

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001593

外加磁场对 SPIO-shRNA 分子探针用于活体荷瘤裸鼠
卵巢癌肿瘤 MR 成像的影响

廖蕊堃, 曾丹妮, Sagar Thapa, 文 明

(重庆医科大学附属第一医院放射科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨外加磁场对 SPIO-shRNA 分子探针用于活体荷瘤裸鼠卵巢癌肿瘤 MR 成像的影响。**方法:**设定探针注射浓度为含铁 18 mg/kg, 扫描时间为探针注射后 27 h; 将 30 只 BALB/c 荷瘤裸鼠随机分为 3 组, 即磁转染组(实验组), 探针转染组(阴性对照组), 荷瘤裸鼠组(空白对照组), 每组样本量分别为 10 只荷瘤裸鼠, 并在扫描前对磁转染组行外加磁场处理。采用磁共振 MR 扫描检测裸鼠体内肿瘤组织及邻近肌肉组织信号强度变化; 每次检查完成后立即处死裸鼠, 取出肿瘤组织及肌肉组织行 HE、普鲁士蓝染色, 并在光学显微镜下观察。**结果:**T1WI 序列各组间肿瘤组织信号强度差异不具有统计学意义($F=2.623$, $P=0.091$), 各组间肌肉组织信号强度差异不具有统计学意义($F=0.434$, $P=0.652$); T2WI 及 T2* 序列磁转染组及探针转染组肿瘤组织信号强度较荷瘤裸鼠组减低, 差异具有统计学意义($P=0.000$), 且磁转染组较探针转染组差异更显著, 差异具有统计学意义($P=0.000$); 而 T2* 序列磁转染组肌肉组织信号强度较其余组信号减低, 差异具有统计学意义($P=0.000$); HE 染色显示各组肿瘤组织结构紊乱, 细胞核异型性增多; 普鲁士蓝染色表明在磁转染组和探针转染组中均存在蓝染铁颗粒, 且磁转染组蓝染颗粒更为丰富。**结论:**外加磁场能够诱导 SPIO-shRNA 分子探针靶向作用于卵巢癌肿瘤组织并提高肿瘤组织摄取的有效浓度。

【关键词】超顺磁性氧化铁; 分子探针; MR 成像; 外加磁场; 卵巢癌**【中图分类号】**R737.31**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-06-19Effects of external magnetic field on MR imaging of ovarian tumor in
nude mice bearing tumor by SPIO-shRNA molecular probe

Liao Ruikun, Zeng Danni, Sagar Thapa, Wen Ming

(Department of Radiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of external magnetic field on MR imaging of ovarian tumor in nude mice bearing tumor in vivo by SPIO-shRNA molecular probe. **Methods:** The concentration of probe injection was set as iron 18 mg/kg, and the scanning time was 27 h after probe injection. BALB/c mice of 30 were randomly divided into 3 groups, namely magnetic transfection group (experimental group), SPIO-shRNA group (negative control group), nude mice bearing cancer group (control group). Sample capacity of each group was 10 and the experimental group was magnetic transfected before scan. Changes of signal intensity in tumor tissue and adjacent muscle tissue were scanned by magnetic resonance imaging (MRI). The nude mice were killed after that treatment, tumor and muscle tissues were sampled for HE and prussian blue stain and observed under optical microscope. **Results:** The difference of tumor tissue signal intensity of T1WI sequence among three groups was not statistically significant ($F=2.623$, $P=0.091$) and the difference of muscle tissue signal intensity in each group was not statistically significant ($F=0.434$, $P=0.652$). Compared with those in the control group, the tumor tissue signal intensity of T2WI and T2* sequence in the experimental group and the negative control group were decreased, with statistically significant differences ($P=0.000$), and compared with that in the negative control group, it was more significantly in experimental group with statistically significant differences ($P=0.000$). Compared with that in the other groups, the T2* sequence of muscle tissue signal intensity in the experimental group was relatively lower, with statistically significant difference ($P=0.000$). HE staining showed that structure of tumor tissue was abnormal and nuclear atypia was increased; prussian blue staining showed that blue-stained iron particles existed in both experimental group and negative control group, with more in the experimental

group. **Conclusion:** The external magnetic field can induce SPIO-shRNA molecular probes target to ovarian tumor tissues and increase the effective concentration of tumor tissue absorption.

【Key words】superparamagnetic iron oxide; molecular probe; magnetic resonance imaging; external magnetic field; ovarian cancer

作者介绍: 廖蕊堃, Email: 330357551@qq.com,

研究方向: 分子影像学。

通信作者: 文 明, Email: liuyuchun65@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81171366)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180408.1434.028.html>

(2018-04-08)

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。分子影像学兴起于 20 世纪末,其作用于病变分子水平,以一种安全无创的方式特异性诊断恶性肿瘤。本课题组针对恶性肿瘤的早期诊断,采用 RNA 干扰技术(RNA interference, RNAi)与分子影像学相结合,将上皮源性卵巢癌 SKOV3 恶性肿瘤细胞中过度表达的表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)作为研究靶点,成功制备出纳米粒径约为 7.37 nm 的球形 SPIO-shRNA 分子探针并用于卵巢癌的早期诊断^[1]。前期工作中已完成活体动物体内药代动力学、药理毒性及荷瘤裸鼠成像等实验^[2-3],而探针作用于体内循环时间较长,肝、脾等主要脏器对探针的摄取、吞噬作用会导致分子探针到达肿瘤组织时探针浓度下降,成像效果不佳。因此迫切需要一种新兴技术来提高靶向药物浓度,以达到早期诊断效果。磁转染是一种新颖、简单且高效的转染培养技术,主要是利用磁力将与磁性颗粒结合的基因载体相吸附,进而使得载体在细胞表面富集。国内外相关研究表明^[4-6],外加磁场(磁转染作用)除了能够使靶向细胞产生定向移动以外,还能利用影像成像技术对靶向细胞起到示踪的作用。因此,本次研究通过进一步建立外加磁场环境,探讨外加磁场对 SPIO-shRNA 分子探针作用于活体荷瘤裸鼠肿瘤组织成像的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料与设备

分子探针由课题组制备,并获得国家发明专利授权[专利号:ZL201410064217.6];SKOV3 肿瘤细胞株(中科院上海细胞库);细胞培养基 RPMI-1640 及胎牛血清(美国 GIBCO 公司);0.25%胰蛋白酶(美国 HYCLONE 公司);磷酸缓冲液 PBS、CO₂ 恒温细胞培养箱(美国 Thermo Forma 公司);戊巴比妥钠(德国 Merck 公司);核固红(武汉博士德工程有限公司);BALB/c 裸鼠 30 只,雌性,5~6 周龄,体质量(20±4) g,购买及饲养均经由重庆医科大学动物实验中心(省部级共建重点实验室);3.0 T 超导型磁共振及腕关节表面线圈(GE 公司);永铁王钕铁硼强力磁铁(上海金昆磁电科技有限公司)。

1.2 实验方法与步骤

1.2.1 荷瘤裸鼠模型建立及实验分组 参照课题组既往的成熟方法^[7]进行,将卵巢癌 SKOV3 细胞株置于含有 10%胎牛

血清及 RPMI1640 培养基内常规培养(恒温 37 ℃、浓度为 5% CO₂ 孵箱中),选择对数期生长细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化,收集至 10 mL 离心管内,以 800 r/min、5 min 离心,随后用无血清、无抗生素细胞悬液稀释至细胞浓度为 1×10⁸ 个/mL,备用。

BALB/c 裸鼠 30 只,将裸鼠随机分为 3 组:分别为荷瘤裸鼠组(空白对照组)、探针转染组(阴性对照组)、磁转染组(实验组),每组分别为 10 只荷瘤裸鼠。将 30 只裸鼠后背部近左侧大腿区域皮下接种 SKOV3 细胞悬液约 0.4 mL(含细胞数约为 1×10⁷ 个);常规饲养,每天定时观察并记录裸鼠精神状态、饮食及肿瘤生长情况,接种后(15±2) d,瘤体直径大于 1.0 cm,提示荷瘤裸鼠建模成功,可以用于进一步的实验。本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.2.2 荷瘤裸鼠 MR 扫描时间、浓度选择 国内外各家报道扫描时间、扫描浓度不一,本课题组经过反复讨论及综合多次预实验结果后统一规定为注射探针后 27 h 采用含铁量 18 mg/kg 进行磁共振扫描^[8]。

1.2.3 MR 扫描参数设置及序列选择 考虑到扫描时间为探针注射后 27 h,若注射前至 MR 扫描结束这段时间内持续麻醉荷瘤裸鼠,可能不符合动物的生活状态而影响实验效果,故而选择在扫描前对磁转染组和探针转染组进行分子探针注射,对荷瘤裸鼠组注射等量生理盐水,随后放回动物实验中心常规分盒饲养,在尾静脉注射 27 h 后开始 MR 扫描;扫描前对磁转染组肿瘤组织区域垫以钕铁硼磁铁(大小为 2.5 cm×2.5 cm×1.0 cm, B=250 mT)20 min,再行 MR 扫描,其余 2 组无特殊处理行常规 MR 扫描。

在每次 MR 扫描前,均采取 2%戊巴比妥钠(剂量为 0.1 mL/20 g)注入荷瘤裸鼠腹腔内麻醉,置于自制泡沫板上,医用胶布俯卧位固定,待其呼吸频率降低且呼吸平稳后(目的在于减少裸鼠呼吸动度伪影对 MR 图像的干扰),置于腕关节线圈内,行 MR 横断位及冠状位扫描。

在参考文献^[9]基础上,经反复预实验并适当调整,最终用于实验的参数设置如下:①T1WI 快速自旋回波序列 FSE:脉冲序列重复时间/回波时间(TE/TR)85/300 MinFull,冠状位 FOV 11 cm,横断位 FOV 6 cm,激励次数 3 次,层厚 2 mm,间距 0.5 mm,矩阵 320×224,翻转角为 20°;②T2WI FSE:TE/TR 85/600 ms,FOV 6 cm,激励次数 3 次,层厚 2 mm,矩阵 320×256,翻转角 17°;③T2* 梯度回波(GRE):TE/TR 300 ms/MinFull,FOV 6 cm,激励次数 3 次,层厚 2 mm,间距 0.5 mm,矩阵 320×256,翻转角 20°。

1.2.4 MR 图像采集及分析 所采集扫描图像均传输至 GE AW4.6 工作站,分别测量各组最大层面肿瘤组织及相邻肌肉组织信号强度。为避免误差,人为规定感兴趣区(region of interest, ROI)图形为方形游标,面积为 20 mm²,测量 3 次,记

录其平均值。

1.2.5 病理切片及染色 MR 扫描结束后,立即经腹腔注入过量的 2%戊巴比妥钠处死裸鼠,取肿瘤组织、肝脏、脾脏及肌肉组织,以 10%缓冲福尔马林液固定,48 h 后行石蜡包埋切片,分别做 HE 及普鲁士蓝染色,光学显微镜下观察。

1.3 统计学方法

统计分析采用软件 SPSS 18.0,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组计量资料比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD- t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 荷瘤裸鼠模型建立

30 只裸鼠生长良好,无 1 只死亡,注射后 (15 ± 2) d,瘤体直径大于 1 cm,色泽红润,形态规则,局部无红肿溃烂等改变。见图 1。



图 1 裸鼠接种后 15 d

Fig.1 15 days after inoculation

2.2 裸鼠 MR 成像

2.2.1 T1WI 序列信号强度变化 磁转染组及探针转染组肿瘤组织信号强度与荷瘤裸鼠组比较,信号强度略微升高,各组间差异不具有统计学意义 ($F=2.623, P=0.091$); 各组间肌肉组织信号强度无明显变化,差异不具有统计学意义 ($F=0.434, P=0.652$),见表 1、图 2。

表 1 各组间 T1WI 肿瘤组织及肌肉组织信号强度

Tab.1 Signal intensity of T1WI FSE in tumor tissues and adjacent muscle tissues in different groups

分组	磁转染组	探针转染组	荷瘤裸鼠组	F 值	P 值
肿瘤组织	768 $\pm$ 19	775 $\pm$ 19	751 $\pm$ 22	2.623	0.091
肌肉组织	513 $\pm$ 25	521 $\pm$ 28	510 $\pm$ 28	0.434	0.652

注:信号强度以灰度值表示

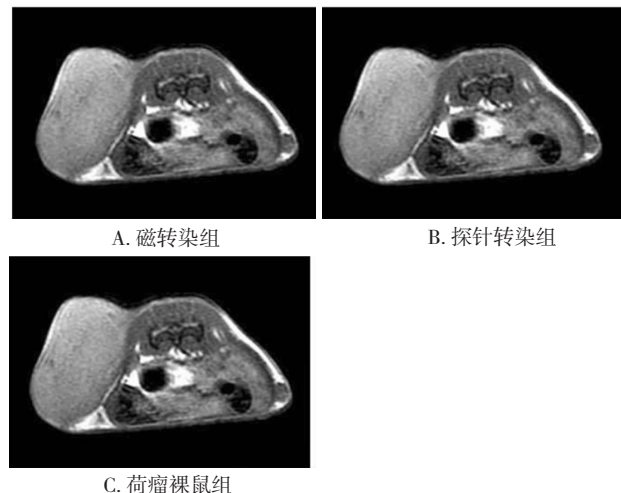


图 2 各组间 T1WI 肿瘤组织信号强度变化

Fig.2 Diagram of signal intensity T1WI FSE in tumor tissues in different groups

2.2.2 T2WI 序列信号强度变化 磁转染组、探针转染组及荷瘤裸鼠组 3 组肿瘤组织信号强度差异具有统计学意义 ($F=173.705, P=0.000$), 其中磁转染组及探针转染组较荷瘤裸鼠组肿瘤组织信号减低,差异具有统计学意义 ($P=0.000$),磁转染组较探针转染组肿瘤组织信号强度下降,差异具有统计学意义 ($P=0.000$); 各组间肌肉组织信号强度差异没有统计学意义 ($F=1.453, P=0.256$),见表 2、图 3。

表 2 各组间 T2WI 肿瘤组织及肌肉组织信号强度

Tab.2 Signal intensity of T2WI FSE in tumor tissues and adjacent muscle tissues in different groups

分组	磁转染组	探针转染组	荷瘤裸鼠组	F 值	P 值
肿瘤组织	424 $\pm$ 36	545 $\pm$ 37	715 $\pm$ 29	173.705	0.000
肌肉组织	211 $\pm$ 19	215 $\pm$ 26	234 $\pm$ 24	1.453	0.256

注:信号强度以灰度值表示

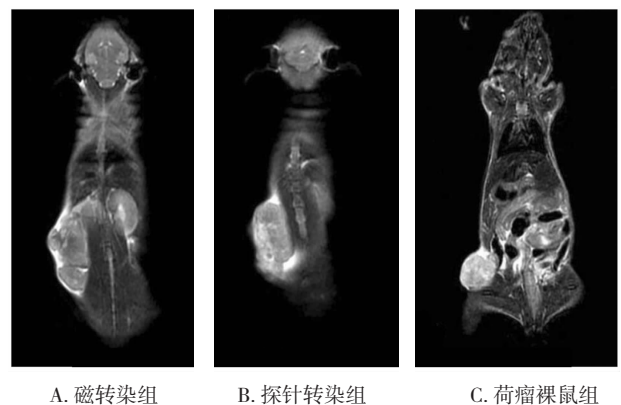


图 3 各组间 T2WI 肿瘤组织信号强度变化

Fig.3 Diagram of signal intensity T2WI FSE in tumor tissues in different groups

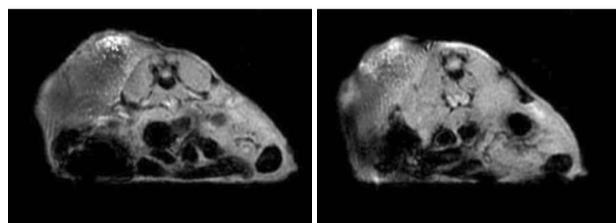
2.2.3 T2*GRE 序列信号强度变化 各组间肿瘤组织信号强度差异具有统计学意义($F=187.758, P=0.000$), 其中磁转染组、探针转染组较空白对照组肿瘤组织信号强度下降明显, 差异具有统计学意义($P=0.000$), 磁转染组较探针转染组更明显, 差异具有统计学意义($P=0.000$); 磁转染组肌肉组织信号强度较其余 2 组信号强度有所下降, 差异有统计学意义($F=200.514, P=0.000$), 见表 3、图 4。

表 3 各组间 T2*GRE 肿瘤组织及肌肉组织信号强度

Tab.3 Signal intensity of T2*GRE in tumor tissues and near muscle tissues in different groups

分组	磁转染组	探针转染组	荷瘤裸鼠组	F 值	P 值
肿瘤组织	336 ± 36	436 ± 32	647 ± 35	187.758	0.000
肌肉组织	418 ± 22	594 ± 27	610 ± 25	200.514	0.000

注: 信号强度以灰度值表示



A. 磁转染组

B. 探针转染组

C. 荷瘤裸鼠组

图 4 各组间 T2*GRE 肿瘤组织信号强度变化

Fig.4 Diagram of signal intensity T2*GRE in tumor tissues in different groups

2.3 病理结果

由图 5 可见, 各组肿瘤组织 HE 染色结果相仿, 均见肿瘤组织结构紊乱, 瘤细胞形态不规则, 中央呈“瘤巢”样改变, 细胞核异型性增多, 部分见核分裂相; 而各组肌肉组织未见明显变形、坏死等征象。

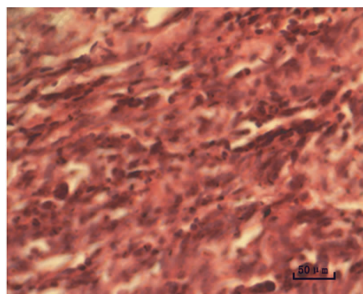
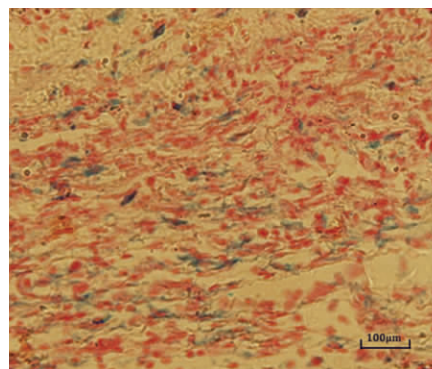


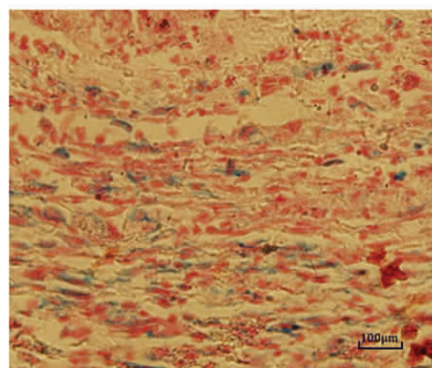
图 5 肿瘤组织 HE 染色 (400 ×)

Fig.5 HE staining images (400 ×)

普鲁士蓝染色显示, 磁转染组及探针转染组肿瘤组织中存在蓝染铁颗粒, 其中磁转染组铁颗粒表达更为丰富, 且多呈中央聚集 (图 6); 仅磁转染组肌肉组织中存在少量蓝染铁颗粒, 其余各组肌肉组织中未见蓝染改变; 磁转染组及探针转染组中肝脏、脾脏少许存在蓝染颗粒, 而荷瘤裸鼠组中未见蓝染颗粒影。



A. 磁转染组普鲁士蓝染色 (200 ×)



B. 探针转染组普鲁士蓝染色 (200 ×)

图 6 普鲁士蓝染色结果

Fig.6 Results of prussian blue staining

3 讨论

本课题组将 RNA 干扰技术与分子影像学相结合, 以卵巢癌中特异性高表达的表皮生长因子受体作为研究靶点, 采用葡聚糖修饰后的 SPIO 连接多聚赖氨酸 (以增加探针亲和力与降低探针细胞毒性等), 形成特异性靶向作用于表皮生长因子受体中短发夹 shRNA 的纳米级 SPIO-shRNA 分子探针^[7]。SPIO 中所含有的 Fe_2O_3 可缩短周围组织中磁场弛豫时间, 使得 MR 成像信号改变, 尤其以 T2 及 T2* 信号改变最为明显, 易于人们判断病变与正常组织^[10]。而 RNA 干扰理论则是多个小片段 shRNA 沉默靶向 mRNA (即卵巢癌肿瘤组织蛋白表达产物),

从而抑制卵巢癌肿瘤组织增生、阻止癌细胞扩散^[11]。

有相关文献^[12]报道指出通过外加磁场可使体外细胞磁转染率得到显著提升,而 Krötz 等^[13]将铁转染技术与反义寡核苷酸结合并作用在小鼠动物体内,利用反义寡核苷酸转染至脐静脉上皮细胞,经过股动脉输入小鼠体内,同时采用荧光显微镜进行观察,探究出由于磁性转染作用使得小鼠体内细胞转染率得以提高。由此可见磁性转染技术应用于体内外已取得了较好的成效,能够提高细胞内铁含量,达到 MR 成像效果。在前期实验得出分子探针最佳扫描时间^[8]的基础上,本次实验构建外加磁性转染环境,将磁性物质紧贴于磁转染组肿瘤组织区域 20 min,观察到磁转染组裸鼠肿瘤组织信号强度在 T2WI 及 T2*GRE 序列上较其余各组明显降低,且易于区分肿瘤组织与正常骨骼肌,这些结果表明在外加磁场的作用下,能够提高 SPIO-shRNA 分子探针作用于靶向肿瘤组织的有效浓度,这与 Huang 等^[14]所观察到磁转染大鼠心脏左前室壁导致相应区域 T2 梯度回波序列信号减低趋势相一致,同时该作者还通过荧光信号结果间接表明钆铁硼磁体在靶区有增强细胞滞留的效应。值得注意的是,本研究中 T2*GRE 序列所见到磁转染组肌肉组织信号降低,笔者推测可能是由于磁转染组中部分骨骼肌受磁性转染作用,导致部分探针浓聚于肌间隙中,从而改变 MR 信号,这将在后续的实验中进行研究。课题组前期动物体内药代动力学研究表明,分子探针主要代谢脏器为肝脏、脾脏等,而肾脏信号强度差异不具有统计学意义^[3],因此未设置肾脏病理染色,而血液标本因实验条件受限易污染等原因,从而掩盖实验结果的真实性,其研究有待后续实验中完善。

本研究通过比对 MR 扫描结果,观察到在外加磁场效应的作用下,磁转染组肿瘤组织信号强度与探针转染组、荷瘤裸鼠组相比,其 T2、T2* 信号强度下降明显,差异具有统计学意义,反映出 SPIO 中的 Fe₂O₃ 较多地滞留在肿瘤组织内,通过三价铁离子改变周围组织所处磁场环境,缩短弛豫时间从而降低信号得以显影,这也从侧面证实该分子探针在外加磁场作用下其转染有效浓度得到提高。同时,普鲁士蓝染色也表明在磁转染组中铁含量更为丰富,与 MR 成像相互印证。因此,外加磁场能够促使 SPIO-shRNA 分子探针易于透过肝脏、脾脏等主要脏器吞噬

作用,提高探针靶向作用于肿瘤组织的有效浓度。

由于实验设备及各方面的因素受限制,本次实验就外加磁场对活体动物体内的影响作出研究,而关于最佳扫描序列以及最佳外部磁场强度等问题也将是未来研究的重要方向。

参 考 文 献

- [1] 李 易,文曦琳,孙红武,等. 超顺磁性氧化铁(SPIO)与多聚赖氨酸(PLL)纳米粒的制备、结构验证及其空间结构表征[J]. 复旦学报:医学版,2014,41(3):309-314.
- [2] 邓小林,吴晓凤,廖蓁堃,等. MR 成像活体示踪 SPIO-shRNA 分子探针的生物分布[J]. 四川大学学报(医学版),2016,47(4):516-521.
- [3] 邓小林,葛晓东,吴晓凤,等. SPIO-shRNA 双功能分子探针药动学及活体 MR 成像研究[J]. 药学报,2015,50(10):1285-1289.
- [4] Prosen L, Prijic S, Music B, et al. Magnetofection: a reproducible method for gene delivery to melanoma cells[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013:209452.
- [5] 陈晓丹,郑 洁,李成鹏,等. 外磁场作用下 SPIO 标记脂肪干细胞经尾静脉移植治疗急性脑缺血[J]. 激光杂志,2013,34(4):95-97.
- [6] 王正雄,刘 敏,陈华英,等. 磁性抗体转染结肠癌干细胞的最佳浓度探索[J]. 重庆医科大学学报,2016,41(10):1051-1055.
- [7] 文曦琳,李 易,葛晓东,等. SPIO-PLL-pshRNA 分子探针转染卵巢癌 SKOV3 细胞及 MR 成像研究[J]. 重庆医科大学学报,2014,39(4):506-510.
- [8] 廖蓁堃,邓小林,曾丹妮,等. SPIO-shRNA 分子探针注射不同时间点荷瘤裸鼠肿瘤区域组织信号变化及 MRI 最佳扫描时间[J]. 吉林大学学报(医学版),2016,42(6):1220-1225.
- [9] 温志鹏,刘海燕,文 明,等. SPIO 标记的 c-erbB2 反义探针用于活体荷瘤裸鼠 MRI 的最佳扫描浓度[J]. 南方医科大学学报,2013,33(4):496-501.
- [10] Hu SL, Lu PG, Zhang LJ, et al. In vivo magnetic resonance imaging tracking of SPIO-labeled human umbilical cord mesenchymal stem cells[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(3):1005-1012.
- [11] Goldberg MS. siRNA delivery for the treatment of ovarian cancer[J]. Methods, 2013, 63(2):95-100.
- [12] Laurentt N, Sapet C, Le GL, et al. Nucleic acid delivery using magnetic nanoparticles: the Magnetofection technology[J]. Ther Deliv, 2011, 2(4):471-482.
- [13] Krötz F, De WC, Sohn HY, et al. Magnetofection—a highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo[J]. Mol Ther, 2003, 7(5 Pt 1):700-710.
- [14] Huang Z, Shen Y, Sun A, et al. Magnetic targeting enhances retrograde cell retention in a rat model of myocardial infarction[J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(6):149.

(责任编辑:罗 萍)