

· 基础研究 ·

## TSH 受体介导高分子纳米药物对甲状腺癌的靶向性研究\*

范永增<sup>1</sup>,袁耿彪<sup>1△</sup>,朱晓娥<sup>1</sup>,包建东<sup>2</sup>,李春<sup>3</sup>

(1. 重庆医科大学附属第二医院核医学科 400010; 2. 江苏省原子医学研究所, 江苏无锡 214063;

3. 美国德州安德森癌症中心, 美国 77030)

**摘要:**目的 制备一种能特异性结合甲状腺癌细胞的靶向性高分子纳米药物, 并对其体外主动寻靶能力进行研究。方法 通过双乳化法和冷冻干燥技术制备高分子纳米材料 PLGA-COOH 微球; 用碳二亚胺法将高分子纳米微球与促甲状腺素(TSH)抗体耦联制备靶向性高分子纳米药物, 检测该靶向性高分子纳米药物的一般特性及其体外寻靶能力, 并与非靶向性高分子纳米药物比较, 以排除静电吸附作用。结果 靶向性高分子纳米药物的平均粒径 533.8 nm, 体外细胞寻靶试验证实, 该靶向性高分子纳米药物能较多、且主动的对甲状腺癌细胞寻靶, 并且能够牢固的聚集到甲状腺癌细胞表面的 TSH 受体, 非靶向性高分子纳米药物未见和甲状腺癌细胞结合。结论 成功制备了 TSH 受体介导的靶向性高分子纳米药物, 该高分子纳米药物在体外对甲状腺癌细胞具有较强的特异性主动靶向能力。

**关键词:** TSH; 靶向; 纳米药物; 甲状腺肿瘤

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.31.018

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)31-3286-03

## Fabrication and targeting characterization of TSH receptor-mediated targeting of nanoparticles\*

Fan Yongzeng<sup>1</sup>, Yuan Gengbiao<sup>1△</sup>, Zhu Xiaoe<sup>1</sup>, Bao Jiandong<sup>2</sup>, Li Chun<sup>3</sup>

(1. Department of Nuclear Medicine, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University,

Chongqing 400010, China; 2. Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi, Jiangsu 214063, China;

3. Anderson Cancer Center, Houston, Texas 77030, USA)

**Abstract: Objective** To prepare one kind of targeting of nanoparticles which thyroid cancer cells can be specifically targeted and to study their targeting ability *in vitro*. **Methods** The high molecular polymer PLGA-COOH nanoparticles contrast agents were produced by the double emulsion technique. TSH antibody was covalently linked to the PLGA-COOH nanoparticle surface using a carbodiimide technique. We detected the general characteristics and targeting ability of the targeting drugs *in vitro*. And compared with the ordinary polymer nanoparticles, and excluded electrostatic adsorption. **Results** The normal size of the targeting nanoparticle was 533.8 nm. Its physical property was determined. The nanoparticle targeting specific to thyroid cancer cells was observed, normal nanoparticles could be more proactive to find the target for thyroid cancer, while the conjugation in control group was negative. **Conclusion** The preparation of the TSH receptor-mediated targeting of polymeric nanoparticles was successful, the targeted nanoparticles can bond to thyroid cancer cells effectively *in vitro*.

**Key words:** TSH; targeting; nanoparticles; thyroid neoplasms

甲状腺癌是一组异质性肿瘤, 其在生物学行为, 组织学表现及对治疗的反应等方面都有明显差异。近年来, 甲状腺癌发病率不断升高, 其中 90% 为分化型甲状腺癌(Differentiated thyroid carcinoma, DTC)<sup>[1]</sup>。在疾病的进展过程中, 有 20%~40% 的 DTC 患者会发生复发和转移, 其中 30% 的 DTC 患者会发生退行性病变、肿瘤侵袭性增强、伴有远处播散、摄碘能力减低; 其中部分 DTC 患者经放射性碘(Radioiodine -131I, <sup>131</sup>I)清除或多次<sup>131</sup>I治疗时, 对<sup>131</sup>I反应性降低、不敏感或耐受等。多种因素造成复发或转移病灶摄碘能力下降,<sup>131</sup>I不能完全清除复发或转移 DTC 病灶、导致了<sup>131</sup>I全身诊断显像(<sup>131</sup>I-whole body scan, <sup>131</sup>I-WBS)对 DTC 的复发和转移病灶的诊断率不高, 限制了<sup>131</sup>I治疗, 降低了<sup>131</sup>I体内照射治疗的效果, 降低了带瘤患者的生存率和生活质量, 给 DTC 术后复发或转移癌的诊断和治疗造成困难, 严重威胁患者的身体健康。本实验旨在制备一种促甲状腺素(TSH)受体介导的靶向高分子纳米药物, 为进一步体内及临床靶向纳米药物的研究打下前期实验基础。

## 1 材料与与方法

## 1.1 材料与仪器 羧基端乳酸/羟基乙酸共聚物(PLGA-

COOH, 聚合比例为 50 : 50); 重组人促甲状腺素(rhTSH)(Abcam Corp, 英国); 鼠抗人 TSH 单克隆抗体(Abcam Corp, 英国); MES 缓冲液(配制浓度 0.1 mol/L, NaOH 调节 pH 至 6.0 及 8.0 备用); PBS 缓冲液(pH=7.4); EDC/NHS(Sigma Corp, 美国); FJ-200 高速分散均质机(上海标本模型厂); Centrifuge 5804R 冷冻离心机(eppendorf, 德国); 倒置荧光显微镜(Olympus CKX41, 日本); Malvern 激光粒径测量仪(3000 SSA 型, 美国)。

**1.2 普通高分子纳米微球的制备** 称量 100 mg 的 PLGA-COOH, 将其充分溶解于 2 mL 二氯甲烷溶剂中(连续相), 然后加入一定比例的双蒸水(分散相), 声振 30 s 后, 将其倒入适量 4% 聚乙烯醇(PVA)溶液中, 高速均质 5 min, 再加入 20 mL 2% 异丙醇溶液, 室温下磁力搅拌 2~5 h, 使微球表面固化。然后加入双蒸水与正己烷以 3 000 r/min 离心, 多次洗涤, 收集微球, 冷冻干燥 48 h 后, 即得 PLGA-COOH 高分子纳米微球冻干粉, 放入 4 °C 冰箱中保存。

**1.3 靶向高分子纳米药物的制备** 将上述步骤制备得到的高分子纳米微球分散溶解在适量的 MES 缓冲液(0.1 mol/L, pH=6.0)中, 然后加入一定量的 EDC/NHS, 室温振荡孵育 30

\* 基金项目: 卫生部核医学重点实验室开放课题基金资助项目(KF200905)。△ 通讯作者, Tel: 13668047619; E-mail: yuan\_gb@126.com。

min, 然后加入双蒸水, 以 3 000 r/min 的速度反复离心洗涤 3 次。再将洗涤后的高分子纳米微球与 TSH 抗体同时分散溶解在适量的 MES 缓冲液 (0.1 mol/L, pH=8.0) 中, 室温下振荡孵育 1~2 h, 再经多次离心洗涤后, 得到靶向高分子纳米药物 (观察组)。对照组的制备: 制备方法同上, 中间不加偶联剂 EDC/NHS, 制备成对照高分子纳米药物, 以排除抗体静电吸附在纳米颗粒上引起的靶向。

**1.4 靶向高分子纳米药物一般性质检测** 光镜电镜下观察微球的形态、分布, 激光测径仪检测其粒径大小和分布。

**1.5 TSH 受体定位及表达的免疫荧光实验** 将处于对数生长长期的人甲状腺癌细胞 (FTC-133) 以  $1 \times 10^4$  /孔的密度加入装有盖玻片的 6 孔板中进行细胞爬片, 待细胞贴壁并长满盖玻片的 70%~80% 时, 换液后加入稀释好的 rhTSH, 37 °C 孵箱中过夜。将 6 孔板中的培养液用干净吸管吸出, 用 PBS 缓冲液漂洗 3 次, 以排除培养液对结果的可能影响。最后用 4% 多聚甲醛原位固定 10~15 min, 将多聚甲醛吸出, 用 PBS 缓冲液漂洗 3 次。将上述制备好的细胞爬片经荧光免疫方法验证甲状腺癌细胞 (FTC-133) 上 TSH 受体的表达情况。具体操作步骤: (1) 将上述已固定好的细胞爬片用 PBS 洗 3 次, 摇床振摇每次 5 min。(2) 0.3%  $H_2O_2$  浸泡室温放置 30 min。(3) PBS 洗 3 次, 摇床振摇每次 5 min。(4) 1% 羊血清 + PBS + 鼠抗人 TSH 单克隆抗体 (1:40), 4 °C 孵育 2~4 h。(5) PBS 洗 3 次, 摇床振摇每次 5 min。(6) 兔抗鼠 TSH 二抗 (1:80 Antimouse body FITC), 37 °C 恒温 1~2 h。(7) PBS 洗 3 次, 摇床振摇每次 5 min。(8) DAPI (1:500), 5~10 min。(9) PBS 洗 3 次, 摇床振摇每次 5 min。(10) 吹干, 用 30% 甘油封片。(11) 荧光显微镜下进行图像采集、分析。

**1.6 靶向高分子纳米药物的体外寻靶实验** 同上制备细胞爬片, 待细胞贴壁后, 加入 0.9 mg/mL rhTSH, 37 °C 孵箱中过夜。预设普通高分子纳米微球和靶向高分子纳米微球, 每组各 3 片细胞爬片。将过夜后的细胞爬片在细胞操作台上吸干培养液, 并用 PBS 洗涤 3 次, 于 3 孔内各加入 200 mL 靶向高分子纳米药物, 另 3 孔内各加入 200 mL 对照组高分子纳米药物。然后再每孔追加 2 mL DMEM-F12 培养液, 并于培养箱内孵育 1~2 h, 最后以 PBS 冲洗每张盖玻片 6 次, 光镜下观察高分子纳米药物与细胞的结合情况。

## 2 结果

**2.1 靶向高分子纳米药物的一般特性检测** 采用本方法制备出的 PLGA-COOH 靶向高分子纳米药物, 外观呈白色粉末状物质, 平均粒径约为 533.8 nm。纳米药物水溶性好, 用生理盐水复容后光镜、电镜下观察可见, 其形态规则、呈球形, 表面光滑, 大小基本均匀, 分散度好, 微球间无明显粘连、聚集现象, 见图 1、2。

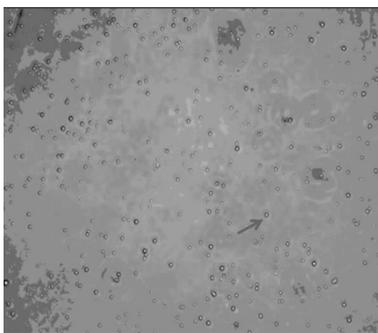


图 1 靶向放射性纳米药物光镜图像

**2.2 免疫荧光检测** 荧光显微镜下观察, FTC-133 细胞呈梭

形, 中心暗区是细胞核, 核周围绿色亮区即是 TSH 受体分布和表达部位 (图 3A), 细胞核 DAPI 染色成蓝色 (图 3B)。

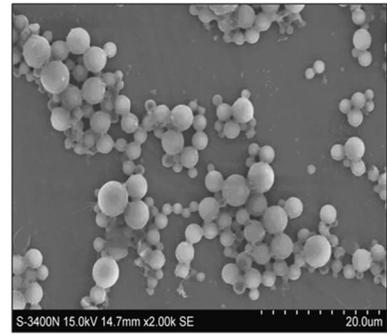


图 2 靶向放射性纳米药物电镜图像

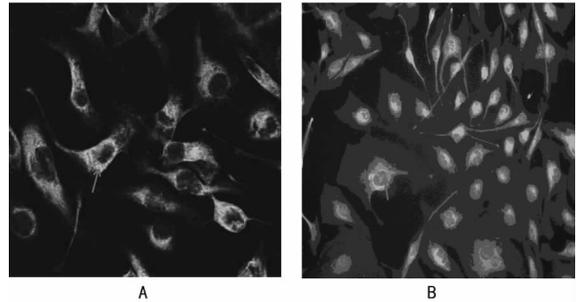
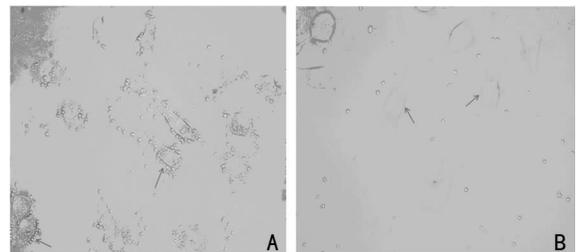


图 3 FTC-133 细胞表面 TSH 受体表达及定位

**2.3 靶向高分子纳米药物体外靶向能力检测** 观察组靶向高分子纳米药物与 FTC-133 的结合情况, 大量靶向高分子纳米药物能够牢固地与 FTC-133 相结合, 紧密聚集在细胞周边 (图 4A)。对照组高分子纳米药物与 FTC-133 的结合情况, FTC-133 周围未见普通高分子纳米药物与之结合 (图 4B)。



A: 观察组; B: 对照组。

图 4 光镜下靶向放射性纳米药物体外细胞寻靶图像

## 3 讨论

甲状腺癌发病率不断增加, 目前仍缺乏明确有效的治疗方法, 尽管通过手术联合<sup>131</sup>I 及 TSH 抑制的治疗, 很大程度上提高了患者的生存率。但因其病理学上的异质性, 易发生退行性改变, 失分化程度不同等因素, 导致甲状腺癌细胞膜表面的功能性蛋白表达降低或无表达, 使得甲状腺癌的摄碘能力降低、对<sup>131</sup>I 抵抗, 降低了治疗的效果, 使得甲状腺癌的治疗仍面临着巨大的挑战<sup>[2-4]</sup>。

TSH 从多方面调控甲状腺的功能, 如: 吸碘作用、甲状腺球蛋白的合成和分泌、甲状腺素的释放等<sup>[5]</sup>。rhTSH (蛋白多肽, 商品化, 可以临床应用); rhTSH 目前采取基因转染仓鼠而能够稳定表达, 临床 I、II、III 期试验已被证实是安全有效的。2009 年美国甲状腺指南已推荐 rhTSH 作为<sup>131</sup>I, 去除甲状腺癌术后残存甲状腺组织的常规用药。本研究中通过 TSH 受体介导的靶向高分子纳米药物, 为进一步的甲状腺癌靶向载药治疗打下了坚实的基础。即通过 TSH 配体或抗体介导的放射

性核素高分子纳米材料药物,特异性的结合甲状腺癌细胞膜表面 TSH 受体,达到对甲状腺癌病灶的特异性的靶向诊断,又能进行特异性的靶向治疗的双重作用。

一直以来甲状腺癌细胞或病灶的摄碘能力是甲状腺癌诊断和制订治疗方案的基础<sup>[6]</sup>,目的是通过甲状腺癌细胞摄取<sup>131</sup>I,从而达到诊断和治疗的目的,但目前的文献报道,仍未见有效的方法。而本研究通过甲状腺癌特异性靶点 TSH 受体的介导,首次将标记或包载的放射性核素特异性结合到甲状腺癌细胞上,结果显示,TSH 受体可以作为甲状腺癌的特异性靶点;经 TSH 受体介导的放射性高分子纳米药物,有潜在的特异性诊断和治疗的作用。

目前国内外报道较多的有:钠碘转运体( $\text{Na}^+/\text{I}^-$ -symporter, NIS),主要存在于甲状腺滤泡基底膜上的跨膜糖蛋白,介导细胞外碘进入甲状腺细胞,是甲状腺激素合成的主要步骤。NIS 基因转染和表达的研究和(或)甲状腺过氧化物酶(Thyroidperoxidase, TPO)基因联合转染 DTC 细胞(人乳头状、滤泡状、未分化)及其他细胞株生物学的研究,都是通过增强 NIS 基因和蛋白表达,达到增加摄碘的能力,但目前的实验报道,由于 NIS 基因表达较低或蛋白非极性表达以及碘的有机化障碍,导致碘的排泌率增加,不能有效增加<sup>131</sup>I 的滞留率。另 NIS 基因在甲状腺细胞的定位对 TSH 有依赖关系,TSH 存在时,则定位到细胞膜上,TSH 不存在时则在细胞膜和细胞质内均有分布。提示 NIS 在甲状腺细胞中可能存在 TSH 依赖性的诱导表达<sup>[7-9]</sup>。

因此,TSH 受体对<sup>131</sup>I 不敏感、耐受或者低分化的 DTC 复发/转移病灶,仍然具有高特异性,是一个高特异性的靶点,TSH 受体是 DTC 术后全身惟一的针对 DTC 和复发/转移病灶的高特异性靶点<sup>[10]</sup>,这也是本研究选择 TSH 受体作为关键靶点的主要理由。

本实验所用高分子纳米材料 PLGA-COOH,是已获 FDA 批准可用于注射型药物控释剂的最常用材料之一,具有安全、稳定、无毒副作用、生物相容性好等优点,且是包裹药物的良好载体<sup>[11-13]</sup>,具有较高的药物负载能力,允许将药物包裹入纳米颗粒内<sup>[14]</sup>,前期研究制备了包裹放射性核素<sup>131</sup>I 的 PLGA 纳米颗粒,经初步研究发现其形态规则,呈球形、实心,大小均匀,理化性质稳定,复溶后分散度好,无明显的粘连、聚集现象,是一种理想载药纳米药物。并通过放射性核素自显影实验及放射性活度计验证了放射性核素的包裹及包封率情况。放射自显影图像清晰,可见载药纳米药物形态规则,大小均匀,球形、球形黑色显影。因高分子材料 PLGA-COOH 表面有大量羧基,而 TSH 单克隆抗体本身含有大量氨基,在一定条件下通过耦联活化剂 EDC/NHS 的活化作用后,再通过碳二亚胺化学连接两者的羧基与氨基以缩合成共价键的形式牢固的连接在一起。碳二亚胺化学连接法是将高分子纳米药物与 TSH 抗体通过共价键的方式连接,为一种十分稳定的连接方法,不易受体内环境的影响,为进一步开展体内实验打下基础。

本实验成功制备了 TSH 受体介导的能够特异性的靶向甲状腺癌细胞的高分子靶向纳米药物,其形态规则,大小均匀,在体外与甲状腺癌细胞(FTC-133)具有较强的结合能力,为进一步甲状腺癌的体内及临床靶向药物的研究奠定坚实的基础。

#### 参考文献:

[1] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer[J]. Cell, 2000, 100(1): 57-70.

- [2] Wells SA, Gosnell JE, Gagel RF, et al. Vandetanib for the treatment of patients with locally advanced or metastatic hereditary medullary thyroid cancer[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(5): 767-772.
- [3] Verbeek HH, Alves MM, de Groot JW, et al. The effects of four different tyrosine kinase inhibitors on medullary and papillary thyroid cancer cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(6): 991-995.
- [4] Davies L, Welch HG. Thyroid cancer survival in the United States: observational data from 1973 to 2005[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2010, 136(5): 440-444.
- [5] Elisei R, Schlumberger M, Driedger A, et al. Follow-up of low-risk differentiated thyroid cancer patients who underwent radioiodine ablation of postsurgical thyroid remnants after either recombinant human thyrotropin or thyroid hormone withdrawal[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(11): 4171-4179.
- [6] Brassard M, Borget I, Edet-Sanson A, et al. Long-term follow-up of patients with papillary and follicular thyroid cancer: a prospective study on 715 patients[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(5): 1352-1359.
- [7] Chung JK, Youn HW, Kang JH, et al. Sodium Iodide Symporter and the Radioiodine Treatment of Thyroid Carcinoma[J]. Nucl Med Mol Imaging, 2010, 44(1): 4-14.
- [8] Smith VE, Read ML, Turnell AS, et al. A novel mechanism of sodium iodide symporter repression in differentiated thyroid cancer[J]. J Cell Sci, 2009, 122(18): 3393-3402.
- [9] Matsumoto H, Sakamoto A, Fujiwara M, et al. Decreased expression of the thyroid-stimulating hormone receptor in poorly-differentiated carcinoma of the thyroid[J]. Oncol Rep, 2008, 19(1): 1405-1411.
- [10] Zhang N, Chittasupho C, Duangrat C, et al. PLGA nanoparticle-peptide conjugate effectively targets intercellular cell-adhesion molecule-1 [J]. Bioconjug Chem, 2008, 19(1): 145-152.
- [11] Rao DA, Forrest ML, Alani AW, et al. Biodegradable PLGA based nanoparticles for sustained regional lymphatic drug delivery[J]. J Pharm Sci, 2010, 99(4): 2018-2031.
- [12] Melancon MP, Li C. Multifunctional synthetic poly(L-glutamic acid)-based cancer therapeutic and imaging agents[J]. Mol Imaging, 2011, 10(1): 28-42.
- [13] Cartiera MS, Ferreira EC, Caputo C, et al. Partial correction of cystic fibrosis defects with PLGA nanoparticles encapsulating curcumin[J]. Mol Pharm, 2010, 7(1): 86-93.
- [14] Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, et al. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(16): 6315-6320.