

## ❖ 实验研究

## MRI observation on lymphatic endothelial cell labeled by GoldMag and anti-podoplanin antibody in vitro

ZHANG Song, ZOU Li-guang\*, ZHANG Dong, YANG Hua, QI Yue-yong, LIANG Kai-yun  
(Department of Radiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**[Abstract]** **Objective** To synthesize molecular probe (GoldMag-pod) which can label lymphatic endothelial cell (LEC), and to investigate the labeling efficiency and MRI enhancement of the molecular probe in vitro. **Methods** GoldMag-pod was synthesized by using single-step coupling process of GoldMag and anti-podoplanin antibody. The coupling efficiency (CE) of GoldMag was determined with UV-Vis spectroscopy. ELISA was performed to evaluate the influence of GoldMag on antibody immunoactivity. The LEC label status of GoldMag-pod was observed with immunofluorescence and Prussian blue staining. After labeling by a range of different concentrations of GoldMag-pod, the variation of GRE T2\* WI signal intensity of the solutions of LEC was investigated. **Results** GoldMag-pod was successfully synthesized, and the CE of GoldMag was 52.94%. The immunoactivity of GoldMag-pod was 42.05% of original antibody. LEC showed green fluorescence after immunofluorescence staining, and the results of Prussian blue staining showed that the positive label rate of LEC increased as the concentration of GoldMag-pod raised up. After labeled by GoldMag-pod, GRE T2\* WI signal intensity of LEC solution decreased significantly. **Conclusion** The molecular probe GoldMag-pod coupled by GoldMag and anti-podoplanin antibody has relative high immunoactivity, which can specifically label LEC and result in targeted enhancement of MR imaging. **[Key words]** Magnetic resonance imaging; Molecular imaging; Molecular probes; PDPN protein, human; Endothelial cells

## MRI 观察金磁微粒结合抗 podoplanin 抗体 体外标记淋巴管内皮细胞

张 松, 邹利光\*, 张 冬, 杨 华, 戚跃勇, 梁开运  
(第三军医大学新桥医院放射科, 重庆 400037)

**[摘 要]** **目的** 制备淋巴管内皮细胞(LEC)靶向分子探针(GoldMag-pod),探讨 GoldMag-pod 对 LEC 的体外标记情况及其在 MR 检查中对信号强度的影响。**方法** 将金磁微粒(GoldMag)与抗 podoplanin 抗体通过“一步法”耦联,制备 GoldMag-pod,以分光光度计检测 GoldMag 的抗体耦联效率,ELISA 法检测抗体与 GoldMag 结合前、后的免疫活性,免疫荧光染色、普鲁士蓝染色检测 GoldMag-pod 对 LEC 的标记情况。用不同浓度 GoldMag-pod 标记 LEC 后,观察 GRE T2\* WI 信号强度的改变。**结果** GoldMag 与抗 podoplanin 抗体通过“一步法”耦联成功,GoldMag 的抗体耦联效率为 52.94%,抗 podoplanin 抗体与 GoldMag 结合后其免疫活力降低为结合前的 42.05%;GoldMag-pod 标记后的 LEC 发出特异性绿色荧光,标记阳性率随 GoldMag-pod 浓度的增高而增高。GoldMag-pod 标记后的 LEC 悬液的 GRE T2\* WI 信号强度明显降低。**结论** GoldMag 与抗 podoplanin 抗体耦联制备的分子探针 GoldMag-pod 具有较高免疫活性,能特异性标记 LEC,产生 MR 靶向增强作用。

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(30770609,81071197)。

**[作者简介]** 张松(1985—),男,江西上饶人,在读硕士。研究方向:磁共振分子成像。E-mail: zhangsong.kele@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** 邹利光,第三军医大学新桥医院放射科,400037。E-mail: zoulg@mail.tmmu.com.cn

**[收稿日期]** 2010-10-05 **[修回日期]** 2010-11-14

[关键词] 磁共振成像;分子成像;分子探针;PDPN 蛋白;人;内皮细胞

[中图分类号] R392-33; R445.2 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2011)02-0237-05

免疫胶体金已广泛应用于免疫组织化学及免疫电镜等领域,它能够通过其表面电荷稳定迅速地吸附蛋白质,而蛋白质的生物活性无明显改变,但将胶体金的这种特性用于磁共振分子探针合成的研究尚不多见。金磁微粒(GoldMag)是一种核壳结构的双功能复合微粒,其核心的超小超顺磁性氧化铁(ultrasmall paramagnetic iron oxide, USPIO)具有 MR 成像增强作用,表面的单体金能将生物大分子耦联于 GoldMag 表面<sup>[1]</sup>。GoldMag 能与抗体经“一步法”结合生成分子探针,减少分子探针合成的步骤和复杂性。淋巴转移是肿瘤转移的常见途径,是决定肿瘤分期分级和治疗方案选择的关键因素。随着淋巴管内皮细胞相关因子研究的进展,探讨淋巴管生成与肿瘤转移扩散的关系已成为肿瘤研究的新热点<sup>[2]</sup>。podoplanin 为生成淋巴管所必需,是淋巴管内皮细胞(lymphatic endothelial cell, LEC)的特异性标记物<sup>[3]</sup>。本实验将 GoldMag 与抗 podoplanin 抗体结合制备成分子探针 GoldMag-pod,探讨其抗体耦联效率(coupling efficiency, CE)、免疫活性以及 GoldMag-pod 体外标记 LEC 后 MR 成像信号强度的改变。

## 1 材料与方 法

1.1 实验材料 GoldMag 生物耦联试剂盒由陕西北美基因有限公司提供,GoldMag 平均粒径为 50 nm,浓度 5 mg/ml。人真皮 LEC、内皮细胞培养基(endothelial cell medium, ECM)购自美国 ScienCell 公司。小鼠抗人 podoplanin 抗体、FITC 标记的羊抗小鼠 IgG、辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗小鼠 IgG 均购自美国 Abcam 公司。羊抗小鼠 IgG 抗体购自北京鼎国生物技术有限公司。普鲁士蓝染色试剂盒购自上海源叶生物技术有限公司。

1.2 GoldMag-pod 的制备及性能检测 “一步法”合成分子探针 GoldMag-pod:取 400  $\mu$ l 抗体缓冲液与 200  $\mu$ g 抗 podoplanin 抗体混匀,取出 100  $\mu$ l 抗体溶液置于离心管中,标记为“pre”,留作检测抗体耦联效率用。取其余 300  $\mu$ l 抗体溶液与 200  $\mu$ l GoldMag 溶液混匀、振荡反应 20 min,之后磁性分离,取上清液置于新的离心管中,标记为“post”。将反应产物用清洗缓冲液清洗 2 次,并分别将清洗缓冲液标记为“wash 1”和“wash 2”。最后将反应物与 1 ml 5%的 BSA 溶液混匀、振荡反应 60 min。磁性分离,弃上清。再加入

1 ml 保存缓冲液,4 $^{\circ}$ C 保存、备用。

用分光光度计(DU800, Beckman)分别检测“pre”、“post”、“wash 1”和“wash 2”溶液在 280 nm 处的吸光(optical density, OD)值。按以下公式计算 GoldMag-pod 的抗体耦联效率(CE):

$$CE = \frac{OD_{280}(\text{wash1}) - OD_{280}(\text{wash2})}{OD_{280}(\text{pre})} \times 100\%$$

用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测抗 podoplanin 抗体与 GoldMag 结合前、后的免疫活性。

1.3 GoldMag-pod 体外标记 LEC LEC 采用 ECM 培养基培养,置于 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中,按 1:2 比例传代培养。

取 1 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml 细胞接种于含盖玻片的 24 孔板中,体积为 1 ml,待细胞贴壁后取出细胞爬片,固定后用山羊血清封闭。将细胞爬片分为阴性对照组、GoldMag 组、抗 podoplanin 抗体组和 GoldMag-pod 组,分别滴加 PBS、GoldMag(125  $\mu$ g/ml)、抗 podoplanin 抗体(1:100)和 GoldMag-pod(根据 GoldMag-pod 的 CE 值将抗 podoplanin 抗体按 1:100 稀释),4 $^{\circ}$ C 过夜。用 PBS 洗去反应物,再滴加 100  $\mu$ l FITC-羊抗小鼠 IgG(1:200),37 $^{\circ}$ C 反应 1 h。最后用 DAPI 染色液复染细胞核 5 min,激光共聚焦显微镜(Leica)下观察各组细胞的荧光强度。

取 1 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml 细胞接种于含盖玻片的 24 孔板中,待细胞贴壁后分别加入 0、1、10、100  $\mu$ g 的 GoldMag-pod,培养液总体积为 1 ml/孔,与 LEC 共培养 2 h 后洗去未结合的 GoldMag-pod,继续培养 12 h。取出细胞爬片,固定后普鲁士蓝染色液染色 10 min,伊红染液染色 1 min,倒置显微镜下观察 GoldMag-pod 与 LEC 的结合情况,计算 LEC 的阳性标记率(视野内阳性细胞数占视野内细胞总数的百分比)。

1.4 GoldMag-pod 标记 LEC 后的 MR 成像 取 1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml 细胞接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后分别加入 0、2、6、10、20、30  $\mu$ g 的 GoldMag-pod 和 GoldMag,培养液总体积为 2 ml/孔,与 LEC 共培养 2 h 后洗去未结合的纳米微粒,继续培养 12 h。以 0.125%胰酶消化后,取 1.5 ml 细胞悬液于 Eppendorf 管中,以浓度为 0、1、3、5、10、15  $\mu$ g/ml(与 LEC 培养液中相同的 GoldMag 浓度)的 GoldMag-pod 和 GoldMag 溶液为

对照,放入盛有双蒸水的塑料盒内行 MR 检查,观察 GoldMag-pod 标记后的 LEC 悬液在梯度回波 (gradient echo, GRE) T2\* WI 的信号强度改变。

MR 扫描条件与图像处理:采用 GE Signa HDx 3.0T MR 成像系统进行轴位扫描, GRE T2\* WI, TR 500 ms, TE 25 ms, 反转角 20°, 层厚 1 mm, 层间隔 0.5 mm, 成像视野 20 cm, 激励次数 2。于同一层内选取每管的感兴趣区 (面积为 25 mm<sup>2</sup>), 测量各管内连续 3 层的 T2\* WI 信号强度, 计算其平均值。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组溶液的 T2\* WI 信号强度比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。各组整体均数有统计学差异时, 采用  $q$  检验行各组均数间的两两比较。

## 2 结果

2.1 GoldMag-pod 抗体耦联效率和免疫活性 “pre” 和 “post” 溶液的平均 OD 值分别为  $0.85 \pm 0.09$  和  $0.25 \pm 0.06$ , “wash 1” 和 “wash 2” 溶液的平均 OD 值分别为  $0.11 \pm 0.03$  和  $0.04 \pm 0.01$ , 根据以上公式计算得出 GoldMag-pod 的 CE 值为 52.94%。ELISA 法检测抗 podoplanin 抗体的平均 OD 值为 0.88, GoldMag-pod 的平均 OD 值为 0.37, 表明抗 podoplanin 抗

体与 GoldMag 结合后, 其免疫活性下降为原先的 42.05%。

2.2 LEC 培养与 GoldMag-pod 体外标记 倒置显微镜观察 LEC: 细胞贴壁生长、分布均匀、呈长梭形, 核较大、呈类圆形 (图 1)。

激光共聚焦显微镜观察 GoldMag-pod 对 LEC 的标记情况: 阴性对照组和 GoldMag 组仅见细胞核发出的蓝色荧光, 无绿色荧光表达; 抗 podoplanin 抗体组的 LEC 细胞质与细胞膜均发出较强的绿色荧光 (图 2A); GoldMag-pod 组 LEC 也发出绿色荧光, 但荧光强度较弱 (图 2B)。

普鲁士蓝染色观察 GoldMag-pod 对 LEC 的标记阳性率: 阴性对照组的 LEC 细胞内外均未见蓝色铁沉积; 随着加入的 GoldMag-pod 浓度的增加, 细胞内铁沉积也逐渐增加, 主要沉积在细胞核周围的胞浆内 (图 3)。浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时 GoldMag-pod 的标记阳性率为 63.63%; 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时标记阳性率为 83.17%; 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时标记阳性率为 98.08%。

2.3 GoldMag-pod 标记 LEC 的 MR 检查结果 MRI 对 GoldMag 孵育 LEC 悬液、GoldMag-pod 标记 LEC 悬液、GoldMag-pod 溶液和 GoldMag 溶液分别进行 GRE T2\* WI, 结果见表 1 和图 4。随着各组溶液浓

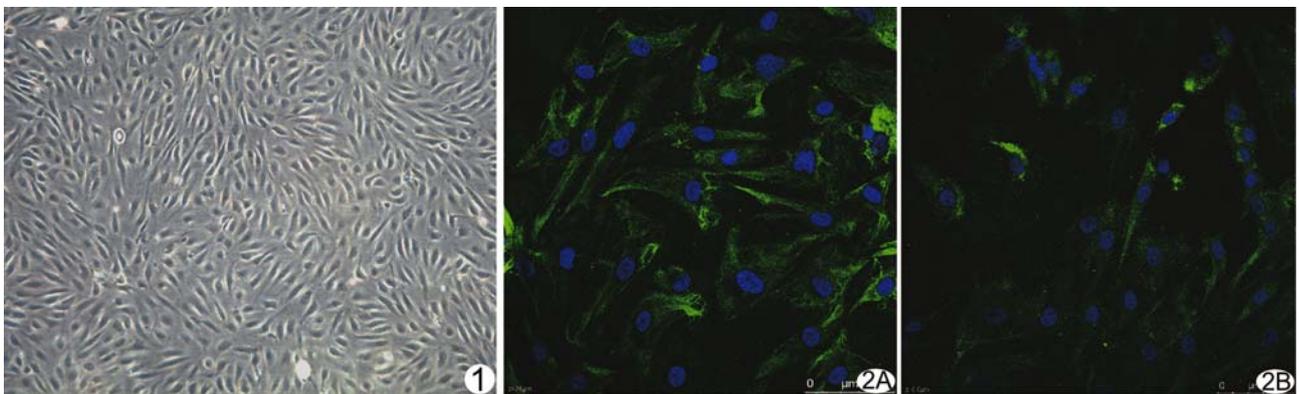


图 1 LEC 贴壁生长倒置显微镜图 ( $\times 100$ ) 图 2 LEC 免疫荧光染色 A. 抗 podoplanin 抗体组; B. GoldMag-pod 组

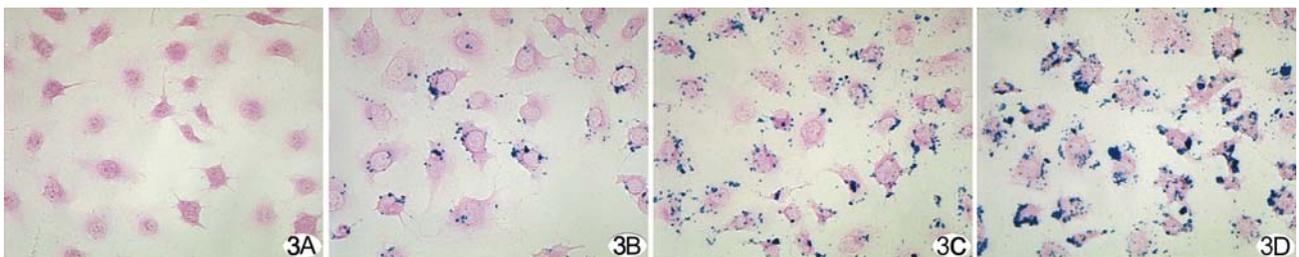


图 3 LEC 经 GoldMag-pod 标记后 (普鲁士蓝染色,  $\times 400$ ) A~D. GoldMag-pod 浓度分别为 0、1、10、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$

表 1 不同溶液浓度下的 T2\* WI 信号强度值( $\bar{x} \pm s$ )

不同溶液	溶液浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	0	1	3	5	10	15
GoldMag 孵育 LEC 悬液	1734.31 $\pm$ 61.98	1659.24 $\pm$ 61.45*	1582.48 $\pm$ 61.82* $\Delta$	1501.62 $\pm$ 64.33* $\Delta$	1414.17 $\pm$ 57.80* $\Delta$	1324.09 $\pm$ 58.12* $\Delta$
GoldMag-pod 标记 LEC 悬液	1745.25 $\pm$ 69.71	1643.38 $\pm$ 51.29*	1418.80 $\pm$ 63.91* $\#$	1259.81 $\pm$ 47.26* $\#$	1012.35 $\pm$ 50.55* $\#$	798.17 $\pm$ 45.32* $\#$
GoldMag-pod 溶液	1761.61 $\pm$ 55.19	1599.82 $\pm$ 52.01	1250.77 $\pm$ 44.09	1038.09 $\pm$ 55.02*	784.10 $\pm$ 39.76*	572.21 $\pm$ 50.76*
GoldMag 溶液	1720.53 $\pm$ 86.48	1491.71 $\pm$ 66.60	1157.04 $\pm$ 57.93	884.30 $\pm$ 52.08	635.27 $\pm$ 54.82	440.57 $\pm$ 37.56
F 值	0.19	5.01	32.00	72.43	136.97	195.61
P 值	0.90	0.03	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: \* :与 GoldMag 溶液比较,  $P < 0.05$ ; # :与 GoldMag-pod 溶液比较,  $P < 0.05$ ;  $\Delta$  :与 GoldMag-pod 标记 LEC 溶液比较,  $P < 0.05$

度的增加, GRE T2\* WI 信号强度均逐渐降低, 其中 GoldMag 溶液信号强度降低最明显, GoldMag-pod 溶液次之, GoldMag-pod 标记 LEC 悬液再次之, GoldMag 孵育 LEC 悬液信号强度降低最不明显。

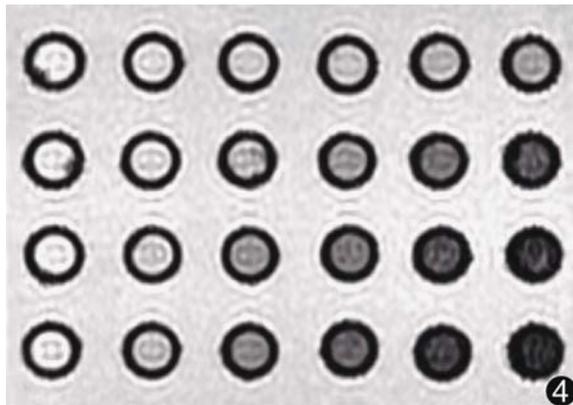


图 4 不同浓度溶液 Eppendorf 管的轴位 GRE T2\* WI 第 1~4 行依次为 GoldMag 孵育 LEC 溶液、GoldMag-pod 标记 LEC 溶液、GoldMag-pod 溶液和 GoldMag 溶液。从左至右各组溶液的浓度分别为 0、1、3、5、10、15  $\mu\text{g/ml}$

### 3 讨论

GoldMag 表面的单体金壳层具有胶体金性质, 通过静电吸引作用和范德华力, 能将蛋白质和多肽等生物大分子非共价耦联于 GoldMag 表面<sup>[1]</sup>; 其核心 USPIO 通过其内  $\text{Fe}^{3+}$  的未成对电子在磁场中自旋产生的局部磁场, 能缩短周围氢质子的横向弛豫时间, 从而达到 MR 成像增强作用<sup>[4]</sup>。CE 值反映分子探针携药能力, 其大小直接影响到分子探针的实验用量。GoldMag 具有较高的 CE 值, 确保所合成的分子探针具有充分的反应基团<sup>[1]</sup>。目前 MR 分子成像研究多采用脂质体或多聚化合物包被的方法合成特异性分子探

针<sup>[5]</sup>, 合成步骤较多, 难以得到粒径均匀的单分散性大分子, 对于脂质体对抗体免疫活性的影响也缺乏深入研究。作为分子探针中的反应基团, 抗体决定着分子探针对靶组织和靶细胞的特异性识别能力。

近年来, 许多研究通过选择高特异性的血管内皮细胞标记物, 应用分子成像的方法对肿瘤的血管生成进行了深入研究<sup>[6]</sup>。随着 VEGFR-3、Prox-1、LYVE-1、podoplanin 和 desmoplakin 等一系列 LEC 标记物的发现, 对肿瘤淋巴管生成的研究也逐渐深入到了分子水平<sup>[7]</sup>。podoplanin 是一种特异性较高的 LEC 标记物, 属于 I 型黏液样跨膜糖蛋白, 由 162 个氨基酸构成, 在促进淋巴管生成、防止细胞黏附和维持肾小球足突细胞形态方面具有重要作用<sup>[3]</sup>, 可以通过促使 ERM 蛋白磷酸化、调整 Rho 家族成员 GTP 酶的活性和重组肌动蛋白细胞骨架等, 最终引起细胞的侵袭和转移<sup>[8]</sup>。本实验以 GoldMag-pod 作为一抗对 LEC 进行标记, 免疫荧光染色可见 LEC 胞浆与细胞膜发出绿色荧光, 说明 GoldMag-pod 能靶向标记 LEC<sup>[9]</sup>, 但由于 GoldMag-pod 中的抗 podoplanin 抗体免疫活性降低, 所标记的细胞荧光强度较弱。在 LEC 培养液中加入 GoldMag-pod 共培养, GoldMag-pod 被 LEC 靶向识别后, 作为异物被 LEC 通过胞饮作用吞噬于细胞内<sup>[10]</sup>, 普鲁士蓝染色中, 亚铁氰化钾能在酸性环境下与细胞中的铁作用, 形成蓝色的亚铁氰化铁沉淀, 能准确定位含铁的部位<sup>[11]</sup>。

GoldMag 通过其核心的 USPIO 引起局部磁场不均匀, 造成周围质子失相位。自旋回波 (spin echo, SE) 序列是 MR 成像最常用的序列之一, 但其采用的  $180^\circ$  脉冲能消除局部不均匀磁场引起的失相位效应<sup>[12]</sup>。GRE T2\* WI 序列中不存在  $180^\circ$  脉冲, 能同时

检测物质本身的 T2 弛豫以及 USPIO 周围不均匀磁场引起的横向弛豫变化,更适于作为 USPIO 及 GoldMag 的成像序列,常用来检测组织中的出血和铁沉积<sup>[4,12]</sup>。本实验中,各组 GRE T2\* WI 信号强度均随溶液浓度的增加而降低。溶液中水分子所含的氢质子磁敏感性最高,但由于 GoldMag-pod 溶液中的 GoldMag 周围包裹了一层抗 podoplanin 抗体,减弱了其核心的氧化铁对周围水分子的作用,使其 GRE T2\* WI 信号强度变化不如 GoldMag 溶液明显。GoldMag-pod 对 LEC 标记 2 h 后,清洗掉未结合的 GoldMag-pod 会造成一部分未结合 GoldMag-pod 的丢失,故 LEC 细胞悬液的 GRE T2\* WI 信号强度的变化更小。由于 LEC 的非特异性吞噬作用,GoldMag 孵育的 LEC 悬液在 GoldMag 达到一定浓度时信号强度也有所降低,但降低程度明显小于 GoldMag-pod 标记 LEC 悬液,进一步说明 GoldMag-pod 能与 LEC 特异性结合。虽然 GoldMag 具有许多优点,但仍有许多生物理化特性有待改进,如 GoldMag 表面缺乏多聚化合物或脂质体的包被,使得分子探针进入生物体内后易被巨噬细胞当作异物所吞噬,导致分子探针相对较短的体内循环时间<sup>[13]</sup>。

总之,本实验证明 GoldMag 能通过其表面的胶体金壳层与抗体直接耦联,其核心的 USPIO 能对 MR 信号产生明显影响。GoldMag 和抗 podoplanin 抗体“一步法”成功合成 GoldMag-pod,所制得的 GoldMag-pod 抗体耦联效率高,能特异性标记 LEC,并对 GRE T2\* W 成像产生负性增强作用。GoldMag-pod 适用于 MR 分子成像,为研究 LEC 的 MR 体内标记及靶向成像提供了实验基础。

#### [参考文献]

- [1] Cui YL, Wang YN, Hui WL, et al. The synthesis of GoldMag nano-particles and their application for antibody immobilization. *Biomed Microdevices*, 2005, 7(2):153-156.
- [2] Sleeman JP, Thiele W. Tumor metastasis and the lymphatic vasculature. *Int J Cancer*, 2009, 125(12):2747-2756.
- [3] Wicki A, Christofori G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer*, 2007, 96(1):1-5.
- [4] 逢鑫,邹利光,杨华,等. USPIO 和 GoldMag 磁共振成像信号特点的实验研究. *第三军医大学学报*, 2010, 32(3):229-232.
- [5] 曲海源,徐缓,韩洪波,等.  $\alpha_v\beta_3$  整合素受体靶向性超顺磁性脂质体的建立及体外磁共振观察. *中国医学影像技术*, 2009, 25(6):969-972.
- [6] 牛洪涛,张文丽,郭启勇,等. 对比剂稳态磁化率 MR 成像动态观察大鼠 C6 胶质瘤血管生成. *中国医学影像技术*, 2009, 25(10):1761-1764.
- [7] Nguyen VA, Furchapter C, Obexer P, et al. Endothelial cells from cord blood CD133<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> progenitors share phenotypic, functional and gene expression profile similarities with lymphatics. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(3):522-534.
- [8] 张松,邹利光. Podoplanin 促进肿瘤侵袭转移的机制及临床意义. *中国肿瘤临床*, 2010, 37(9):536-539.
- [9] Yang L, Peng XH, Wang A, et al. Receptor-targeted nanoparticles for in vivo imaging of breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(14):4722-4732.
- [10] Sun C, Lee JSH, Zhang MQ. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliver Rev*, 2008, 60(11):1252-1265.
- [11] Li XB, Du XK, Huo TL, 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.
- [12] Chavhan GB, Babyn PS, Thomas B, et al. Principles, techniques, and applications of T2\*-based MR imaging and its special applications. *Radiographics*, 2009, 29(5):1433-1449.
- [13] Thorek DLJ, Chen AK, Czupryna J, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. *Ann Biomed Eng*, 2006, 34(1):23-38.