

文章编号:1000-582X(2008)08-0956-05

SPIO 标记的反义探针磁学性能检测

文 明^{1a}, 柏 玮^{1b}, 李必波^{1c}, 韩 忠², 陆云峰^{1a}, 李少林^{1b}, 杨学恒²

(1. 重庆医科大学 a 附属第一医院放射科; b. 基础医学院放射医学教研室;

c. 药学院, 重庆 400016; 2. 重庆大学 数理学院, 重庆 400030)

摘 要:采用化学交联法制备超顺磁性氧化铁(SPIO)标记的 c-erbB2 癌基因反义脱氧寡核苷酸探针,经过 1.5T 磁共振仪测定,其 T_2 弛豫率为 $0.156 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; 振动样品磁强计测定出探针的磁化强度为 69.423 8 emu/g Fe, 比饱和磁化强度 68.413 4 emu/g, 比剩余磁化强度为 30.354 1 emu/g, 剩磁为 19.734 5 Gs。为了检测探针的有效性,进一步使用该探针转染高表达 c-erbB2 癌基因的 SK-Br-3 肿瘤细胞株,同时使用正义和无义探针转染 SK-Br-3 肿瘤细胞株、反义探针转染正常小鼠肝细胞作对照,结果发现反义探针能够特异性进入 SK-Br-3 肿瘤细胞内,且能明显改善该细胞的磁学参数并降低磁共振扫描下的信号强度。

关键词:分子影像学;反义脱氧寡核苷酸;氧化铁纳米;磁学参数;磁共振;细胞成像

中图分类号:O482.5

文献标志码:A

Magnetic properties measurement of antisense oligodeoxynucleotide probes labeled by superparamagnetic iron oxide

WEN Ming^{1a}, BAI Wei^{1b}, LI Bi-bo^{1c}, HAN Zhong², LU Yun-feng^{1a}, LI Shao-lin^{1b}, YANG Xue-heng²

(1a. Department of Radiology, First Affiliated Hospital; b. College of Pharmacology; c. Department of Radiation Medicine, the Basic Medical College, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, P. R. China; 2. College of Mathematics and Physics, Chongqing University, Chongqing 400030, P. R. China)

Abstract: The c-erbB2 oncogene antisense oligodeoxynucleotide probe was obtained by chemical cross-linking approach. Its T_2 relaxivity was $0.156 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, which was determined with a 1.5T MR system. The saturated magnetization, specific saturated magnetization, specific retentivity and retentivity were 69.423 8 emu/g Fe, 68.413 4 emu/g, 30.354 1 emu/g and 19.734 5 Gs, respectively. These measurements were obtained with a vibrating-sample magnetometer. To test its effectiveness, highly expressive SK-Br-3 oncocytes were transfected with the antisense oligodeoxynucleotide probe. Meanwhile, SK-Br-3 oncocytes were transfected with the sense and non-sense oligodeoxynucleotide probe, and normal mouse liver cells were transfected with the antisense oligodeoxynucleotide probe. The results show that the antisense probe could enter the SK-Br-3 oncocytes effectively, and improve the magnetic properties and decrease the signal intensity in MR scanning obviously.

Key words: molecular imaging; antisense oligodeoxynucleotide; iron oxide nanoparticle; magnetic property; magnetic resonance; cell imaging

收稿日期:2008-04-17

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070230);重庆市卫生局医学科研资助项目(062025);重庆医科大学优秀博士基金资助项目(重医大文 2006-182)

作者简介:文明(1964-),男,重庆医科大学副主任医师,博士,主要研究方向为肿瘤分子影像学。

李少林(联系人),男,重庆医科大学教授,博士生导师,(E-mail)shaolinli202@sina.com。

欢迎访问重庆大学期刊网 <http://qks.cqu.edu.cn>

恶性肿瘤已日益成为危害人类健康和生命的主要疾病之一,对恶性肿瘤的早期、特异性诊断是提高生存率、改善生活质量的关键所在,影像学检查在其中发挥着举足轻重的作用。传统的影像诊断方法主要针对肿瘤形成实质性肿块后的形态学成像,但此时患者已经处于临床中晚期阶段,治疗效果不佳,预后差。寻找一种早期、特异性诊断肿瘤的新方法,一直是国内外研究者不懈追求的目标。

兴起于上世纪末的分子影像学,着眼于采用影像的手段来显示活体组织、细胞水平的特定分子变化,并对其生物学行为进行定性和定量评估,在早期、特异性诊断恶性肿瘤方面有着极其巨大的应用和开发前景。在分子影像学研究中,制备特异性高、亲和力好的靶向探针是实现活体成像的关键因素;而理想的分子影像学检测设备磁共振(magnetic resonance, MR),具有成像时间长,空间与时间分辨力高,图像对比度好等优点,但其最大的缺点是对信号探测的敏感性较低,一般只能检测到组织中 μmol 级的顺磁性成分含量,所以要求用于 MR 成像的分子探针具有良好的磁学性能^[1-2]。笔者采用化学交联法,将纳米级超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)标记于 c-erbB2 癌基因反义寡脱氧核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN),制成分子探针,检测主要的磁学参数,评价是否能满足 MR 成像的要求。

1 材料与方 法

1.1 主要材料及仪器

葡聚糖包被的 SPIO 为课题组自制^[3];c-erbB2 癌基因 ASODN 片段通过 genebank 和 gene search 软件设计,定位于该基因 mRNA 的转录起始位 160~174 位点,委托上海生工生物工程技术有限公司合成,序列为 5'-CTCCATGGTGCTCAC-3',同时设计该基因的正义和无义片段作为对照研究,序列分别为 5'-CACTCGTGGTACCTC-3'、5'-GGTCGATGCCGCGTC-3',为避免细胞内核酶降解,上述 3 种片段均进行了硫代磷酸化修饰;高碘酸钠、硼氢化钠和碳酸氢钠为国产分析纯;SK-Br-3 肿瘤细胞株购自中科院上海细胞库,正常小鼠肝细胞由重庆医科大学基础医学院肖力阳硕士馈赠;美国 AKTA prime plus 高效液相色谱生物分离纯化系统;美国 GE 公司 1.5T 超导型 MR 仪;南京大学电子研究所 HH-15 振动样品磁强计。

1.2 SPIO 标记的反义探针制备

采用化学交联法进行反义探针制备^[4-5],已申请

国家专利(受理号 200710092512.5),制备后的探针置于 4℃ 冰箱保存备用。并用同样条件制备 SPIO 标记 c-erbB2 癌基因的正义和无义片段,以下称为正义探针和无义探针。

1.3 T_2 弛豫率测定

取适量反义探针样品,分别加水稀释至铁浓度为 0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16、0.18 和 0.20 mmol/L,依次取这些浓度的样品稀释液 10 mL 分别装于 9 支管径为 1 cm 的试管,再取 10 mL 纯净水作对照。将这 10 只试管分次放置于 8cm 线圈,1.5T 超导型 MR 仪进行横断位扫描。扫描选择 Carr-Purell-Meiboom-Gill 序列,扫描条件为层厚 5 mm,视野 16 cm,TR/TE=2 000/20 ms,共获 6 个回波像,然后用 ROI 程序直接测量每管的 T_2 值(测定范围为 65 个像素)。以铁浓度(mmol/L)为横坐标(X),所对应的 T_2 值倒数(即 $1/T_2$ 值)为纵坐标(Y)作图,得到直线的斜率即为该样品的弛豫率^[6]。同样方法测定正义和无义探针 T_2 弛豫率。

1.4 磁化曲线测定

将反义探针样品装入 1 cm 的试管,密封后置入振动样品磁强计。逐渐加大磁场强度,并从显示屏观察磁化曲线,直到样品的磁化强度不再增加为止。记录磁化曲线相关数据,计算机处理后获得样品的饱和磁化强度、比饱和磁化强度、比剩余磁化强度和剩磁等参数。同样方法测定正义和无义探针磁化曲线。

1.5 转染细胞株并行 MR 成像

SK-Br-3 肿瘤细胞株培养于含 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的培养液中,37℃,CO₂ 孵箱,提取增殖活跃的对数生长期细胞,调整浓度为 4×10^6 个/mL,分装成 3 份,分别加入反义、正义和无义探针各 2 mL(均调整 Fe 浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)培养 18 h 后提取细胞,D-Hanks 液洗涤 2 遍,继续培养 72 h 后取其中一部分做普鲁士蓝染色,光学显微镜下观察细胞内铁分布,并设未加入探针的同批次肿瘤细胞、反义探针转染的正常小鼠肝细胞相同条件下染色作为对照组;另一部分用于 MR 成像,具体方法为取反义、正义和无义探针转染 SK-Br-3 肿瘤细胞及同批未转染肿瘤细胞,均调整细胞浓度为 5×10^5 个/mL,另外用含探针培养基(Fe 浓度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、无探针培养基、反义探针转染的正常小鼠肝细胞、蒸馏水作为对照。以上 8 组分别置入 8 个 Ependoff 管行 MR 扫描,扫描条件与步骤 1.3 相同。

2 结果

2.1 样品的 T_2 弛豫率

样品的原结果见表1及图1。可以看出,随着铁浓度的增加,反义探针样品的 T_2 值逐渐下降,符合MR成像阴性对比剂的基本特征。利用表1数据作出图1,求得回归方程为 $Y=0.156X-0.0036$, $r=0.99941$, $n=9$,所以样品的弛豫率为 $0.156 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。此外,测得正义和无义探针 T_2 弛豫率同样为 $0.156 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

表1 反义脱氧寡核苷酸探针样品不同铁浓度下的 T_2 值

| 探针铁浓度/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) | T_2 值/ms | $1/T_2$ 值/ ms^{-1} |
|---|------------|-----------------------------|
| 0.04 | 386.71 | 0.0025859 |
| 0.06 | 170.35 | 0.0058702 |
| 0.08 | 115.53 | 0.0086557 |
| 0.10 | 86.77 | 0.0115247 |
| 0.12 | 66.36 | 0.0150693 |
| 0.14 | 54.41 | 0.0183789 |
| 0.16 | 47.33 | 0.0211282 |
| 0.18 | 40.47 | 0.0247096 |
| 0.20 | 37.18 | 0.0268961 |
| 纯净水 | 1374.60 | 0.0007274 |

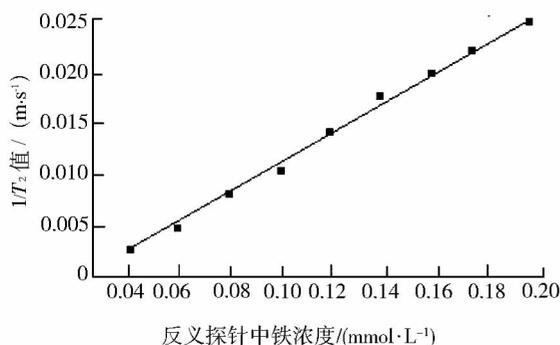


图1 反义脱氧寡核苷酸探针的弛豫率回归曲线

2.2 样品的磁化曲线

样品的磁化曲线结果见图2,可以发现,随着外加磁场强度的增大,反义探针样品的磁化强度值相应增大;当外加磁场增大到3000Gs时,继续增大磁场强度(本实验加大到10000Gs),样品磁化强度值保持不变,即达到磁饱和。此外,磁化曲线为一条过原点的单一曲线,说明当外加磁场为0时,样品几

乎没有剩磁,即具有超顺磁性。

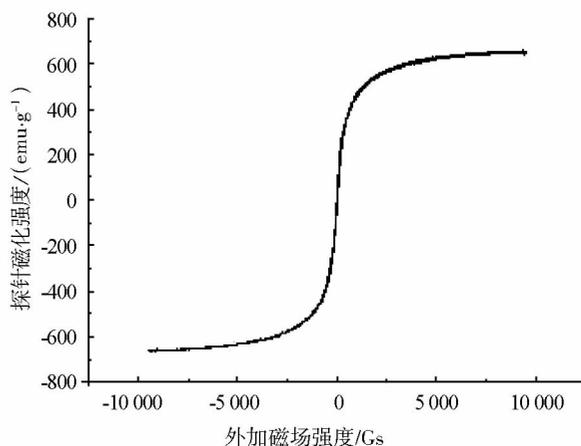


图2 反义脱氧寡核苷酸探针的磁化曲线

通过外推法求得所制备反义探针的饱和磁化强度为 69.4238 emu/g Fe ,比饱和磁化强度 68.4134 emu/g ,比剩余磁化强度为 30.3541 emu/g ,剩磁为 19.7345 Gs 。

同理,得出正义和无义探针磁化曲线与反义探针样品相同,磁学参数基本一致。

2.3 转染细胞株的显微镜观察

反义探针转染的SK-Br-3肿瘤细胞浆中,均可见多少不等的蓝色铁颗粒,转染率100%(见图3);而对照组(包括正义和无义探针转染SK-Br-3肿瘤细胞、反义探针转染正常小鼠肝细胞)胞浆内无明显铁颗粒出现。

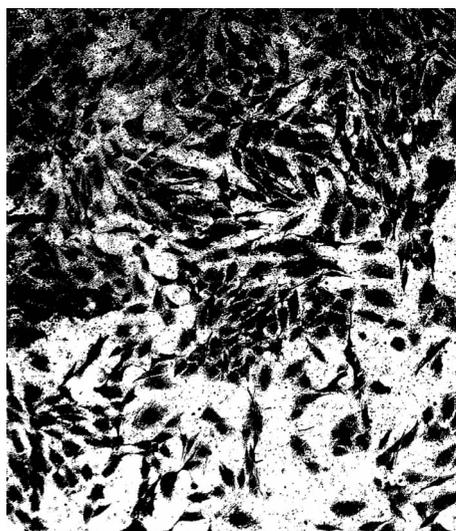


图3 反义脱氧寡核苷酸探针转染SK-Br-3肿瘤细胞(普鲁士蓝染色 $\times 200$)

2.4 MR 成像

反义探针转染 SK-Br-3 肿瘤细胞及含探针培养基均呈低信号,其中转染细胞的信号最低。正义和无义探针转染的 SK-Br-3 肿瘤细胞、未转染的 SK-Br-3 肿瘤细胞、反义探针转染的正常小鼠肝细胞、无探针培养基及蒸馏水均显示为高信号(见图 4)。



注:1.反义探针转染 SK-Br-3 肿瘤细胞;2.含探针培养基;
3.正义探针转染 SK-Br-3 肿瘤细胞;4.无义探针转染 SK-Br-3
肿瘤细胞;5.未转染的 SK-Br-3 肿瘤细胞;6.反义探针转染的
正常小鼠肝细胞;7.无探针培养基;8.蒸馏水

图 4 MR 成像

3 讨 论

实验根据分子生物学上的反义基因技术原理,选择 c-erbB2 癌基因作为研究的靶基因,这是因为该基因的扩增和表达仅限于恶性肿瘤组织中,若合成与之相反的寡核苷酸序列,就可以通过碱基互补配对而特异结合,实现反义探针的靶向聚集^[7-9]。此外,选择水基磁性液体 SPIO 作为标记物,是考虑到 SPIO 的核心为 Fe_3O_4 ,由于生长旺盛的肿瘤细胞膜上存在着大量的转铁蛋白受体^[10-12],容易主动将 SPIO 自细胞外向细胞内转运,使细胞内聚积较多的铁,从而干扰周围磁场,引起质子失相位,缩短组织的 T_2 值,造成细胞信号降低,与周围信号的对比明显增加^[1,3,11-13]。但是,SPIO 表面缺少邻近配位的原子,颗粒之间存在着纳米作用能,容易发生团聚,且该颗粒和细胞膜均带负电荷,若将 SPIO 直接转染细胞,细胞往往不容易摄取。在前期实验中^[3],将 SPIO 的外层包被葡聚糖,解决了 SPIO 的颗粒团聚问题,Zeta 电位为正电荷(+20.04 mv);此外,包被于 SPIO 表面葡聚糖的羟基在氧化为醛基后,能与

ASODN 的氨基反应形成席夫碱(schiff base),二者之间容易产生共价结合^[4-5]。这样,不仅能增加探针在体内的稳定性,还可望获得较小的粒径。经原子力显微镜检测,发现反义探针颗粒均匀,排列整齐、规则,相互之间无团聚,粒径为 25~40 nm(属于超小型颗粒)^[14]。这样,便于探针在活体内逃避网状内皮系统的吞噬,延长半衰期,更易于穿过血管及组织间隙达到靶器官,从而具备强的靶向性^[15]。

鉴于笔者选择的制备方法属于氧化还原反应,各种试剂的剂量、反应时间、反应温度以及纯化方式等均可能导致杂质及中间产物的产生,这些物质为弱顺磁质,含量过高将降低探针的磁化效应,即影响 MR 成像的对比效果,使得组织或细胞之间的信号差别不明显。所以,制备后必须通过检测样品的磁学参数,才能客观地衡量其磁学性能。通常,检测的主要指标包括 T_2 弛豫率、饱和磁化强度、比饱和磁化强度、比剩余磁化强度和剩磁等参数^[3,6,11,12,15]。

T_2 弛豫率主要反应磁性物质如 SPIO 对质子横向弛豫过程速率的影响程度^[3,12,13]。弛豫率越大,则表示该物质缩短质子弛豫时间的能力越强,在 MR 图像上造成组织间的信号差别就越大,负性对比剂的造影效果也就越明显,那么这种物质就越适合用作 MR 成像的对比剂。从研究显示,反义探针的弛豫率为 $0.156 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,高于文献报道的商业化超小型颗粒对比剂 Resovist(又称 SHU555C) ($0.060 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)、Ferumoxtran-10(又称 Sinerem) ($0.080 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)及 P7228 ($0.080 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)^[1,6,11-12,15-16],与自制的 SPIO 基本相等^[3]。

磁化曲线所包含的饱和磁化强度、比饱和磁化强度、比剩余磁化强度和剩磁等参数反映了探针的磁响应能力^[1,12,13]。研究证实,样品在外加磁场下有良好的磁响应性,当撤销磁场后剩磁为 19.7345 Gs,几乎接近零。这是因为,样品粒径极小,每个粒子都是一个单磁畴,此时样品的磁化率不再服从居里-外斯定律,磁化方向就不再固定在一个易磁化方向,而是产生无规则的变化,结果导致超顺磁性的出现^[1,3,12]。国外 SPIO 产品如 Ferumoxides 的饱和磁化强度为 63 emu/g Fe,而 MR 成像对比剂所要求的最低强度为 41 emu/g Fe^[11-12,17],样品的饱和磁化强度为 69.4238 emu/g Fe,故完全能满足 MR 成像的要求。

为了检测制备的反义探针是否具备与靶细胞高度特异性结合的能力,并改变细胞的磁学参数,笔者使用其转染高表达 c-erbB2 癌基因的 SK-Br-3 肿瘤

细胞株,同时设定 SPIO 标记的正义和无义探针转染同样的肿瘤细胞株,反义探针转染正常肝细胞等作为对照。经过普鲁士蓝染色发现,反义探针转染组中几乎每个细胞胞浆内均有多少不等的蓝色铁颗粒,转染率达 100%,而 3 个对照组(包括正义和无义探针转染 SK-Br-3 肿瘤细胞、反义探针转染正常小鼠肝细胞)胞浆内无明显铁颗粒出现。MR 成像显示,转染后肿瘤细胞的信号明显降低,且低于含探针培养基。

4 结 论

通过测定反义探针样品的弛豫率和磁化曲线等磁学参数,提示制备的反义探针纳米粒子纯度高,杂质少,具有超顺磁性。此外,通过转染肿瘤细胞株,发现探针还具有特异性高,能有效转染肿瘤细胞,改善细胞磁学特性,并得到清晰的 MR 成像图片。

感谢重庆医科大学公共卫生学院统计学教研室何美为实验提供数据处理。

参考文献:

- [1] BELLIN M F. MR contrast agents, the old and the new [J]. *Eur J Radiol*, 2006, 60(3): 314-323.
- [2] 文明,李少林. 磁共振成像用于分子影像学[J]. *中国医学影像技术*, 2007, 23(1): 147-150.
WEN MING, LI SHAO-LIN. Application of MRI in molecular imaging [J]. *Chin J Med Imaging Technol*, 2007, 23(1): 147-150.
- [3] 柏玮,宋琳,文明,等. 超顺磁性磁共振对比剂的制备及性能检测[J]. *重庆医科大学学报*, 2007, 32(9): 922-925.
BAI WEI, SONG LING, WEN MING, et al. Preparation and performance testing for superparamagnetic contrast agent of magnetic resonance [J]. *J Chongqing Med University*, 2007, 32(9): 922-925.
- [4] TALANOV V S, GARMESTANI K, REGINO C A, et al. Preparation and in vivo evaluation of a novel stabilized linker for ²¹¹At labeling of protein [J]. *Nucl Med Biol*, 2006, 33(4): 469-480.
- [5] HOGEMANN D, JOSEPHSON L, WEISSLEDER R, et al. Improvement of MRI probes to allow efficient detection of gene expression [J]. *Bioconjug Chem*, 2000, 11(6): 941-946.
- [6] PINTASKE J, BANTLEON R, KEHLBACH R, et al. Effect of concentration of SHU 555A labeled human melanoma cells on MR spin echo and gradient echo signal decay at 0.2, 1.5, and 3T [J]. *Magn Reson Mater Phy*, 2006, 19(1): 71-77.
- [7] BLASBERG R G, TJUVAJEV J G. Molecular-genetic imaging: current and future perspective [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(10): 1620-1629.
- [8] FAZIAO D A, CHIEW Y E, SINI R L, et al. Expression of c-erbB2 receptors, heregulin and oestrogen receptor in human breast cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2000, 87(7): 486-500.
- [9] 文明,柏玮,李少林. 分子影像学中的肿瘤反义基因显像[J]. *重庆医科大学学报*, 2007, 32(5): 554-557.
WEN MING, BAI WEI, LI SHAO-LIN. Antisense geng imaging of tumor in molecular imaging [J]. *J Chongqing Med University*, 2007, 32(5): 554-557.
- [10] CALZOLARI A, OLIVIERO I, DEAGLIO S, et al. Transferrin receptor 2 is frequently expressed in human cancer cell lines [J]. *Blood Cel, Mol, Disease*, 2007, 39(1): 82-91.
- [11] DALDRUP LINK H E, RUDELIUS M, PIONTEK G, et al. Migration of iron oxide-labeled human hematopoietic progenitor cells in a mouse model: In 1.5T MR imaging equipment [J]. *Radiology*, 2005, 234(1): 197-205.
- [12] THOREK D L J, CHEN A K, CZUPRYNA J, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging [J]. *Annal Biomed Engin*, 2006, 34(1): 23-38.
- [13] BOWEN C V, ZHANG X, SAAB G, et al. Application of the static dephasing regime theory to superparamagnetic iron-oxide loaded cells [J]. *Magn Reson Med*, 2002, 48(1): 52-61.
- [14] WEN M, LI B B, BAI W, et al. Application of atomic force microscopy in morphological observation of antisense probe labeled with magnetism [J]. *Mol Vis*, 2008, 14(1): 114-117.
- [15] VOGL T J, SCHWARZ W, BLUME S, et al. Preoperative evaluation of malignant liver tumor: comparison of unenhanced and SPIO (Resovist)-enhanced MR imaging with biphasic CTAP and intraoperative US [J]. *Europ Radiol*, 2003, 13(1): 262-272.
- [16] METE S, BONATERRA G, RUDELIUS M, et al. Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents in vitro [J]. *Europ Radiol*, 2004, 14(7): 1851-1858.
- [17] MORNET S, VASSEUR S, GRASSET F, et al. Magnetic nanoparticle design for medical applications [J]. *Progr Solid State Chem*, 2006, 34(2/4): 237-247.

(编辑 陈移峰)