

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.03.005

文章编号: 1005-8982(2020)03-0022-05

EGFR 靶向性 MRI 探针的制备及其与 NSCC 细胞 靶向结合的研究 *

刘成, 李烁, 张全明

(深圳市南山区人民医院 耳鼻喉科, 广东 深圳 518000)

摘要: **目的** 探讨表皮生长因子受体(EGFR)靶向性磁共振成像(MRI)探针的制备及其与鼻咽部鳞状细胞癌(NSCC)细胞靶向结合的研究。**方法** 利用 NSCC 表面 EGFR 作为靶受体, 构建一种具有 EGFR 靶向性 MRI 探针, 检测探针的性质, 将探针与 NSCC 和正常鼻咽细胞孵育, 进行普鲁士蓝染色、间接免疫荧光及 MRI, 观察铁染色、荧光染色及 T_2WI 信号强度变化, 并计算信号强度变化率。**结果** EGFR 靶向性 MRI 探针的粒径为 $(77.0 \pm 1.5) \text{ nm}$, 超顺磁性氧化铁(SPIO)负载率为 $(306.0 \pm 4.9) \mu\text{g/ml}$, 阿霉素(DOX)负载率为 $(103.3 \pm 3.1) \mu\text{g/ml}$, 弛豫率为 (110.4 ± 2.9) , 提示 EGFR 靶向性 MRI 探针制备成功。EGFR 靶向性 MRI 探针与 NSCC 细胞共孵育后, 细胞内可见不同量的蓝色铁 Fe 颗粒, 随着 SPIO 浓度的升高而增加; EGFR 靶向性 MRI 探针与正常鼻咽细胞共孵育, 细胞内未见明显铁颗粒存在。西妥昔单抗(阳性对照)对 NSCC 细胞膜有强烈的绿色荧光表达, 阴性对照呈现很微弱的绿色荧光表达, EGFR 靶向性 MRI 探针与 DOX 荧光强度相近。随浓度 5、10、20、40 和 80 mg/ml 梯度增高, EGFR 靶向性 MRI 探针 T_1 信号基本无变化, EGFR 靶向性 MRI 探针 T_2 信号强度逐渐减弱, EGFR 靶向性 MRI 探针在 20、40 和 80 mg/ml 3 个时间点比较, T_2 信号强度明显下降, 其中 80 mg/ml 时 T_2 信号强度下降最显著。EGFR 靶向性 MRI 探针与 NSCC 细胞共孵育后 MRI 信号在 T_2WI 上有不同程度的降低 ($P < 0.05$), SPIO 浓度越高 MRI 信号强度降低越明显 ($P < 0.05$)。**结论** EGFR 靶向性 MRI 探针的粒径小, 可降低 MRI 的 T_2 信号强度, 具有高度的靶向性。

关键词: 鼻咽部鳞状细胞癌 / 鼻咽肿瘤; 表皮生长因子受体; 多功能磁共振成像探针

中图分类号: R766.3

文献标识码: A

Preparation of EGFR-targeted MRI probe and its targeted binding to nasopharyngeal squamous carcinoma cells*

Cheng Liu, Shuo Li, Quan-ming Zhang

(Department of Otolaryngology, Nanshan District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

Abstract: Objective To investigate the preparation of epidermal growth factor receptor (EGFR) targeted magnetic resonance imaging (MRI) probe and its targeted binding to nasopharyngeal squamous cell carcinoma (NSCC) cells. **Methods** Using NSCC surface EGFR as a target receptor, a EGFR-targeted MRI probe was constructed to detect the properties of the probe. The probe was incubated with NSCC and normal nasopharyngeal cells for Prussian blue staining, indirect immunofluorescence and MRI, and to observed iron staining, fluorescent staining and T_2WI signal intensity changes, and to calculate signal intensity change rate. **Results** The particle size of the EGFR-targeted MRI probe was $(77.0 \pm 1.5) \text{ nm}$, the SPIO loading rate was $(306.0 \pm 4.9) \mu\text{g/ml}$, and the DOX loading rate was $(103.3 \pm 3.1) \mu\text{g/ml}$. The heave rate Rz was (110.4 ± 2.9) , suggesting that the EGFR-targeted MRI

收稿日期: 2019-08-03

* 基金项目: 深圳市南山区科技计划项目 (No: 2018040); 深圳市科创委知识创新计划 (No: JCYJ20180302144624391)

probe was successfully prepared. After EGFR-targeted MRI probe was co-incubated with NSCC cells, different amounts of blue iron particles were observed in the cells, which increased with the increase of SPIO concentration. EGFR-targeted MRI probes were incubated with normal nasopharyngeal cells, and no obvious iron particles were present inside. Cetuximab (positive control) showed strong green fluorescence expression on NSCC cell membranes, but the negative control showed a very weak green fluorescence expression, and the EGFR-targeted MRI probe was similar to cetuximab. The T_1 signal of the EGFR-targeted MRI probe was almost unchanged with the gradient of 0, 5, 10, 20, 40 and 80 mg/ml, and the T_2 signal intensity of the EGFR-targeted MRI probe was gradually weakened. Compared with the EGFR-targeted MRI probes at 20, 40 and 80 mg/ml, the T_2 signal intensity decreased significantly, and the difference of T_2 signal intensity was the most significant at 80 mg/ml. MRI signal was significantly decreased on T_2 WI after EGFR-targeted MRI probes co-incubated with NSCC cells ($P < 0.05$). The higher the SPIO concentration was, the more obvious the decrease of MRI signal intensity was ($P < 0.05$). **Conclusion** The EGFR-targeted MRI probe has a small particle size, which can reduce the T_2 signal intensity of MRI and has a high degree of targeting.

Keywords: nasopharyngeal squamous cell carcinoma/nasopharyngeal neoplasms; ErbB receptors; multifunctional magnetic resonance imaging probe

鼻咽部鳞状细胞癌 (nasopharyngeal squamous cell carcinoma, NSCC) 早期诊断困难, 大多数诊断时已到晚期, 错过手术最佳时机, 患者的 5 年病死率较高, 接近 30%^[1-2]。负载显影剂、靶向因子和化疗药物的多功能分子影像探针是肿瘤治疗研究的热点及难点, 目前关于 NSCC 靶向显影与治疗多功能载体的研究较少^[3-4]。本研究拟利用 NSCC 表面表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR) 作为靶受体, 构建 EGFR 靶向性的 MRI 探针, 从体外细胞水平探讨探针与 NSCC 细胞靶向结合, 为 NSCC 早期诊治提供思路和技术参考^[5-6]。

1 材料与方 法

1.1 细胞、材料与试剂

NSCC 和正常鼻咽细胞系由中南大学肿瘤研究所曹亚教授提供, 超小型超顺磁性氧化铁 (USPIO) [TANBead[®] USPIO-101 (台湾先进纳米科技股份有限公司) 核心为四氧化三铁 Fe_3O_4 纳米颗粒 (Fe 浓度为 10 mg/ml), 大小为 6 ~ 10 nm, pH 值为 (3.8 ± 0.5)], 阿霉素 (北京百奥莱博科技有限公司, HPLC $\geq 99.0\%$), 西妥昔单抗 (Cetuximab, CET, 德国默克里昂制药公司, 规格 100 mg : 50 ml), 甲醇分析纯 (上海国药集团化学试剂有限公司), 碳化二亚胺盐酸盐 EDC · HCl (上海品纯试剂有限公司), 明胶和核固红染料 (武汉博士德公司), 标准铁溶液 (GBW08616, 1 000 μ g/ml) (北京国家标准物质研究中心), 亚铁氰化钾分析纯 (天津市化学试剂三厂), 胰酶、EDTA (美国 Amresco 公司)。

1.2 主要设备

光学显微镜 (日本 Olympus 公司), 免疫荧光显微镜 (同济医院公共实验室), 磁性分离器 (台湾先进纳米科技股份有限公司), 4.7 T/30 cm 小动物磁共振成像仪 (德国 Bruker Biospec 公司), 普通细胞培养箱 (美国科俊仪器有限公司), JP-C50 型超声波振荡仪 (广州市吉普超声波电子设备有限公司), JI80-2 型台式离心机 (武汉市首义医疗器械厂), HPIAS21000 型全自动医学彩色图像分析系统 (武汉华中科技大学同济医学院病理教研室)。

1.3 方法

1.3.1 EGFR 靶向性 MRI 探针的制备 将萘、钾和丙烯醇溶解于四氢呋喃溶液, 然后加入环氧乙烷及正己烷, 利用阴离子开环聚合反应合成一端为烯丙基另一端为羟基的聚乙二醇 (Allyl-PEG-OH), 通过烯丙基聚乙二醇的羟基端引发己内酯开环聚合为烯丙基聚乙二醇聚己内酯共聚物 (Allyl-PEG-PCl), 利用烯丙基和 2-氨基乙基硫醇盐酸盐的水相加成将烯丙基转化为氨基, 得到 α -氨基聚乙二醇聚己内酯共聚物 (NH₂-PEG-PCl), 用叶酸修饰得到叶酸功能化的聚乙二醇聚己内酯共聚物 (Fa-PEG-PCl)^[7]。合成疏水型 Fe_3O_4 纳米粒子 (SPION), 将疏水型 Fe_3O_4 纳米粒子表面改性, 制备亲水型 Fe_3O_4 纳米粒子 (WSPIO), 加入阿霉素 (2 mg/ml) 376 μ l 混匀, 后加入 7.52 mg EDC · HCl, 然后采用溶剂挥发法制备负载超顺磁性氧化铁 (SPIO) 的聚合物胶束, 得到表面亲水、内部疏水的 EGFR 靶向性 MRI 探针。

1.3.2 EGFR 靶向性 MRI 探针理化特性的分析 探针的表征包括: 粒径、SPIO 和阿霉素 (Doxorubicin, DOX) 负载率、弛豫率。应用透射电子显微镜 (trans-

mission electron microscope, TEM) 测量探针的粒径, 采用原子吸收法测定 SPIO 的含量, 将已知重量的 SPIO 分散到 1 mol/L HCl 溶液中, 使 SPIO 分解为铁离子并溶解在溶液中, 根据已经建立的标准曲线, 测定 280 nm 处的吸收得到 DOX 的负载, 测定 248.3 nm 处的吸收, 计算出铁含量, 用氧化铁的质量除以胶束的总质量, 得到 SPIO 的负载率。通过 MR 扫描仪行常规 T₂ 和 T₂ mapping 序列成像, 扫描参数设置: 回波时间分别取 8.50、17.00、25.50、34.00、42.50、51.00、59.50 及 68.00 ms, 重复时间 1 055 ms, 视野 10 cm × 10 cm, 层厚与层间距均为 5 mm, 矩阵 256 × 256。观察 T₂ 信号强度在探针溶液不同浓度 (0、0.10、0.30、0.60、0.90、1.80 nmol/L) 下的改变情况, 获得 1/T₂ 值, 计算弛豫率。

1.3.3 NSCC 的培养 在 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 饱和湿度下, 采用 RPMI 1640 培养液 [含青霉素钠 (100 u/ml)、链霉素 (100 u/ml) 及小牛血清 (100 μg/ml)] 进行 NSCC 和正常鼻咽细胞传代培养。

1.3.4 普鲁士蓝染色 将 SPIO 浓度分别为 5、10、20、40 和 80 μg/ml 的 EGFR 靶向性 MRI 探针分别与 NSCC 细胞及正常鼻咽细胞 (细胞计数 5 × 10⁵ 个) 在 RPMI 1640 培养液中共孵育 1 h, 之后用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次, 用 4% 戊二醛固定 10 min, 采用普鲁士蓝反应液孵育 30 min, 蒸馏水洗 3 次, 伊红 (0.5%) 复染 3 min, 显微镜下观察 Fe 染色情况^[8]。

1.3.5 间接免疫荧光检测 将等量 NSCC 细胞接种在 24 孔板中, 并培养 1 d。当 NSCC 细胞铺满玻片时, 采用冰甲醇进行固定, 10 min 后采用 PBS 洗玻片 3 次, 正常兔血清室温封闭。40 min 后, 向各玻片分别加入 EGFR 靶向性 MRI 探针、西妥昔单抗及 PBS。置入 4℃ 湿盒 1 d。次日采用 PBS 洗玻片 3 次, 加入含有 FITC 标记的兔抗人 IgG (避光), 室温孵育。采用 Hoechst 33258 避光染色, 采用 PBS 洗玻片 3 次, 脱水、封片、荧光显微镜观察。

1.3.6 细胞的 MRI 肿瘤磁敏感成像 在 RPMI 1640 培养液中加入 EGFR 靶向性 MRI 探针 (SPIO 分别为 0、5、10、20、40 和 80 μg/ml) 分别与 NSCC 细胞及正常鼻咽细胞孵育 1 h, 消化、洗涤、重悬细胞, 置于 1.5 ml Ependoff 管中采用 MRI 扫描^[9]。采用 Philips Intera 3T MRI 系统, 环形表面线圈 (C3 线圈) 行轴面及冠状面扫描, T₂WI 采用快速自旋回波 (FSE) 系列, TE 100 ms, TR 1 600 ms, 层厚 1.5 mm, 矩阵 384 × 512, 4 次激励。选择相似的兴趣区测量 6 个信号强度, 计算信号变化率 (Δ SI), Δ SI = [(SIL - SIU) / SIU] × 100%, SIL 为 EGFR 靶向性 MRI 探针与细胞共

孵育后的信号强度, SIU 为细胞信号强度。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用单因素方差分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFR 靶向性 MRI 探针的理化特性

EGFR 靶向性 MRI 探针的粒径为 (77.0 ± 1.5) nm, SPIO 负载率为 (306.0 ± 4.9) μg/ml, DOX 负载率为 (103.3 ± 3.1) μg/ml, 弛豫率为 (110.4 ± 2.9), 提示 EGFR 靶向性 MRI 探针制备成功。见图 1、2。

2.2 普鲁士蓝染色结果

EGFR 靶向性 MRI 探针与 NSCC 细胞共孵育后, 细胞内可见不同量的蓝色 Fe 颗粒, 随着 SPIO 浓度的升高而增多; EGFR 靶向性 MRI 探针与正常鼻咽细胞共孵育, 细胞内未见明显 Fe 颗粒存在。见图 3。

2.3 EGFR 靶向性 MRI 探针对 NSCC 细胞的免疫结合活性

西妥昔单抗 (阳性对照) 在 NSCC 细胞膜有强烈的绿色荧光表达, 阴性对照呈现很微弱的绿色荧光表达, EGFR 靶向性 MRI 探针与西妥昔单抗荧光强度相近。见图 4。

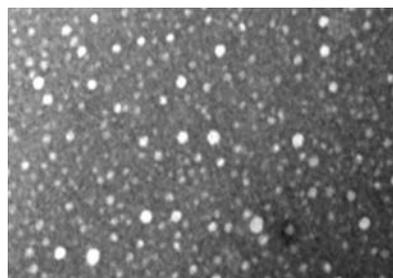


图 1 EGFR 靶向 MRI 探针的 TEM 图 (× 200)

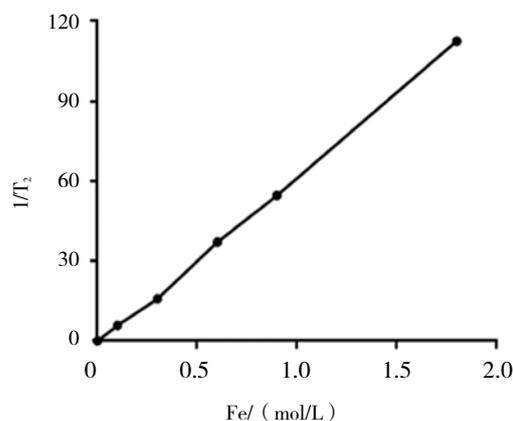


图 2 弛豫曲线

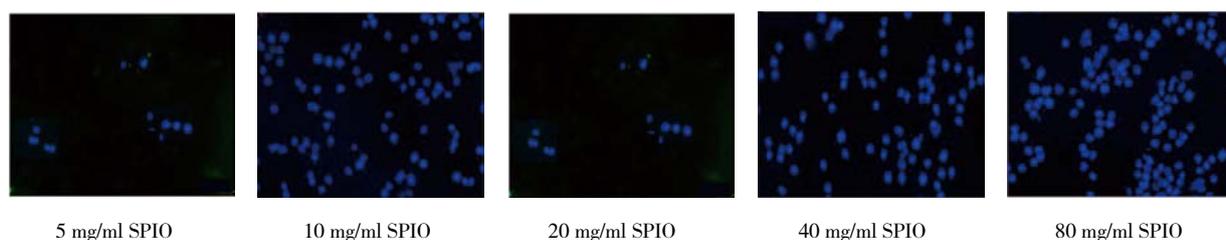
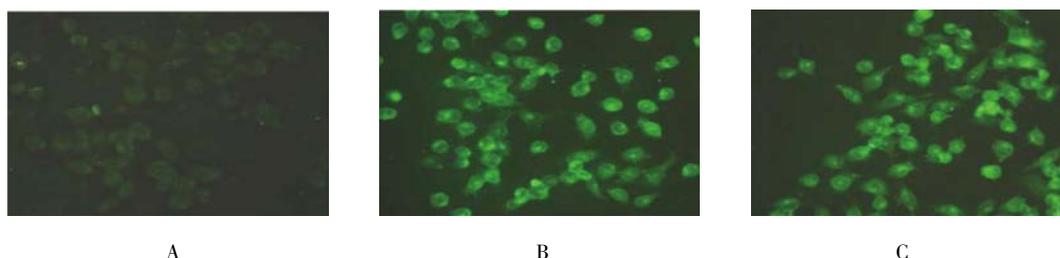


图 3 NSCC 细胞内可见不同量的蓝色 Fe 颗粒 (普鲁士蓝染色 × 200)



A: 阴性对照 (PBS); B: 阳性对照 (西妥昔单抗); C: EGFR 靶向性 MRI 探针。
图 4 3 组 NSCC 细胞内不同的绿色荧光表达 (Hoechst 33258 染色 × 200)

2.4 体外 MRI

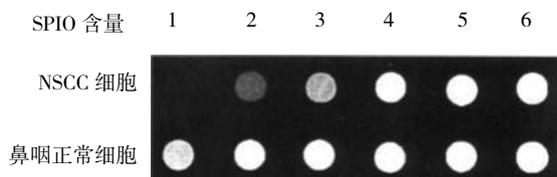
随浓度 0、5、10、20、40 和 80 mg/ml 梯度升高, EGFR 靶向性 MRI 探针 T₁ 信号基本无变化, EGFR 靶向性 MRI 探针 T₂ 信号强度逐渐减弱, EGFR 靶向性 MRI 探针在 20、40 和 80 mg/ml 3 个浓度点比较, T₂ 信号强度明显下降, 其中 80 mg/ml T₂ 信号强度下降最显著 (见图 5)。EGFR 靶向性 MRI 探针与 NSCC 细胞

共孵育后 MRI 信号在 T₂WI 上有不同程度的减低 ($P < 0.05$), SPIO 浓度越高 MRI 信号强度减弱越明显 ($P < 0.05$)。见表 1。

3 讨论

NSCC 发病机制尚不明确, 是临床常见的耳鼻咽喉恶性肿瘤之一^[10-12]。临床上, 放疗是 NSCC 治疗的主要手段。研究表明, 单纯放疗治疗各期 NSCC 的 5 年总生存率可达 70%。为此, 制定合理的放疗靶区是提高 NSCC 治愈率的关键因素。MRI 具有良好的软组织对比性及空间分辨率, 能较好地诊断 NSCC, 但常规的 MRI 常用的造影剂钆 (Gd-DTPA) 未分布在特殊的靶向器官, 只对 T₁ 信号增强, 并未能显示亚临床病灶。USPIO 是一种粒径小、具有超顺磁性、敏感性高、毒性低和生物可降解的新型磁性纳米生物材料, 常用于恶性肿瘤的影像诊断中。相关研究表明, NSCC 的 EGFR 表达水平 $\geq 85%$ ^[13]。EGFR 是一种已知分子量为 170 ~ 180 kD 的糖蛋白单体, 其与配基结合后, 可提高络氨酸激酶活性, 从而吸引具有 SH2 区域的信号分子, 进而启动细胞分裂、信号传递、DNA 复制、基因转录等一系列变化, 具有促进细胞增殖、黏附、侵袭及其转移, 进而诱导形成肿瘤的作用^[14]。因此, 制备 EGFR 靶向性 MRI 探针针对高表达 EGFR 的 NSCC 进行 MRI 免疫显像理论上是可行的。

本研究自行制备 EGFR 靶向性 MRI 探针, 观察其对 EGFR 表达阳性的 NSCC 细胞的主动靶向作用, 即



1: 80 μg/ml; 2: 40 μg/ml; 3: 20 μg/ml; 4: 10 μg/ml; 5: 5 μg/ml; 6: 0 μg/ml。

图 5 体外 MRI

表 1 不同浓度 SPIO 与 NSCC 细胞孵育后在 T₂WI 上信号变化情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

SPIO	MRI 信号强度	信号变化率 /%
5 μg/ml	1 557.00 ± 94.00	0.00 ± 0.00
10 μg/ml	1 456.00 ± 46.00	-5.01 ± 2.15
20 μg/ml	1 216.00 ± 41.00	-23.52 ± 4.26
40 μg/ml	842.00 ± 30.00	-46.26 ± 12.13
80 μg/ml	118.00 ± 56.00	-89.52 ± 32.15
F 值	612.177	33.231
P 值	0.000	0.000

配体介导、位点特异性的纳米复合物在肿瘤细胞中的聚集, 探讨靶向性。将不同浓度 SPIO 的 EGFR 靶向性 MRI 探针与 NSCC 细胞孵育, 通过普鲁士蓝染色、间接免疫荧光和 MRI 观察 NSCC 细胞对 EGFR 靶向性 MRI 探针的摄取情况, 结果显示, 普鲁士蓝染色证实 EGFR 靶向性 MRI 探针对 NSCC 细胞的靶向摄取依赖于 SPIO 浓度, 西妥昔单抗 (阳性对照) 在 NSCC 细胞膜有强烈的绿色荧光表达, 阴性对照呈现很微弱的绿色荧光表达, 提示阳性对照 NSCC 细胞膜 EGFR 高表达, 阴性对照是非特异性结合导致; EGFR 靶向性 MRI 探针细胞膜有强烈的绿色荧光表达, EGFR 靶向性 MRI 探针组与西妥昔单抗荧光强度相近, 说明 EGFR 靶向性 MRI 探针有良好的免疫活性和结合活性, EGFR 靶向性 MRI 探针可特异性结合进入 NSCC 细胞内, 从而降低 MRI T_2 信号强度。

综上所述, EGFR 靶向性 MRI 探针的粒径小, 可降低 MRI 的 T_2 信号强度, 具有高度的靶向性。EGFR 靶向性 MRI 探针为 NSCC 的早期准确诊断和治疗提供新的思路和技术, 其 NSCC 体内示踪有利于复发、转移病灶的早期检出, 可在准确诊断的同时进行联合化疗, 值得推广。

参 考 文 献:

- [1] 倪良平. 3.0T 磁共振动态增强与弥散加权成像对鼻咽癌临床分期诊断价值的研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.
- [2] SHANMUGARATNAM K, CHAN S H, DE-THÉ G, et al. Histopathology of nasopharyngeal carcinoma: correlations with epidemiology, survival rates and other biological characteristics[J]. *Cancer*, 2015, 44(3): 1029-1044.
- [3] 唐洪, 杨凯, 赵成, 等. 近红外荧光量子点表皮生长因子受体单克隆抗体探针对头颈部鳞状细胞癌活体可视化成像和体内分布的动物实验研究 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2016, 30(6): 568-573.
- [4] WANG L J, LI H S, WANG Q S, et al. Construction and evaluation of the tumor-targeting, cell-penetrating multifunctional molecular probe iCREKA[J]. *Contrast Media Mol I*, 2018, 2018(2): 1-11.
- [5] THAVARAJ S. Human papillomavirus-associated neoplasms of the sinonasal tract and nasopharynx[J]. *Semin Diagn Pathol*, 2016, 33(2): 104-111.
- [6] KIM S H, PARK S E, BAE H G, et al. Epithelial-myoepithelial carcinoma of the nasopharynx: a case report and review of the literature[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(2): 927.
- [7] CHEN L, QIAN M, ZHANG L, et al. Co-delivery of doxorubicin and shRNA of Beclin1 by folate receptor targeted pullulan-based multifunctional nanomicelles for combinational cancer therapy[J]. *Rsc Advances*, 2018, 8(32): 17710-17722.
- [8] VELTMAN J A, HOPMAN A H N, BOT F J, et al. Detection of chromosomal aberrations in cytologic brush specimens from head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Cytopathol*, 2015, 81(5): 309-314.
- [9] DAI Z, MA H, TIAN L, et al. Construction of a multifunctional nanoprobe for tumor-targeted time-gated luminescence and magnetic resonance imaging in vitro and in vivo[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(24): 11597-11603.
- [10] ZHANG P, ZHANG L, LIU H, et al. Clinicopathologic characteristics and prognosis of tongue squamous cell carcinoma in patients with and without a history of radiation for nasopharyngeal carcinoma: a matched case-control study[J]. *Cancer Res Treat*, 2017, 49(3): 695-705.
- [11] LANDRY D, GLASTONBURY C M. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: a review[J]. *Radiol Clin N Am*, 2015, 53(1): 81-97.
- [12] VICENTE N, TAYLOR M, BARROS L, et al. Indirect immunofluorescence for detection of pituitary antibodies[J]. *Wild Environ Med*, 2015, 16(3): 173-174.
- [13] YANG R, WU Y, ZOU J, et al. The Hippo transducer TAZ promotes cell proliferation and tumor formation of glioblastoma cells through EGFR pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(24): 36255-36265.
- [14] OH S, KIM H, NAM K S, et al. Glut1 promotes cell proliferation, migration and invasion by regulating epidermal growth factor receptor and integrin signaling in triple negative breast cancer cells[J]. *Bmb Reports*, 2017, 50(3): 132-137.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 刘成, 李烁, 张全明. EGFR 靶向性 MRI 探针的制备及其与 NSCC 细胞靶向结合的研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(3): 22-26.