



# 中国临床医学

Chinese Journal of Clinical Medicine

ISSN 1008-6358  
CN 31-1794/R

## 靶向CD147纳米微泡的制备及超声成像能力检测

袁海霞, 关佩珊, 金赞杰, 杨萍, 吴爱琴, 王文平

引用本文:

袁海霞, 关佩珊, 金杰, 杨萍, 吴爱琴, 王文平. 靶向CD147纳米微泡的制备及超声成像能力检测[J]. 中国临床医学, 2022, 29(1): 84-87.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2022.20211165>

## 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

### 低频超声联合微泡促进多发性大动脉炎血管平滑肌细胞凋亡的生物学效应

Biological effects of low-frequency ultrasound combined with microbubbles on promoting apoptosis of vascular smooth muscle cells in Takayasu arteritis

中国临床医学. 2019, 26(1): 93-97 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20180453>

### 抗GPC3/CD3双特异性重链抗体的制备及其抗肝癌作用评价

Preparation of anti-GPC3/CD3 bispecific heavy chain antibody and evaluation of its anti-liver cancer effect

中国临床医学. 2021, 28(3): 416-421 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210990>

### 预后营养指数与靶向治疗中晚期肝癌患者的预后关系

Prognostic significance of prognostic nutritional index in intermediate and advanced hepatocellular carcinoma with targeted therapy

中国临床医学. 2021, 28(3): 476-481 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20202574>

### 钠钙交换器1对肝细胞肝癌增殖与侵袭的影响

The role and mechanisms of NCX1 on proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma

中国临床医学. 2017, 24(6): 873-878 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20170291>

### miR-145在肾细胞癌患者肿瘤细胞中低表达及其临床意义

Low expression of miR-145 in tumor cells from renal cell carcinoma patients and its clinical significance

中国临床医学. 2020, 27(3): 418-421 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20200145>

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2022.20211165

· 短篇论著 ·

## 靶向 CD147 纳米微泡的制备及超声成像能力检测

袁海霞<sup>1,2</sup>, 关佩珊<sup>1</sup>, 金赞杰<sup>2,3</sup>, 杨 萍<sup>2</sup>, 吴爱琴<sup>1</sup>, 王文平<sup>1,2,3\*</sup>

1. 复旦大学附属中山医院厦门医院超声科, 厦门 361015

2. 复旦大学附属中山医院超声科, 上海 200032

3. 复旦大学超声医学与工程研究所, 上海 200032

引用本文 袁海霞, 关佩珊, 金赞杰, 等. 靶向 CD147 纳米微泡的制备及超声成像能力检测 [J]. 中国临床医学, 2022, 29(1):84-87. YUAN H X, GUAN P S, JIN Y J, et al. Preparation and ultrasonic imaging ability of CD147-targeted nanobubbles[J]. Chinese Journal of Clinical Medicine, 2022, 29(1):84-87.

〔摘要〕 目的 制备靶向 CD147 纳米微泡造影剂, 并评价其理化性质、对肝细胞肝癌 (肝癌) 细胞的靶向能力及超声成像能力。方法 将 PLGA-PEG、DSPE-PEG2000-COOH、全氟丙烷饱和水溶液混合, 通过偶联反应与 CD147 抗体结合, 制备靶向 CD147 纳米微泡。将靶向 CD147 及非靶向纳米微泡分别与 MHCC-97H (肝癌细胞) 共孵育, 检测纳米微泡的寻靶能力。靶向 CD147 微泡制备后 1 d 及 3 d 检测粒径大小, 并进行体外及裸鼠体内超声显像。结果 制备后 1 d 靶向微泡粒径 (188.1±4.8) nm、3 d 为 (193.1±11.3) nm。免疫荧光检测显示靶向 CD147 纳米微泡较非靶向纳米微泡可更多与 MHCC-97H 细胞结合 ( $P<0.01$ )。制备后 1 d 及 3 d, 靶向 CD147 纳米微泡可均匀分布于 PBS 中, 在裸鼠体内有较好的超声成像能力。结论 制备的靶向 CD147 纳米微泡理化性质稳定, 可与肝癌细胞特异性结合, 在体外及体内均具有较好的超声成像能力, 可作为一种特异结合肝癌细胞的超声分子显像及肝癌治疗的分子探针。

〔关键词〕 CD147; 肝癌细胞; 超声分子成像; 寻靶能力

〔中图分类号〕 R 445.1 〔文献标志码〕 A

## Preparation and ultrasonic imaging ability of CD147-targeted nanobubbles

YUAN Hai-xia<sup>1,2</sup>, GUAN Pei-shan<sup>1</sup>, JIN Yun-jie<sup>2,3</sup>, YANG Ping<sup>2</sup>, WU Ai-qin<sup>1</sup>, WANG Wen-ping<sup>1,2,3\*</sup>

1. Department of Ultrasound, Zhongshan Hospital, Fudan University (Xiamen Branch), Xiamen 361015, Fujian, China

2. Department of Ultrasound, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

3. Institute of Ultrasound Medicine and Engineering, Fudan University, Shanghai 200032, China

〔Abstract〕 Objective To prepare CD147-targeted nanobubble contrast agent and to evaluate its physicochemical properties, liver cancer cell-targeting ability, and ultrasound imaging ability. Methods PLGA-PEG, DSPE-PEG2000-COOH, and perfluoropropane saturated aqueous solution were mixed and combined with CD147 antibody by coupling reaction to prepare CD147-targeted nanobubbles. CD147-targeted and non-targeted nanobubbles were co-incubated with MHCC-97H cells, respectively, and the targeting ability of nanobubbles was evaluated. The particle size of CD147-targeted microbubbles was detected at 1 d and 3 d after the preparation, and the ultrasonic imaging was performed *in vitro* and in nude mice. Results CD147-targeted nanobubbles were uniformly distributed in the solution, and immunofluorescence results showed that CD147-targeted nanobubbles bond to MHCC-97H cells significantly more than the non-targeted nanobubbles ( $P<0.01$ ). The average diameter of targeted bubbles was (188.1±4.8) nm and (193.1±11.3) nm at 1 d and 3 d after preparation, respectively. At the 1 d and 3 d, the targeted microbubbles had good ultrasound imaging ability both *in vitro* and *in vivo*. Conclusion The prepared CD147-targeted nanobubbles have stable physical and chemical properties, can specifically bind to liver cancer cells, and have good ultrasound imaging ability *in vitro* and *in vivo*. They can be used as a nano-scale molecular probe for ultrasonic molecular imaging and targeted therapy of liver cancer.

〔收稿日期〕 2021-05-26 〔接受日期〕 2021-09-15

〔基金项目〕 福建省卫生健康科研人才项目 (2019-ZQNB-39), 厦门市科技计划医疗卫生项目 (3502Z20184002), 上海市临床重点专科项目 (shslczdk03501)。Supported by Health and Science Research Project of Fujian Province (2019-ZQNB-39), the program of Xiamen Science and Technology Plan (3502Z20184002), and Shanghai Municipal Key Clinical Specialty (shslczdk03501)。

〔作者简介〕 袁海霞, 博士, 副主任医师。E-mail: haixiyuan75@163.com

\* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-64041990-2474, E-mail: puguang61@126.com

[Key Words] CD147; hepatoma cell; ultrasonic molecular imaging; target-seeking ability

肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是一种富血管实体瘤, 发病率居全球恶性肿瘤第 5 位, 相关死亡率居第 3 位<sup>[1]</sup>。近年来, 纳米级微泡超声造影剂在 HCC 诊疗中的应用越来越受到关注。纳米级微泡进入机体后可逃脱机体网状内皮系统的清除, 在体内循环时间长, 并可穿透肿瘤血管屏障, 通过渗透与滞留增强效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR) 在肿瘤组织间隙内蓄积, 不再局限于血池显像<sup>[2]</sup>。而结合特定抗体或配体的靶向纳米微泡造影剂, 在肿瘤等疾病的早期诊断及靶向治疗方面具有更广阔的应用前景。CD147 属于免疫球蛋白家族, 是一种跨膜糖蛋白, 在 HCC 细胞高度表达并与 HCC 进展和预后密切相关<sup>[3]</sup>。本研究拟制备一种靶向 CD147 的纳米级微泡造影剂, 并检测其理化性质、超声成像能力, 以及其与 HCC 细胞特异性结合的能力, 以期为临床 HCC 诊疗监测提供一种纳米级超声分子探针。

## 1 材料与方法

1.1 试剂与材料 全氟丙烷购自上海上氟科技有限公司, 香豆素-6 购自比迪生物科技 (上海) 有限公司, 聚乙烯醇 (PVA, 分子量 3 000) 购自 Sigma 公司, 二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-羧基 (DSPE-PEG2000-COOH) 购自上海士宇生物技术有限公司; 卵磷脂购自 Alfa Aesar 公司; 聚乳酸-羟基乙酸-聚乙二醇共聚物 (PLGA-PEG) 购自上海舜纳生物科技有限公司; CD147 抗体购自神州细胞生物科技有限公司。

1.2 仪器设备 Mastersizer 3000 激光粒度仪购自英国马尔文公司; SB20001 电子天平购自上海沪粤明科学仪器有限公司, 超声破碎仪购自宁波洛尚智能科技有限公司; TGL20MW 台式离心机购自湖南赫西仪器装备有限公司; JEOL2010 透射电子显微镜购自日本电子株式会社; 搅拌器购自上海豫康科教仪器设备有限公司。

1.3 制备方法 将 30 mg PLGA-PEG、15 mg DSPE-PEG2000-COOH 溶解于含 1.5 mL 二氯甲烷的三颈瓶中, 加入 150  $\mu$ L 全氟丙烷饱和水溶液,

于 100 W 超声破碎仪中冰浴乳化 5 min, 通入全氟丙烷气体, 加入 5 mL 3% 聚乙烯醇再次超声乳化 5 min。二次乳化悬液中再次加入 20 mL 全氟丙烷饱和 1% 聚乙烯醇溶液, 400 r/min 搅拌过夜; 11 180 $\times$ g 离心 10 min, 去除聚乙烯醇, 制得全氟丙烷超声纳米微泡。将纳米微泡以吗啉乙磺酸 (MES) 缓冲溶液 (pH=5) 透析过夜, 加入 EDC 孵育 2 h 以活化表面羧基; 调整溶液 pH 至 7.0, 加入 0.1 mg CD147 抗体 (偶联反应) 过夜。以 Sephadex G25 凝胶层析柱分离去除游离抗体, 获得靶向 CD147 超声纳米微泡, 浓缩至  $5\times 10^8$  个/mL, 分装于 5 mL 西林瓶中 (每瓶 2 mL), 充入全氟丙烷气体 4 $^{\circ}$ C 密闭保存。

1.4 理化性质检测 检测纳米微泡粒径电位表征: 纳米微泡制备后 1 d 及 3 d 时, 用适量纯水稀释, 通过激光粒度仪检测溶液中靶向纳米囊泡及未修饰纳米囊泡的粒径、电位及多分散系数。

1.5 靶向 MHCC-97H 细胞能力检测 取对数生长期的 MHCC-97H 细胞, 消化计数, 以每孔  $2\times 10^4$  个细胞铺于共聚焦培养皿, 过夜。次日, 在孔中加入 50  $\mu$ L 香豆素 6 荧光标记的靶向及非靶向超声微泡, 并设置 0.9% 氯化钠液阴性对照。处理后的细胞继续培养 4 h, 以 PBS 洗涤 2 次后, 用 4% 甲醛溶液室温固定 20 min; 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次, DAPI 染色 15 min, PBS 洗涤 2 次。最后, 每孔加入 PBS, 通过共聚焦显微镜拍摄, ImageJ 软件分析微泡/核荧光强度比值。

1.6 超声成像能力检测 备用纳米微泡用 PBS 稀释 (1 : 100), 注入专用琼脂模具中。采用 Canon Aplio i500 超声仪, 14L5 探头, 将超声探头置于微泡溶液表面, 检测微泡超声成像能力。用裸鼠制作 MHCC-97H 皮下移植瘤模型, 经裸鼠尾静脉注射按 1 : 10 稀释的纳米微泡 50  $\mu$ L, 启动超声造影模式, 机械指数 (MI) 设为 0.1, 焦点设置于肿瘤稍下方, 观察肿瘤成像效果。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 23.0 统计软件。计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示, 组间比较采用独立样本  $t$  检验, 检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 微泡理化性质 结果(表1)显示:制备完成的微泡溶液在全氟丙烷气体中4℃密闭保存后1 d及3 d,粒径大小均一,电位及聚合物分散性指数(PDI)未见明显变化。

表1 靶向与非靶向CD147纳米微泡理化性质比较

| 微泡        | 粒径/nm      | 电位/mV     | PDI         |
|-----------|------------|-----------|-------------|
| 靶向CD147微泡 |            |           |             |
| 1 d       | 188.1±4.8  | -26.0±2.0 | 0.191±0.009 |
| 3 d       | 193.1±11.3 | -29.4±2.9 | 0.185±0.009 |
| 非靶向微泡     |            |           |             |
| 1 d       | 174.6±5.1  | -32.8±2.6 | 0.163±0.009 |
| 3 d       | 183.6±8.3  | -30.3±2.7 | 0.173±0.009 |

PDI:聚合物分散性指数。

2.2 靶向CD147纳米微泡的细胞水平寻靶能力 共聚焦显微镜下观察(图1)发现:靶向微泡较非靶向纳米微泡能更高效地与MHCC-97H细胞结合(微泡/核荧光强度比值:1.18±0.36 vs 0.15±0.04,  $P<0.01$ )。

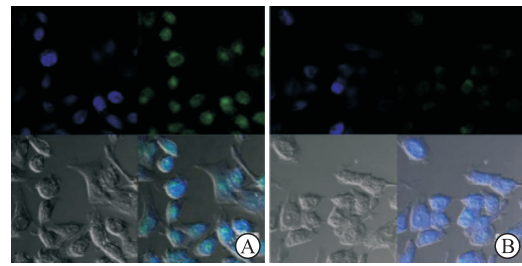


图1 共聚焦显微镜下观察纳米微泡靶向

### MHCC-97H 的能力

A:靶向CD147微泡;B:非靶向微泡。蓝色为DAPI染色的细胞核,绿色为是荧光标记的纳米微泡。Original magnification: ×400。

2.3 纳米微泡体外超声成像 超声成像(图2)显示:靶向与非靶向纳米微泡制备后1、3 d均匀分布于用PBS溶液中。

2.4 靶向CD147微泡裸鼠皮下移植瘤内超声造影 超声造影(图3)显示:靶向与非靶向纳米微泡制备后1、3 d,在裸鼠移植瘤模型体内均有较好的超声造影效果。

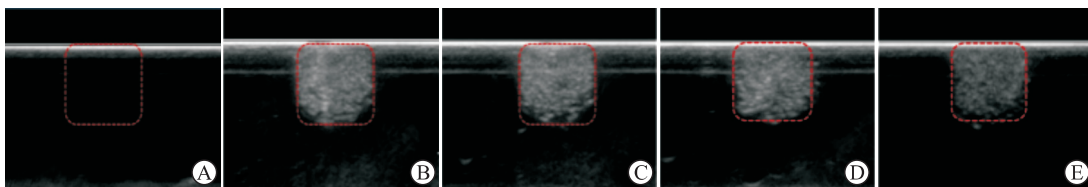


图2 纳米微泡体外超声成像图

A:琼脂模具中滴入0.9%氯化钠液,无回声;B:靶向CD147微泡制备后1 d;C:靶向CD147微泡制备后3 d;D:非靶向纳米微泡制备后1 d;E:非靶向纳米微泡制备后3 d。

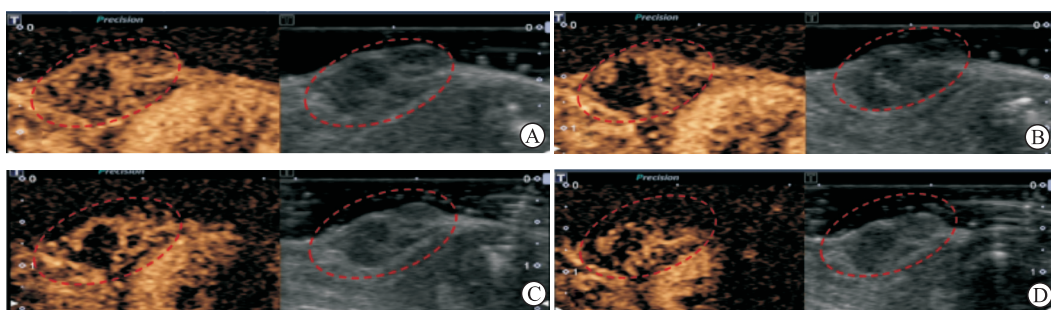


图3 纳米微泡注射于裸鼠MHCC-97H皮下移植瘤模型后超声造影(左侧)及基波超声成像(右侧)

A:靶向CD147微泡制备后1 d;B:靶向CD147微泡制备后3 d;C:非靶向微泡制备后1 d;D:非靶向微泡制备后3 d。

## 3 讨论

靶向纳米微泡通过将纳米微泡与多肽或抗体

偶联,进而能与癌细胞表面过表达的生物标志物紧密结合,实现分子成像。其显像功能较传统超声造影技术特异度和灵敏度更高,使活体组织或病灶细

胞的抗原表位可视化并有助于定量分析,有利于临床实施针对性治疗及疗效评估,且临床风险小<sup>[4-5]</sup>。

CD147 在肿瘤病理免疫组化检查中阳性率很高,达 75%。CD147 在肿瘤组织中的表达阳性率明显高于癌旁组织<sup>[6]</sup>。HAb18G/CD147 是从 HCC 细胞 cDNA 库中筛选出来的一种抗原,其编码序列与 CD147 相似,是 CD147 家族的新成员<sup>[7]</sup>。HAb18G/CD147 广泛表达于多种 HCC 细胞系,但不表达于 LO2 人类正常肝细胞系,且表达于 74.0% (37/50) HCC 患者的肿瘤细胞膜<sup>[8]</sup>。CD147 可反映 HCC 细胞的生长,诱导基质金属蛋白酶的分泌,促进 HCC 细胞的侵袭及转移,同时参与 HCC 血管生长和耐药性形成过程<sup>[3]</sup>。目前,有关靶向 CD147 的纳米微泡超声造影剂用于肿瘤的报道较少。Liu 等<sup>[9]</sup>制备了一种靶向 CD147 的纳米微泡;体外实验发现,该纳米微泡只与 HCC 细胞结合而不与正常肝细胞结合,本研究细胞实验也发现靶向 CD147 微泡能特异性结合于 HCC 细胞表面;在裸鼠体内实验中,靶向纳米微泡也获得了较好的超声成像效果。后续研究将结合超声定量参数分析靶向与非靶向微泡的成像差异。

微泡的粒径、电位的稳定性、超声成像能力决定其是否可作为合格的分子探针应用于超声分子显像及靶向治疗。本研究研制的靶向 CD147 微泡理化性质稳定,在 4℃ 及充满全氟丙烷的密闭环境中保存 1 d 及 3 d 后,其物理性质均未明显变化,与李翠仙等<sup>[10]</sup>制备的超声微泡类似,且在体外及裸鼠体内均表现良好的超声成像能力。

综上所述,本研究制备了一种通过靶向 CD147 特异结合于 HCC 细胞的纳米微泡,该微泡大小、分布均匀,稳定性好,在体外及裸鼠体内均有良好的超声成像能力,保存 3 d 后性能仍稳定,是一种较为理想的超声分子造影剂,为 HCC 分子显像及治疗提供了新方向。后续通过分析其不同时间点的超声成像灰度值,有利于肿瘤超声定量分析。

**利益冲突:** 所有作者声明不存在利益冲突。

## 参考文献

- [1] SHI Y, ZHAI B. A recent advance in image-guided locoregional therapy for hepatocellular carcinoma[J]. *Gastrointest Tumors*, 2016, 3(2):90-102.
- [2] FAN X Z, WANG L F, GUO Y L, et al. Experimental investigation of the penetration of ultrasound nanobubbles in a gastric cancer xenograft[J]. *Nanotechnology*, 2013, 24(32):325102.
- [3] LU M, WU J, HE F, et al. Cell expression patterns of CD147 in N-diethylnitrosamine/phenobarbital-induced mouse hepatocellular carcinoma[J]. *J Mol Histol*, 2015, 46(1):79-91.
- [4] PERERA R H, HERNANDEZ C, ZHOU H, et al. Ultrasound imaging beyond the vasculature with new generation contrast agents[J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2015, 7(4):593-608.
- [5] UNNIKRISHNAN S, KLIVANOV A L. Microbubbles as ultrasound contrast agents for molecular imaging: preparation and application[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2012, 199(2):292-299.
- [6] ZHANG D W, ZHAO Y X, WEI D, et al. HAb18G/CD147 promotes activation of hepatic stellate cells and is a target for antibody therapy of liver fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2012, 57(6):1283-1291.
- [7] WANG W D, ZHAO M, LI Y. Expressions and clinical significance of CD147 and CK19 in hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 2012, 11(9):517-521.
- [8] ZHU S, LI Y, ZHANG Y, WANG X, et al. Expression and clinical implications of HAb18G/CD147 in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology Research the Official Journal of the Japan Society of Hepatology*, 2014, 45(1):97-106.
- [9] LIU F, WANG X, YANG L, et al. A novel method for preparing microbubbles targeting hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatogastroenterology*, 2009, 56(93):1163-1168.
- [10] 李翠仙, 黄备建, 袁海霞, 等. 血管内皮生长因子受体 2 及整合素双靶向超声微泡的制备及其体外成像与寻靶能力检测[J]. *中华超声影像学杂志*, 2019, 28(3):261-266. LI C X, HUANG B J, YUAN H X, et al. Preparation of vascular endothelial growth factor receptor 2/ Integrin $\alpha$  $\beta$ 3 dual-targeted contrast ultrasound agent and its ultrasound imaging features and targeted ability: a in vitro study[J]. *Chinese Journal of Ultrasonography*, 2019, 28(3):261-266.

[本文编辑] 姬静芳