

〔文章编号〕 1007-0893(2021)24-0004-03

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2021.24.002

脑胶质瘤双模态纳米对比剂的制备

林帆 雷益 熊小丽 张海飞 王玉理*

(深圳市第二人民医院 深圳大学第一附属医院, 广东 深圳 518000)

〔摘要〕 **目的:** 制备并验证脑胶质瘤双模态纳米探针。**方法:** 采用聚合的方法结合吲哚菁绿 (ICG)、DOTA-Gd 以及 Angiopep-2, 形成双模态的对比剂。**结果:** 复合物稳定无沉淀, BSA-ICG-DOTA-Gd 复合物表面 zeta 电位显示为 10.9 mV, 而多功能酶标仪结果显示复合物具有 ICG 荧光特性, 700 nm 波长光进行激发在 820 nm 处有发射峰。复合物紫外吸收试验显示, 在 280 nm 处有明显蛋白的吸收峰, BSA-ICG-DOTA-Gd 复合物通过小动物荧光成像系统在 720 nm 波长光激发下显示出明显的荧光, 动物实验结果显示注射复合物 ICG-DOTA-Gd-ANG2 0.5 h 后, 荧光可达顶峰, 随后立即下降。**结论:** 双模态对比剂具有较好的稳定性、荧光性, 有潜在的应用价值。

〔关键词〕 脑胶质瘤; 核磁共振; 纳米探针

〔中图分类号〕 R 739.41; TQ 421.7 〔文献标识码〕 A

Preparation of Bimodal Nano-contrast Agent for Glioma

LIN Fan, LEI Yi, XIONG Xiao-li, ZHANG Hai-fei, WANG Yu-li*

(Shenzhen Second People's Hospital, The First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Guangdong Shenzhen 518000)

〔Abstract〕 **Objective** To prepare and validate a bimodal nanoprobe for glioma. **Methods** A polymerization method was used to combine indocyanine green (ICG), DOTA-Gd, and Angiopep-2 to form a bimodal contrast agent. **Results** The complexes were stable without precipitation, and the surface zeta potential of the BSA-ICG-DOTA-Gd complex showed 10.9 mV, while the results of multifunctional enzyme standardization showed that the complexes had ICG fluorescence properties, with excitation by light at 700 nm and emission at 820 nm. peak at 820 nm. The UV absorption test of the complex showed a clear protein absorption peak at 280 nm, and the BSA-ICG-DOTA-Gd complex showed a clear fluorescence under the excitation of 720 nm wavelength light by the small animal fluorescence imaging system, and the results of animal experiments showed that the fluorescence could reach the peak by injecting the complex ICG-DOTA-Gd-ANG2 for 0.5 h, and then declined immediately. **Conclusion** This dual-mode contrast agent has good stability and fluorescence, and has potential applications.

〔Key Words〕 Glioma; Magnetic resonance imaging; Nanoprobe

胶质瘤呈浸润生长^[1], 难以完全切除。目前, 核磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 扫描配合增强扫描, 再加上手术导航系统是识别胶质瘤边界“标配”方法^[2], 但由于血脑屏障的存在, 对比剂的高通透性和滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR) 会减弱, 导致肿瘤边界难以识别。另外, 手术过程中脑组织的变形和移位, 也可以导致导航图像无用武之地。

随着纳米聚合物技术兴起, 为很多医疗难题提供了新的思路。在对比剂合成方面, 它可以提供多种小分子在结构及功能的联合^[3-7]。首先, DOTA-Gd 可以帮助评估病灶; 而吲

哚菁绿 (indocyanine green, ICG) 的荧光能力强, 毒性低, 可以作为光学对比剂用于手术过程。而 Angiopep-2 可以帮助对比剂分子与血管内皮细胞和胶质瘤上的低密度脂蛋白受体相关蛋白-1 受体结合, 从而顺利通过血脑屏障进入肿瘤组织, 解决血脑屏障问题^[7-10]。因此, 针对于上述难题, 本研究将利用纳米技术聚合上述几种重要的分子发挥其优势。

1 资料和方法

1.1 实验材料

包括乙酰丙酮铁 (III)、无水苯甲醇、戊二醛、2-(N

〔收稿日期〕 2021-10-28

〔基金项目〕 深圳市科技计划项目基础研究项目资助课题 (JCYJ2018022816333734); 深圳市第二人民医院临床研究项目资助课题 (20203357036)

〔作者简介〕 林帆, 男, 主任医师, 主要研究方向是磁共振影像诊断

〔*通信作者〕 王玉理 (E-mail: wangyuli777@163.com; Tel: 13823140778)

-吗啉)乙磺酸水合物(MES)、N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(N-Hydroxysuccinimide, NHS)购自阿拉丁试剂(中国上海),牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)和 ICG 购自美国 Sigma-Aldrich。乙醇、氯仿等溶剂购自国药集团化学试剂有限公司。Angiopep 肽(TFFYGGSRGKRNNFKTEEY)由上海强耀生物科技有限公司合成。

1.2 方法

预先进行 BSA 的纯化,然后精密称取 BSA 50 mg,在 5 mL 磷酸缓冲液(phosphate buffer, PB) ($0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH = 7.4) 进行重悬,置于超声仪中超声分散 10 min。向其中加入 Gd-DOTA-NHS ester ($0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 ICG ($0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 室温避光振荡 ($220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 过夜。用截留分子量 30000 的超滤管进行超滤离心,去除未反应的 Gd-DOTA-NHS ester 和 ICG,再用 5 mL PB 缓冲液 ($0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH = 7.4) 进行重悬。向上述溶液中加入 EDC ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 Sulfo-NHS ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 室温避光振荡 30 min。用截留分子量 30000 的超滤管去除未反应的 EDC 和 Sulfo-NHS,加入事先用 5 mL PB 缓冲液 ($0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH = 7.4) 溶解的 Angiopep-2 ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 多肽溶液。室温避光振荡过夜。再用截留分子量 30000 的超滤管去除未反应的 Angiopep-2 多肽,并用 5 mL PB 缓冲液 ($0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH = 7.4) 进行重悬。通过小动物荧光成像测试纳米探针在活体鼠模型血脑屏障靶向能力,在近红外下 (IVIS Lumina XRMS III) 验证 ICG 荧光活体荧光成像效果。用小鼠进行多模态纳米探针体内验证,在近红外下 (IVIS Lumina XRMS III) 验证 ICG 荧光活体荧光成像效果。

2 结果

研究结果显示:BSA-ICG-DOTA-Gd 复合物无沉淀,澄清透明,溶液颜色与 ICG 荧光溶液颜色一致。合成的复合物在水箱中稳定性良好(见封三图 1);BSA-ICG-DOTA-Gd 复合物表面 zeta 电位显示为 10.9 mV,BSA 自身表面 zeta 电位显负电,间接证明 BSA 表面发生改变;BSA-ICG-DOTA-Gd 复合物多功能酶标仪结果显示复合物具有 ICG 荧光特性,700 nm 波长光进行激发在 820 nm 处有发射峰,与 ICG 峰一致。表明 ICG 偶联成功;另外,BSA-ICG-DOTA-Gd 复合物紫外吸收试验以及复合物在小动物荧光成像的试验显示,在 280 nm 处有明显蛋白的吸收峰(BSA 的紫外特征峰),720 nm 和 800 nm 有 ICG 荧光分子的激发峰和发射峰;BSA-ICG-DOTA-Gd 复合物通过小动物荧光成像系统在 720 nm 波长光激发下显示出明显的荧光,验证了复合物体外荧光成像能力;动物实验结果显示注射复合物 ICG-DOTA-Gd-ANG2 后 0.5 h,荧光可达顶峰,随后随即下降(封三图 2)。

3 讨论

胶质瘤是成人中枢神经系统最常见的肿瘤,占颅内肿瘤的 40%~43%,其发病率于近 30 年来逐年递增,年增长率约 1.2%^[11]。由于临床疗效欠佳,生存期短,对个人、家庭和社会造成巨大的危害,因此,任何能提高其诊疗的技术都具有重要意义。手术治疗是脑胶质瘤的主要手段,但该肿瘤呈浸润性生长,与周围正常脑组织分界不明显,难以完全切除。

MRI 技术可借助原子共振原理对活体结构成像,有较好的组织分辨率,具有无创伤、无辐射等特点,可以直观显示人体及动物的三维解剖结构,再通过 DOTA-Gd 等对比剂,又可以间接计算灌注和代谢等信息。目前,MRI 扫描配合 DOTA-Gd 对比剂,再加上手术导航系统是识别胶质瘤边界“标配”方法。但它有两点不足之处,(1)血脑屏障:因为胶质瘤在脑组织浸润生长,相应区域的血脑屏障常常保持完整,加上瘤区新生血管壁孔径细小,造影剂难以渗透,所以钆对比剂在胶质瘤的增强作用较身体其他部位的肿瘤弱很多,即 EPR 效应减弱,其结果就是肿瘤边界难以识别;

(2)术中的“Brain shift”问题^[12]:在手术过程中,脑组织和肿瘤难免变形和移位,因此,即使术前导航的 MRI 图像上能准确识别肿瘤边界,在手术中,实际脑瘤区的位置与导航图像可能差距甚远。

近红外荧光成像(near-infrared fluorescence, NIRF)^[13]技术可以实时显影,是生物成像领域的佼佼者。NIRF 的检测波长介于 700~1000 nm,在此波段范围内生物体自身组织的吸收较弱,因此,荧光穿透的深度可达 4~10 cm,使之成为光学成像中较理想的方法,可以用于探测不同的小分子,辅助手术导航。

基于纳米聚合物的新兴技术,可以实现多种小分子在结构及功能的联合。因此,本研究结合了 MRI 和 NIRF 的优势,将 MRI 对比剂 DOTA-Gd 和 NIRF 对比剂 ICG 有机结合起来,形成一种新型的双模对比剂 ICG-DOTA-Gd。本研究结果显示该复合物具有较好的荧光性和稳定性。

然而,单纯结合 DOTA-Gd 和 NIRF 并不足够,因为在脑内,对比剂或者药物要从血液或者脑脊液到达肿瘤需要经过两道屏障:(1)脑毛细血管壁与神经胶质细胞之间形成的屏障,是主要阻止物质从血浆进入脑组织;(2)脉络丛形成的屏障,阻止脑脊液和血浆之间的物质交换。虽然这些屏障的作用是阻止有害物质进入脑组织,但同时也阻止了一些药物或者对比剂进入肿瘤。DOTA-Gd 就是其中被拦在“门外”的大分子,因此,常规 MRI 增强扫描时,对比剂并不能到达血脑屏障完整的脑组织或者脑肿瘤,无法获得强化,只有当胶质瘤破坏正常血脑屏障后,对比剂才能进入相应组织,引起强化。ICG 也有类似的情况,在注射 ICG 后,只会流经肿瘤周围的血管,然后很快就会被廓清。因此有学者提出“ICG 第二窗口技术”,在显影前 24 h 注射 25 mg,因

为 EPR 的提高, 小分子对比剂可以通过已经破坏的血脑屏障进入肿瘤组织, 同时因为缺乏淋巴组织廓清, 小分子对比剂很容易停留在肿瘤内, 更好的显像。研究表明, 这种方式能更好、而且更长时间地显示肿瘤并判断其边界, 并且获得更佳的肿瘤-背景信噪比^[9]。然而, 这种方法依然只对血脑屏障破坏明显的胶质瘤效果好。

因此, 需要更好的方法提高对比剂通过血脑屏障的数量及延长肿瘤的停留时间。医用纳米聚合物技术能 PEG 化以延长纳米粒子在血液中循环时间, 从而增加 EPR 效果。但是, 仅仅将纳米粒子和药物连接形成对比剂的效果仍不理想, 学者认为是肿瘤内血脑屏障、缺氧环境、细胞致密性等减少了纳米合成对比剂的进入。为了提高纳米聚合物靶向效能, 有研究者将纳米聚合物结合具有特殊功能的配体, 如细胞穿透肽和主动靶向性配体。前者主要是通过提高细胞膜的通透性(紫外线、蛋白酶), 但缺乏对正常和肿瘤细胞的选择, 后者通过肿瘤细胞上特殊的靶向受体-配体效应(狂犬病毒糖蛋白肽 RVG 29, 转铁蛋白、蛇神经毒素肽 CDX 等)。其中低密度脂蛋白受体相关蛋白(low density lipoprotein receptor-related protein, LRP), 在脂蛋白、蛋白酶/蛋白酶抑制剂复合体、细胞外基质蛋白等介导跨血脑屏障转运的配体上高表达, 而 Angiopep-2 是类似于 LRP 的新型多肽, 其跨膜转运效率明显高于转铁蛋白, 因此, 大大提高了通过血脑屏障转运进入脑肿瘤的几率^[9-10]。利用此技术可以结合多种小分子的功能, 正如本研究使用的方法, 聚合 DOTA-Gd、Angiopep-2 和 ICG, 形成 ICG-DOTA-Gd-ANG2。首先, DOTA-Gd 可以作为 MRI 对比剂在术前帮助评估病灶; 而 ICG 荧光能力强, 毒性低, 可以作为光学对比剂在手术过程显影, 由于它是实时显影, 可以解决术中脑移位的问题; 另外, 通过 Angiopep-2, 可以顺利通过血脑屏障进入肿瘤组织, 解决了血脑屏障的问题^[8-10]。动物实验也验证了其荧光能力及其可靠性。可见, 该复合物既可以用于术前的 MRI 肿瘤定位, 也可以用于术中在近红外下定位。更进一步, 可以继续与相关的肿瘤抑制药物分子进行结合, 从而达到显影、手术、化疗的一体化结合, 为肿瘤的诊疗提供了精准的工具。

[参考文献]

(1) Westphal M, Lamszus K. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches (J). *Nature Reviews Neuroscience*, 2011, 12(9): 495-508.

(2) Lee J, Thawani JP, John P, et al. Intraoperative Near-Infrared Optical Imaging Can Localize Gadolinium-Enhancing Gliomas During Surgery (J). *Neurosurgery*, 2016, 79(6): 856.

(3) Zhao S, Wu J, Wang C, et al. Intraoperative fluorescence-guided resection of high-grade malignant gliomas using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a systematic review and meta-analysis of prospective studies (J). *Plos One*, 2013, 8(5): e63682.

(4) Cortnum S, Laursen R. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant gliomas-a new treatment modality (J). *Ugeskrift for Laeger*, 2013, 175(9): 570.

(5) Rey-Dios R, Cohen-Gadol AA. Technical principles and neurosurgical applications of fluorescein fluorescence using a microscope-integrated fluorescence module (J). *Acta Neurochir(Wien)*, 2013, 155(4): 701-706.

(6) Swanson KI, Clark PA, Zhang RR, et al. Fluorescent Cancer-Selective Alkylphosphocholine Analogs for Intraoperative Glioma Detection (J). *Neurosurgery*, 2015, 76(2): 115.

(7) Madajewski B, Judy BF, Mouchli A, et al. Intraoperative Near-Infrared Imaging of Surgical Wounds after Tumor Resections Can Detect Residual Disease (J). *Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2012, 18(20): 5741.

(8) 张婧婧. Angiopep-2 介导的双靶向纳米载体研究及其在大鼠 C6 胶质瘤 MR 显像中的价值 (J). *安徽医药*, 2016, 20(8): 1450-1454.

(9) 金莹莹, 张家文. Angiopep-2 修饰的纳米递药系统和纳米成像系统在胶质瘤诊疗中的应用 (J). *中国医学计算机成像杂志*, 2015, 21(5): 413-418.

(10) 熊志勇. Angiopep-2 修饰纳米颗粒穿越血脑屏障的能力 (J). *华中科技大学学报(医学版)*, 2014, 43(3): 304-306.

(11) Wen PY, Packer RJ. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: clinical implications (J). *Neuro-Oncology*, 2021, 23(8): 1215-1217.

(12) Gerard IJ, Kersten-Oertel M, Hall JA, et al. Brain Shift in Neuronavigation of Brain Tumors: An Updated Review of Intra-Operative Ultrasound Applications (J). *Frontiers in oncology*, 2021, 10(2): 618837.

(13) Marshall MV, Rasmussen JC, Tan IC, et al. Near-Infrared Fluorescence Imaging in Humans with Indocyanine Green: A Review and Update (J). *The Open Surgical Oncology Journal*, 2010, 2(2): 12-25.