

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.22.006

VEGF 靶向分子探针的制备及对卵巢癌细胞 SKOV3 体外成像的初步研究 *

陈琳¹ 刘静² 沙田添¹ 杨延延³ 潘奇^{3Δ}

(1 西安医学院第二附属医院妇科 陕西 西安 710038;

2 西安医学院第二附属医院门诊办 陕西 西安 710038; 3 西安医学院第二附属医院影像科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:制备分子探针 VEGF-USPIO 和研究其在体外对卵巢癌细胞的靶向成像作用。**方法:**采用化学偶联法将 VEGF 抗体与 USPIO 连接,构建成具有免疫活性的靶向分子探针 VEGF-USPIO。用 CCK-8 法检测该探针对于卵巢癌细胞株 SKOV3 细胞活性的影响;普鲁士蓝染色法检测细胞磁性标记情况,并对经过标记的细胞进行体外磁共振成像,观察其对磁共振信号强度的影响。**结果:**成功合成了分子靶向探针 VEGF-USPIO;当探针浓度在 60 $\mu\text{g/mL}$ 及以下时对细胞活性无影响($P>0.05$);细胞普鲁士蓝染色结果显示标记了靶向探针 VEGF-USPIO 的细胞其胞膜及胞浆含铁颗粒沉积较多;细胞体外磁共振成像结果显示经靶向探针标记的细胞, T2WI 信号强度较未标记探针的对照组细胞降低($P<0.05$)。**结论:**所合成的 VEGF-USPIO 通过磁共振信号强度的变化实现 MRI 成像。

关键词:血管内皮生长因子;卵巢癌;超小型超顺磁性氧化铁;分子成像

中图分类号:R-33; R737.31 文献标识码:A 文章编号: 1673-6273(2018)22-4229-04

Preparation of VEGF Targeted Molecular Probes and Preliminary Study on *in Vitro* Imaging of Ovarian Cancer Cells SKOV3*

CHEN Lin¹, LIU Jing², SHA Tian-tian¹, YANG Yan-yan³, PAN Qi^{3Δ}

(1 Department of gynaecology, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

2 Outpatient office, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

3 Department of Radiology, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To prepare a specific targeting VEGF-USPIO molecular probe and explore its target imaging effect on ovarian cancer cells in vitro. **Methods:** The VEGF antibody was ligated with USPIO using a chemical coupling method to construct an immunologically active targeting molecule probe VEGF-USPIO. The effect of the probe on the activity of ovarian cancer cell line SKOV3 by CCK-8 assay. The Prussian blue staining method was used to detect the magnetic labeling of the cells, and the labelled cells were subjected to in vitro magnetic resonance imaging to observe their influence on the magnetic resonance signal intensity. **Results:** The molecular targeting probe VEGF-USPIO was successfully synthesized. The results of cytotoxicity test showed that it had no effect on cell viability when the probe concentration was 60 $\mu\text{g/mL}$ or less, ($P>0.05$); Prussian blue staining showed that the cells labeled with VEGF-USPIO targeting probe had more deposition of iron-containing particles in the plasma membrane and cytoplasm. *In vitro* magnetic resonance imaging (MRI) showed that the T2WI signal intensity of the cells labeled with the targeted probe was lower than that of the control cells without the labeled probe ($P<0.05$). **Conclusion:** The synthesized molecularly-targeted probe VEGF-USPIO achieve specific MRI imaging through changes in signal intensity.

Key words: VEGF; Ovarian cancer; USPIO; Molecular imaging

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)22-4229-04

前言

对卵巢癌的早期发现和早期诊断为提升患者生存率的关键^[1]。目前对于卵巢癌的诊断主要包括影像学检查和血清肿瘤标志物测定,其中磁共振(Magnetic Resonance, MR)作为常用的影像学检查方法,具有高软组织分辨率、无电离辐射等优点。

但因其成像敏感性相对稍差,在卵巢癌的早期诊断方面仍具有一定的局限性^[2]。近年来,分子影像学的飞速发展对卵巢癌的早期诊断提供了新的思路。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)是一类高度特异性的促血管生成因子,能够刺激肿瘤血管内皮细胞增生,与恶性肿瘤的发生、发展、转移等生物学特性密切相关^[3,4]。研究表明,VEGF 在卵巢癌

* 基金项目:陕西省科技厅社会发展攻关项目(2016SF-295);陕西省教育厅专项科研资助项目(16JK1662)

作者简介:陈琳(1982-), 硕士, 主治医师, 研究方向:妇科肿瘤的分子机制研究, 电话: 18991307331, E-mail: 28110705@qq.com

Δ 通讯作者:潘奇, E-mail: 1287346579@qq.com

(收稿日期:2018-05-28 接受日期:2018-07-12)

组织中高表达,而在正常卵巢组织中低表达或不表达^[9]。本研究目的以 VEGF 为靶向分子,以超小型超顺磁性氧化铁纳米粒子 (Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles,USPIO) 作为载体,制备成具有特异性的 MR 分子探针 VEGF-USPIO,用探针标记卵巢癌细胞 SKOV3,通过磁共振体外细胞成像,观察所制备探针的靶向性,并探讨其理化特性及在体外对卵巢癌细胞的特异性成像作用,为寻找卵巢癌的早期诊断方法提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

超小型超顺磁性氧化铁粒子 (USPIO,20-30 nm 粒径,0.2 mol Fe/L) 购自美国 guerbet 公司,VEGF 单克隆抗体购于 abcam 公司,人卵巢癌细胞株 SKOV3 购自于上海细胞库,PBS 缓冲液、胎牛血清、McCoy's 细胞培养基均购自美国 Gibco 公司,Cell counting kit-8(CCK-8) 试剂盒、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)及普鲁士蓝试剂盒均购于 Sigma 公司,GE 公司 3.0T MR 成像设备。

1.2 方法

1.2.1 VEGF 靶向 USPIO 分子探针的构建 分别取两个 1.5 mL 的 EP 管,其中一管加入 5 μ L 兔抗人及抗大鼠 VEGF 单克隆抗体及 200 μ L PBS,充分混匀。另一管中加入同等体积的 PBS。两管内分别加入 EDC 1 mg,混匀后加入 USPIO 200 μ L,37 $^{\circ}$ C 振荡过夜。次日,在强力磁铁吸引下,将两管内容物用 PBS 洗涤 3 次,再次加入 PBS 溶液 400 μ L,充分混匀备用。

1.2.2 细胞毒性实验 将对数生长期的 SKOV3 细胞用 0.25 %胰酶消化计数,以 10^3 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板,置于 37 $^{\circ}$ C,5 %CO₂ 细胞培养箱中常规培养 24 小时,待细胞贴壁后,弃去孔内培养液,实验组加入之前制备好的含有 VEGF-USPIO 靶向探针的 McCoy's 培养基 100 μ L,浓度梯度分别为 20、40、60、80 μ g/mL。对照组加入纯 McCoy's 培养基 100 μ L,每组设置 3 个复孔。继续放置细胞培养箱常规培养,24 小时后取出培养板,每孔加入 20 μ L CCK-8 试剂,继续培养 2 小时,酶标仪测定 490 nm 波长各孔的 OD 值,无细胞的纯培养基作为空白对照。细胞活性=[(实验组细胞 OD 值-空白对照 OD 值)/(对照组细胞 OD 值-空白对照 OD 值)] $\times$ 100 %。

1.2.3 细胞普鲁士蓝染色 SKOV3 细胞常规消化计数,以每孔 10^5 个细胞的密度接种于放有干净盖玻片的四孔板中,加入含 10 %胎牛血清的 McCoy's 培养基,放入细胞培养箱中常规培养至细胞铺满盖玻片。取出培养板,选取两孔加入 30 μ L 铁浓度为 60 μ g/mL 的靶向探针 VEGF-USPIO,另外两孔加入 30 μ L 非靶向探针 USPIO 作为对照。再次将培养板放入培养箱,常规培养 1 小时后取出盖玻片,PBS 清洗 3 遍,4 %多聚甲醛固定 30 分钟,再次用 PBS 冲洗 3 次,加入 2 %亚铁氰化钾和等体积 2 %盐酸,30 分钟后用 PBS 冲洗 3 次,0.1 %核固红复染 20 分钟,PBS 冲洗后晾干,中性树胶封片,光学显微镜下观察。

1.2.4 细胞悬液 MR 成像分析 取对数生长期的 SKOV3 细胞,常规消化计数,以 10^5 个细胞/孔的密度接种于 6 孔板,常规培养 24 小时。待细胞贴壁后,选择三孔分别加入 20、40、60 μ L 铁浓度为 60 μ g/mL 的 VEGF-USPIO 靶向探针,另外三孔加入同等剂量的普通培养基作为对照组,继续常规培养。每组设置三个复孔。4 小时后弃去培养基,PBS 洗涤三次后常规胰酶消化,将细胞重悬于含有 10 %明胶的 EP 管中,采用 GE 3.0T MR 进行扫描。另取一 EP 管,加入同等体积蒸馏水作为空白对照。MR 采用 GE 3.0T 磁共振扫描仪和头部采集线圈。T2WI 扫描采用 FSE 序列,参数如下:FOV=24 cm $\times$ 18 cm,矩阵=256 $\times$ 256,TR=2348 ms,TE=118 ms,层厚=2.0 mm。扫描结束后,测量各组细胞 T2WI 信号强度(SI)。

1.2.5 统计学处理 所得实验数据录入 SPSS19.0 统计软件进行统计处理。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。计量资料两组比较采用 t 检验或单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞毒性检测结果

结果表明,浓度为 20、40、60 μ g/mL 的靶向探针分别作用于 SKOV3 细胞,对细胞活性的影响均较小,实验组和对照组的差异均无统计学意义($P>0.05$);当探针浓度达到 80 μ g/mL 时,实验组细胞生长活性明显降低,两组差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。因此,本实验浓度选择 60 μ g/mL 的靶向探针完成后续实验。

表 1 不同浓度探针作用于 SKOV3 细胞后的细胞活性(n=3)

Table 1 The cell activity of different concentration probes after acting on SKOV3 cells(n=3)

Concentration(μ g/mL)	Test group(%)	Control group(%)	t	P
20	88.73 $\pm$ 8.56	89.56 $\pm$ 9.65	0.12	0.907
40	86.22 $\pm$ 7.76	90.73 $\pm$ 5.05	0.84	0.446
60	80.35 $\pm$ 7.06	89.21 $\pm$ 6.08	1.65	0.175
80	74.23 $\pm$ 7.36	89.60 $\pm$ 5.65	2.87	0.046*

2.2 普鲁士蓝染色结果

电镜下观察经普鲁士蓝染色的细胞,发现标记了靶向探针 VEGF-USPIO 的实验组细胞,在其胞膜及胞浆中可见大量蓝色颗粒沉积,而标记非靶向探针的对照组细胞中蓝色颗粒明显少于实验组。见图 1。

2.3 细胞悬液 MR 成像

结果显示,蒸馏水的 T2WI 信号强度为:2565.38 $\pm$ 117.43。与未标记探针的对照组相比,用探针 VEGF-USPIO 标记的实验组细胞 T2WI 信号强度降低,40 μ L 和 60 μ L 剂量的实验组与对照组比较有统计学差异($P<0.05$)。实验组各剂量 T2WI 信

号强度也有统计学差异 ($P<0.05$), 随着探针剂量的增加, 其 T2WI 信号强度逐渐降低。见表 2, 图 2。

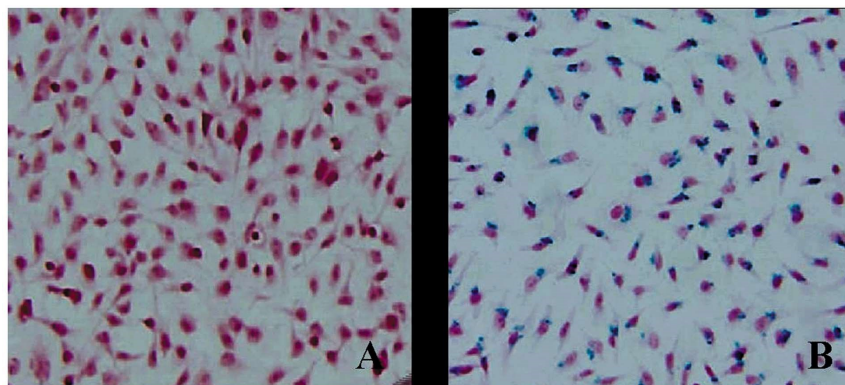


图 1 普鲁士蓝染色各组细胞内蓝染铁颗粒沉积情况 ($\times 200$)

Fig.1 Blue-stained iron particle deposition in Prussian blue stained cells ($\times 200$)

注: A 非靶向 USPIO B 靶向 VEGF-USPIO

A Non-targeting probe USPIO B Targeting Probe VEGF-USPIO

表 2 不同剂量探针标记的实验组与对照组细胞 T2WI 信号强度比较 (n=3)

Table 2 Comparison of T2WI signal intensity between experimental and control groups labeled with different doses of probe (n=3)

Dose (μL)	Test group	Control group	t	P
20	2153.62 $\pm$ 130.52	2361.41 $\pm$ 137.53	1.89	0.131
40	1642.89 $\pm$ 68.56	2295.38 $\pm$ 64.46	12.01	<0.001*
60	848.32 $\pm$ 47.21	2254.73 $\pm$ 98.61	22.28	<0.001*
F	162.5	0.79		
P	<0.001*	0.493		

3 讨论

分子影像学目前已广泛应用于肿瘤的早期诊断和分子靶向治疗疗效评价等方面^[6,7]。而分子成像需具备: 高效的分子探针; 分子探针在体内特异性结合; 信号的有效放大; 高分辨率的成像设备等条件^[8]。其中, 高效、无毒且具有靶向性的分子探针的构建则是重中之重。

为了实现对卵巢癌的特异性分子成像, 首先需要选取一种在卵巢癌组织中高表达, 而在正常卵巢癌组织或卵巢良性肿瘤中不表达或低表达的靶向标志物作为靶点。Zhou^[9]等以叶酸受体 (folate-receptor, FR) 为靶向分子, 建立了特异性液态氟碳对比剂, 与无叶酸标记的传统对比剂在体外与卵巢癌细胞共同培养, 发现叶酸标记组与细胞结合率明显高于传统对比剂组。这一研究充分证实了使用靶向对比剂在肿瘤分子成像中的可行性。Li^[10]等以整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 为靶点, 合成了以其特异性配体 RGD 修饰的氧化铁颗粒作为特异性探针, 通过 MR 成像及荧光同步显像, 观察到该探针能够特异性识别高表达 $\alpha\text{v}\beta 3$ 的肿瘤; 并且观察到其 T2WI 信号强度与所使用探针浓度呈反比。以上研究充分说明选取合适的靶向分子能够实现对卵巢癌的特异性成像, 从而对于寻找卵巢癌的早期诊断方法提供了新的思路。

VEGF 是肿瘤血管生成的重要细胞因子, 其在恶性肿瘤的发生、发展、转移以及腹水形成等方面发挥重要作用^[11]。已有大量研究表明, VEGF 在卵巢癌组织中高表达, 而在正常卵巢组

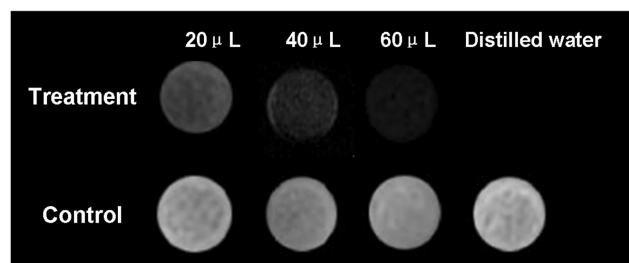


图 2 不同剂量探针标记 SKOV3 细胞后的 MR 体外成像

Fig.2 In vitro imaging of MR after labeling SKOV3 cells with different doses of probes

织或卵巢良性肿瘤组织中不表达或极少表达, 其对于卵巢癌的发生、转移及腹水生成等方面起到关键作用^[12-14]。但是, 以 VEGF 作为靶点用于卵巢癌早期诊断方面的研究目前国内外均少有报导。因此, 本研究选取 VEGF 作为靶点进行卵巢癌分子成像研究, 期望能够对寻找卵巢癌的早期诊断方法提供新的方向。

制备分子探针还需选取合适的对比剂作为载体。MR 靶向对比剂主要分为阳性对比剂和阴性对比剂两种, 其中, 阳性对比剂目前应用较为广泛的为 Gd^{3+} , Mn^{2+} 对比剂; 而阴性对比剂则以超顺磁性氧化铁 (SPIO) 为代表^[15]。USPIO 是一类新型的纳米级的超顺磁性氧化铁微粒, 具有分辨正常组织及肿瘤组织的能力, 可以被网状内皮系统所摄取, 当其在组织中大量聚积时, 能够显著降低该处组织的 T2 信号, 从而产生负性强化, 增加组

织间的对比度,实现特异性成像^[16,17]。但是单纯的 USPIO 对于肿瘤的显像并不具有特异性,因此需要寻找针对某种肿瘤的特异性抗原,制备具有特异性的靶向分子探针,以达到对肿瘤早期诊断的目的。

本研究组选择 VEGF 作为靶向分子制备成卵巢癌特异性靶向探针。对于探针毒性的检测是体外实验研究的基础,若所构建的探针毒性过大,可能会影响目的基因的表达。本研究采用 CCK-8 法检测其细胞毒性,结果显示,当探针浓度在 60 $\mu\text{g/mL}$ 及以下时,细胞活力均在 80%以上,表明在一定浓度范围内,探针对于细胞活性无影响,探针无毒性;而当探针浓度增加至 80 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞活力下降至 74.23%。因此,选择探针最佳浓度为 60 $\mu\text{g/mL}$ 进行后续成像实验。普鲁士蓝染色结果显示大量蓝染颗粒沉积在探针标记过的 SKOV3 细胞表面,表明所制备的靶向探针 VEGF-USPIO 能够主动与 SKOV3 细胞所表达的 VEGF 抗原特异性结合,从而使铁颗粒沉积于细胞膜及胞浆内。通过上述实验可以充分说明,所制备的探针具有无毒,高效的特点,可以用于后续的体外成像实验。最后,将分别标记了靶向探针和未标记探针的 SKOV3 细胞重悬于 10%明胶中进行体外磁共振扫描,结果显示,靶向组较对照组细胞 T2WI 信号强度降低,且随着探针剂量的不断增加,信号强度逐渐降低。上述结果表明,高表达 VEGF 的卵巢癌细胞 SKOV3 可以被所制备的特异性靶向探针 VEGF-USPIO 所标记,并能够通过磁共振信号强度的改变实现细胞的分子靶向成像。

综上所述,本研究成功合成了具有分子靶向性的特异性探针 VEGF-USPIO,并通过实验证实该探针在一定浓度范围内无细胞毒性,在体外可以与高度表达 VEGF 的卵巢癌细胞特异性结合,并通过磁共振信号强度的变化实现靶向成像。还有研究显示,血清 VEGF 含量与患者预后呈正相关,肿瘤术后,血清中 VEGF 含量明显较前下降,是评价肿瘤预后的有意义的指标^[18,19]。因此,本研究组还将用所构建的分子探针用于动物体内成像和卵巢肿瘤分子靶向治疗预后及疗效评价的相关研究。

参考文献(References)

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, et al. Colorectal cancer statistics, 2017[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2017, 67(3): 177-193
- [2] Starmans LWE, Burdinski D, Haex NPM, et al. Iron oxide nanoparticle-micelles (ION-micelles) for sensitive (molecular) magnetic particle imaging and magnetic resonance imaging [J]. PloS one, 2013, 8(2): e57335
- [3] Patterson DM, Gao D, Trahan DN, et al. Effect of MDM2 and vascular endothelial growth factor inhibition on tumor angiogenesis and metastasis in neuroblastoma[J]. Angiogenesis, 2011, 14(3): 255-266
- [4] Komiya E, Sato H, Watanabe N, et al. Angiomodulin, a marker of cancer vasculature, is upregulated by vascular endothelial growth factor and increases vascular permeability as a ligand of integrin $\alpha_v\beta_3$ [J]. Cancer medicine, 2014, 3(3): 537-549
- [5] Chen Y, Zhang L, Liu W, et al. VEGF and SEMA4D have synergistic effects on the promotion of angiogenesis in epithelial ovarian cancer [J]. Cellular & molecular biology letters, 2018, 23(1): 2
- [6] Nilvebrant J, Åstrand M, Georgieva-Kotseva M, et al. Engineering of bispecific affinity proteins with high affinity for ERBB2 and adaptable binding to albumin[J]. PloS one, 2014, 9(8): e103094
- [7] Qawasm I, Shmuel M, Eyal S. Interactions of ABCG2 (BCRP) with epidermal growth factor receptor kinase inhibitors developed for molecular imaging[J]. Frontiers in pharmacology, 2014, 5: 257
- [8] Wilson KE, Wang TY, Willmann JK. Acoustic and photoacoustic molecular imaging of cancer [J]. Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine, 2013, 54(11): 1851-1854
- [9] Zhou Y, Zheng Y, Ran H, et al. Preparation of relate receptor-targeted contrast agent with liquid fluorocarbon nanoparticles encapsuled in lipid membrane and its targeting performance study in vitro[J]. Chin J Med Imaging Technol, 2015, 17: 1189-1196
- [10] Li K, Zhang ZP, Luo M, et al. Multifunctional ferritin cage nanostructures for fluorescence and MR imaging of tumor cells [J]. Nanoscale, 2012, 4(1): 188-193
- [11] Martin L, Schilder R. Novel approaches in advancing the treatment of epithelial ovarian cancer: the role of angiogenesis inhibition [J]. Journal of Clinical Oncology, 2007, 25(20): 2894-2901
- [12] Shen W, Li HL, Liu L, et al. Expression levels of PTEN, HIF-1 α , and VEGF as prognostic factors in ovarian cancer [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(11): 2596-2603
- [13] Graybill W, Sood AK, Monk BJ, et al. State of the science: Emerging therapeutic strategies for targeting angiogenesis in ovarian cancer[J]. Gynecologic oncology, 2015, 138(2): 223
- [14] Monk BJ, Choi DC, Pugmire G, et al. Activity of bevacizumab (rhuMAB VEGF) in advanced refractory epithelial ovarian cancer[J]. Gynecologic oncology, 2005, 96(3): 902-905
- [15] 张紫欣, 梁宇霆, 孟颖. 卵巢癌的 MR 分子成像研究进展[J]. 国际医学放射学杂志, 2015, 38(4): 339-342
- [16] Zhang Zi-xin, Liang Yu-xi, Meng Ying. Progress in MR molecular imaging research of ovarian cancer [J]. International Journal of Medical Radiology, 2015, 38(4): 339-342
- [17] Eamegdool SS, Weible MW, Pham BTT, et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticle prelabelling of human neural precursor cells[J]. Biomaterials, 2014, 35(21): 5549-5564
- [18] Savla R, Garbuzenko OB, Chen S, et al. Tumor-targeted responsive nanoparticle-based systems for magnetic resonance imaging and therapy[J]. Pharmaceutical research, 2014, 31(12): 3487-3502
- [19] Oehler MK, Caffier H. Prognostic relevance of serum vascular endothelial growth factor in ovarian cancer [J]. Anticancer research, 2000, 20(6D): 5109-5112
- [19] Burger RA, Brady MF, Bookman MA, et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer [J]. New England Journal of Medicine, 2011, 365(26): 2473-2483