

MRI observation of apoptotic cells using superparamagnetic iron oxide nanoparticles labeled Annexin V in vitro

LI Zong-fang¹, LIU Liu^{2*}, TIAN Wei¹, TENG Gao-jun³, ZHANG Yu⁴, GE Yu-qing⁴, WANG Fu-ke²

(1. Center of Imaging, 2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China; 3. Department of Radiology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China; 4. Department of Biomedical Engineering, Southeast University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the feasibility of imaging apoptotic cells in vitro by MRI with SPIO labeled Annexin V. **Methods** Five tubes (A – E) containing different cells were scanned with MR and then stained with Prussian blue, including tube A (cells not treated with H₂O₂ before incubated with SPIO), tube B (cells treated with H₂O₂ before incubated with SPIO), tube C (cells not treated with H₂O₂ and as control tube), tube D (cells treated with H₂O₂ before incubated with Annexin V-SPIO) and tube E (cells not treated with H₂O₂ before incubated with Annexin V-SPIO). **Results** There were statistically significant differences among five tubes on the signal intensity of MR ($F = 569.38, P < 0.01$), especially between tube D and tube B, tube E and tube A, tube D and tube E. Prussian blue stain revealed SPIO labeled Annexin V could bind specifically to apoptotic cells. **Conclusion** SPIO labeled Annexin V can bind specifically to apoptotic cells, inducing the signal intensity changes of MRI. **[Key words]** Magnetic resonance imaging; Apoptosis; Annexin V

MRI 观察超顺磁性纳米颗粒标记的 Annexin V 体外检测细胞凋亡

李宗芳¹, 刘 流^{2*}, 田 伟¹, 滕皋军³, 张 宇⁴, 葛玉卿⁴, 王福科²

(1. 昆明医学院第一附属医院影像中心, 2. 口腔颌面外科, 云南 昆明 650032; 3. 东南大学附属中大医院放射科, 江苏 南京 210009; 4. 东南大学生物医学工程系, 江苏 南京 210009)

[摘要] **目的** 利用 MRI 观察超顺磁性纳米颗粒(SPIO)标记的膜联蛋白 V(Annexin V)体外检测凋亡细胞的能力。 **方法** 对 5 管不同的细胞进行 MRI 和普鲁士蓝染色, 分别为: A 管: 未经 H₂O₂ 诱导凋亡处理的细胞与 SPIO 孵育; B 管: 经 H₂O₂ 诱导凋亡处理的细胞与 SPIO 孵育; C 管: 经 H₂O₂ 诱导凋亡处理的细胞的空白管; D 管: 经 H₂O₂ 诱导凋亡处理的细胞与 Annexin V-SPIO 孵育; E 管: 未经 H₂O₂ 诱导凋亡处理的细胞与 Annexin V-SPIO 孵育。 **结果** 5 管间总体比较 MR 信号值差异有统计学意义($F = 569.38, P < 0.01$), 其中 A、B、C 三管的 MR 信号值差异无统计学意义, D 和 B 管、E 和 A 管、D 和 E 管的 MR 信号值比较差异均有统计学意义。普鲁士蓝染色显示 Annexin V-SPIO 可与凋亡细胞膜特异性结合。 **结论** Annexin V-SPIO 可与体外凋亡细胞特异性结合, 并引起磁共振信号改变。

[关键词] 磁共振成像; 凋亡; 膜联蛋白 V

[中图分类号] R-332; R445.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2009)05-0734-04

目前体外探测细胞凋亡的影像学技术主要包括核素显像、MR、光学与生物发光成像、超声成像等^[1-2]。本研究将超顺磁性纳米颗粒(superparamagnetic iron oxide, SPIO)标记于膜联蛋白 V(Annexin V)上, 用 MRI 显示 Annexin V-SPIO 在体

外与凋亡细胞的结合, 探讨 Annexin V-SPIO 检测凋亡细胞的能力。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 高分化大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株 PC12 细胞, 购自昆明中科院动物所。主要试剂: 不完全 RPMI-1640 培养液(南京凯基生物公司), 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所), Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(Bipec Biopharma Corporation, USA), Annexin-V (BD Pharmingen™, USA), 磁性纳米颗粒二巯基丁二酸包覆的三氧化二铁纳米颗

[作者简介] 李宗芳(1973 -), 女, 河南安阳人, 在读博士, 讲师。研究方向: 磁共振分子影像。E-mail: lizf111@126.com

[通讯作者] 刘流, 昆明医学院第一附属医院口腔颌面外科, 650032。

E-mail: liuliu3939@126.com

[收稿日期] 2008-11-26 **[修回日期]** 2009-01-08

粒(DMSA@ MNPs, 8 nm, 由东南大学生物科学与医学工程学院惠赠), H₂O₂(Alfa 公司, 美国), 多聚赖氨酸。

1.1.2 主要设备 Herabus CO₂ 培养箱, Zeiss 倒置显微镜, 净化工作台(吴江市生化净化设备厂), Corning 细胞培养瓶, Greiner 6 孔培养板, BD FACSCanto™, 流式细胞仪(BDFACS-Canto™, USA)。

1.2 实验方法

1.2.1 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞凋亡

(1) PC12 细胞的培养及传代: PC12 细胞按常规培养于含 10% 胎牛血清及双抗(青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 μg/ml) 的 PRMI-1640 培养基中, 置于 5% CO₂、饱和湿度、37℃ 培养箱内培养。根据细胞生长情况, 贴壁约 80% 时用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

(2) H₂O₂ 诱导 PC12 细胞凋亡: 将生长良好的 PC12 细胞制成细胞悬液, 按 1 × 10⁴/ml 接种于 6 孔细胞培养板中, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养至细胞贴壁约 80% 时分组处理。分别用终浓度为 0、50、100、200、400 μmol/L 的 H₂O₂ 处理 PC12 细胞, 继续培养 1 h, 重复实验 3 次。

(3) 流式细胞仪检测 PC12 细胞的凋亡率: Annexin V-FITC/PI 检测凋亡, 然后以流式细胞仪检测, 以 Annexin + /PI - 为早期凋亡, Annexin + /PI + 为中晚期凋亡。

1.2.2 Annexin V-SPIO 的合成 取 0.2 mg DMSA@ MNPs 溶解在 1 ml 吗啉乙磺酸钠盐缓冲液(MES)中进行磁分离, 超声作用 10 min, 加入一定量 1,2-二氯乙烷(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS), 振荡反应 15 min 进行磁分离, MES 洗涤 3 次, 然后加入 10 μg Annexin V, 室温下振荡反应 2 h 磁分离, PBS 洗涤 3 次, 再加入 1 mg/ml 氨基化聚乙二醇(PEG-NH₃) 的 PBS, 37℃ 包被 2 h 磁分离, PBS 洗涤 3 次, 4℃ 保存。

1.2.3 MRI 采用 GE 1.5T Signa Infinity 超导型 MR 扫描系统, 序列: 梯度回波 T2WI(T2* WI): TR/TE = 200 ms/20 ms, 翻转角度 = 15°, 层厚/间隔为 2 mm/0.2 mm, 视野为 8 cm, 矩阵为 320 × 192, 激励次数为 3, 对 5 管细胞行 MR 扫描: A 管为未经 H₂O₂ 诱导凋亡处理的细胞与 SPIO 孵育, B 管为经 H₂O₂ 诱导凋亡处理的细胞与 SPIO 孵育, C 管为经 H₂O₂ 诱导凋亡处理的细胞的空白管, D 管为经 H₂O₂ 诱导凋亡处理的细胞与 Annexin V-SPIO 孵育, E 管为未经 H₂O₂ 诱导凋亡处理的细胞与 Annexin V-SPIO 孵育。

将生长良好的 PC12 细胞制成细胞悬液, 按 1 × 10⁴/ml 接种于 6 孔细胞培养板中, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养至细胞贴壁约 80% 时分组处理。按上述分组将需诱导凋亡的细胞用终浓度为 200 μmol/L 的 H₂O₂ 作用 1 h 终止, 用 PBS 洗涤 2 遍, 再按上述分组分别加入 SPIO 和 Annexin V-SPIO 及 1 × Annexin V 结合缓冲液(SPIO 和 Annexin V-SPIO 的终浓度均为 30 μg/ml), 室温下作用 20 min 后终止, 用 PBS 洗涤 3 遍, 然后收集细胞于 EP(Eppendorf tube)管中, 1000 r/min 离心 6 min, 弃上清, 加入浓度为 1% 的融化琼脂糖 0.5 ml 并迅速吹打混匀, 待冷却后行 MR 扫描。重复实验 5 次。

1.2.4 染色 将生长良好的 PC12 细胞制成细胞悬液, 按 1 × 10⁴/ml 接种于预先用多聚赖氨酸包被过的盖玻片上, 然后按

1.2.3 中步骤, 至加入 SPIO 和 Annexin V-SPIO 及 1 × Annexin V 结合缓冲液作用 20 min 后终止, PBS 洗涤 3 遍, 用 4% 甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 3 遍, 后行普鲁士蓝染色。另取部分 PC12 细胞按 1 × 10⁴/ml 接种于预先用多聚赖氨酸包被过的盖玻片上, 然后加入 SPIO(终浓度为 30 μg/ml), 培养 24 h 后, 用 4% 甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 3 遍, 行普鲁士蓝染色。将上述盖玻片置于含 2% 亚铁氰化钾的 6% 盐酸溶液室温 30 min, PBS 洗涤 3 遍, 1% 核固红复染 1 min, 流水冲洗, 光镜下观察。

1.3 统计学处理 所有统计数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 13.0 统计分析软件处理。比较不同浓度 H₂O₂ 作用下各组间凋亡细胞百分比及比较不同成分的细胞管在 MR(T2* WI) 上信号值差异有无统计学意义, 均采用单因素方差分析方法两两比较中的 LSD 法, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞凋亡 流式细胞仪图中 Q3 为第三象限, 代表活细胞; Q4 为第四象限, 代表早期凋亡细胞; Q2 为第二象限, 代表中晚期凋亡细胞。浓度为 0、50、100、200、400 μmol/L H₂O₂ 诱导 PC12 细胞凋亡(Q2 + Q4) 百分比分别为 (6.87 ± 1.46)%、(9.40 ± 1.61)%、(13.03 ± 2.35)%、(51.03 ± 5.37)%、(80.50 ± 6.71)%。各处理浓度总体比较差异有统计学意义(F = 187.53, P = 0.00), 两两比较其中 0、50、100 μmol/L H₂O₂ 差异无统计学意义, 0、50、100 μmol/L 分别与 200、400 μmol/L 的处理浓度间差异有统计学意义, 200 μmol/L 与 400 μmol/L 的处理浓度间差异亦有统计学意义。以上统计学分析显示随着 H₂O₂ 浓度的增高, PC12 细胞凋亡率逐渐增高, 且从 200 μmol/L 的处理浓度开始有统计学差异, 因此下述实验采用 200 μmol/L 的处理浓度诱导细胞凋亡(图 1)。

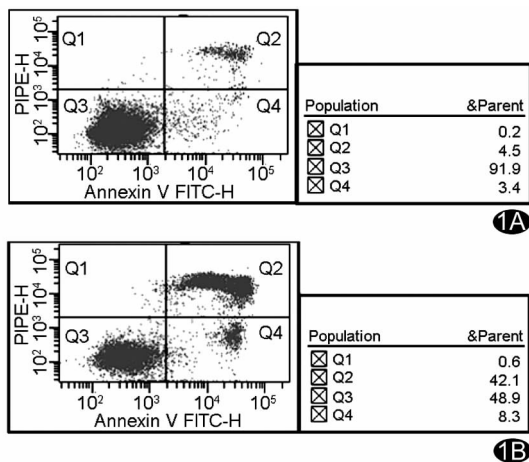


图 1 Annexin V-FITC/PI 双染法测定不同浓度 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞凋亡的流式细胞图 A. 0 μmol/L H₂O₂ 诱导 PC12 细胞凋亡; B. 200 μmol/L H₂O₂ 诱导 PC12 细胞凋亡

2.2 MRI 不同成分细胞管的 T2* WI 信号值为: A 管 6423.38 ± 231.60, B 管 6302.62 ± 124.37, C 管 6520.01 ±

87.74, D 管 2457.86 ± 161.35 , E 管 4167.02 ± 200.69 。MRI 信号值各管间总体比较差异有统计学意义 ($F = 569.38, P = 0.00$), 两两比较 A、B、C 管差异无统计学意义, C 管与 D、E 管, D 与 B 管、E 管与 A 管、D 管与 E 管差异均有统计学意义 (图 2)。

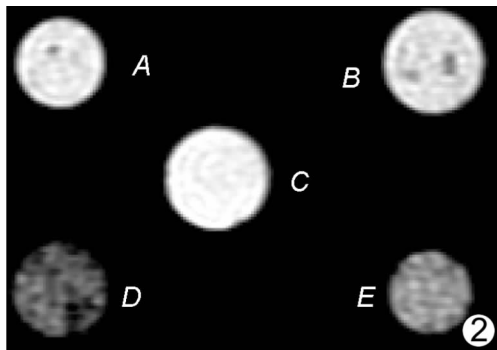


图 2 不同成分细胞管的 MRI (T2*WI) C 管信号最高, A、B 管信号稍低于 C 管, D、E 管信号明显降低, 且 D 管信号低于 E 管

2.3 普鲁士蓝染色 A、B、C 孔均未见蓝色铁颗粒黏附于细胞膜 (图 3), D、E 孔见蓝色铁颗粒黏附形态无明显变化 (早期凋亡) 和已皱缩的细胞 (中、晚期凋亡) 的细胞膜 (图 4、5), 与 SPIO 共孵育 24 h 的 PC12 细胞见大量蓝色铁颗粒进入细胞浆中 (图 6), 与黏附于细胞膜的铁颗粒形态不同。

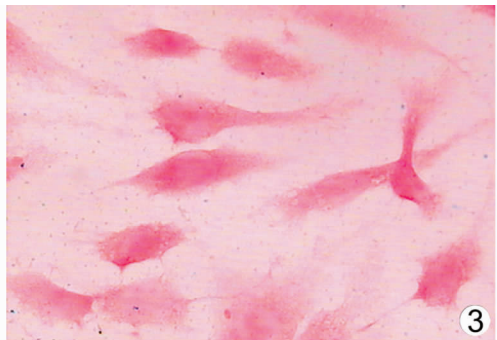


图 3 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 诱导 PC12 细胞凋亡后与 SPIO 共孵育的细胞的普鲁士蓝染色 未见蓝色铁颗粒特异性黏附于细胞膜, 亦未见进入胞浆内, 只在背景上见少量蓝色铁颗粒 ($\times 1000$)

3 讨论

多种疾病均以细胞凋亡为主要特征^[3-4], 如神经退行性疾病、脑和心肌缺血/再灌注损伤、面神经损伤致其中枢神经元的凋亡、慢性肝炎和移植排斥反应等。因此, 研究活体细胞凋亡检测具有重要临床价值。

H_2O_2 是活性氧簇的主要成分之一, 可以跨膜扩散进入细胞内, 是一种比较常用的细胞氧化应激诱导剂, 广泛用于诱导细胞凋亡。PC12 细胞来源于大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤的细

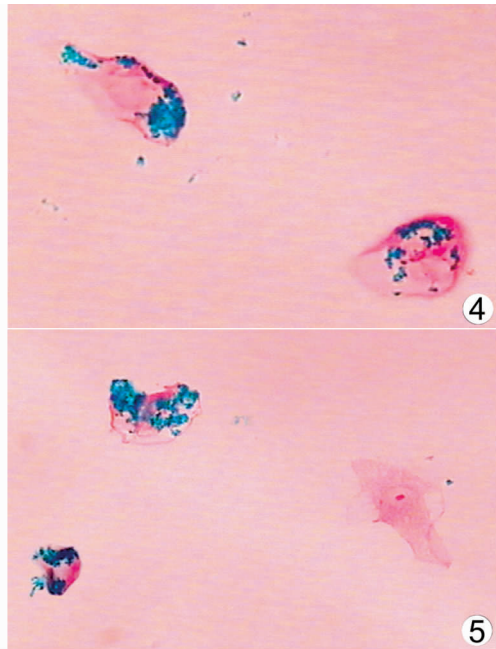


图 4、5 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 诱导 PC12 细胞凋亡与 Annexin V-SPIO 共孵育的细胞的普鲁士蓝染色 蓝色铁颗粒黏附于形态无明显变化 (早期凋亡) 及已经皱缩的细胞 (中、晚期凋亡) 的细胞膜上, 正常细胞膜上未见蓝色铁颗粒黏附 ($\times 1000$)

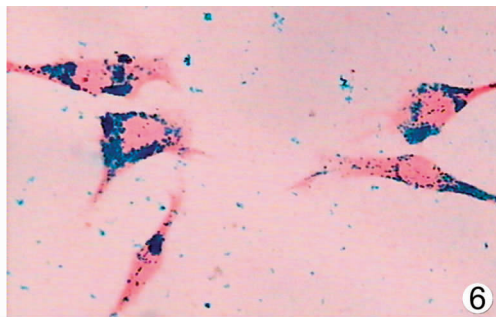


图 6 与 SPIO 共孵育 24 h 的 PC12 细胞的普鲁士蓝染色 大量蓝色铁颗粒进入细胞浆中, 与黏附于细胞膜的铁颗粒形态不同 ($\times 1000$)

胞系, 是目前应用最多的体外研究神经元的取代模型。本研究采用 H_2O_2 诱导 PC12 细胞凋亡进行体外 MR 扫描。

目前国外利用磁共振凋亡检测探针进行凋亡细胞的 MRI 已经取得了较大进展, 其中最成功的是应用 Annexin V 或突触结合蛋白 I (Synaptotagmin I) 与外翻的 PS 特异性结合的原理来探测凋亡^[5]。Schellenberger 等^[6] 将交联铁氧纳米粒子 (cross-linked iron oxide nanoparticles, CLIO) 连接于 Annexin V, 作为磁共振凋亡检测探针, 发现喜树碱治疗后的 Jurkat T 细胞 (65% 发生凋亡) 与 Annexin V-CLIO 温育后, MR T2WI 信号强度明显降低。在后续研究中 Schellenberger 等^[7] 又合成了 Annexin V-CLIO-Cy 5.5 这种既可以用于磁共振成像、也可以用于光学成像的磁/光学纳米粒子。Sosnovik 等^[8] 用 Annexin V-CLIO-Cy 5.5 对大鼠的心肌细胞凋亡进行体外和体内 MR 观察, 结果显示 Annexin V-CLIO-Cy 5.5 可使凋亡心肌细

胞 T2WI 信号明显降低。最近 van Tilborg 等^[9]合成了两种类型脂质基础上的磁/光学双重造影剂,除均含有 Annexin V 和荧光显像剂外,其中一种含 SPIO,直径约为 10 nm,另一种含钆造影剂(Gd-DTPA-BSA),直径约为 100 nm,这两种造影剂均显著增加了凋亡细胞的弛豫率,并且通过共聚焦显微镜证实这种弛豫率的增加来自于造影剂与凋亡细胞的结合,显示出磁共振凋亡检测探针用于研究细胞凋亡的巨大潜力。

本研究将 Annexin V 与 SPIO 结合并用 MRI 方法对其检测凋亡细胞的能力进行了初步评价,结果显示:①A、B、C 管 MR 信号值无统计学差异,且 A、B 孔普鲁士蓝染色均未见蓝色铁颗粒黏附于细胞膜和进入细胞浆;但 MRI 中 A 管和 B 管信号较 C 管稍降低,可能与 SPIO 的非特异性沉积有关,因为普鲁士蓝染色显示背景上有少量蓝色铁颗粒,提示未与 Annexin V 结合的 SPIO 在短时间内(20 min 内)不与凋亡和正常细胞结合,亦不进入胞浆内,使 MR 信号不会明显降低。②在相同条件下,加入 Annexin V-SPIO 的细胞(即 D、E 管)与加入 SPIO 的细胞(即 B、A 管)比较 MRI 信号明显降低,普鲁士蓝染色 A、B 孔均未见蓝色铁颗粒,只有 D、E 孔见蓝色铁颗粒黏附于胞膜上,且与 SPIO 和 PC12 细胞共孵育 24 h 后胞浆中的大量蓝染颗粒不同,说明 MR 信号改变来源于与 Annexin V 结合后的 SPIO,而非 SPIO 的非特异性沉积或 SPIO 被吞入胞浆内,但 SPIO 与 Annexin V 的结合效率需进一步研究。③因 D 管和 E 管中凋亡细胞的量不同,D 管 MR 信号较 E 管显著降低,E 管细胞虽未诱导凋亡,但 PC12 细胞在正常生长状态下亦有少量凋亡细胞(参见 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞凋亡 0 μmol/L 组),而 D 管细胞被 H₂O₂ 诱导后产生大量凋亡细胞,提示 Annexin V-SPIO 与凋亡细胞结合的量与细胞的凋亡量有一定关系,但可引起 MR 信号改变的凋亡细胞数量下限值尚需进一步研究。④本研究 MR 低信号颗粒存在不均匀性,可能原因如下:Annexin V 是与凋亡细胞的细胞膜上外翻的 PS 结合,早期凋亡和中、晚期凋亡的细胞膜上外翻的 PS 数量不等,因此 Annexin V-SPIO 与不同凋亡时期的细胞膜的结合量不同,使不同细胞负载 Annexin V-SPIO 的量不同,负载 Annexin V-

SPIO 量较大的细胞信号降低明显,反之则信号降低轻微;凋亡细胞有聚集成团倾向,很容易造成吹打混匀不够彻底,从而形成负载 Annexin V-SPIO 的细胞团,造成 MR 低信号颗粒的不均匀。

[参考文献]

- [1] Luo QY, Zhu RS. Imaging modalities for in vivo detection of apoptosis. Chin J Med Imaging Technol, 2004, 20(10): 1620-1623.
罗全勇, 朱瑞森. 活体内探测细胞凋亡的影像学技术. 中国医学影像技术, 2004, 20(10): 1620-1623.
- [2] Luo QY, Zhang ZY, Wang F, et al. Preparation and bioevaluation of ^{99m}Tc-Annexin B1 as a novel radiotracer for apoptosis imaging. Chin J Med Imaging Technol, 2008, 24(8): 1177-1181.
罗全勇, 张志勇, 王芳, 等. ^{99m}Tc-Annexin B1 的制备及其探测细胞凋亡的实验研究. 中国医学影像技术, 2008, 24(8): 1177-1181.
- [3] Mattson MP, Culmsee C, Yu ZF, et al. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. Cell Tissue Res, 2000, 301(1): 163-171.
- [4] Mattsson P, Delfani K, Janson AM, et al. Motor neuronal and glial apoptosis in the adult facial nucleus after intracranial nerve transection. J Neurosurg, 2006, 104(3): 457-460.
- [5] Zhao M, Beauregard DA, Loizou L, et al. Non-invasive detection of apoptosis using magnetic resonance imaging and a targeted contrast agent. Nat Med, 2001, 7(11): 1241-1244.
- [6] Schellenberger EA, Bogdanov A Jr, Högemann D, et al. Annexin V-CLIO: a nanoparticle for detecting apoptosis by MRI. Mol Imaging, 2002, 1(2): 102-107.
- [7] Schellenberger EA, Sosnovik D, Weissleder R, et al. Magneto/optical annexin V, a multimodal protein. Bioconjug Chem, 2004, 15(5): 1062-1067.
- [8] Sosnovik DE, Schellenberger EA, Nahrendorf M, et al. Magnetic resonance imaging of cardiomyocyte apoptosis with a novel magneto-optical nanoparticle. Magn Reson Med, 2005, 54(3): 718-724.
- [9] van Tilborg GA, Mulder WJ, Deckers N, et al. Annexin A5-functionalized bimodal lipid-based contrast agents for the detection of apoptosis. Bioconjug Chem, 2006, 17(3): 741-749.