

抗 ICAM-1 液态氟碳纳米微球靶向损伤心肌细胞的体外实验及其细胞毒性作用研究*

韦馨¹, 唐红^{1△}, 尚艳文¹, 李国华², 李奥³, 王炼⁴, 宋海波², 方华²

1. 四川大学华西医院 心内科(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 麻醉科(成都 610041);

3. 重庆医科大学附属第二医院 超声影像学研究所(重庆 400010); 4. 四川大学华西口腔医院 病理科(成都 610041)

【摘要】 目的 制备一种耦联细胞间黏附分子-1(ICAM-1)单抗的液态氟碳(PFOB)纳米微球,检测其基本理化特性与细胞毒性作用并实现其与体外培养损伤心肌细胞的靶向结合。方法 将生物素化 ICAM-1 单抗与普通(对照组)及生物素化(实验组)PFOB 纳米微球耦联,免疫荧光技术检测抗体与微球的耦联情况;MTT 法检测微球对心肌细胞的细胞毒性作用;将两组微球分别加入非肿瘤坏死因子- α (TNF- α)损伤和 TNF- α 损伤后大鼠乳鼠心肌细胞中,观察并半定量计算各组微球与心肌细胞的结合情况。结果 ICAM-1 单抗与实验组微球成功耦联,耦联率 95%,共聚焦显微镜下微球呈绿色荧光,其粒径、电位、浓度分别为(385.3 \pm 88.9) nm, -(60.3 \pm 6.11) mV, 7.0 \times 10⁸/mL,而对照组微球不见或仅见微弱荧光;不同浓度、不同作用时间下实验组微球对心肌细胞无毒性作用;无论心肌细胞是否暴露于 TNF- α ,对照组微球均未见附着在心肌细胞膜周,而 TNF- α 损伤下实验组微球与心肌细胞的附着量是非损伤下的 10 倍($P<0.01$)。结论 成功制备出耦联 ICAM-1 单抗的 PFOB 纳米微球,该靶向微球无细胞毒性作用且与体外高表达 ICAM-1 心肌细胞有较强的结合力。

【关键词】 液态氟碳 心肌细胞 靶向 ICAM-1 纳米

Cytotoxicity of PFOB Nanoparticle Coupled with ICAM-1 Antibody on Cardiomyocytes and its Targeted Adhesion to Injured Cardiomyocytes *in vitro*

WEI Xin¹, TANG Hong^{1△}, SHANG Yan-wen¹, LI Guo-hua², LI Ao³, WANG Lian⁴, SONG Hai-bo², FANG Hua².

1. Department of Cardiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Anesthesia, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Institute of Ultrasonic Image, Department of Ultrasound, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 4. Department of Pathology, West China Stomatological Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: hxyyth@gmail.com

【Abstract】 **Objective** To synthesize perfluorooctylbromide (PFOB) nanoparticle coupled with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) monoclonal antibody, and to investigate the characteristics of the nanoparticle and its cytotoxicity on and targeted adhesion to injured cardiomyocytes *in vitro*. **Methods** PFOB nanoparticle (control group) biotinylated PFOB nanoparticle (experimental group) were coupled with biotinylated ICAM-1 antibody. The combination of ICAM-1 antibody and the nanoparticle was detected by immunofluorescent assay. The cytotoxicity of the nanoparticle on rat cardiomyocytes was determined with MTT assay *in vitro*. The adhesion of the nanoparticle to normal and TNF- α injured cardiomyocytes were observed and semiquantified with optical microscope. **Results** ICAM-1 antibody was successfully coupled with biotinylated PFOB nanoparticle at a rate around 95%, which showed green fluorescence under the laser Confocal Scanning Microscope, with (385.3 \pm 88.9) nm in size, -(60.3 \pm 6.11) mV in electric potential, and 7.0 \times 10⁸/mL in concentrations. No fluorescence was observed with the nanoparticle in the control group. No cytotoxicity of the nanoparticle on rat cardiomyocytes was found. There was limited adhesion of the nanoparticle in the control group to cardiomyocytes, normal or injured. A 10-fold increase in adhesion was detected when the nanoparticle in the experimental group was exposed to the injured cardiomyocytes compared with those exposed to the normal cardiomyocytes [(5.1 \pm 0.22) vs. (0.5 \pm 0.3) nanoparticle per cell, $P<0.05$]. **Conclusion** ICAM-1 monoclonal antibody is successfully coupled with PFOB nanoparticle, which can effectively bind to the cardiomyocytes overexpressing ICAM-1 without showing cytotoxicity *in vitro*.

【Key words】 PFOB Cardiomyocyte Targeting ICAM-1 Nanometer

随着超声造影技术及生物纳米技术的飞速发

展,新型纳米级超声造影剂已逐渐成为国内外超声造影领域的研究热点,它的出现使得超声造影剂从血池显像逐渐向血管外显像发展转变。液态氟碳(PFOB)纳米脂质微球作为一种新型纳米级超声造影剂,具有普通超声造影剂无法比拟的优势。

* 国家自然科学基金项目(No. 30872535)和四川省科技厅支撑项目(No. 2008SZ0198)资助

△ 通讯作者, E-mail: hxyyth@gmail.com

静息状态下,细胞间黏附分子-1(ICAM-1)在内皮细胞、上皮细胞、心肌细胞、白细胞等低水平表达,心肌细胞缺血再灌注损伤(I-R)时,细胞因子(肿瘤坏死因子 TNF- α ,白介素 IL-1 β 等)诱发 ICAM-1 在上述细胞表面表达迅速上调^[1]。虽然目前已有众多研究将抗 ICAM-1 单克隆抗体作为靶向配体实现炎症后内皮细胞的靶向结合^[2-4],但是国内外心肌细胞靶向结合的研究报道较少。本研究前期已确立生物素化 PFOB 纳米脂质微球的制备方法,并成功实现其与损伤心肌细胞的间接靶向结合^[5]。本实验在此基础上,制备耦联抗 ICAM-1 单克隆抗体的 PFOB 纳米脂质微球,检测其理化特性及细胞毒性作用,并实现对损伤后心肌细胞的直接靶向结合,使 I-R 损伤范围及严重程度的超声评价成为可能。

1 材料与方法

1.1 实验动物

日龄 1~3 d 的 SD 大鼠乳鼠,雌雄不限,由四川大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂和仪器

卵磷脂购自国药集团化学试剂有限公司;生物素标记聚乙醇化磷脂(DSPE PEG2000 Biotin)购自 Avanti 公司;PFOB 购自法国 Elf Atochem 公司;生物素化 ICAM-1 单克隆抗体(Biotin anti-rat CD54)购自 BioLegend 公司;链霉亲和素购自美国 Sigma 公司;TNF- α 购自 Peprotech 公司;FITC 标记羊抗小鼠 IgG、DAPI 染剂(北京中杉金桥公司);GYB40-10S 高压乳匀机(上海东华公司),马尔文纳米粒径电位分析仪(英国 Malvern 公司),倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司),激光共聚焦显微镜(美国 Bio-Rad 公司),流式细胞仪(美国 BD 公司),酶联免疫检测仪(美国 Bio-Red 2550 EIA Reader)等。

1.3 方法

1.3.1 生物素化(普通)PFOB 纳米微球的制备及检测^[6,7] 取 13 mL 三氯甲烷溶剂、2 mL DSPE PEG2000 Biotin(普通微球制备不加 DSPE PEG2000 Biotin)及 0.3 g 卵磷脂于 100 mL 烧杯中,搅拌 30 min 后于旋转蒸发成膜,再加入 50 mL PBS 水化 20 min,电动分散乳化(16 000 r/min, 5 min)同时加入 3 mL PFOB,最后采用 70 kPa 下高压乳化 3 次,每次 5 min,4 °C 冰箱内保存备用。检测其理化性质;光镜及电镜下观察其形态;通过加入不等量(0,0.1,0.2,0.4,0.8 mL)的链霉亲和素

(0.2 mg/mL)观察微球体外聚集情况。

1.3.2 耦联抗 ICAM-1 单克隆抗体的 PFOB 靶向纳米微球的制备及检测 分别取 0.5 mL 生物素化和普通 PFOB 纳米微球于 EP 管中,2500 r/min、4 min 离心后弃上清、纯水重悬,分别加入链霉亲和素(0.2 mg/mL)0.5 mL,涡旋 15 min 后离心弃上清、重悬,重复 3 次,再分别加入 1:100 稀释的生物素化 ICAM-1 小鼠抗大鼠单抗 200 μ L,4 °C,孵育过夜,次日离心后弃上清、重悬,置于 4 °C 冰箱内保存备用。通过测定制备当日、3 d、10 d 后微球的理化性质检测其稳定性;分别取 50 μ L 抗 ICAM-1 及普通 PFOB 纳米微球于 EP 管中,再分别加入 1:100 稀释的 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 200 μ L,37 °C,避光孵育 30 min 后离心弃上清,重悬,流式细胞仪及激光共聚焦显微镜下检测抗体与微球的耦联情况。

1.3.3 心肌细胞原代培养 取日龄 1~3 d 的 SD 大鼠乳鼠 8 只,断头处死后消毒;无菌条件下,取大鼠的心室肌组织,放入盛有 PBS 液的西林瓶中;反复冲洗、去血污后剪成 1 mm³ 块状;将剪碎后的组织吸入离心管,向内加 4 mL 0.05% 混合消化液,37 °C 恒温摇床中摇动 5 min;摇闭,抽取上清液放入一离心管中,加入 3 mL 的 10% 胎牛血清中止消化,重复以上步骤 3 次;然后离心 5 min(1200 r/min);转闭,去上清,加入适量的含 10% 胎牛血清高糖培养基;六孔板内置入无菌血盖片,抽取培养瓶中的液体接种于 6 孔板内,每孔 2 mL,接种于 96 孔板内,每孔约 200 μ L,将其放入二氧化碳培养箱内,隔天换液。

1.3.4 细胞毒性检测 采用 MTT 法检测。设置调零孔、对照孔、不同作用时间(24 h、48 h、72 h)及不同浓度的靶向微球孔(按最大浓度即 1:0 稀释,1:2,1:5,1:10,1:20,1:40,1:80,1:160 稀释,复孔 5 个;将含心肌细胞的混悬液接种于 96 孔板内(调零孔不加),每孔约 200 μ L;培养 24 h 后加入不同浓度的靶向微球;当微球与心肌细胞作用 24 h、48 h 及 72 h 后,每孔加入 MTT 液(5 mg/mL)20 μ L,避光孵育 4 h 后终止培养,吸出上清液后每孔再加 200 μ L 二甲亚砜,震荡 10 min,使结晶物充分溶解;离心(1200 r/min,3 min)取上清液后转入另一干净酶标板内,酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处,测定各孔的光吸收值(OD 值)。

1.3.5 抗 ICAM-1 靶向 PFOB 纳米微球与损伤心肌细胞直接结合 实验分为 4 组:A 组(TNF- α 损

伤+靶向微球组),B组(非 TNF- α 损伤+靶向微球组),C组(TNF- α 损伤+普通微球组),D组(非 TNF- α 损伤+普通微球组)。S-D大鼠乳鼠心肌细胞体外培养2d后按分组向A组、C组加入TNF- α (200 ng/mL)200 μ L,B组、D组不加,12 h后取出血盖片,40 g/L多聚甲醛固定细胞15 min,PBS液轻洗3次,每次5 min;加入山羊血清液200 μ L,37 $^{\circ}$ C,孵育30 min,将靶向微球加入A、B组中,普通微球加入C、D组中,37 $^{\circ}$ C孵育40 min后轻洗3次,每次5 min;加入200 μ L FITC标记羊抗小鼠IgG(1:100稀释),37 $^{\circ}$ C避光孵育30 min后再用PBS轻洗3次,每次5 min;最后加入DAPI液(5 μ g/mL)100 μ L,避光孵育5 min后用PBS液洗2次;激光共聚焦显微镜下观察,随机计数5个400倍视野心肌细胞数目及黏附于细胞表面的微球数目,计算微球与心肌细胞比值作为评价微球黏附率的指标^[8]。

1.3.6 统计学方法 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异性比较采用单因素方差分析,两组间差异性比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物素化 PFOB 纳米微球的体外聚集观察

未加亲和素的生物素化 PFOB 纳米微球光镜下均匀分散;加入0.1 mL及0.2 mL亲和素组;镜下未见明显聚集;加入0.4 mL及0.8 mL亲和素组;溶液可见分为两层,上层透明乳液状,底部被少量沉淀物覆盖,镜下可见微球团状聚集(图1)。

2.2 生物素化及靶向 PFOB 纳米微球的光镜和透射电镜观察

生物素化及靶向 PFOB 纳米微球光镜下形态

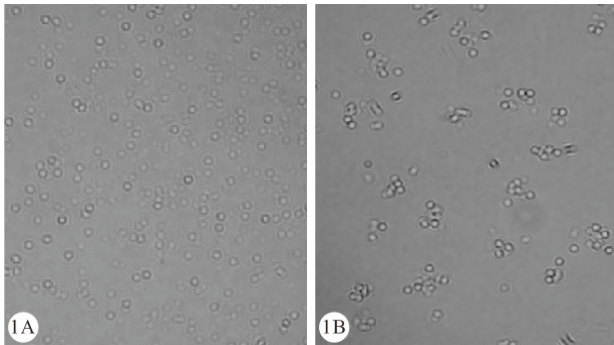


图1 未加亲和素(A)和加入0.4 mL亲和素(B)的生物素化PFOB微球镜下观察。 $\times 400$

无明显差异,外形均呈球形,大小均一,分布均匀(图2)。生物素化及靶向 PFOB 纳米微球透射电镜下形态相似,如同面包被一层芝麻的糯米团(图3)。

2.3 基本理化性质及稳定性检测结果

生物素化 PFOB 纳米微球的理化特性:粒径(200.6 \pm 90.7) nm,多分散度指数(PDI)值0.19,电位-(52.1 \pm 11.9) mV,浓度为6.5 $\times 10^8$ /mL。靶向 PFOB 纳米微球的理化特性:粒径(385.3 \pm 88.9) nm,PDI值0.20,电位-(60.3 \pm 6.11) mV,浓度为7.0 $\times 10^8$ /mL。

抗 ICAM-1 靶向 PFOB 纳米微球在制备当日(0 d)、3 d、10 d后粒径分别为(385.3 \pm 88.9) nm,(400.2 \pm 92.4) nm,(450 \pm 100) nm;电位分别为-(60.3 \pm 6.1) mV,-(55.4 \pm 8.1) mV,-(50.6 \pm 7.5) mV;浓度为7.0 $\times 10^8$ /mL,6.4 $\times 10^8$ /mL,6.0 $\times 10^8$ /mL,不同存放时间的粒径、电位及浓度差异均无统计学意义($P > 0.05$),说明在-4 $^{\circ}$ C下靶向微球可稳定保存至少10 d。

2.4 激光共聚焦显微镜下观察

生物素化 PFOB 纳米微球在加入 ICAM-1 单克隆抗体及 FITC 荧光二抗后可见亮绿色环状荧光包绕微球表面,而核心未着色(图4);普通 PFOB 纳米微球表面无绿色荧光,呈一片黑色。

2.5 流式细胞仪检测抗 ICAM-1 单抗与生物素化微球耦联率结果

抗 ICAM-1 单抗与生物素化 PFOB 纳米微球(实验组)耦联率高达95%(图5),而普通 PFOB 纳米微球(对照组)的耦联率极低(0.4%)。

2.6 抗 ICAM-1 PFOB 纳米微球对心肌细胞毒性作用研究

2.6.1 不同浓度微球相同作用时间下心肌细胞活

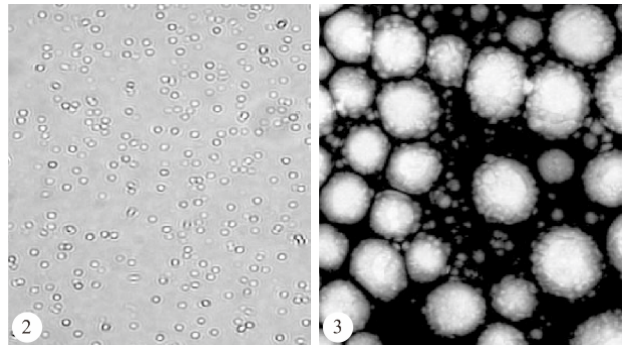


图2 生物素化或靶向 PFOB 纳米微球的光学显微镜下形态。 $\times 400$

图3 生物素化及抗 ICAM-1 靶向 PFOB 纳米微球的透射电子显微镜下形态。 $\times 30\ 000$

Fig 1 Microscope image of biotinylated PFOB nanoparticle without avidin (A) and with 0.4 mL avidin (B). $\times 400$

Fig 2 Optical

microscopy image of biotinylated or targeted PFOB nanoparticle. $\times 400$

Fig 3 Transmission electron microscopy image of biotinylated or

ICAM-1 antibody conjugated PFOB nanoparticle. $\times 30\ 000$

力测定 由图 6 可见,不同浓度靶向微球作用 24 h 后其心肌细胞与对照孔 OD 值差异无统计学意义 (P 均 >0.05);作用 48 h 后 1:5、1:10、1:20 稀释孔 OD 值均高于对照孔 (P 均 <0.05),余浓度孔与对照孔 OD 值差异无统计学意义 (P 均 >0.05);作用 72 h 后各实验孔 OD 值均高于对照孔 (P 均 <0.05),说明微球的浓度并不会降低心肌细胞的活力,反之,一定浓度微球在一定的作用时间下还会增强心肌细胞的活力。

2.6.2 相同浓度微球不同作用时间下心肌细胞活

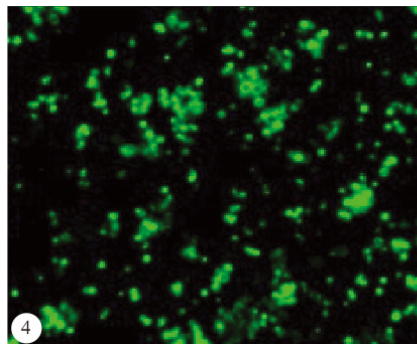


图 4 激光共聚焦显微镜下靶向 PFOB 纳米微球形态。×600

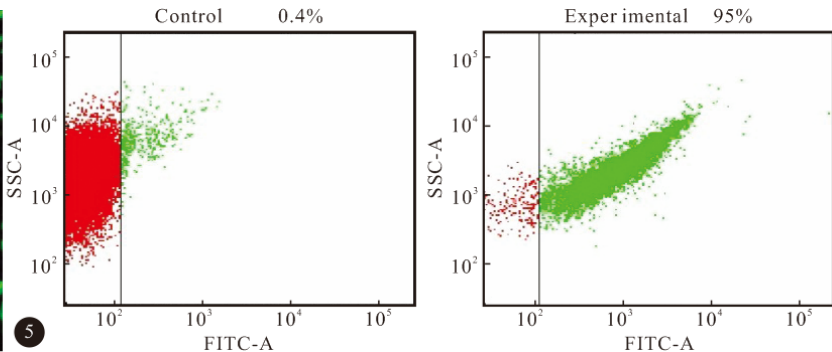


图 5 抗 ICAM-1 单抗与普通微球及生物素化 PFOB 纳米微球的耦联率流式检测图

Fig 4 Confocal laser scanning microscopy image of targeted PFOB nanoparticle. ×600

Fig 5 The coupling rate of ICAM-1 antibody with normal and biotinylated PFOB nanoparticle measured by Flow Cytometry

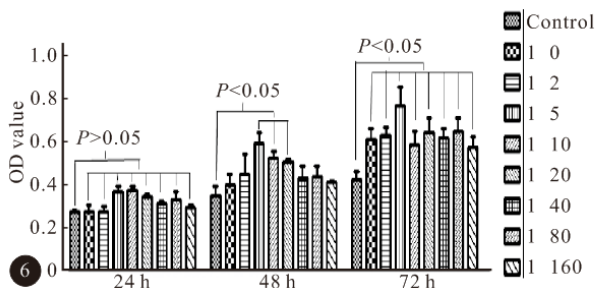


图 6 不同靶向微球浓度同一作用时间下心肌细胞 OD 值分布图

Fig 6 The OD value of cardiomyocytes at different concentration of targeted nanoparticle with the same response time

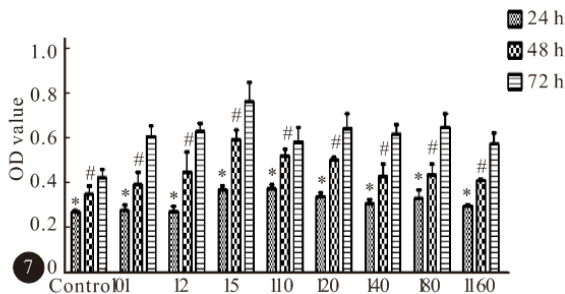


图 7 同一浓度靶向微球不同作用时间下心肌细胞 OD 值分布图

Fig 7 The OD value of cardiomyocytes at different response time with the same concentration of targeted nanoparticle

* $P < 0.05$, vs. 48 h and 72 h; # $P < 0.05$, vs. 72 h

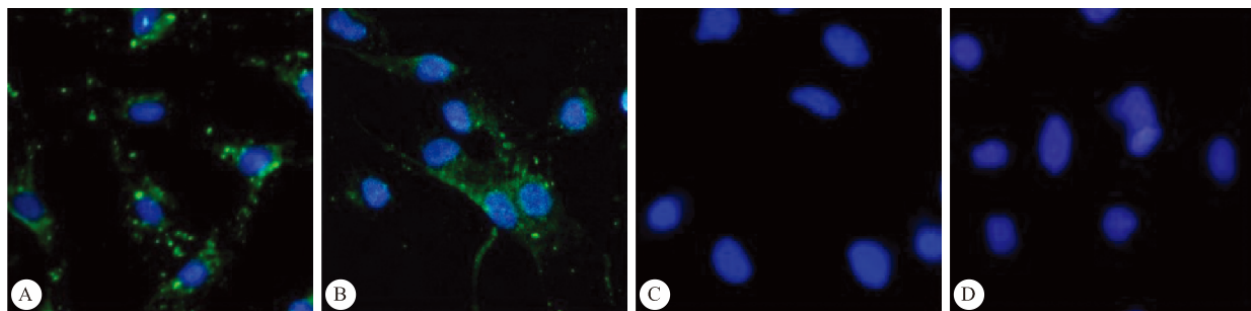


图 8 微球与心肌细胞体外结合图。×400

Fig 8 Combination graph of the nanoparticles with cardiomyocytes in vitro under Confocal laser scanning microscopy. ×400

A: Targeted nanoparticles + injured cardiomyocytes; B: Targeted nanoparticles + non-injured cardiomyocytes; C: Normal nanoparticles + injured cardiomyocytes; D: Normal nanoparticles + non-injured cardiomyocytes

力检测 见图 7。不同作用时间下对照孔细胞的 OD 值差异有统计学意义,72 h 均高于 24 h 及 48 h (P 均 <0.05);实验孔同一浓度靶向微球在不同作用时间下心肌细胞 OD 值差异有统计学意义,72 h 均高于 24 h 及 48 h (P 均 <0.05),说明微球的作用时间也不会降低心肌细胞的活性,随着作用时间的增加,细胞活力还会增强。

2.7 抗 ICAM-1 靶向 PFOB 纳米微球直接结合 TNF- α 损伤后心肌细胞

由图 8 可见, A 组:激光共聚焦显微镜下可见心

肌细胞膜周有较多绿色荧光附着,B组:可见心肌细胞膜周有少量绿色荧光附着,两组结合率分别是 5.1 ± 0.22 , 0.5 ± 0.30 (个/细胞),A组结合率是B组的10倍,差异有统计学意义($P < 0.01$)。C、D组心肌细胞膜周均未见绿色荧光附着,仅见细胞核蓝色荧光。

3 讨论

PFOB纳米微球是一种新型多功能纳米级超声造影剂,近年来因其有望用于超声、CT及MRI等多领域显影的特点受到了国内外研究者的广泛关注。Lanza等^[9,10]首先通过高压均质法制备出含PFOB的脂质微球,粒径约200~300 nm,具有纳米级超声造影剂的独特优势:如半衰期长,聚集显影,能穿过血管内皮实现血管外“声学染色”等。

由于血浆中的调理素及网状内皮系统(RES)可对脂质产生特异性调理及摄取、清除作用,当单纯脂质微球进入体内后其半衰期较短,因此脂质表面的修饰极为重要。最为常用的修饰方法有聚乙二醇(PEG)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-PEG)。PEG在脂质表面形成致密的毛刷状构象,掩盖脂质表面的疏水性结合位点,阻碍血浆成分接近脂质,可有效地躲避RES的识别及吞噬^[11,12]。本实验靶向纳米微球的制备采用PFOB作为核心,卵磷脂作为外壳并采用PEG-DSPE进行表面修饰,在制备后不同存放时间的理化性质测定结果表明自制的靶向纳米微球可稳定保存至少10 d,其原因主要与脂质外壳及PFOB核心自身的稳定性有关,还可能与表面电位有关;靶向纳米微球携同种负电荷,在一定程度上,表面电位越高,微球间的互斥力越大,微球间的距离也越大,因此不会发生凝集沉淀,稳定性越高。靶向微球的稳定性检测为体内靶向显影实验奠定了基础。

研究表明,对于单克隆抗体等大分子配体,最为常用的耦联方法即生物素-亲和素系统。每个亲和素能结合4个分子的生物素,二者的亲和力比抗原抗体间的亲和力高至少一万倍。何佰永等^[5]采用生物素-亲和素桥接作用将生物素化纳米微球间接耦联到体外损伤心肌细胞表面。Hamilton等^[13]研究发现即使在剪切力大的主动脉或颈动脉内,采用生物素-亲和素结合配体的靶向造影剂仍能与血管动脉粥样硬化灶上高表达的血管内皮细胞黏附分子-1有效结合。本实验通过生物素化纳米微球与普通纳米微球作对比,发现加入一定量的链霉亲和素后,均

匀分散的生物素化纳米微球有明显聚集现象,而普通纳米微球无聚集,验证了生物素与亲和素间的结合反应;另外抗ICAM-1单克隆抗体与生物素化纳米微球耦联实验发现:耦联单抗后的靶向微球的粒径及电位绝对值均较耦联抗体前偏大,这一现象与朱叶锋等^[14]的研究结果相似,这可能与抗体在溶液中一般带负电荷的特性及抗体与微球耦联后的空间构象发生改变有关,可间接证明靶向微球表面连接有抗体。免疫荧光显示:加入荧光二抗后,激光共聚焦显微镜下靶向微球表面可见亮绿色环状荧光,流式细胞仪检测其抗体的耦联率高达95%,而普通微球表面无荧光或极少量荧光。为抗ICAM-1PFOB纳米微球靶向结合体外损伤心肌细胞的实验研究奠定了基础。

靶向纳米微球作为一种生物材料或药物,其毒性作用是能否进入临床使用的关键,目前国内外通用的细胞毒性检测方法有MTT比色法,溶血试验等。MTT比色法具有操作简单,试验周期短等优点^[15]。卞爱娜等^[16]采用MTT比色法评价了人肝癌靶向脂质体微泡造影剂的安全性,发现所制免疫脂质体微泡并不影响人正常肝细胞的增殖。本实验采用MTT比色法评价不同浓度靶向微球作用不同时间后心肌细胞的活力发现:靶向微球的浓度及作用时间均不会降低心肌细胞的活力,反之,一定浓度靶向微球在一定的作用时间下还会增强心肌细胞的活力,这可能与微球外壳的组成成分特性有关,如微球表面的PEG修饰外壳属高分子材料,其特点是生物可降解、无生物毒性;另外心肌细胞正常生长周期也可能与心肌细胞活性有关,需要进一步研究论证。

研究表明^[17,18],心肌I-R损伤,其病理过程主要与细胞因子TNF- α 等有关,它可刺激血管内皮细胞释放ICAM-1,促进中性粒细胞聚集,导致心肌微血管阻塞及心肌损伤,加重I-R损伤程度。本实验前期研究发现^[5],正常生理状态下,ICAM-1在体外培养心肌细胞表面呈低水平表达,而加入TNF- α 后可上调心肌细胞表面ICAM-1的表达量,与Ikeda等、李祥平等的研究结果相似^[19,20],证实了TNF- α 的体外损伤心肌细胞模型建立的可行性。基于此,本实验将自制的抗ICAM-1靶向纳米微球及普通纳米微球与TNF- α 损伤后心肌细胞相结合,结果表明,无论心肌细胞是否暴露于TNF- α ,激光共聚焦显微镜下普通微球组均未见微球与细胞表面结合,而靶向微球组均可见微球与细胞表面结合,且靶向微球与损伤后心肌细胞的结合率是非损伤心肌细胞的

10 倍。由于正常生理状态下心肌细胞表面的 ICAM-1 呈低水平表达,因此极少量靶向微球可与细胞表面 ICAM-1 发生抗原-抗体反应;当 TNF- α 损伤心肌细胞后,心肌细胞表面 ICAM-1 表达迅速上调,大量靶向微球与心肌细胞表面 ICAM-1 发生抗原-抗体反应。对于普通微球而言,由于其外壳并未被生物素标记,无法通过生物素-亲和素桥接作用构建抗 ICAM-1 靶向微球,即使损伤后心肌细胞表面产生大量 ICAM-1 抗原,也无法结合在一起。

综上所述,本研究为下一阶段靶向纳米微球对 I-R 损伤心肌的体内超声显像研究奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 2002;53(1):31-47.
- 2 Weller GE, Villanueva FS, Klibanov AL, *et al.* Modulating targeted adhesion of an ultrasound contrast agent to dysfunctional endothelium. *Ann Biomed Eng*, 2002; 30(8): 1012-1019.
- 3 Villanueva FS, Jankowski RJ, Klibanov S, *et al.* Microbubbles targeted to intercellular adhesion molecule-1 bind to activated coronary artery endothelial cells. *Circulation*, 1998; 98(1):1-5.
- 4 Weller GE, Lu E, Csikari MM, *et al.* Ultrasound imaging of acute cardiac transplant rejection with microbubbles targeted to intercellular adhesion molecule-1. *Circulation*, 2003; 108(2): 218-224.
- 5 何佰永,李赵欢,唐红等.液态氟碳脂质微球靶向损伤心肌细胞的体外实验. *生物医学工程学杂志*, 2011; 28(6): 1171-1174.
- 6 陈松,康娟,王志刚等.纳米液态氟碳脂质微球超声造影剂的制备及体外聚集实验研究. *第三军医大学学报*, 2008; 30(23):2161-2163.
- 7 杨杨,王志刚,郑元义等.液态氟碳纳米脂质微球超声对比剂用于增强正常大鼠 CT 显影实验研究. *中国医学影像技术*, 2008; 24(9):1314-1344.
- 8 刘娅妮,邓又斌,刘冰冰等.靶向性声学造影剂与不同程度损伤血管内皮细胞相互作用的实验研究. *中国医学影像技术*, 2006; 22(11):1617-1620.
- 9 Lanza GM, Wickline SA. Targeted ultrasonic contrast agents for molecular imaging and therapy. *Curr Probl Cardiol*, 2003; 28(12):625-653.
- 10 Hughes MS, Marsh JN, Hall CS, *et al.* Acoustic characterization in whole blood and plasma of site-targeted nanoparticle ultrasound contrast agent for molecular imaging. *J Acoust Soc Am*, 2005; 117(12):964-972.
- 11 Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res*, 2003; 42(6): 463-478.
- 12 马超,匡安仁.长循环脂质体的研究进展及其在核医学中的应用. *生物医学工程学杂志*, 2007; 24(4):941-945.
- 13 Hamilton AJ, Huang SL, Warnick D, *et al.* Intravascular ultrasound molecular imaging of atheroma components *in vivo*. *J Am Coll Cardiol*, 2004; 43(3):453-460.
- 14 朱叶锋,冉海涛,张群霞等.靶向纳米脂质超声造影剂制备及体外寻靶能力实验研究. *中国超声医学杂志*, 2009; 25(3):220-222.
- 15 李国华,龚振宇,于淑湘等.3Y-TZP 全磁材料体外细胞毒性试验(MTT法). *中国美容医学*, 2008; 17(3):401-403.
- 16 卞爱娜,高云华,谭开彬等.人肝癌靶向脂质体微泡造影剂的鉴定及免疫学性质研究. *中华超声影像学杂志*, 2004; 13(9): 696-699.
- 17 Civelek A, Roth M, Lemke P, *et al.* Leukocyte-depleted secondary blood cardioplegia attenuates reperfusion injury after myocardial ischemia. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2003; 51(5): 249-254.
- 18 Albertine KH, Weyrich AS, Ma XL, *et al.* Quantification of neutrophil migration following myocardial ischemia and reperfusion in cats and dogs. *J Leukoc Biol*, 1994; 55(5):557-566.
- 19 Ikeda U, Ikeda M, Kano S, *et al.* Neutrophil adherence to rat cardiac myocyte by proinflammatory cytokines. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1994; 23:647-652.
- 20 李祥平,许顶立,贾满盈.肿瘤坏死因子 A 和血管紧张素 II 对心肌细胞的细胞间粘附分子-1 表达的影响. *中国病理生理杂志*, 2000; 16(1):77-78.

(2012-10-14 收稿,2013-01-06 修回)

编辑 沈进