

新型分子探针近红外荧光标记 Zn-DPA 监测肿瘤疗效的研究

胡硕¹, 柴文文¹, 刘治国², 尹楚南¹, 雷萌¹

(中南大学 1. 湘雅医院核医学科, 长沙 410008; 2. 分子影像中心, 长沙 410078)

[摘要] **目的:**探讨新型分子探针近红外荧光标记 Zn-DPA (Zn-DPA-PSS794) 通过光学成像监测阿霉素治疗卵巢癌细胞株 OVCAR-8 的杀伤作用, 并与 Cy5.5-annexin V 光学成像效果进行比较。**方法:**MTT 和流式细胞术分析阿霉素对卵巢癌细胞株 OVCAR-8 的杀伤作用。将 OVCAR-8 种植到裸鼠皮下, 成瘤后分为对照组和治疗组, 每组再分 2 个亚组, 即 DPA 组和 annexin V 组。治疗组静脉注射阿霉素, 2 次后各组裸鼠分别进行 Zn-DPA-PSS794 光学显像和 Cy5.5-annexin V 光学显像, 并进行定量分析。处死裸鼠, 分离肿瘤, 切片后进行 HE 染色, Western 印迹检测肿瘤组织中 caspase-3 蛋白表达水平。**结果:**阿霉素对 OVCAR-8 的 IC₅₀ 为 6 μmol/L, 阿霉素能体外诱导 OVCAR-8 凋亡、坏死, 总效率达 35%。阿霉素治疗裸鼠移植瘤 48 h 后, Zn-DPA-PSS794 光学成像和 Cy5.5-annexin V 光学成像均为阳性, 而对照组 2 种光学成像结果均为阴性, 对照组和治疗组肿瘤部位的荧光强度差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。肿瘤组织 HE 染色示肿瘤细胞核大, 深染。治疗组中 caspase-3 蛋白高表达, 而对照组低表达。**结论:**Zn-DPA-PSS794 光学成像能有效监测阿霉素治疗 OVCAR-8 荷瘤裸鼠的疗效, 与 Cy5.5-annexin V 显像效果类似。

[关键词] Zn-DPA; annexin V; 光学成像; 卵巢癌; 阿霉素; 疗效监测

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2011.08.011

Near-infrared fluorescent zinc-dipicolylamine: a new molecular imaging probe to monitor the efficiency of chemotherapy

HU Shuo¹, CHAI Wenwen¹, LIU Zhiguo², YIN Chunan¹, LEI Meng¹

(1. Department of Nuclear Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008;

2. Molecular Imaging Center, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: Objective To investigate the feasibility of a novel molecular probe of Zn-DPA-PSS794 to monitor the efficiency of doxorubicin to ovarian cancer and compare with Cy5.5-annexin V. **Methods** Efficiency of doxorubicin to OVCAR-8 cells in vitro was measured by MTT assay and flow cytometry. The in vivo studies were performed on an OVCAR-8 xenograft tumor model. Mice were divided into a control group and a treatment group. Each group was divided into 2 subgroups, DPA and annexin V. In the treatment group, the mice were treated with doxorubicin for 2 doses. All mice were performed optical imaging by Zn-DPA-PSS794 or Cy5.5-annexin V, respectively and then sacrificed. The tumor was separated and stained by HE. The expression of caspase-3 protein was

收稿日期 (Date of reception) 2011-05-27

作者简介 (Biography) 胡硕, 博士, 副教授, 主要从事放射性核素分子显像的研究。

通信作者 (Corresponding author) 胡硕, E-mail: hushuo_xy@sina.com

基金项目 (Foundation item) 湖南省科技厅自然科学基金(2011SK3230)。 This work was supported by the fund of Department of Science and Technology of Hunan Province, P. R. China (2011SK3230)。

measured by Western blot. **Results** The IC50 of doxorubicin to OVCAR-8 was 6 $\mu\text{mol/L}$. The percentage of apoptosis and dead cells was 35% after doxorubicin treatment. In the optical image, photons accumulated in the tumor either by Zn-DPA-PSS794 or Cy 5.5-annexin V in the treatment group. That was negative in the control group. The fluorescence intensity had significant difference between the 2 groups ($P < 0.001$). The nuclei were big and stained with deep color after the cells were stained with HE. The caspase-3 expression was high in the treatment group, while it was low in the control group. **Conclusion** Zn-DPA-PSS794 as a probe used by optical imaging can monitor the efficiency of doxorubicin to OVCAR-8 xenograft tumor, which is similar to Cy5.5-annexin V.

Key words: Zn-DPA; annexin V; optical imaging; ovarian cancer; doxorubicin; monitoring efficiency

抗肿瘤药物对肿瘤细胞的作用大多数是诱导细胞凋亡、坏死,因此测定肿瘤细胞凋亡、坏死成为评价肿瘤疗效的一项新指标。传统的流式细胞测定、免疫组织化学、原位细胞凋亡检测分析等方法虽然是评估凋亡水平的主要手段,但有创的检测方法不能在临床推广应用。随着分子影像的发展,在活体内显示细胞凋亡的发生发展过程越来越受到研究者的青睐^[1-3],因它是一种非创伤性显像,且可以在活体内实时、连续地观察细胞凋亡、坏死的过程,所以细胞凋亡、坏死显像对评价肿瘤化疗、放疗疗效,预测肿瘤对化疗药物的反应有重要的意义。

在分子影像中,新近发展起来的光学显像因其具有较高的空间分辨率、显像剂无辐射、标记后化合物稳定、适合在同一活体内一次注射后反复显像等优点,已受到广泛关注^[4]。近红外线荧光(NIRF)被证实具有被组织吸收少、穿透力强的优点,是较好的荧光显像剂^[5]。本研究拟探讨一种新型的分子显像剂近红外荧光标记 zinc(II)-dipicolylamine (Zn-DPA-PSS794)能否通过近红外线荧光显像,在活体内显示阿霉素治疗卵巢癌荷瘤裸鼠后,肿瘤细胞凋亡、坏死的情况,从而对肿瘤化疗的疗效进行评价。

1 材料与方 法

1.1 材 料

卵巢癌细胞株 OVCAR-8 由中南大学湘雅医院中心实验室提供,Zn-DPA-PSS794 由美国国立卫生研究院分子影像中心陈小元教授惠赠,Cy5.5 由美国 Amshersham 公司提供。膜联蛋白(annexin V)由美国 BD 公司提供。裸鼠由中南大学动物中心提供。DMEM 培养基和胎牛血清为美国 Gibco 公司产品,MTT 购自美国 Sigma 公司,流式细胞仪为美国 FACS Caliber 产品,annexin V、碘化丙啶(PI)和

caspase-3 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。其他常规试剂和仪器均为国产。

1.2 方 法

1.2.1 MTT 检测阿霉素对 OVCAR-8 的毒性

将对数生长期的细胞接种到 96 孔板,24 h 后加入不同浓度阿霉素(0,0.1,0.5,1,5,10,50,100,500,1000 $\mu\text{mol/L}$),37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱内培养 48 h 后加入 3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四唑(MTT)(10 mg/mL)10 μL ,继续培养 4 h,去上清液,加入二甲基亚砷 150 μL ,摇床上轻摇 10 min,用酶标仪检测细胞活性光密度值,并计算细胞活性百分比,用 GraphPad 3.0 计算 IC50。

1.2.2 流式细胞仪检测阿霉素对 OVCAR-8 的作用

将对数生长期的细胞接种到 6 孔板,24 h 后加入 IC50 浓度的阿霉素,48 h 后消化、离心、重悬,加入 annexin V-FITC(10 mg/mL)10 μL ,室温避光孵育 20 min,离心去上清,用 Buffer 重悬,加 10 mg/mL PI 10 μL ,避光孵育 5 min,上流式细胞仪检测。

1.2.3 建立 OVCAR-8 荷瘤模型

20 只 8 周龄雌性裸鼠,分为对照组和治疗组,每组再分为 2 个亚组($n = 5$),即 DPA 组和 annexin V 组,分别用 DPA 和 annexin V 作显像剂进行光学显像。将对数生长期的 OVCAR-8 细胞 5×10^6 个,100 μL 注射到荷瘤裸鼠背部近右肩的皮下,观察肿瘤生长情况,测量肿瘤直径。

1.2.4 阿霉素治疗后光学显像

治疗组荷瘤裸鼠静脉注射 5 mg/kg 阿霉素溶液,间隔 1 d 后再次给药,剂量同前。第 2 次给药 24 h 后,与对照组裸鼠一起进行 Zn-DPA-PSS794 或 Cy5.5-annexin V 光学显像。根据参考文献[6]用 Cy5.5 标记 annexin V,按照试剂盒说明书合成 Zn-DPA-PSS794,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。显像前,将裸鼠用 1.5% 的乙醚吸入麻醉后,尾静脉注射 Cy5.5-annexin

V 150 nmol/kg, 或 Zn-DPA-PSS794 3~4 mg/kg^[7], 分别于 1, 2, 4, 24 h 后通过小动物荧光显像仪进行显像, 采集时间为 30 s, Cy5.5-annexin V 显像的激发波长为 640 nm, 发射波长为 820 nm; Zn-DPA-PSS794 显像的激发波长为 750 nm, 发射波长为 830 nm。计算机软件画出每个肿瘤的兴趣区(ROI)并计算单位时间内 ROI 内的荧光强度, 减去本底的荧光强度, 获得肿瘤的荧光强度。

1.2.5 HE 染色

光学显像完成后, 处死动物, 分离肿瘤组织, 用冷 PBS 溶液冲洗 3 遍, 部分肿瘤组织用 4% 甲醛溶液浸泡, 然后用石蜡包埋, 再切片, 每片厚 5 μm , 脱蜡, 水化, 苏木精染色 5 min 后伊红染色 2 min, 在光学显微镜下观察肿瘤细胞形态, 并拍照。

1.2.6 Caspase-3 蛋白表达水平检测

组织裂解提取肿瘤组织总蛋白, 每泳道上样 40 μg 蛋白, SDS-PAGE 电泳后, 电转膜至硝酸纤维素膜, 封闭 3 h 后加入相应的 caspase-3 一抗, 室温摇床孵育 2 h, 加入二抗孵育 30 min, DAB 显色, 照片。

1.3 统计学处理

实验数据均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 GraphPad 3.0 软件进行统计分析, 组间计量资料的差异采用 *t* 检验分析, 检验水准为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 检测阿霉素对 OVCAR-8 的毒性

阿霉素能有效抑制 OVCAR-8 的生长, 其 48 h 对 OVCAR-8 的 IC₅₀ 为 6 $\mu\text{mol/L}$ 。阿霉素的浓度为 1~500 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 OVCAR-8 的抑制率呈对数剂量依赖性(图 1)。

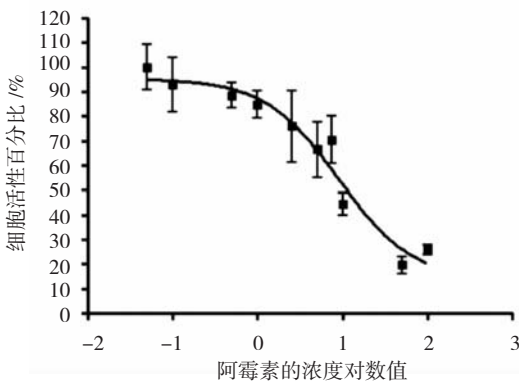


图 1 MTT 检测阿霉素对 OVCAR-8 的毒性。

Fig. 1 Toxicity of doxorubicin to OVCAR-8.

2.2 流式细胞仪检测阿霉素对 OVCAR-8 的作用

流式细胞仪检测阿霉素能有效诱导 OVCAR-8 凋亡、坏死, 阿霉素作用 48 h, OVCAR-8 凋亡率为 15%, 坏死率为 20%, 总效率达 35%(图 2)。

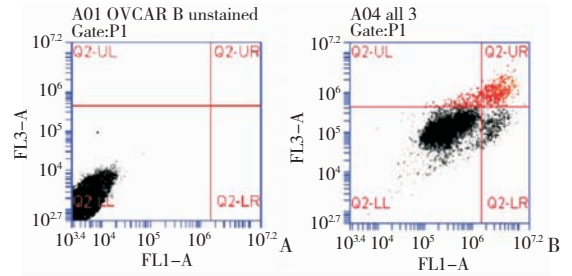


图 2 流式细胞仪检测阿霉素对 OVCAR-8 的作用。A: 阴性对照细胞; B: 阿霉素治疗后 48 h, OVCAR-8 凋亡率为 15%, 坏死率为 20%, 总效率达 35%。LL: 正常活细胞区; LR: 早期凋亡细胞区; UR: 晚期凋亡和坏死细胞区。

Fig. 2 Efficiency of doxorubicin to OVCAR-8 measured by flow cytometry. A: Control cells; B: Cells were treated by doxorubicin for 48 h. The apoptotic percentage is 15%, the dead percentage is 20%, and the total efficient percentage is 35%. LL: Normal cells; LR: Early apoptotic cells. UR: Late apoptotic cells and dead cells.

2.3 光学显像

注射显像剂后 1~24 h, 治疗组肿瘤均显影较清晰, 但早期本底相对较高, 肿瘤的平均荧光强度在 24 h 最高。Cy5.5-annexin V 显像中, 治疗组肿瘤的平均荧光强度为 1.4×10^6 photon/($\text{cm}^2 \cdot \text{s}$), 对照组为 0.98×10^6 photon/($\text{cm}^2 \cdot \text{s}$), 治疗组肿瘤的荧光强度高于对照组 ($P < 0.001$, 图 3); Zn-DPA-PSS794 显像中, 治疗组的平均荧光强度为 2.3×10^6 photon/($\text{cm}^2 \cdot \text{s}$), 对照组为 1.3×10^6 photon/($\text{cm}^2 \cdot \text{s}$), 治疗组肿瘤的荧光强度高于对照组 ($P < 0.001$, 图 4)。因此选择注射显像剂后 24 h 作为最佳显像时间。

2.4 HE 染色

DPA 组和 annexin V 组的肿瘤组织 HE 染色后, 光镜下观察, 可见癌细胞紧密排列, 有不规则腺样结构, 核大, 有分裂相, 系腺上皮肿瘤来源(图 5)。

2.5 Caspase-3 蛋白表达水平检测

各组肿瘤组织经 Western 印迹分析, 治疗组中, DPA 组和 annexin V 组的 caspase-3 蛋白均高表达; 对照组中, DPA 组和 annexin V 组的 caspase-3 蛋白均低表达(图 6)。

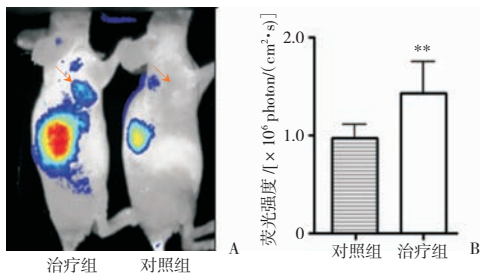


图 3 Cy5.5-annexin V 显像。 A: Cy5.5-Annexin V 光学成像图, 裸鼠尾静脉注射显像剂后 24 h, 治疗组的肿瘤显影清晰, 对照组肿瘤显影很淡(箭头所示); B: 肿瘤部位的荧光强度直方图, 与对照组比较, $** P < 0.001$ 。

Fig. 3 Optical imaging with Cy5.5-annexin V. A: Photons accumulated in the tumor after Cy 5.5-annexin V was injected via tail vessel of the nude mice for 24 h in the treatment group. That is negative imaging in the control group (Arrows); B: Histogram of the fluorescent intensity of the tumor in the 2 groups. Compared with the control group, $** P < 0.001$.

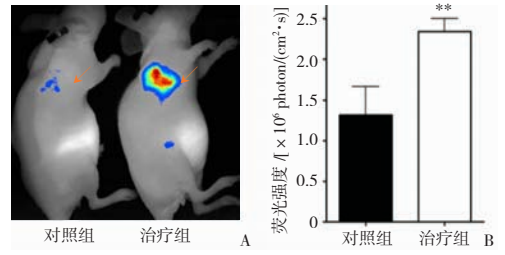


图 4 Zn-DPA-PSS794 显像。 A: Zn-DPA-PSS794 光学成像图, 裸鼠尾静脉注射显像剂后 24 h, 治疗组的肿瘤显影清晰, 对照组肿瘤显影很淡(箭头所示); B: 肿瘤部位的荧光强度直方图。与对照组比较, $** P < 0.001$ 。

Fig. 4 Optical imaging with Zn-DPA-PSS794. A: Photons accumulated in the tumor after Zn-DPA-PSS794 was injected via tail vessel of the nude mice for 24 h in the treatment group. That is negative imaging in the control group (Arrows); B: Histogram of the fluorescent intensity of the tumor in the 2 groups. Compared with the control group, $** P < 0.001$.

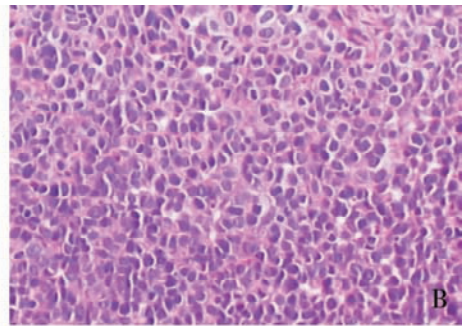
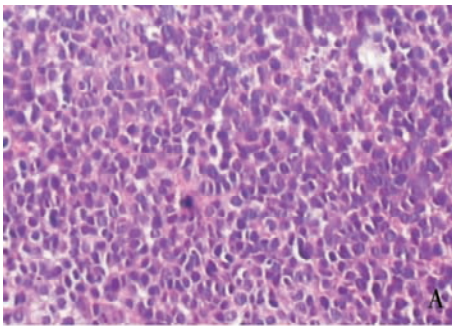


图 5 HE 染色 ($\times 200$)。 A: DPA 组; B: Annexin V 组。肿瘤组织中癌细胞排列紧密, 核大, 深染, 并有分裂相。

Fig. 5 HE staining ($\times 200$). A: DPA group; B: Annexin V group. Cells of the tumor tissues arrange tightly. The nuclei are big with deep color.

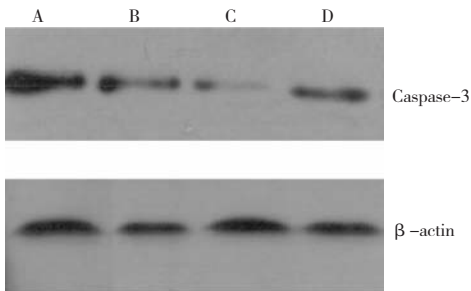


图 6 Caspase-3 蛋白水平检测。 A: DPA 治疗组; B: DPA 对照组; C: Annexin V 对照组; D: Annexin V 治疗组。

Fig. 6 Expression of caspase-3 protein. A: DPA treatment group; B: DPA control group; C: Annexin V control group; D: Annexin V treatment group.

3 讨 论

在分子影像学飞速发展的今天, 实时监测肿瘤细胞凋亡、坏死的显像技术能改变肿瘤的临床治疗

方案, 提高疗效、减少治疗过程中毒副作用对机体的影响; 而合适探针或显像剂的选择应用是分子影像技术发展的关键, 凋亡显像剂主要的特异性靶目标是外翻磷脂酰丝氨酸 (phosphatidyl serine, PS)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 (caspase) 活化、线粒体通透性改变、死亡因子受体表达及肿瘤坏死因子 α 介导的细胞死亡^[8]。

研究^[9]表明: 在正常细胞膜上, PS 基团位于细胞质侧, 而细胞凋亡早期, 细胞膜表面的改变之一是 PS 从细胞膜内转移并暴露在细胞膜外表面, 给出可被吞噬信号。PS 基团位置的改变成为早期细胞凋亡、直至坏死的一个重要标志。因此选择对 PS 的高亲和性的显像剂, 检测暴露在细胞膜外的 PS, 从而建立一种早期凋亡指标的检测方法是研究者努力的目标。近年来, annexin V 蛋白因能与凋亡细胞表面的 PS 特异性结合而显像, 受到广大研究者的广泛关注。Annexin V 含有 319 个氨基酸, 有与钙离子和磷脂特异性结合位点。研究者们将放射性核素标记

annexin V,通过 PET 或 SPECT 显像监测肿瘤治疗后细胞凋亡、坏死情况^[10],也有用 annexin V 与发射红外线的荧光素(Cy5.5)结合,建立一种无创性探测细胞凋亡的近红外线光学检查手段^[11],或将2种探针同时标记在 annexin V 上进行双模式显像^[12],均获得较满意的结果;但 annexin V 首先是一种蛋白,作为显像剂进入体内有可能产生免疫源性反应,而其稳定性不够也使其不能长期储存^[13]。另外 annexin V 的蛋白结构上有23个有活性的氨基残基,在与多重报告基因进行生物螯合时,会降低其与细胞膜上 PS 的亲合力^[14]。

Zn-DPA 是一种小分子化合物,能选择性地与细胞凋亡或坏死时细胞膜外翻的 PS 结合^[15]。研究^[16]发现:当光的波长在 650~900 nm 时,其对组织的穿透力达到最强,因此本研究利用近红外线荧光素标记 Zn-DPA,通过光学显像仪探测卵巢癌化疗后肿瘤细胞凋亡、坏死情况,并与 Cy5.5-annexin V 光学显像进行比较。结果显示:在体外阿霉素能有效诱导 OVCAR-8 细胞凋亡、坏死;阿霉素治疗 OVCAR-8 荷瘤裸鼠 2 次后,Zn-DPA-PSS794 光学显像即可见肿瘤部位有很强的荧光信号,其荧光强度高于未治疗的肿瘤($P < 0.001$),肿瘤组织经 Western 印迹检测,显示 caspase-3 蛋白高表达,而 caspase-3 是一个重要的凋亡诱导者,在细胞凋亡中扮演中心角色,它的活性高进一步证实细胞凋亡的发生。在本研究中,Zn-DPA-PSS794 与 Cy 5.5-annexin V 均能在凋亡、坏死的肿瘤细胞中显影,与文献^[17]报道类似,而且 Zn-DPA-PSS794 在凋亡坏死肿瘤组织中聚集的荧光强度明显高于 Cy5.5-annexin V,提示 DPA 可能较 annexin V 更敏感地显示肿瘤细胞的凋亡、坏死,因此可推测小分子显像剂 Zn-DPA 有可能取代 annexin V,成为有发展应用前景的检测肿瘤细胞凋亡、坏死的显像剂。

由于荧光素的高度稳定性,荧光显像可反复进行,便于动态观察肿瘤治疗后凋亡情况,有利于快速判断和确定疾病进展程度和疗效;但可见光包括荧光很难穿透体表到达深层的生物组织,荧光标记的组织对比剂不适合体内深部组织的显像,这是目前光学显像的不足之处。放射性核素穿透性强,灵敏度高,利用放射性核素标记 Zn-DPA 将是笔者下一步研究的方向。

志谢:感谢美国国立卫生研究院(National Institute of Health,NIH)分子影像中心主任陈小元教授给予本研究的大力支持与帮助!

参考文献:

[1] Haberkorn U, Markert A, Mier W, et al. Molecular imaging of

- tumor metabolism and apoptosis [J]. *Oncogene*, 2011, 16. [Epub ahead of print]
- [2] Vangestel C, Peeters M, Mees G, et al. In vivo imaging of apoptosis in oncology: an update [J]. *Mol Imaging*, 2011, 26. [Epub ahead of print]
- [3] Smith B A, Xiao S, Wolter W, et al. In vivo targeting of cell death using a synthetic fluorescent molecular probe [J]. *Apoptosis*, 2011, 16(7):722-731.
- [4] Edgington L E, Berger A B, Blum G, et al. Noninvasive optical imaging of apoptosis by caspase-targeted activity-based probes [J]. *Nat Med*, 2009, 15(8):967-973.
- [5] Sun D, Yang K, Zheng G, et al. Study on effect of peptide-conjugated near-infrared fluorescent quantum dots on the clone formation, proliferation, apoptosis, and tumorigenicity ability of human buccal squamous cell carcinoma cell line Beac2D885 [J]. *Int J Nanomedicine*, 2010, 5:401-405.
- [6] Petrovsky A, Schellenberger E, Josephson L, et al. Near-infrared fluorescent imaging of tumor apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(8):1936-1942.
- [7] Smith B A, Akers W J, Leevy W M, et al. Optical imaging of mammary and prostate tumors in living animals using a synthetic near infrared zinc(II)-dipicolylamine probe for anionic cell surfaces [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(1):67-69.
- [8] Niu G, Chen X. Apoptosis imaging: beyond annexin V [J]. *J Nucl Med*, 2010, 51(11):1659-1662.
- [9] Collingridge D R, Glaser M, Osman S, et al. In vitro selectivity, in vivo biodistribution and tumour uptake of annexin V radiolabelled with a positron emitting radioisotope [J]. *Br J Cancer*, 2003, 89(7):1327-1333.
- [10] Li X, Link J M, Stekhova S, et al. Site-specific labeling of annexin V with F-18 for apoptosis imaging [J]. *Bioconjugate Chem*, 2008, 19(8):1684-1688.
- [11] 田蓉,孙红芳,匡安仁,等.细胞凋亡近红外线荧光显像在评价肿瘤放疗早期疗效中的作用 [J]. *中国临床医学影像杂志*, 2008, 19(12):846-849,871.
- TIAN Rong, SUN Hongfang, KUANG Anren, et al. Evaluation of early efficacy of tumor radiation therapy using NIRF imaging [J]. *Journal of China Clinic Medical Imaging*, 2008, 19(2):846-459,871.
- [12] Zhang R, Lu W, Wen X, et al. Annexin A5-Conjugated Polymeric Micelles for Dual SPECT and Optical Detection of Apoptosis [J]. *J Nucl Med*, 2011, 52(6):958-964.
- [13] Frey B, Schildkopf P, Rödel F, et al. AnnexinA5 renders dead tumor cells immunogenic-implications for multimodal cancer therapies [J]. *J Immunotoxicol*, 2009, 6(4):209-216.
- [14] Vanderheyden J L, Liu G Z, He J, et al. Evaluation of Tc-99m-MAG(3)-annexin V: influence of the chelate on in vitro and in vivo properties in mice [J]. *Nucl Med Biol*, 2006, 33(1):135-144.
- [15] DiVittorio K M, Leevy W M, O'Neil E J, et al. Zinc(II) coordination complexes as membrane-active fluorescent probes and antibiotics [J]. *ChemBiochem*, 2008, 9(2):286-293.
- [16] Adams K E, Ke S, Kwon S, et al. Comparison of visible and near-infrared wavelength-excitable fluorescent dyes for molecular imaging of cancer [J]. *J Biomed Opt*, 2007, 12(2):024017.
- [17] Smith B A, Gammon S T, Xiao S. In vivo optical imaging of acute cell death using a near-infrared fluorescent zinc-ipcicolylamine probe [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(2):583-590.