

# 靶向肿瘤血管诱发血栓栓塞体系的建立及活性鉴定

王显江<sup>1</sup>, 王池真<sup>1</sup>, 陈小丽<sup>1</sup>, 李哲<sup>1</sup>, 罗伶俐<sup>2</sup>, 吕莎<sup>1</sup>, 梅理祥<sup>1</sup>, 周娇<sup>1</sup>, 王生育<sup>1</sup>, 颜江华<sup>1\*</sup> (1. 厦门大学医学院抗癌研究中心 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学附属第一医院麻醉科 福建 厦门 361003)

**摘要:**目的 建立一种新型的靶向高效诱发肿瘤血管血栓栓塞体系磁流体-神经纤维网蛋白1抗体 A6-链霉亲和素:生物素-短截型组织因子(MF-A6-SA:B-tTF)。方法 化学交联技术制备神经纤维网蛋白1抗体 A6-链霉亲和素、磁流体-神经纤维网蛋白1抗体 A6-链霉亲和素和生物素-短截型组织因子交联物,凝血因子X活化实验鉴定复合体系活化凝血因子X的活力,荧光显微镜技术和普鲁士蓝染色法同时观察施加外界磁场后复合体系的靶向作用,凝血实验直接观察复合体系引入链霉亲和素:生物素的生物放大效应,体内生物分布实验观察复合体系的安全性。结果 成功制备磁流体-神经纤维网蛋白1抗体 A6-链霉亲和素及生物素-短截型组织因子,磁流体-神经纤维网蛋白1抗体 A6-链霉亲和素:生物素-短截型组织因子体系保留有高效激活凝血因子X的活性,与靶点的结合具有靶向性及高效富集性,体内实验证实能安全有效诱发肿瘤血管血栓。结论 成功制备的具有靶向诱发肿瘤血管血栓栓塞体系磁流体-神经纤维网蛋白1抗体 A6-链霉亲和素:生物素-短截型组织因子为进一步探索肿瘤血管的靶向治疗奠定基础。

**关键词:**靶向;神经纤维网蛋白1单克隆抗体;短截型组织因子;磁流体;血管栓塞;抗肿瘤

doi:10.11669/cpj.2014.17.008 中图分类号:R965 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2014)17-1508-05

## Establishment and Characterization of a Targeting Tumor Vessels System for Inducing Thrombosis

WANG Xian-jiang<sup>1</sup>, WANG Chi-zhen<sup>1</sup>, CHEN Xiao-li<sup>1</sup>, LI Zhe<sup>1</sup>, LUO Ling-li<sup>2</sup>, LÜ Sha<sup>1</sup>, MEI Li-xiang<sup>1</sup>, ZHOU Jiao<sup>1</sup>, WANG Sheng-yu<sup>1</sup>, YAN Jiang-hua<sup>1\*</sup> (1. Cancer Research Center, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a novel targeting tumor vessels system MF-A6-SA:B-tTF for efficiently inducing thrombosis. **METHODS** Chemical cross-linking technique was used to prepare a cross-linking agent of the A6-Streptavidin (A6-SA), MF-A6-SA and Biotin-tTF (B-tTF). FX coagulation assay was used to test MF-A6-SA:B-tTF system's FX activity. Fluorescence microscopy and prussian blue staining were used to simultaneously observe the targeting activity of MF-A6-SA:B-tTF with an external magnetic field. Hemagglutination was directly used to study the system's biological amplification by SA/B. Biodistribution experiment was used to observe the toxicity of MF-A6-SA:B-tTF. **RESULTS** MF-A6-SA and B-tTF were successfully prepared. MF-A6-SA:B-tTF system could activate FX, inducing the blood coagulating cascade powerfully. MF-A6-SA:B-tTF could be accumulated to the desired target area with targeting and induce thrombosis in tumor blood vessels *in vitro* and *in vivo*. **CONCLUSION** The double targeting tumor vessels system MF-A6-SA:B-tTF maybe provide a basis for developing the tumor blood vessels targeting therapy.

**KEY WORDS:** targeting; anti-neuropilin 1 (NRP1) antibody; truncated tissue factor (tTF); magnetic fluid; thrombosis; anti-tumor

选择性血栓栓塞肿瘤血管以阻断肿瘤细胞的血供,是一种非常有潜力的抗肿瘤策略。该策略以短截型组织因子(truncated tissue factor, tTF)为效应因子,肿瘤新生血管标志物配体为靶向载体,构建载体与tTF的融合蛋白,以选择性诱发肿瘤血管血栓<sup>[1]</sup>。但是,传统的tTF融合蛋白存在靶点富集率低、活化FX能力弱、大剂量tTF又易导致误栓等缺点。因此,探索发展新的高效的靶向载体具有深远的意义。

神经纤维网蛋白1(NRP1)是新发现的肿瘤血管新靶标,大量表达于肿瘤血管内皮细胞及肿瘤细胞。NRP1作为血管内皮生长因子(VEGF)165及与血管新生相关的其他几种VEGF家族成员的受体,在血管

新生方面发挥重要调节作用,为肿瘤药物靶向治疗提供了一个潜在的靶点<sup>[2]</sup>。目前,NRP1抗体与其他抗肿瘤药物、毒素、放射性核素等交联,已广泛应用于肿瘤血管靶向治疗<sup>[3]</sup>。磁流体(magnetic fluid, MF)是一种新型的载体材料,具有液体的流动性,在外加磁场的作用下又能呈现固体状态,已被应用于血管栓塞治疗。另外,携载药物的磁流体,在外磁场作用下,将磁流体定向于靶区,所含药物定位释放,集中在病灶,具有高效速效低毒的特点<sup>[4]</sup>。链霉亲和素(streptavidin, SA)与生物素(biotin, B)是一种生物反应放大系统,二者具有强大的结合力( $K_a 10^{-15} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),一个SA分子能结合4个B分子。将SA:B体系与抗原-抗

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30973485, 81172970);国家级大学生创新性实验项目(201210384134)

作者简介:王显江,男,硕士,研究方向:肿瘤分子靶向药物; \* 通讯作者:颜江华,男,博士,教授,研究方向:肿瘤分子靶向药物

E-mail: jhyan@xmu.edu.cn

• 1508 • Chin Pharm J 2014 September, Vol. 49, No. 17

中国药学杂志 2014 年 9 月第 49 卷第 17 期

体反应体系连成一体,可以起到多级放大作用,显著降低后者用量和提高灵敏度。

鉴于 NRP1 抗体的潜在价值及 MF 和 SA:B 系统的特性,我们提出以下的设想:以 NRP1 抗体 A6 和 MF 为载体,同时联合 SA:B 系统,携载 tTF 效应因子,建立一种新型的选择性诱发肿瘤血管血栓栓塞体系(MF-A6-SA:B-tTF)。利用 NRP1 抗体 A6 的生物靶向性、磁流体 MF 的磁控靶向性和 SA:B 的生物放大效应,实现 tTF 在靶点的高效富集、高效促发凝血反应,进而产生更强的抗肿瘤作用。

## 1 材料

碳二亚胺(EDC),RBITC 荧光素,链霉亲和素(streptavidin),生物素(biotin)(Sigma 公司);NRP1 单克隆抗体 A6、tTF 融合蛋白(厦门大学医学院抗癌研究中心);磁流体(MF)由本实验制备;本实验所用的菌株、细胞株均为本实验室保存。

## 2 方法

### 2.1 MF-A6-SA 和 B-tTF 交联物的制备

参照碳二亚胺(EDC)使用说明书,利用化学交联技术分别制备 A6-Streptavidin(A6-SA)和 Biotin-tTF(B-tTF)交联物,所制备得的最终产物经 SDS-PAGE 电泳分析鉴定。接着称取本实验前期制备的 MF<sup>[5]</sup>,以 0.5% 戊二醛溶液为交联剂,交联 MF 和 A6-SA(预先标记有 RBITC 荧光素),制备得 MF-A6-SA,在荧光显微镜下观察交联效果。

### 2.2 MF-A6-SA:B-tTF 复合体系的 tTF 组分活性鉴定

通过 FX 活化实验鉴定 B-tTF 交联物中 tTF 组分的活性,具体过程按 Ruf<sup>[6]</sup>的方法进行,用 Tris 缓冲液中配制系列浓度(0.01 ~ 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )的 BSA、tTF、A6-tTF、A6-SA:B-tTF 和 MF-A6-SA:B-tTF 蛋白溶液;加 100  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  FVII 37 °C 温育 10 min;加 FX 至终浓度 5  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  混匀后室温温育 10 min;加入 100  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA 终止反应;加 2  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  生色底物 S2222;在 5 min 之内用酶标仪测  $A_{405}$ 。

### 2.3 MF-A6-SA:B-tTF 复合体系的靶向功能

施加外界磁场产生不同磁场强度,观察药物的磁控靶向性及生物靶向性。具体步骤如下:在细胞培养皿中划分 4 个区域,均匀接种 MCF-7 细胞后,同时在培养皿的一侧放置磁铁,使培养皿 4 个区域的细胞处于不同的磁场强度中。利用数字特斯拉计测得 4 个区域的磁场强度由低到高分别为 0、340、1 050 和 3 160 G。由于在外加磁场的作用下,分布

于 4 个区域的药液浓度形成了梯度,以蛋白为指标用改良的 Bradford 法测定药物质量浓度分别为 0.14、0.71、1.35 和 2.83  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。药液孵育细胞一段时间后,荧光显微镜下观察不同区域细胞的荧光强度并拍照,接着进行普鲁士蓝染色,普通显微镜下观察拍照。图像利用 Image-Pro Plus 分析软件分析统计荧光强度和普鲁士蓝染色强度。重实验复 3 次,以获得准确、可靠的实验结果。

### 2.4 MF-A6-SA:B-tTF 复合体系中 SA:B 系统的生物放大效应

为了观察 MF-A6-SA:B-tTF 体系中 SA:B 的生物放大效应,以 MF-A6-tTF 为对照组,设置 3 个剂量组进行红细胞凝血实验,每组实验重复 3 次以上。具体步骤如下:实验组 MF-A6-SA:B-tTF 各质量浓度组均先加入 0.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 MF-A6-SA 组分孵育靶细胞,一定时间后再加 3 个质量浓度梯度(0.5、1.0 和 2.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的 B-tTF 组分。对照组 MF-A6-tTF 以 tTF 组分的质量浓度为指标分别加 0.5、1.0 和 2.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 MF-A6-tTF 孵育细胞。充分孵育 2 h 后,各组加入 30  $\mu\text{L}$  抗凝全血,再加终浓度为 15  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{CaCl}_2$ ,静置反应 20 min 后,光学显微镜下观察凝血情况,以红细胞聚集程度和纤维蛋白的形成为指标。观察分析 MF-A6-SA:B-tTF 体系是否具有 SA:B 系统的放大效应。

### 2.5 MF-A6-SA:B-tTF 复合体系在体内的生物分布

为了观察 MF-A6-SA:B-tTF 复合体系在体内的安全性,设计如下实验:以 MCF-7 细胞荷瘤小鼠做为模型,尾静脉注射 0.2  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  MF-A6-SA 0.2 mL,间隔 4 h 后再尾静脉注射 0.2  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  B-tTF 0.1 mL,分别于不同时间点(2、4、8 和 16 h)取心、肝、脾、肺、肾和肿瘤,同种组织称取等量的部分组织进行溶解,然后使用 ICP-AES 测定铁含量,观察 MF-A6-SA:B-tTF 的生物分布特征。同时,留取部分组织进行切片和 HE 染色,观察栓塞效果。以生理盐水组作为对照组,每组设 3 只实验动物。

## 3 结果

### 3.1 MF-A6-SA 和 B-tTF 的交联物

MF-A6-SA(其中 A6 标有 RBITC 荧光素)在荧光显微镜下能观察到红色荧光信号,对照组 MF 无红色荧光信号,说明 MF 表面有交联上 A6-SA 蛋白。见图 1A。等浓度下 tTF 和 B-tTF 的电泳带略有差异,B-tTF 较为粗厚,这可能是由于其相对分子质量略大,但是由于 Biotin 相对分子质量很小约  $34 \times$

$10^3$ , 因此 tTF 和 B-tTF 在条带的位置差异不明显。见图 1B。

### 3.2 MF-A6-SA:B-tTF 复合体系 tTF 的活性

由于 TF 与 FVII 结合后形成 TF-FVIIa 复合物, 活化 FX 为 FXa, 而 S2222 作为显色底物可以被分解成多肽和对硝基苯胺, 后者在 405 nm 处有强吸收峰, 测得的吸光度可间接反应 TF 水平, 进而鉴定融合蛋白 tTF 部分的活性及其水平。tTF、A6-tTF、A6-SA:B-tTF 和 MF-A6-SA:B-tTF 蛋白在  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  以上时都能有效活化 FX 而增强 405 nm 处吸收峰, 且无明显差异, 而同浓度的 BSA 没有反应。可见 tTF 融合蛋白的 tTF 组分保留了活化 FX 而启动外源性凝血通路的活性。见图 2。

### 3.3 MF-A6-SA:B-tTF 复合体系的靶向功能

在高磁场强度处, 靶细胞的荧光强度更强、普鲁士蓝染色更深, 分别指示了 MF-A6-SA:B-tTF 中的

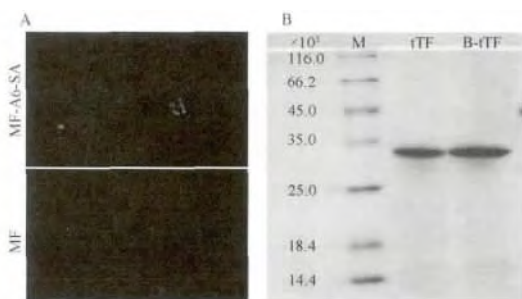


图 1 MF-A6-SA 和 B-tTF 复合物的鉴定

A - 荧光显微镜图; B - 电泳图

Fig. 1 Determination of the composites of MF-A6-SA and B-tTF

A - fluorescence microscope; B - electrophoresis

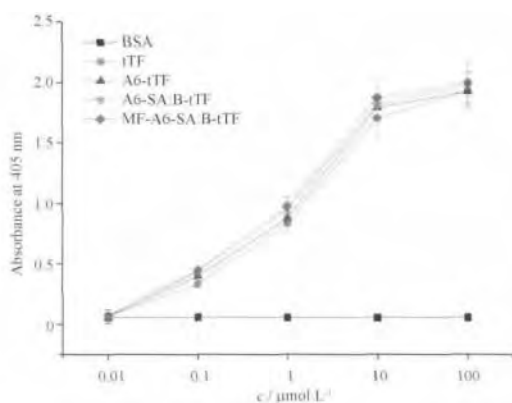


图 2 Factor X 活化实验分析 MF-A6-SA:B-tTF 的促凝血活力.  $n=3 \bar{x} \pm s$

Fig. 2 Blood coagulation activity of MF-A6-SA:B-tTF by FX activation assay.  $n=3 \bar{x} \pm s$

A6 组分和 MF 组分的靶向性。磁场高的地方 MF 富集更多, 同时 A6 结合靶细胞也更强, 不仅说明了 MF-A6-SA:B-tTF 具有生物靶向, 在外界磁场的作用下还具有磁靶向性, 即呈现多重靶向功能, 提高了效应因子投递的靶向性。见图 3。

### 3.4 MF-A6-SA:B-tTF 复合体系中 SA:B 的生物放大效应

细胞凝血实验直接观察 MF-A6-SA:B-tTF 复合体系中 SA:B 系统的生物放大效应。对照组 MF-A6-tTF 在 tTF 组分分别为 0.5、1.0 和 2.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 凝血反应呈现逐渐增强的趋势。实验组 MF-A6-SA:B-tTF 在 MF-A6-SA 组分浓度固定为 0.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 分别加 0.5、1.0 和 2.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  3 个质量浓度的 B-tTF 组分, MF-A6-SA:B-tTF 的 MF-A6-SA 组分在较低浓度下能够充分抓取 B-tTF 组分形成 tTF 富集状态, 实现与 MF-A6-tTF 相似的凝血反应趋势, 充分说明了 SA:B 系统的放大作用。见图 4。

### 3.5 MF-A6-SA:B-tTF 复合体系的体内生物分布

尾静脉注射 MF-A6-SA:B-tTF 后, 观察所有实验动物的日常行为, 在整个实验过程中无异常现象, 说明 MF-A6-SA:B-tTF 无体内毒性。给药后在不同时间点取心、肝、脾、肺、肾和肿瘤, 利用 ICP-AES 分析组织中的 Fe 含量, 结果见图 5, 给药后 MF-A6-SA:B-tTF 迅速在肿瘤组织中富集, 并在 4 h 处达到高峰。其他正常组织中肝和脾组织分布相对较高, 肝、脾和肺组织在 4 h 处分布最高, 8 h 后则开始显著下降, 这可能与肝、脾为网状内皮系统组织有关, 属于正常的体内代谢过程。取 4 h 时间点的各组织进行组织切片及 H&E 染色, 结果见图 6, 心、肝、脾、肺和肾等正常组织没有出现血管血栓堵塞和细胞坏死, 而在肿瘤组织处可见明显的血管血栓堵塞, 说明 MF-A6-SA:B-tTF 能够高选择性地堵塞肿瘤血管。

## 4 讨论

本实验的宗旨在于获得对肿瘤血管有高选择性的肿瘤血管血栓堵塞剂。tTF 是唯一不存在于正常人血浆中的凝血因子, 是外源性凝血级联反应的始发因子。与肿瘤的侵袭、转移密切相关, 具有促进肿瘤生长、侵袭、转移的作用。游离的 tTF 融合蛋白对 FX 活化能力很低, 治疗剂量并不诱发正常组织血管堵塞, 但是当 tTF 借助其他载体蛋白, 如抗体、配体、多肽等, 与胞膜结合后发挥 TF 膜内组分的作用, 使 tTF 凝血酶活性恢复 FX 活化能力。NRP1 单克隆

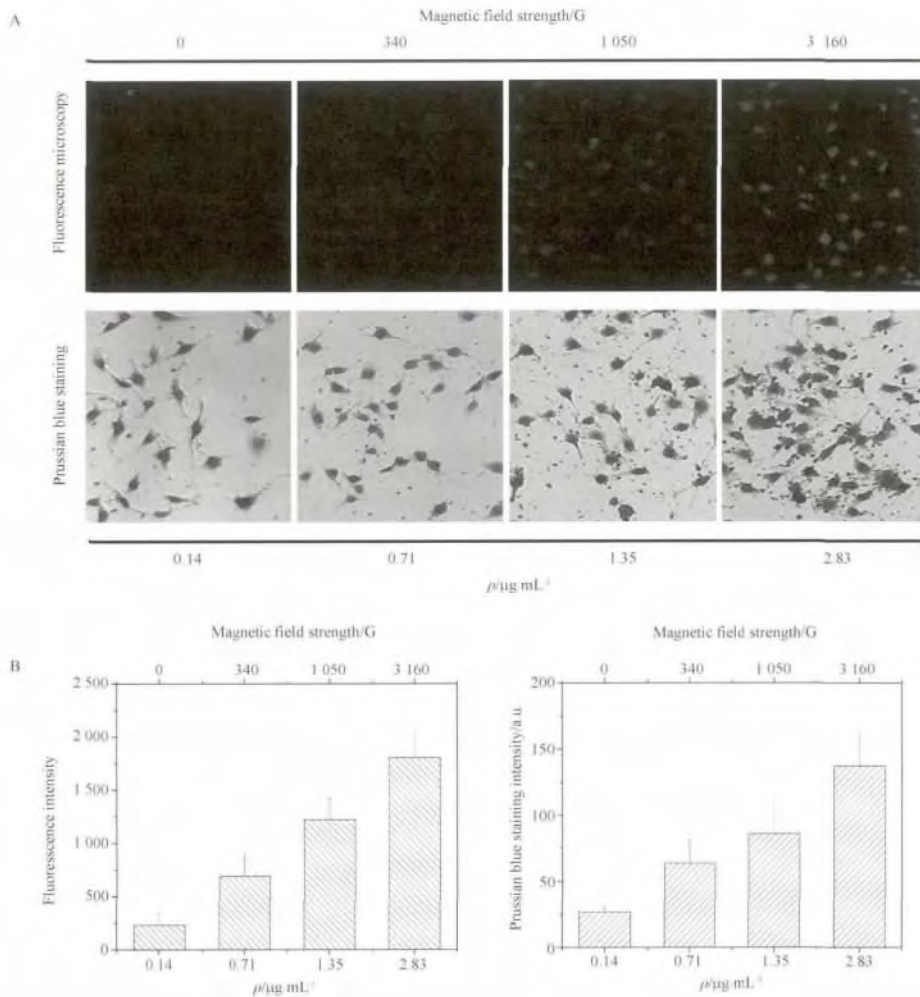


图3 MF-A6-SA:B-4TF 的双靶向实验.  $n = 3 \bar{x} \pm s$

A - 在不同磁场力下 MF-A6-SA:B-4TF 作用于细胞后的荧光显微图片和普鲁士蓝染色图片 ( $\times 400$ ); B - 通过计算相关染色值的测量定量分析 MF-A6-SA:B-4TF 的靶向性

Fig. 3 Double targeting tests of MF-A6-SA:B-4TF.  $n = 3 \bar{x} \pm s$

A - fluorescence microscopy images and prussian blue staining images for cells treatment with MF-A6-SA:B-4TF in different magnetic field strengths; B - the quantitative analysis of cell targeting of MF-A6-SA ( $\times 400$ ):B-4TF was measured by the relative staining mean value

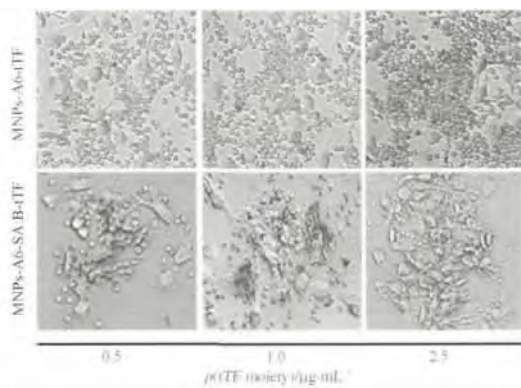


图4 凝血反应检测 MF-A6-SA:B-4TF 体系中 SA:B 组分的生物放大效应 ( $\times 2000$ )

Fig. 4 Biological amplification of SA:B moiety of MF-A6-SA:B-4TF by hemagglutination ( $\times 200$ )

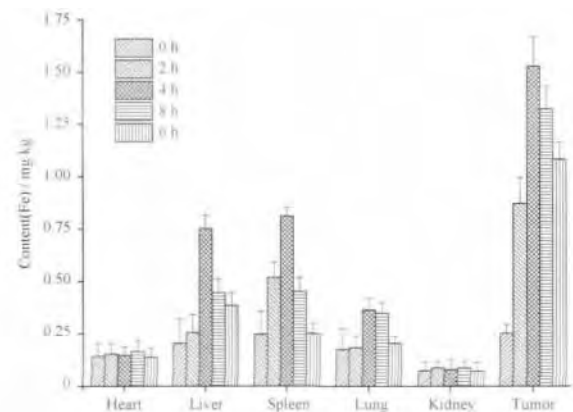


图5 静脉注射给药 0 2 4 8 16 h 后小鼠不同组织中的 Fe 含量数据图.  $n = 3 \bar{x} \pm s$

Fig. 5 Fe uptake in different organs of mice at 0 2 4 8 16 h after intravenous injection.  $n = 3 \bar{x} \pm s$



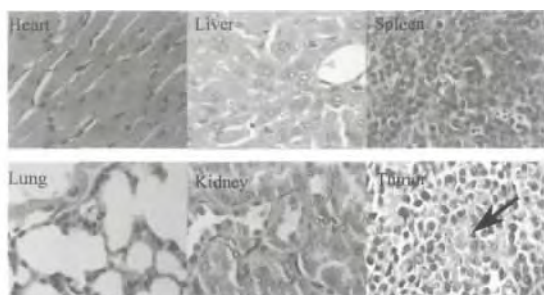


图 6 小鼠不同组织 H&E 染色图(×400)

Fig. 6 H&E Staining micrographs of different organs of mice (×400)

抗体 A6 作为生物载体,能够使恢复 tTF 体内活性,也能够高度靶向高表达 NRP1 的肿瘤新生血管内皮细胞或肿瘤细胞,提高 tTF 诱发血栓栓塞的靶向性。MF 可借助于外磁场精确定位和控制<sup>[7]</sup>,因此能够可控性地携带 tTF 到达预期区域,实现磁控靶向性。MF-A6-SA:B-tTF 复合体系融合了 A6 的生物靶向和 MF 的磁控靶向,细胞实验结果明显展示了 MF-A6-SA:B-tTF 的靶向功能。MF-A6-SA:B-tTF 复合体系在生物靶向作用的基础上加上了物理靶向作用,从而使整个体系具有更强的靶点亲和力。由于 SA:B 系统具有生物放大效应,可以实现在一定量的 MF-A6-SA 给药量下,降低 B-tTF 给药量也能达到高剂量的效果,即实现生物放大效应。细胞凝血实验显示了 MF-A6-SA:B-tTF 复合体系具有生物放大效应,可以降低 tTF 用药量,进一步确保给药安全性。体内实验也显示了 MF-A6-SA:B-tTF 复合体系确保体内给药的安全性又能够高选择性的栓塞肿瘤血管。

## 5 结论

总的来说,我们利用 SA:B 的放大系统成功地建立一种新型高效的瘤血管靶向性的血栓栓塞反应体系 MF-A6-SA:B-tTF,能通过 A6 载体实现生物靶向,通过 MF 实现磁控靶向,使效应因子 tTF 在靶区高效富集诱发凝血反应,并在体内外实验证实这些特性。该研究为肿瘤血管靶向性血栓栓塞治疗提供了新制剂,也为该治疗策略的进一步完善提出了新思路。

## REFERENCES

- [1] HUANG X M, MOLEMA G, KING S, *et al.* Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature [J]. *Science*, 1997, 275 (5299): 547-550.
- [2] RAIMONDI C, RUHRBERG C. Neuropilin signalling in vessels, neurons and tumours [J]. *Semin Cell Dev Biol* 2013, 24 (3): 172-178.
- [3] LI X, LUO F H, WANG S, *et al.* Monoclonal antibody against NRP-1 b1b2 [J]. *Hybridoma (Larchmt)*, 2011, 30 (4): 369-373.
- [4] JAIN T K, MORALES M A, SAHOO S K, *et al.* Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents [J]. *Mol Pharm*, 2005, 2 (3): 194-205.
- [5] CHEN X L, LÜ H Y, YE M, *et al.* Novel superparamagnetic iron oxide nanoparticles for tumor embolization application: Preparation, characterization and double targeting [J]. *Int J Pharm*, 2012, 426 (1-2): 2482-2455.
- [6] RUF W, REHEMTULLA A, EDGINGTON T S, *et al.* Phospholipid-independent and-dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266 (4): 2158-2166.
- [7] LEI Z L, PANG X L, LI N, *et al.* A novel two-step modifying process for preparation of chitosan-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> microspheres [J]. *J Mater Process Technol*, 2009, 209 (7): 3218-3225.

(收稿日期:2014-01-06)