

SPIO 标记的 *c-erbB2* 反义探针用于活体荷瘤裸鼠 MR 的最佳扫描时间探讨*

温志鹏, 刘海燕, 文明[△], 贺海容, 谭书德, 李少林

重庆医科大学附属第一医院 放射科 (重庆 400016)

【摘要】 目的 探讨超顺磁性氧化铁(SPIO)标记的 *c-erbB2* 反义寡脱氧核苷酸探针用于活体荷瘤裸鼠 MR 的最佳扫描时间。**方法** 荷瘤裸鼠 30 只,注射反义探针(12.0 mg Fe/kg)并于不同时间点(注射前,注射后 60 min、180 min、360 min、720 min 及 1 440 min)同步行 MRI 扫描。在完成一个时间点扫描后,立即处死荷瘤裸鼠 5 只,取出肿瘤组织,行 HE 及普鲁士蓝染色,光学显微镜下观察;测量肿瘤组织及邻近肌肉组织各时间点信号强度。**结果** 成功建立荷瘤裸鼠模型,成瘤率 100%。对比荷瘤裸鼠在反义探针注射前后的不同时间点扫描的信号强度,发现肿瘤组织在注射后 360 min 信号变化最明显,在 MR 扫描图像上能清楚显示。HE 染色发现肿瘤组织结构紊乱,存在大量异性肿瘤细胞,排列呈“癌巢”状,在各时间点表现相似;而普鲁士蓝染色发现各观察时间点标本的肿瘤组织中均散在分布斑点状蓝色铁颗粒,以注射反义探针后 360 min 分布最密集。**结论** SPIO 标记的 *c-erbB2* 反义寡脱氧核苷酸探针能靶向于肿瘤组织,用于 BALB/c 裸鼠 MR 的最佳扫描时间为注射后 360 min。

【关键词】 超顺磁氧化铁 反义探针 活体动物 MR 成像 扫描时间

Optimal Time for MRI Scanning of Tumors in BALB/c Mice Using *c-erbB2* Antisense Probe Labeled with Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles WEN Zhi-peng, LIU Hai-yan, WEN Ming[△], HE Hai-rong, TAN Shu-de, LI Shao-lin. Department of Radiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[△] Corresponding author, E-mail: 13883669699@163.com

【Abstract】 Objective To determine the optimal time for MRI scanning of tumors in BALB/c mice using *c-erbB2* antisense probe labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Methods** SK-Br-3 tumor-bearing BALB/c mice ($n=30$) were injected with antisense probe (12.0 mg Fe/kg). MRI scanning was performed on 5 mice before the injection and 60 min, 180 min, 360 min, 720 min and 1 440 min after the injection, respectively. Tumor tissues were taken immediately after the scanning and fixed with 10% formalin and paraffin-embedded sections. The MRI signal strength of the tumors and adjacent muscles were compared with changes detected under a microscope using HE and Prussian blue staining. **Results** SK-Br-3 tumors were introduced to the BALB/c mice successfully. The strongest signal intensity was detected by the MRI 360 min after injection with the antisense probe. The pathological examination revealed structural disorders of the tumor tissues, with a large number of special-shaped cells arranged in a cancer nest shape. Punctuate blue iron particles were observed in all of the tumor tissues, with the greatest density occurring at 360 min after the injection with the antisense probe. **Conclusion** The optimal time for MRI scanning of tumors in BALB/c mice using *c-erbB2* antisense probe labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles should be set at 360 min after injection.

【Key words】 Superparamagnetic iron oxide Antisense probe Live animal MR imaging Scan time

由于目前缺乏针对恶性肿瘤早期诊断、转移预警、疗效预测及有效治疗的临床方法,恶性肿瘤已经成为导致人类死亡的主要疾病。兴起于上世纪末的

分子影像学,是近年来医学影像学研究的热点,通过制备相关的分子探针,以安全无创和原位实时的方式建立针对肿瘤早期诊断的分子影像技术,发展与恶性肿瘤转移预警及疗效预测相关的动态可视化方法,是肿瘤临床诊断的研究热点^[1]。借鉴分子生物学中的反义基因理论,我们在前期研究中,成功制备了超顺磁性氧化铁(SPIO)标记的 *c-erbB2* 癌基因反义寡脱氧核苷酸(ASODN)探针^[2,3],并研究了该探

* 国家自然科学基金(No. 30940021)、重庆市自然科学基金(CSTC No. 2008BB5209)和重庆市卫生局医学科研基金(No. 062025)资助

[△] 通讯作者, E-mail: 13883669699@163.com

针在活体动物体内的药代动力学及主要脏器分布^[4]。在此基础上,本实验将探针用于 BALB/c 荷瘤裸鼠 MR 成像,观察各时间点肿瘤组织信号变化趋势,期望得出最佳的 MR 扫描时间。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料及仪器

SPIO 标记的 *c-erbB2* 癌基因 ASODN 反义探针:课题组制备,获得国家发明专利授权(专利号 ZL 200710092512.5),具体步骤参见文献^[2,3];SK-Br-3 肿瘤细胞株(高表达 *c-erbB2* 癌基因):中科院上海细胞库;BALB/c 裸鼠:30 只,雌雄不限,3~4 周龄,体质量 10~15 g,购买及饲养于重庆医科大学实验动物中心(省部共建重点实验室)。美国 GE 公司 3.0T MR 扫描仪及腕关节表面线圈。

1.2 实验方法

1.2.1 SK-Br-3 肿瘤细胞株荷瘤裸鼠模型建立 参照课题组之前的方法^[5],SK-Br-3 肿瘤细胞株用含 10% 胎牛血清的 DMEM(低糖)培养基在 37℃、5% CO₂ 培养箱中传代培养,之后取对数生长期 SK-Br-3 细胞,0.25% 胰蛋白酶消化,收集至 5 mL 离心管以 1 200 r/min×5 min 离心,无血清无抗生素培养液制备细胞悬液,稀释至细胞浓度约为 5×10⁷/mL。BALB/c 裸鼠 30 只,于每只左前背部靠近左前肢皮下处接种 SK-Br-3 细胞悬液约 0.2 mL(含细胞数约为 1×10⁷),接种后 15~20 d,瘤体直径大于 1.0 cm,提示建模成功,可用于 MR 扫描。

1.2.2 SPIO 标记的反义探针在荷瘤裸鼠的 MR 活体成像

1.2.2.1 SPIO 剂量的选择 参照文献^[6]及前期预实验结果,反复比较,确定本实验中用于荷瘤裸鼠 MR 活体成像的反义探针剂量为 12 mg Fe/kg。

1.2.2.2 MR 扫描的时间点选择 文献记载的 MR 扫描时间没有统一的规定,各家报道差异很大,课题组在前期研究及多次预实验的基础上,并综合文献结果^[1,6-9],最终确定 MR 扫描的时间点分别在探针注射前及注射后 60 min、180 min、360 min、720 min 及 1 440 min(每个时间点 5 只裸鼠)。

1.2.2.3 MR 扫描序列及参数选择 使用美国 GE 公司 3.0T MR 扫描仪及腕关节表面线圈,参照文献^[8,10]及预实验,确定用于本实验的扫描序列及参数为:①T1WI 快速自旋回波序列(FSE)序列:脉冲序列重复时间/回波时间(TE/TR) MinFull/600, Echo Train Length 3, Bandwidth 31.25, Freq 320,

Phase 192, 激发次数 2;②T2WI FSE 序列:TE/TR 85/600, Echo Train Length 18, Bandwidth 41.67, Freq 320, Phase 256, 激发次数 2;③T2* 梯度回波(GRE)序列:TE/TR MinFull/300, Flip Angle 20, Bandwidth 20.83, Freq 320, Phase 224, 激发次数为 2。各序列均分别行横断位及冠状位扫描,层厚 4 mm,层距 0.5 mm,视野 14 cm。

1.2.2.4 MR 扫描 30 只荷瘤裸鼠注射 2% 巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,再吸入适量异氟醚加深麻醉并轻度抑制呼吸(将运动及呼吸伪影减少到最低),仰卧位固定于自制泡沫板上,置于腕关节面线圈中,头先进,完成上述序列及参数扫描后,尾静脉注射反义探针,在确定的 5 个时间点行相同序列、参数及部位扫描。

1.2.2.5 MR 图像分析 测定各时间点荷瘤裸鼠的肿瘤组织及邻近肌肉组织(空白对照)信号强度,感兴趣区选择在肿瘤最大层面,取值范围至少包含 50 个像素。

1.2.3 病理学检查 完成一个时间点扫描后,立即处死荷瘤裸鼠 5 只(腹腔注射过量巴比妥钠),取出肿瘤组织,10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋切片,HE 及普鲁士蓝染色,光学显微镜下观察。

1.3 统计学方法

计量结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各时间点间比较采用单因素重复测量资料的方差分析,两两比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荷瘤裸鼠模型的建立

精心饲养及严格无菌操作下,30 只裸鼠均存活,接种部位无红肿、溃烂,并逐渐于接种部位长出肿瘤,其他部位未见肿瘤形成,成瘤率 100%(图 1)。

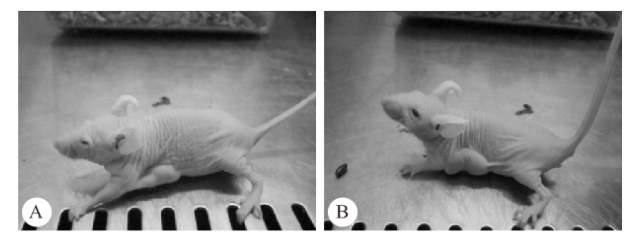


图 1 荷瘤裸鼠模型

Fig 1 The model of Tumor-burdened nude mice

A: 12 d after inoculation; B: 15 d after inoculation

2.2 反义探针在荷瘤裸鼠活体 MR 成像

2.2.1 T1WI FSE 序列中信号强度的变化 结果见图 2、表 1。在 T1WI FSE 序列中,肿瘤组织信号

强度于探针注射后 60 min 明显增加,60~360 min 信号强度仍缓慢增加,于 360 min 达到峰值,此时肉眼可见信号轻度升高,之后开始缓慢下降。注射后 60、180 及 360 min 信号强度与注射前对比差异均

具有统计学意义($P<0.01$),且 360 min 组信号强度均较其余各组高($P<0.05$);注射后 720~1 440 min 肿瘤组织信号强度基本恢复至注射前水平($P>0.05$)。邻近肌肉组织信号强度在探针注射

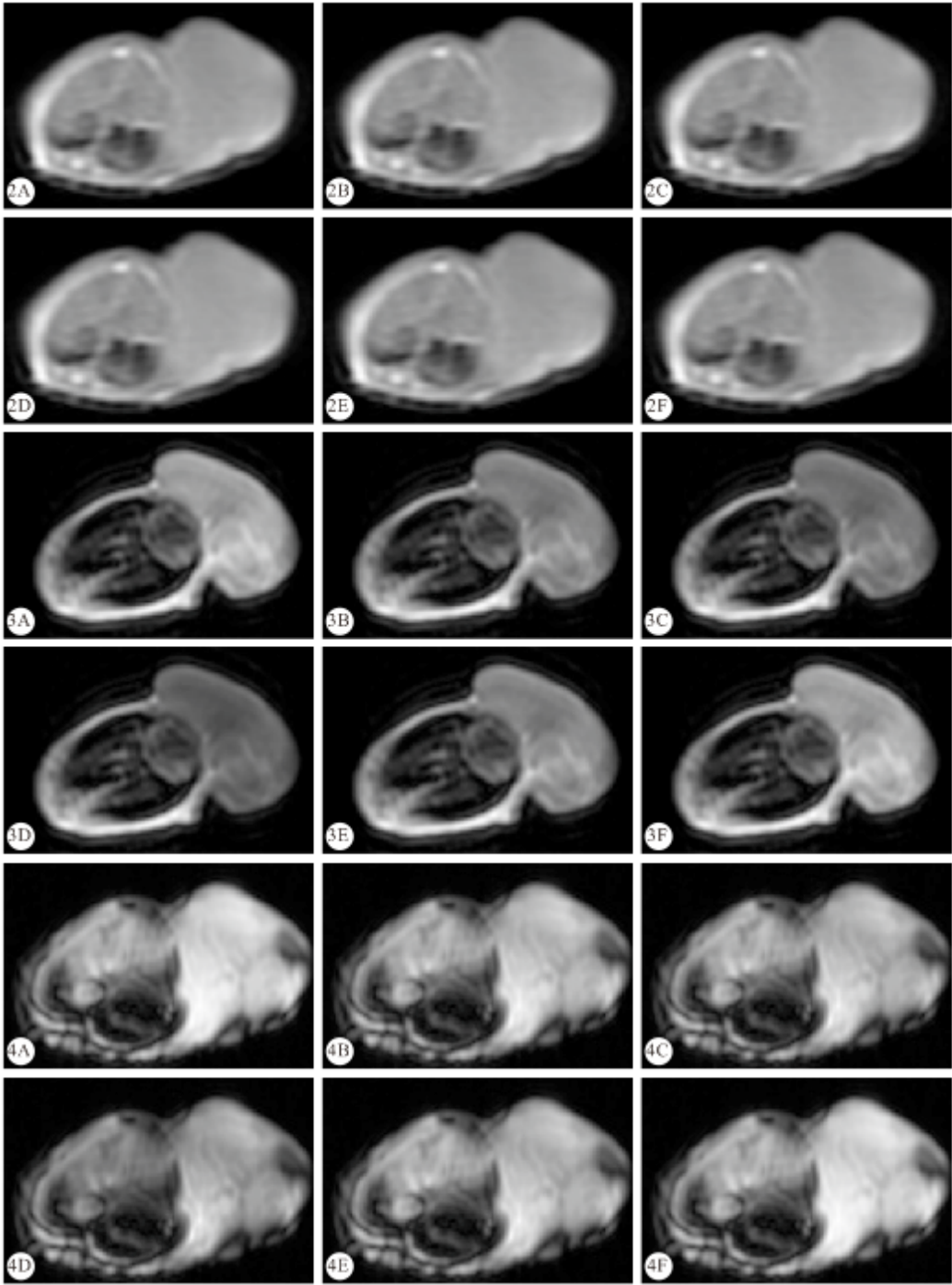


图 2 反义探针注射后 T1WI FSE 各时间点肿瘤组织信号系列变化

图 3 反义探针注射后 T2WI FSE 各时间点肿瘤组织信号系列变化

图 4 反义探针注射后 T2 * GRE 各时间点肿瘤组织信号系列变化

Fig 2 The signal change of tumor tissues over time in T1WI FSE sequence after injection of antisense probe

Fig 3 The signal change of

tumor tissues over time in T2WI FSE sequence after injection of antisense probe

Fig 4 The signal change of tumor tissues over time in T2 *

GRE sequence after injection of antisense probe

A; Before injection; B; 60 min after injection; C; 180 min after injection; D; 360 min after injection; E; 720 min after injection; F; 1 440 min after injection

后 60~180 min 出现了一过性的小幅度增加,与注射前比较差异具有统计学意义($P<0.05$),但之后(360、720 及 1 440 min)很快恢复至探针注射前水平($P>0.05$),与肿瘤组织信号变化趋势不一致。

2.2.2 T2WI FSE 序列中信号强度的变化 结果见图 3、表 2。在 T2WI FSE 序列中,肿瘤组织信号强度于探针注射后 60 min 明显下降,60~360 min 信号强度仍缓慢下降,于 360 min 达到最低,此时肉眼可见信号明显降低,之后开始缓慢回升,注射后 60、180、360 及 720 min 信号强度与注射前比较差异均具有统计学意义($P<0.05$),且 360 min 时信号强度均较其余各时点低($P<0.05$);注射后 1 440 min 肿瘤组织信号强度基本恢复至探针注射前水平($P>0.05$)。邻近肌肉组织信号强度在探针注射后 60~360 min 也出现了小幅度降低,但不如

肿瘤组织变化明显,且 720 min 时信号强度与注射前对比差异已不具有统计学意义($P>0.05$),说明已恢复至探针注射前水平,与肿瘤组织信号变化趋势不一致。

2.2.3 T2 * GRE 序列中信号强度的变化 结果见图 4、表 3。在 T2 * GRE 序列中,肿瘤组织信号强度变化与 T2WI FSE 序列基本相似;邻近肌肉组织信号强度在探针注射后 60 min 出现了一过性的小幅度降低($P<0.05$),之后各时间点信号强度与探针注射前比较差异无统计学意义($P>0.05$),360 min 已恢复至探针注射前水平,与肿瘤组织信号变化趋势不一致。

2.3 病理学检查结果

见图 5。HE 染色显示肿瘤组织结构紊乱,存在大量异形细胞,排列呈“癌巢”状,胞浆稀少,胞核异

表 1 T1WI FSE 序列各组织各时间点信号强度(n=5)

Table 1 The signal strength of each time point in T1WI FSE sequence (n=5)

	Before injection	60 min after injection	180 min after injection	360 min after injection	720 min after injection	1 440 min after injection
Tumo tissue	715±41	798±13 *	814±21 *	857±27 *·#	755±35	721±31
Adjacent muscular tissue	549±32	569±29 *	588±23 *	543±23	550±31	545±26

* $P<0.05$, vs. before injection; # $P<0.05$, vs. other time points

表 2 T2WI FSE 序列各组织各时间点信号强度(n=5)

Table 2 The signal strength of each time point in T2WI FSE sequence (n=5)

	Before injection	60 min after injection	180 min after injection	360 min after injection	720 min after injection	1 440 min after injection
Tumo tissue	521±36	438±34 *	321±30 * *	235±42 * *·#	462±26 *	520±38
Adjacent muscular tissue	244±23	188±18 *	228±20 *	232±22 *	245±23	242±21

* $P<0.05$, * * $P<0.001$, vs. before injection; # $P<0.05$, vs. other time points

表 3 T2 * GRE 序列各组织各时间点信号强度(n=5)

Table 3 The signal strength of each time point in T2 * GRE sequence (n=5)

	Before injection	60 min after injection	180 min after injection	360 min after injection	720 min after injection	1 440 min after injection
Tumo tissue	619±39	523±41 *	437±37 * *	332±30 * *·#	531±32 *	605±40
Adjacent muscular tissue	648±25	529±32 *	632±28	642±21	646±25	648±26

* $P<0.05$, * * $P<0.001$, vs. before injection; # $P<0.05$, vs. other time points

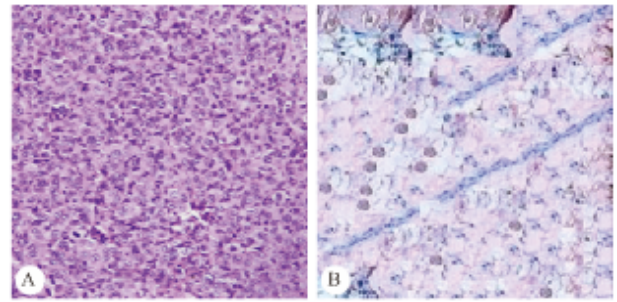


图 5 注射反义探针 360 min 后荷瘤裸鼠肿瘤组织的染色
Fig 5 Staining of tumor tissues 360 min after injection of antisense probe
A: HE ×200; B: Prussian blue ×400

型性明显,并有核分裂现象;各观察时间点标本表现相似。

普鲁士蓝染色显示,在注射反义探针前,肿瘤组织中没有蓝色铁颗粒分布;在注射反义探针后,各观察时间点标本的肿瘤组织中均散在分布斑点状蓝色铁颗粒,以注射反义探针后 360 min 分布最密集。

3 讨论

肿瘤的早期显示及定性诊断是分子影像学研究的主要目的,MR 成像具有无创、无辐射、多参数多方位及高分辨率等优点,并随着各种相关探针陆续研究成功,使得 MR 分子成像对肿瘤早期显示及定

性诊断的研究显示出良好的应用前景^[1,7,8,11]。

单一的 SPIO 用于 MR 成像^[1],在注射进入活体后,主要依赖 Kupffer 细胞的吞噬作用而聚集在肝、脾及淋巴结等组织,对肿瘤组织的特异性不强。本实验利用具有生物相容性的 SPIO 作为成像部分,以共价键方式连接与 *c-erbB2* 癌基因序列相反的寡核苷酸,制成磁性反义探针^[2,3],并选择高表达 *c-erbB2* 癌基因的 SK-Br-3 肿瘤细胞建立荷瘤裸鼠模型。根据反义基因理论,探针中的寡核苷酸能与癌基因靶向结合,实现在肿瘤部位的特异性富集,并滞留更长的时间。前期的实验结果发现^[4],反义探针注射后,脾脏及肝脏富集量在 180 min 达到高峰,肾脏在注射后 60 min 达高峰,而肌肉组织则稳步逐渐升高,360 min 的分布与其他脏器之间存在差异。根据这些结论,并综合文献记载^[1,6-9],最终确定 MR 扫描的时间点分别在探针注射前及注射后 60 min、180 min、360 min、720 min 及 1 440 min。分析各序列信号强度变化可见,肿瘤组织在反义探针注射后 60 min 即出现信号强度变化,与注射前对比差异具有统计学意义($P < 0.05$),随后的测定数据显示,肿瘤组织信号强度变化于 360 min 达到峰值;以 T2 序列信号变化为例,注射探针后 360 min 肿瘤组织出现明显的信号降低,在 MR 扫描图像上清楚显示,之后缓慢恢复至探针注射前正常水平;邻近肌肉组织在探针注射后也可出现信号强度变化,但信号强度变化较肿瘤组织不明显,在 MR 扫描图像上也无明显肉眼所见的改变,与肿瘤组织有着明显差异。信号强度的改变,也从病理学结果中得到证实,二者的结论完全一致。从这些结果中,我们推测,是探针中的寡核苷酸与肿瘤组织的 *c-erbB2* 癌基因实现了靶向结合,才导致反义探针在肿瘤组织中的滞留更明显、更持久,并远远长于脾脏、肝脏、肾脏及肌肉等组织。探针中的寡核苷酸与肿瘤组织的 *c-erbB2* 癌基因是否出现反义效应,导致癌基因表达受到抑制或封闭,在随后的研究中已经展开。

本实验结果显示,反义探针注入荷瘤裸鼠体内后,明显改变了肿瘤组织的信号强度,在 360 min 信号强度变化最大且信号强度变化能达到肉眼分辨的水平,故注射后 360 min 为荷瘤裸鼠 MR 成像的最佳扫描时间。

鉴于实验设备及条件的局限等因素,注射探针后的观察时间间隔范围较大,其间可能有着更准确的扫描时间,这还需要进一步的实验加以完善。此外,进一步的研究如最佳探针浓度、最佳 MR 扫描序列等,也是随后的观察内容。

参 考 文 献

- 1 乔瑞瑞,曾剑峰,贾巧娟等. 磁性氧化铁纳米颗粒——通向肿瘤磁共振分子影像的重要基石. 物理化学学报,2012;28(5):993-1011.
- 2 Wen M, Li B, Bai W, *et al.* Application of atomic force microscopy in morphological observation of antisense probe labeled with magnetism. *Mol Vis*,2008;14(1):114-117.
- 3 Wen M, Li B, Ouyang Y, *et al.* Preparation and quality test of superparamagnetic iron oxide labeled antisense oligodeoxynucleotide probe: a preliminary study. *Ann Biomed Eng*,2009;37(6):1240-1250.
- 4 谭书德,欧阳羽,文 明等. 超顺磁性氧化铁标记的反义探针在动物体内的药动学及主要脏器分布研究. 中国药理学杂志,2011;46(21):1656-1660.
- 5 谢 娟,李少林,张玉偲.^{99m}Tc 标记 *c-erbB2* 反义寡脱氧核苷酸对乳腺癌显像的实验研究. 中华医学杂志,2005;85(41):2940-2942.
- 6 文 明,宋 琳,柏 玮等. 纳米级超顺磁性氧化铁的制备及其对小鼠急性毒性作用的观察. 第二军医大学学报,2007;28(10):1104-1108.
- 7 Shi X, Wang SH, Swanson SD, *et al.* Dendrimer-functionalized shell-crosslinked iron oxide nanoparticles for *in vivo* magnetic resonance imaging of tumors. *Adv Mater*,2008;20(2):1671-1678.
- 8 陆菁菁,王 芳,金征宇等. 靶向磁性纳米粒子用于肿瘤的磁共振分子成像. 中国医学科学院学报,2009;31(2):124-128.
- 9 Lin MM, Kim HH, Kim H, *et al.* Surface activation and targeting strategies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in cancer-oriented diagnosis and therapy. *Nanomedicine*,2010;5(1):109-133.
- 10 Li X, Du X, Huo T, *et al.* Specific targeting of breast tumor by octreotide-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 3.0-Tesla magnetic resonance scanner. *Acta Radiol*,2009;50(6):583-594.
- 11 Chen K, Chen X. Design and development of molecular imaging probes. *Curr Top Med Chem*,2010;10(12):1227-1236.

(2013-01-07 收稿,2013-04-29 修回)

编辑 余 琳