR spectrum of the prepared PLGA-PEG-NHS

1, 2, 5; PLGA; 3; NHS; 4; PEG. PLGA: Poly(lactic-co-glycolic acid); PEG: Polyethylene glycol; NHS: N-hydroxysuccinimide

2.2 纳米造影剂的形态、粒径和电位 利用 BCA 法测得纳米造影剂的抗体含量,结果为每 1 mg 的纳米造影剂含有 17.9 μg 的抗体,抗体的连接比例为 (17.9±3.1) μg/mg。将制得的靶向纳米造影剂于电子显微镜下观察,发现粒子为形态比较规则的圆球形,大小均匀,分散度好,没有出现粒子团聚的现象(图 3A)。电位粒径分析仪测得靶向纳米造影剂的粒径在 95~370 nm 范围内呈正态分布(图 3B),平均粒径为 198.9 nm,多分散系数 PDI 为 0.26;靶向纳米造影剂的表面 Zeta 电位为-31.8 mV(图 3C)。

2.3 纳米造影剂的包封率和载药量 GC-MS 法测定 PFOB 含量的标准曲线为 $y = 12.609x + 0.4441$ ($R^2 = 0.9997$),日内精密度 RSD 为 0.71%。纳米造影剂包封率测定结果为 (63.7±3.9)% ($n = 3$),载药量测定结果为 (14.3±0.9)% ($n = 3$)。

2.4 纳米造影剂体外释放特性的测定 利用透析法考察靶向纳米造影剂的体外释药特性,对 PFOB 的释放进行拟合得到曲线: $Y = 16.52 \ln(t) + 19.446$ ($R^2 = 0.9971$),该曲线符合一级速率方程,即释放是按时间变化先多后少的非恒速释药。由图 4 可见,纳米造影剂中的 PFOB 释放可以分成 3 个阶段:第一阶段释放比较快,前 3 h 有一个突释,释放量占总药量的 37.4%,这是纳米造影剂表面的 PFOB 从纳米造影剂脱离导致的快速释放;3 h 后进入了一个平稳释放的状态,这是纳米造影剂内部的 PFOB 向表层扩散从而进入了释放液中,前 24 h 累计释放了

73.2%;24 h 后药物的扩散进入一个平衡状态,纳米造影剂中的 PFOB 释放减缓。前 48 h PFOB 累计释放了 85.3%。

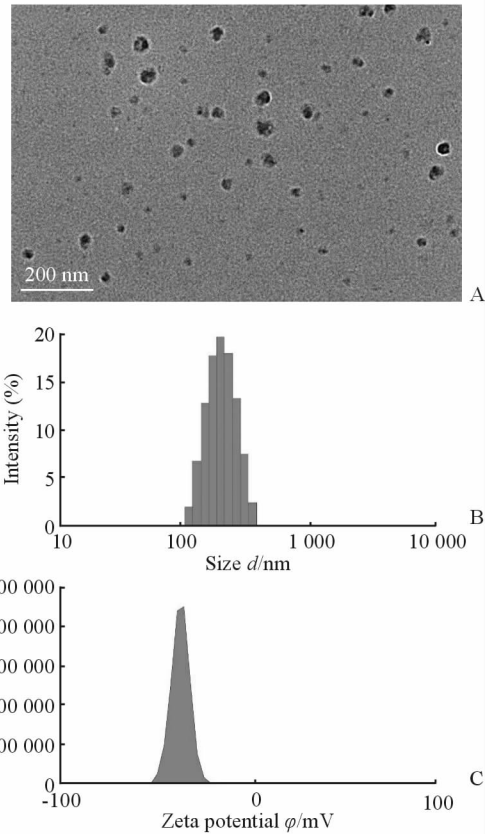


图3 靶向纳米造影剂的形态(A)、粒径(B)和 Zeta 电位分布(C)

Fig 3 The morphology (A), size (B) and Zeta potential distribution (C) of targeted nano-scale ultrasound contrast agent

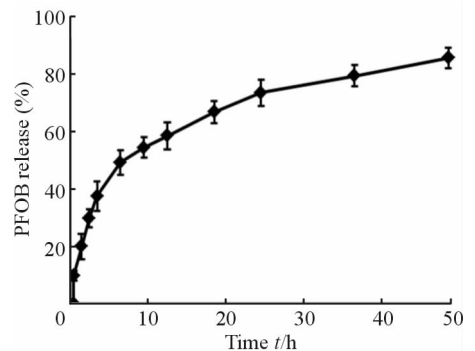


图4 纳米造影剂中 PFOB 的体外释放曲线

Fig 4 Release curves of PFOB from targeted nano-scale ultrasound contrast agent

PFOB; Perfluorooctyl bromide, $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.5 纳米造影剂的体外靶向性评价 利用荧光显微镜观察胰腺癌细胞对靶向纳米造影剂的摄取(图 5),可以发现高表达 Hedgehog 抗原的 SW1990 细胞

对靶向纳米造影剂的摄取量比较多, 绿色荧光在细胞内分布比较均匀, 荧光强度明显高于非靶向纳米造影剂的对照组; 而不表达 Hedgehog 抗原的 CFPAC-1 细胞对靶向纳米造影剂的摄取量没有明显增加, 说明 Hedgehog 抗体修饰的纳米造影剂对表达 Hedgehog 抗原的胰腺癌细胞有靶向作用。利用过量的 Hedgehog 抗体封闭细胞表面的 Hedgehog 抗原后, SW1990 细胞对靶向纳米造影剂的摄取量显著下降, 表明在 SW1990 细胞对靶向纳米造影剂的摄取过程中, Hedgehog 抗原-抗体介导的内吞途径发挥了重要

作用。利用流式细胞仪对纳米造影剂摄取的定量研究发现, 靶向纳米造影剂作用 1 h 后, SW1990 细胞的平均荧光强度为 1 463. 9, 而非靶向纳米造影剂作用的 SW1990 细胞平均荧光强度只有 352. 6, 仅为前者的 1/4, 而利用抗体封闭 Hedgehog 抗原后, 靶向纳米造影剂作用的细胞平均荧光强度下降为 414. 1, 下降非常明显。而 Hedgehog 抗原低表达的 CFPAC-1 细胞的平均荧光强度与纳米造影剂表面是否连接抗体关联不大, 靶向和非靶向纳米造影剂组的细胞平均荧光强度分别为 389. 7 和 205. 6(图 6)。

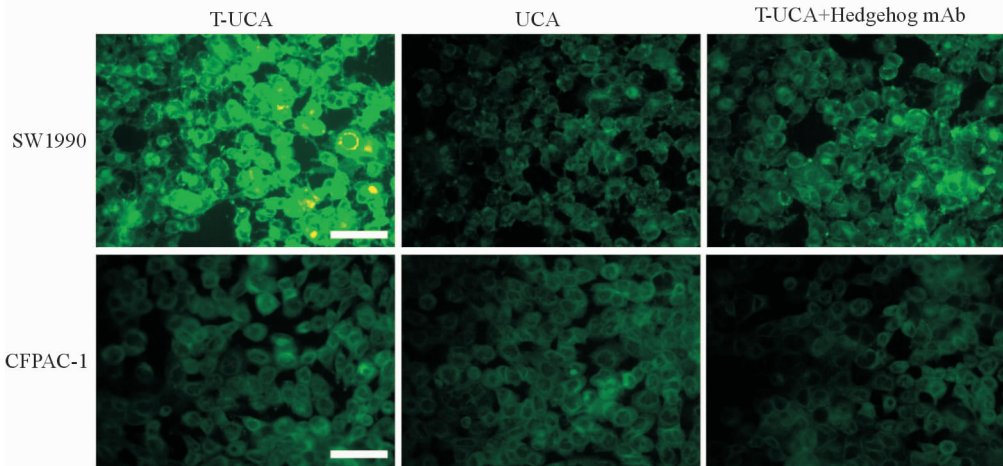


图 5 荧光显微镜观察纳米造影剂的细胞摄取情况

Fig 5 Cellular uptake of nano-scale ultrasound contrast agent observed by fluorescence microscope

T-UCA: Cells were treated with targeted nano-scale ultrasound contrast agent; UCA: Cells were treated with non-targeted nano-scale ultrasound contrast agent; T-UCA + Hedgehog mAb: Cells were pretreated with excessive Hedgehog monoclonal antibody before treated with targeted nano-scale ultrasound contrast agent. Original magnification: $\times 20$

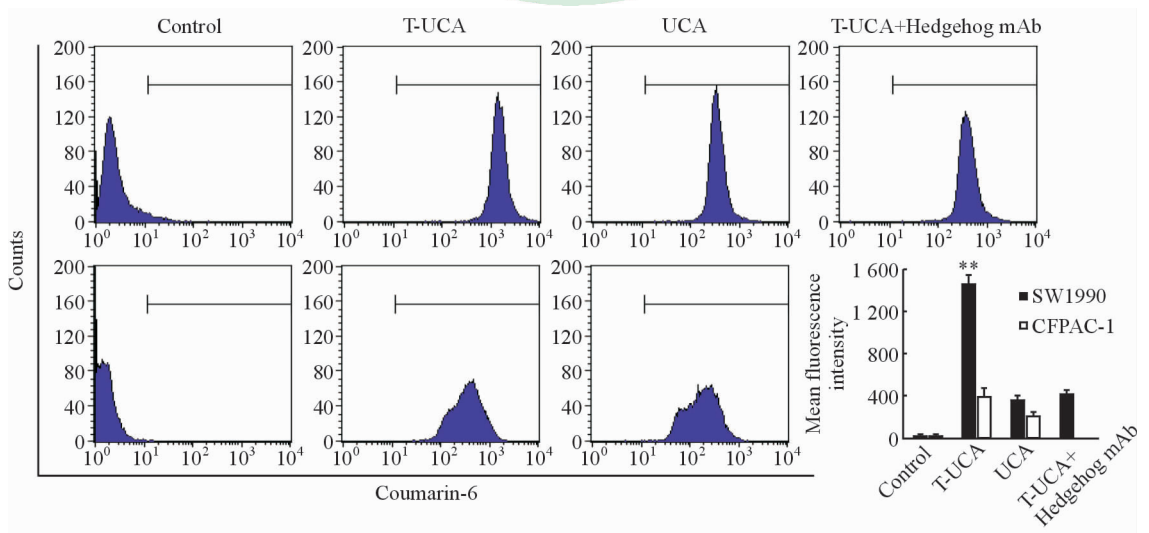


图 6 流式细胞仪检测 SW1990 细胞(上排)和 CFPAC-1 细胞(下排)对纳米造影剂的摄取情况

Fig 6 The cellular uptake of nano-scale ultrasound contrast agent determined by flow cytometry (The upper line for SW1990 cells and the lower line for CFPAC-1 cells)

Control: The untreated cells; T-UCA: Cells were treated with targeted nano-scale ultrasound contrast agent; UCA: Cells were treated with non-targeted nano-scale ultrasound contrast agent; T-UCA + Hedgehog mAb: Cell were pretreated with excessive Hedgehog monoclonal antibody before treated with targeted nano-scale ultrasound contrast agent. ** $P < 0.01$ vs other groups. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

近年来 CE-EUS 已成为胰腺癌诊断的首选方法,超声造影剂可以大大提高 CE-EUS 的敏感性。现有的超声造影剂主要为微泡造影剂,微泡的直径较大(多为 2~6 μm),存在无法穿透血管壁到达靶细胞、特异性不强、半衰期短等局限^[16],易造成误诊或漏诊^[16]。而纳米级造影剂具有穿透血管内皮间隙使血管外靶组织显像的能力^[17],因此靶向性、纳米级的造影剂成为近年来分子影像学的研究热点。

为克服传统微泡造影剂的缺点,本课题利用 PLGA、双功能 PEG 和 PFOB 构建了一种能对胰腺癌特异性靶向的纳米级造影剂。PFOB 的聚集成像性能克服了微泡造影剂的声影现象与背景噪声,从而提高成像的分辨准确度^[15]。PLGA 是一种优良的纳米粒制备材料,但单独应用制备的纳米微粒会在体内清除迅速,PEG 的修饰可以减少网状内皮系统(reticuloendothelial system, RES)对 PLGA 纳米微粒的清除,延长其在血液循环的存留时间,有利于纳米粒到达肿瘤部位^[18],同时 PEG 有独特的亲水特性,桥接 Hedgehog mAb 后可使得后者分布于纳米粒表层,有助于单抗靶向功能的发挥。

本研究采用乳化挥发法制备纳米粒时,目标粒径为 200 nm 左右,本实验制得的纳米粒的平均粒径为 198.9 nm,制得的靶向纳米造影剂稳定性好,粒径大小均匀,该粒径大小可以充分利用肿瘤的增强渗透滞留效应(enhanced permeability and retention effect, ERP),使纳米造影剂在肿瘤部位滞留和蓄积^[19];靶向纳米造影剂的表面 Zeta 电位为 -31.8 mV, Zeta 电位的绝对值在 30 mV 以上时,纳米粒表面的净电荷足以让微粒间产生较大的静电斥力,使得纳米粒稳定性提高,保持粒径大小均匀,减少聚集现象^[20]。体外释放实验表明,纳米粒 PFOB 的释放符合一级速率方程,经 3 h 的突释后进入平稳释放状态,24 h 后释放减缓,前 48 h 累计释放了 85.3%。靶向纳米造影剂作为肿瘤特异性诊断试剂,需要在注射后靶向并富集到肿瘤部位,然后进行超声诊断成像,在体内这一过程需要一定时间才能实现,因此 PFOB 不能立即全部释放,但也不能释放太缓慢,而我们制得的纳米造影剂的释放特性可以满足这一条件。在体外寻靶实验中,靶向造影剂被高表达 Hedgehog 抗原的 SW1990 细胞大量摄取,而不表达 Hedgehog 抗原的 CFPAC-1 细胞未见

特异性的摄取增强。利用抗体封闭 Hedgehog 抗原后,靶向纳米粒随着抗体浓度增高而与细胞的结合能力减弱,可进一步证明靶向纳米造影剂与 SW1990 细胞的特异性结合,即抗体导向的靶向纳米造影剂具有靶向结合胰腺癌细胞的能力。

综上所述,本研究选用 PFOB 包裹在 PEG 修饰的 PLGA 纳米微粒中得到纳米级超声造影剂,在表面连接 Hedgehog 单抗以实现胰腺癌的靶向性,体外评价表明具有成为胰腺癌靶向的新型造影剂的潜力,后期我们将进一步在动物体内验证其靶向性和超声造影增强效果。

[参考文献]

- [1] Hidalgo M. Pancreatic cancer [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362: 1605-1617.
- [2] Verbeke C S. Resection margins in pancreatic cancer [J]. *Pathologie*, 2013, 34(Suppl 2): 241-247.
- [3] Bilimoria K Y, Bentrem D J, Feinglass J M, Stewart A K, Winchester D P, Talamonti M S, et al. Directing surgical quality improvement initiatives: comparison of perioperative mortality and long-term survival for cancer surgery [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 4626-4633.
- [4] Diethrich C F, Sharma M, Hocke M. Contrast-enhanced endoscopic ultrasound [J]. *Endosc Ultrasound*, 2012, 1: 130-136.
- [5] Luz L P, Al-Haddad M A, Sey M S, DeWitt J M. Applications of endoscopic ultrasound in pancreatic cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20: 7808-7818.
- [6] Deshpande N, Needles A, Willmann J K. Molecular ultrasound imaging: current status and future directions [J]. *Clin Radiol*, 2010, 65: 567-581.
- [7] Liu H L, Fan C H, Ting C Y, Yeh C K. Combining microbubbles and ultrasound for drug delivery to brain tumors: current progress and overview [J]. *Theranostics*, 2014, 4: 432-444.
- [8] Kaufmann B A, Lindner J R. Molecular imaging with targeted contrast ultrasound [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18: 11-16.
- [9] Chiu J W, Wong H, Leung R, Pang R, Cheung T T, Fan S T, et al. Advanced pancreatic cancer: flourishing novel approaches in the era of biological therapy [J]. *Oncologist*, 2014, 19: 937-950.
- [10] Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K. Hedgehog signaling in prostate cancer and its therapeutic

- implication [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 13979-14007.
- [11] Choi J S, Seo K, Yoo J W. Recent advances in PLGA particulate systems for drug delivery [J]. *J Pharm Invest*, 2012, 42: 155-163.
- [12] Danhier F, Ansorena E, Silva J M, Coco R, Breton A L, Pr eat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications [J]. *J Control Release*, 2012, 161: 505-522.
- [13] Gao W, Wang J. Synthetic micro/nanomotors in drug delivery [J]. *Nanoscale*, 2014, 6: 10486-10494.
- [14] Diaz-López R, Tsapis N, Santin M, Bridal S L, Nicolas V, Jaillard D, et al. The performance of PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as an ultrasound contrast agent [J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 1723-1731.
- [15] Diaz-López R, Tsapis N, Fattal E. Liquid perfluorocarbons as contrast agents for ultrasonography and ¹⁹F-MRI [J]. *Pharm Res*, 2010, 27: 1-16.
- [16] Zheng S G, Xu H X, Chen H R. Nano/microparticles and ultrasound contrast agents [J]. *World J Radiol*, 2013, 5: 468-471.
- [17] Paefgen V, Doleschel D, Kiessling F. Evolution of contrast agents for ultrasound imaging and ultrasound-mediated drug delivery [J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 197.
- [18] Kolate A, Baradia D, Patil S, Vhora I, Kore G, Misra A. PEG-a versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems [J]. *J Control Release*, 2014, 192: 67-81.
- [19] Nichols J W, Bae Y H. EPR: evidence and fallacy [J]. *J Control Release*, 2014, 190: 451-464.
- [20] Elzoghby A O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: reviewing three decades of research [J]. *J Control Release*, 2013, 172: 1075-1091.

[本文编辑] 曾奇峰, 孙岩

• 消息 •

2015 中加 (NSFC-FRQS) 肿瘤学术研讨会成功举办

由国家自然科学基金委员会 (NSFC) 与加拿大魁北克医学研究基金会 (FRQS) 联合主办、第二军医大学长征医院消化内科承办的 2015 中加 (NSFC-FRQS) 肿瘤学术研讨会 [2015 Sino-Canada (NSFC-FRQS) Symposium on Cancer Research] 于 2015 年 10 月 19 日至 20 日在沪成功举办。

第二军医大学孙颖浩校长、王红阳院士, 长征医院郑兴东院长、医教部蔡剑飞主任等领导出席了开幕式, 国家自然科学基金委员会国际合作局邹立尧副局长、刘秀萍副处长和加拿大魁北克医学研究基金会负责人 Anne-Cécile Desfaits 博士参加了本次会议。孙校长在开幕式上发表了热情洋溢的欢迎辞, 向来自国内外的各位专家学者和参会代表表示热烈欢迎, 向国家自然科学基金委员会和加拿大魁北克医学研究基金会对我校信任表示衷心感谢, 期望通过本次研讨会增进中加双方科学家的合作和交流, 进一步提高双方肿瘤研究水平。

本次会议由谢渭芬教授和 Anne-Marie Mes-Masson 教授担任共同主席, 詹启敏院士等 16 名来自中加两国肿瘤学研究领域的著名学者分别就肿瘤遗传学、肿瘤新疗法及个体化治疗、肿瘤微环境和肿瘤免疫学等 4 个主题进行了深入的交流和探讨。此外还举行了圆桌会议, 就如何加强两国肿瘤医学研究合作等方面进行了深入讨论。

本次研讨会的顺利召开促进了中加科学家在肿瘤医学领域的交流, 为两国学者将来在肿瘤医学研究领域开展多层次、多角度合作奠定了良好的基础, 将进一步推动两国肿瘤研究的发展。