

## 适配体介导的 MRI-As 靶向造影剂的动物体内实验

林彩燕<sup>1</sup>, 周永恒<sup>2</sup>, 曹晶<sup>1</sup>, 胡华钟<sup>3</sup>, 钟文飞<sup>1</sup>, 朱秋连<sup>4</sup>, 严鹏科<sup>1</sup>

(1. 广州医科大学附属第三医院药学部, 广东省广州市 510150; 2. 广州市增城区人民医院, 广东省广州市 511300;  
3. 南方医科大学第三附属医院, 广东省广州市 510000; 4. 广州市碳码科技有限公司, 广东省广州市 510670)

[关键词] 动脉粥样硬化; 核磁共振成像; 适配体; 靶向造影剂

[摘要] **目的** 合成一种靶向于动脉粥样硬化(As)病变的核磁共振成像(MRI)纳米造影剂, 为开发新型动脉粥样硬化 MRI 诊断技术提供实验依据。**方法** 运用自主研发的对泡沫细胞具有靶向性的寡核苷酸适配体 PM1, 与四氧化三铁( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )纳米粒耦联, 制备出具有靶向作用的 MRI 造影剂, 命名为 MRI-As。用高脂饲料饲养建立载脂蛋白 E 基因敲除( $\text{ApoE}^{-/-}$ )小鼠 As 动物模型, 苏丹红 IV 染色鉴定主动脉 As 病变。MRI 成像仪检测 MRI-As 造影剂对 As 小鼠斑块 MRI 成像的影响。**结果**  $\text{ApoE}^{-/-}$ 小鼠模型动物 MRI 显像可以观察到主动脉壁毛糙, As 病灶呈高信号亮点, 与周围组织形成良好对比, 中心信号较高, 较均匀, 边缘较清楚。注射 MRI-As 造影剂后, As 病变区信号强度呈下降趋势, 管壁不光滑, 呈多发斑点状信号的缺损。对照组动物注射 MRI-As 造影剂后, 血管壁信号强度无明显变化。**结论** MRI-As 造影剂对 As 病变能起到主动靶向作用, 利用  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒对 As 病变的阴性对比效果, 显著提高了 As 病变的 MRI 图像分辨率, 具有 As MRI 影像的新型、快速、高效、无创、无辐射造影剂的潜质。

[中图分类号] R44

[文献标识码] A

### Animal experiment of aptamer mediated MRI-As targeting contrast agent in vivo

LIN Cai-Yan<sup>1</sup>, ZHOU Yong-Heng<sup>2</sup>, CAO Jing<sup>1</sup>, HU Hua-Zhong<sup>3</sup>, ZHONG Wen-Fei<sup>1</sup>, ZHU Qiu-Lian<sup>4</sup>, YAN Peng-Ke<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510150, China; 2. Guangzhou Zengcheng District People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 511300, China; 3. the Third Affiliated Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510000, China; 4. Department of Bioinformatics, Guangzhou GenCoding Lab, Guangzhou, Guangdong 510670, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Magnetic resonance imaging; Aptamer; Targeting contrast agent

[ABSTRACT] **Aim** To synthesize a nuclear magnetic resonance imaging (MRI) nano contrast agent targeted to atherosclerosis (As) lesions, and to provide experimental evidence for the development of a new MRI diagnostic technique for As. **Methods** The self developed aptamer PM1, which was targeted to the foam cells, was coupled to iron oxide ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanoparticles, and the target MRI contrast agent was prepared, named MRI-As. The As animal model of apolipoprotein E gene knockout ( $\text{ApoE}^{-/-}$ ) was established by feeding with high-fat diet. The As lesion of aorta was identified by Sudan red IV staining. Effect of MRI-As contrast agent on MRI imaging of plaque in As mice was detected by MRI imager. **Results** MRI imaging of the  $\text{ApoE}^{-/-}$  mice animal model showed that the aortic wall was rough. As lesions showed high signal intensity, which was well contrasted with the surrounding tissues. The central signal was higher, more uniform and the edge was clearer. After injection of MRI-As contrast agent, the signal intensity of As lesion area showed a downward trend, and the vascular wall was not smooth and showed the defect of multiple spot signal. After injection of MRI-As contrast agent in control group, the signal intensity of vascular wall did not change significantly. **Conclusions** MRI-As contrast agent can play an active targeting to As lesions. Using the negative contrast effect of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles on As lesions, MRI-As contrast agent significantly enhances the resolution of the MRI image of As lesion, and it has the potential of new, fast, efficient, non-invasive, non radiative contrast agent for As MRI image.

[收稿日期] 2017-11-01

[修回日期] 2018-02-10

[基金项目] 广东省自然科学基金(2014A030313491); 广东省应用型科技研发专项(2015B020233015); 广州市产学研协同创新重大专项项目(201604020166)

[作者简介] 林彩燕, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化靶向药物的研究, E-mail 为 1044479778@qq.com。通讯作者严鹏科, 医学博士, 博士后, 教授, 研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化靶向药物的研究, E-mail 为 Yanpk988@126.com。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)所致的心脑血管疾病是威胁人类健康的首位死因,中国每年至少造成200万人死亡,且这一数据不断攀升<sup>[1-3]</sup>。现有的As影像诊断技术包括血管内超声、数字血管造影、血管镜检查,均为有创诊断技术,必须插入导管才能形成影像,操作复杂,且有一定的危险性和并发症<sup>[4-5]</sup>,不能满足临床需要。因此,急需研发满足临床诊断需要的、具备对As精确诊断、操作简单、安全性高、医疗费用相对便宜等特性的诊断技术<sup>[6-7]</sup>。适配体(aptamer,又译为适体或适配子),为20~200个碱基的单链DNA或RNA,由SELEX技术筛选获得,通过其空间构象与靶物质特异性结合,是目前最具潜力的靶向物质<sup>[8-10]</sup>。本研究利用自主研发的对泡沫细胞具有靶向性的适配体(PM1)<sup>[11-12]</sup>,合成具有As主动靶向的磁性四氧化三铁( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )纳米颗粒核磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)-As造影剂,通过载脂蛋白E基因敲除(apolipoprotein E gene knocked-out, ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠体内实验,用MRI技术验证该MRI-As造影剂是否能检测出动脉硬化发生的部位及斑块大小,从而实现As的无创性、特异性诊断。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

ApoE<sup>-/-</sup>小鼠20只,雄性,6周龄,体重17~18 g,购自北京大学实验动物部,许可证号:SCXK(京)2006-0008。在广州医科大学实验动物中心SPF级环境(室温23℃,相对湿度65%,12 h明暗交替)饲养至8周龄后,随机分成两组,模型组开始喂养高脂饲料,对照组继续喂养普通饲料。

### 1.2 主要试剂及仪器

适配体偶联的超顺磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米粒(实验室自制);鼠用高脂饲料:鼠用普通饲料83.5%+胆固醇1.5%+猪油15%(广东省医学实验动物中心);苏丹红IV染色液-A液(Leagene公司);小动物核磁共振成像仪(PharmaScan70/16型,美国);体式显微镜(Nikon公司)。

### 1.3 MRI-As造影剂的制备

按专利文献(专利号ZL201310237217X)所述的方法,制备适配体偶联的超顺磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米粒,主要过程为:建立泡沫细胞模型,利用指数富集配基的系统进化技术,从体外合成的随机单链DNA文库中筛选得到特异性寡核苷酸适配体PM1,长度81

碱基,序列为CCCCTGCAGGTGATTTTGCTCAAGTCGTTCCCGTCCTCTCCTCTGCGCCCCGTCTCGGCCAGTATCGCTAATCAGGCGGAT<sup>[8]</sup>,用硅烷包裹 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 得到超顺磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米粒,适配体PM1与超顺磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米粒偶联得到适配体偶联的超顺磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米粒。

### 1.4 As动物模型鉴定

动物造模16周后每组取3只小鼠,处死动物,取降主动脉起始处至腹主动脉分叉处主动脉,体式显微镜下剪除血管外结缔组织及脂肪,纵向剖开,生理盐水冲洗残血,将血管条放置于10%甲醛液中固定45~60 min,再将血管条取出用生理盐水冲洗后,置苏丹红IV染色液中染色10 min,再次生理盐水冲洗。将血管条放置在滤纸上,以透明胶片覆盖,用黑色彩笔描出内膜苏丹红IV着色部及整条主动脉轮廓,将描摹得到的胶片放置投影仪上并投射于墙壁,调整好焦距以求放大倍数适宜。将1 cm×1 cm的测试方测格胶片随机覆盖胶片及墙壁上的投影物。计数位于总血管内膜面积内的测点总数(P)以及脂质染色轮廓内的测点总数(P0),然后按公式计算面积分数,即: $A/A0=P/P0$ ,求出斑块面积占整条主动脉面积的百分比。

### 1.5 PharmaScan70/16小动物核磁共振成像仪扫描成像

采用2通道9563正交体线圈,小鼠用异氟烷麻醉后,模型组经尾部静脉注射0.5 mL MRI-As造影剂(1 mg DNA/kg体重),对照组予0.5 mL不含适配体的磁性纳米颗粒。动物置俯卧置线圈中,采用Scout三平面扫描定位(参数:TR 47 ms,TE 5 ms,Flip angle 20, Average 1, Matrix 128×128),扫描6层,层厚1 mm,层间距0.2 mm,FOV 50 mm×50 mm。以肾为解剖标志定位在肾中间位置,体线圈调谐后,频率校准到299.5 MHz,功率校准,使用3Dshim局域匀场。使用梯度回波序列(Gems)(参数:TR 78.72 ms,TE 6.58 ms,Flip angle 20, Average 4, Matrix 256×256),扫描6层,层厚1 mm,层间距0 mm,FOV 13 mm×28 mm,扫描时间1 min 21 s。确定血管位置。使用快速多层面自旋回波序列(Fsems)(参数:TR 1800 ms, Esp 10 ms, Et 18, Kzero 5, 有效TE 50 ms, Average 16, Matrix 128×256),扫描6层,层厚2 mm,层间距0 mm,扫描时间15 min 22 s。

### 1.6 统计分析

用SPSS 16.0软件进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学分析采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学

意义。

## 2 结果

### 2.1 主动脉 As 的鉴定

模型组:高脂喂养 16 周后,取降主动脉起始处至腹主动脉分叉处主动脉,剪除血管外结缔组织及脂肪,纵向剖开,苏丹红 IV 染色后观察,可以观察到病变区呈深红色,观察到明显的动脉粥样斑块形成(图 1)。对照组:血管壁柔软,富有弹性,主动脉壁薄厚均匀,内膜光滑,未见 As 斑块形成(图 1)。模型组病变面积与血管面积之比为  $49.2\% \pm 17.6\%$ ,对照组没有观察到斑块形成。

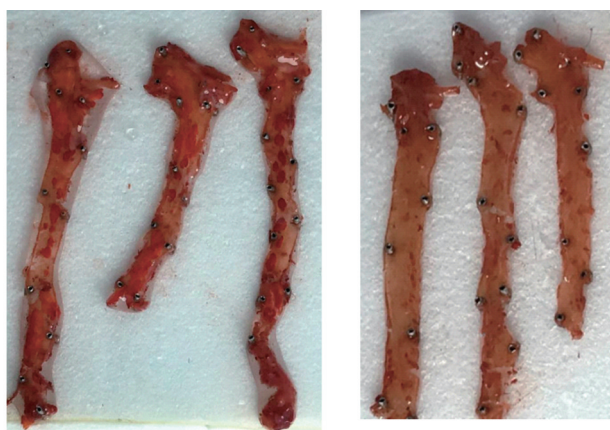


图 1. ApoE<sup>-/-</sup>小鼠主动脉 As 病变苏丹红 IV 染色 左图为模型组,右图为对照组。

Figure 1. Sudan red IV staining of aortic As lesions in ApoE<sup>-/-</sup> mice

### 2.2 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的 MRI 结果

模型组可以观察到主动脉壁毛糙,As 病灶呈高信号亮点,与周围组织形成良好对比,中心信号较高,较均匀,边缘较清楚;病变呈偏心增生,管腔狭窄,病变位置、形状、大小和组织病理结果基本吻合(图 2)。对照组管腔光滑,无明显异常信号改变。

模型组注射 MRI-As 造影剂后,As 病变区信号强度呈下降趋势,管壁不光滑,呈多发斑点状信号缺损(图 2)。对照组注射 MRI-As 造影剂后,血管壁信号强度无明显变化(图 2)。注射无适配体磁性纳米颗粒后,模型组和对照组信号强度均无明显变化。

## 3 讨论

As 主要累及大型和中型的肌弹力型动脉,表现出的动脉壁增厚、管腔狭窄是临床影像学诊断的主要依据。但在血管分叉处,血流变化湍急、不规则,这对 MRI 成像造成不利影响。As 病变的病理学特征,主要为动脉壁增厚,管腔狭窄。病变由动脉内膜开始,先有脂质沉积,伴大量巨噬细胞浸润,吞噬脂质,形成泡沫细胞;平滑肌细胞增殖,纤维脂质增生,形成纤维帽状覆盖;病变内坏死组织与脂质形成无细胞成分的脂质核心,病情进一步发展,可出现钙质沉积、肉芽组织增生、动脉瘤形成、斑块内出血、斑块破裂、血栓形成、管腔堵塞等多种病理现象<sup>[1]</sup>。因此研究和开发新型 As 诊断技术是目前 As 防治研究的全球热点之一。目前被认为是诊断 As 的“金标准”有:血管内超声、数字血管造影、血管镜检查,均为有创诊断技术,必须插入导管才能形成影像,操作复杂,且有一定的危险性和并发症。

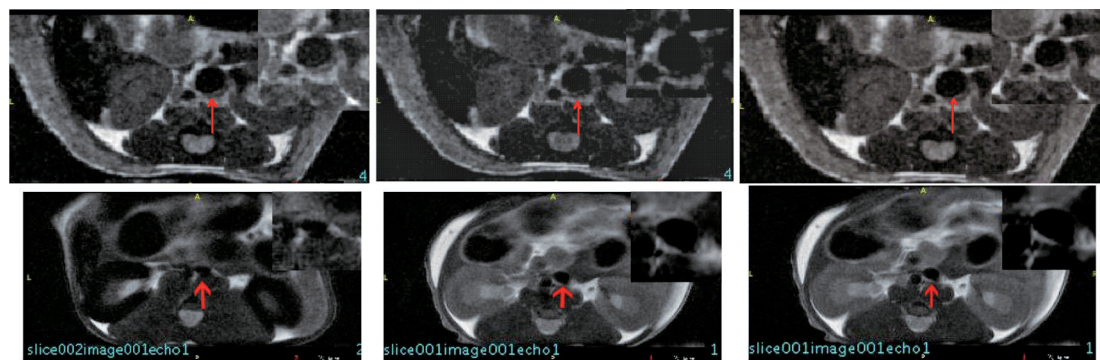


图 2. ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 MRI 图 上排图为模型组,其中左图为不注射 MRI-As 造影剂,箭头所指为 As 病变区;中图为注射 MRI-As 造影剂,箭头所指为 As 病变区多发斑点状信号缺失;右图为注射 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米粒,箭头所指为 As 病变信号没有改变。下排图为对照组,其中左图为不注射 MRI-As 造影剂,箭头所指为正常动脉;中图为注射 MRI-As 造影剂,箭头所指为正常动脉,无信号改变;右图为注射 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米粒,箭头所指为正常动脉,无信号改变。每个图右上角为箭头所指处的放大效果。

Figure 2. MRI images of ApoE<sup>-/-</sup> mice



适配体为 20~200 个碱基的单链 DNA 或 RNA, 由 SELEX 技术筛选获得, 通过其空间构象与靶物质特异性结合, 是目前公认最具潜力的靶向物质<sup>[5-6]</sup>。近年兴起的适配体靶向药物技术, 为 As 的体内靶向性无创诊断提供了基础。截至 2013 年, 适配体药物已有辉瑞公司生产的抗眼底血管增生适配体药 Macugen 被批准用于临床, 另有其他公司的 11 个适配体药物正在各期临床试验中, 抗凝血的 REG1 进入 III 期临床研究, 抗肿瘤的 NOX-E36 进入 II 期临床研究。我国已有近 50 个适配体技术获国家专利, 但目前无成药性研究。本课题组已成功利用 SELEX 技术获得特异性结合 As 病变细胞的适配体 PMI<sup>[8]</sup> 及一些肿瘤细胞亲和适配体, 将这些适配体应用于疾病诊断和治疗具有良好前景。

MRI 造影剂的使用不仅能使病变组织容易被诊断和识别, 还可以反映病变部位的某些生物学特征及评价治疗效果<sup>[3]</sup>。超顺磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  作为 MRI 造影剂的磁性物质, 其优点在于灵敏度较高, 粒径较小, 生物安全性较为良好, 而且可以用多种物质对其进行修饰, 具有较大的潜在应用价值<sup>[4]</sup>。

ApoE<sup>-/-</sup>小鼠是目前应用最为广泛的 As 动物模型, 经高脂饲养后, 能形成与人类相似的 As 血管病变<sup>[13]</sup>。ApoE<sup>-/-</sup>小鼠经高脂饲养后, 成模快速, 多以 4-5 型 As 病变为主, 甚至可观察到 6 型 As 型病变。本研究发现: ApoE<sup>-/-</sup>小鼠高脂饲养 16 周后, 苏丹红 IV 染色, 可以看到明显的 As 斑块形成, 主动脉管壁厚薄不均匀, 模型组病变面积与血管面积之比为  $49.2\% \pm 17.6\%$ , 表明模型建立成功。

我们研究发现, 在 MRI 7T 实验中, 模型组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠可以观察到主动脉壁毛糙, As 病灶呈高信号亮点, 偏心增生, 管腔狭窄, 病变位置、形状、大小和组织病理结果基本吻合; 而对照组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉管腔光滑, 未见明显异常信号改变。注射 MRI-As 造影剂后, 模型组小鼠病灶信号下降, 有多发斑点状信号的缺损; 对照组小鼠血管壁信号强度一直无变化或变化甚小。注射无适配体磁性纳米颗粒后, 模型组和对照组信号强度均无明显变化。出现这种 MRI 血管影像改变的情况, 我们分析原因有: (1) 在注射具有 As 靶向磁性纳米颗粒后, 由于适配体的靶向性作用, 使 MRI-As 造影剂中的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  迅速聚集于病变的泡沫细胞周围, 所以, As 模型小鼠病灶信号降低; (2) 小鼠的 As 病变属于 4-6 型, 主要为粥样斑块或复合病变, 病变内巨噬细胞的分布不均匀, 聚集于纤维帽附近、脂质核心或坏死灶边缘, 故在 MRI 影像中呈多发斑点状信号缺失。对照组注射 MRI-As 造影剂后, 血管壁 MRI 信号强度一直无明显变化, 进一步证明 MRI-As 造影剂对 As

病变的靶向性。

我们的研究表明, MRI-As 造影剂是具有 As 靶向的磁性纳米颗粒, 在小鼠的 MRI 实验中, 证实对 As 病变有主动靶向作用。这些实验结果提示, 我们合成的 As 靶向磁性纳米颗粒, 具有 As 的 MRI 影像的新型、快速、高效、无创、无辐射造影剂的潜质。

进一步的研究需建立大型哺乳动物 As 病变模型, 验证 MRI-As 造影剂对 As 主动靶向 MRI 影像的量效关系, 建立数字化影像诊断模式; 完善 MRI-As 造影剂作为影像诊断试剂所需的工艺优化、质控标准、毒理影响等临床前研究资料, 为开发新型 As 主动靶向 MRI 影像的、安全、高效诊断试剂奠定研究基础。

#### [参考文献]

- [1] Siontis GC, Stefanini GG, Mavridis D, et al. Percutaneous coronary interventional strategies for treatment of in-stent restenosis: a network meta-analysis[J]. *Lancet*, 2015, 386(9994): 655-664.
- [2] 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 等. 中国心血管病报告 2016[J]. *中国循环杂志*, 2017, 32(6): 521-530.
- [3] 范媛媛, 郑博, 王新刚, 等. 冠状动脉造影及介入术后止血方法对血管并发症的影响[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2015, 7(1): 49-53.
- [4] Walker KA, Power MC, Hoogeveen RC, et al. Midlife systemic inflammation, late-life white matter integrity, and cerebral small vessel disease: The atherosclerosis risk in communities study[J]. *Stroke*, 2017, 48(12): 3 196-202.
- [5] 苏祖晖, 赖天幸, 周祥萍, 等. 动脉粥样硬化靶向 MRI 造影剂的合成及表征[J]. *今日药学*, 2016, 26(7): 457-461.
- [6] 林静燕, 严鹏科, 张超, 等. 动脉粥样硬化靶向性磁共振造影剂的合成及理化特性鉴定[J]. *中国现代应用药学*, 2014, 31(4): 433-437.
- [7] 肖毅, 董洪武, 谭丽玲. 急性心肌梗死伴完全性左束支传导阻滞患者急诊冠状动脉造影和心电图的相关性研究[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2017, 9(6): 734-737.
- [8] Liang C, Guo B, Wu H. Aptamer-functionalized lipid nanoparticles targeting osteoblasts as a novel RNA interference-based bone anabolic strategy[J]. *Nat Med*, 2015, 21(3): 288-294.
- [9] Sharma TK, Bruno JG, Dhiman A. ABCs of DNA aptamer and related assay development[J]. *Biotechnol Adv*, 2017, 35(2): 275-301.
- [10] Pengke Yan, Chenglai Xia, Caiwen Duan, et al. Biological characteristics of foam cell formation in smooth muscle cells derived from bone marrow stem cells[J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(7): 937-946.
- [11] 严鹏科, 汪江波, 张慧, 等. 泡沫细胞靶向适配子的体外筛选[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(6): 459-464.
- [12] 严鹏科, 汪江波, 张慧, 等. 巨噬细胞源性泡沫细胞适配子 PMI 的特异性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(5): 405-408.
- [13] Beierfub A, Dietrich H, Kremser C, et al. Knockout of apolipoprotein E in rabbit promotes premature intervertebral disc degeneration: A new in vivo model for therapeutic approaches of spinal disc disorders[J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0 187 564.

(此文编辑 曾学清)