

肝细胞去唾液酸糖蛋白受体介导的超顺磁性氧化铁粒子磁共振增强研究

许乙凯 陈永鹏 张嘉宁 刘杏元 乔东访

【摘要】 目的:探讨标记乳糖基白蛋白超顺磁性氧化铁粒子(LAC-HAS-SPIO)与肝细胞去唾液酸糖蛋白受体(ASG)的结合特性。**方法:**采用 NaBH₃CN 还原法制备富含乳糖基的白蛋白(LAC-HSA),然后将其标记上粒径 $18.6 \pm 19\text{nm}$ 的 SPIO (LAC-HAS-SPIO)。通过体外及体内试验,观察 ASG 受体阻断剂 D-半乳糖对 LAC-HAS-SPIO 增强效果的影响;电镜观察和比较 LAC-HAS-SPIO 与普通 SPIO 在肝内分布差异。**结果:**①电镜发现普通 SPIO 仅分布在 kupffer 细胞,而 LAC-HAS-SPIO 能分布到肝细胞内及肝细胞膜上;②预先加入 D-半乳糖的试管,其信号强度远低于单纯加 LAC-HAS-SPIO 管;③大鼠预先注射 D-半乳糖组,肝组织增强度为 $-60.3\% \pm 21.2\%$,低于未注射 D-半乳糖组(肝强化率 $-89.4\% \pm 25.5\%$, $0.01 < P < 0.05$)。**结论:**LAC-HAS-SPIO 是一种新型的针对 ASG 受体的肝特异显像剂,对发现肝脏疾病的早期形态及功能变化将有重要价值。

【关键词】 肝受体 造影剂 磁共振成像

MR contrast enhancement with hepatic asialoglycoprotein receptor mediated superparamagnetic iron oxide particles Xu Yikai, Chen Yongpeng, Zhang Jianing, et al. Medical Imaging Center, Nan Fang Hospital of the First Military Medical University, GuangZhou 510515

【Abstract】 Objective: To investigate the feasibility of lactosaminated human serum albumin coated Superparamagnetic iron oxide Particles (LAC-HAS-SPIO) binded specifically to hepatic asialoglycoprotein receptor (ASG-receptor). **Methods:** LAC-HSA was prepared by reductive amination method in the presence of NaBH₃CN. Then, LAC-HSA was reacted with mixing of Fe²⁺ and Fe³⁺ to synthesize. LAC-HAS-SPIO. The contrast enhancement experiment of LAC-HAS-SPIO were carried out in vitro (in samples of the hepatic membrane suspensions enriched with ASG receptors) and in vivo (in 8 rats) with and without D-galactose (a competitive blocker to saturate ASG binding sites), respectively. The biodistribution differences between usual SPIO and LAC-HAS-SPIO in rat livers were observed under electron microscope. **Results:** ① Under electron microscope, electron dense particles were identified only in kupffer cells in the usual SPIO group, on the contrary, large amounts of electron dense deposit were identified on the surface of hepatocyte membranes and within hepatic cytoplasm. ② The signal intensity of hepatic membrane suspension was significantly lower after incubation with LAC-HAS-SPIO after blockade using D-galactose. ③ The liver enhancing rate in the rats ($n = 4$) received D-galactose before administration of LAC-HAS-SPIO, was $-60.3\% \pm 21.2\%$, those reached $-89.4\% \pm 25.5\%$ in the rats ($n = 4$) which did not received injection of D-galactose. ($0.01 < P < 0.05$). **Conclusions:** The results indicate that LAC-HAS-SPIO is a hepatic ASG receptor directed contrast agent. It may be clinically useful for monitoring early morphologic and functional changes in hepatic diseases.

【Key words】 Hepatic receptor Contrast agent MRI

众所周知,受体一般指存在细胞膜上的糖蛋白分子,配体在结构上赋有特别基团,能与受体产生类似钥匙和锁的形态结构识别。磁共振受体显像是继放射性核素受体显像之后,出现的研究活体内受体空间解剖分布受体数量(密度)和功能状态的无创性新方法,在提高磁共振造影剂的靶向分布水平及肿瘤的早期定性和定位诊断等方面均展示了诱人的发展前景^[1]。本文

将尝试制备一种标记乳糖基(化)白蛋白的超顺磁性氧化铁粒子(LAC-HAS-SPIO),探讨其与肝细胞膜上的去唾液酸糖蛋白受体(ASG 受体)特异性结合的可能性。

材料与方法

1. LAC-HAS-SPIO

乳糖基白蛋白(LAC-HSA)的合成,将 600mg 人血清白蛋白(HAS),2.6g α -乳糖和 1.5g NaBH₃CN 溶于 PH 8.0 的磷酸盐缓冲液 35ml,在 37℃ 水浴中充分反

510515 广州第一军医大学附属南方医院影像中心、
全军肝炎实验室、实验动物中心、电镜室
* 本文获国家自然科学基金资助(批准号 39700226)

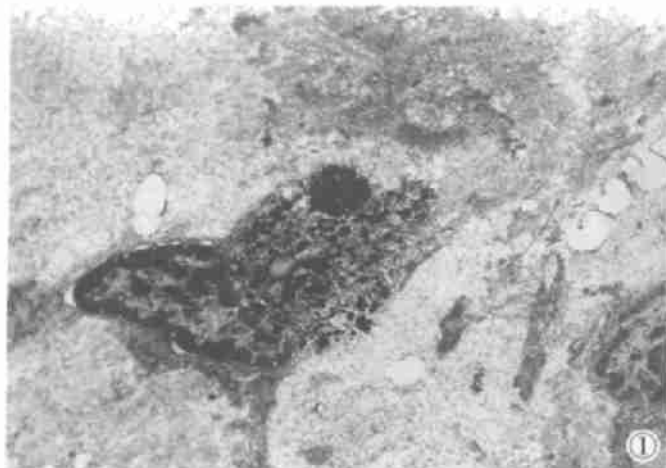


图1 Kupffer细胞内可见大量电子致密的SPIO粒子。

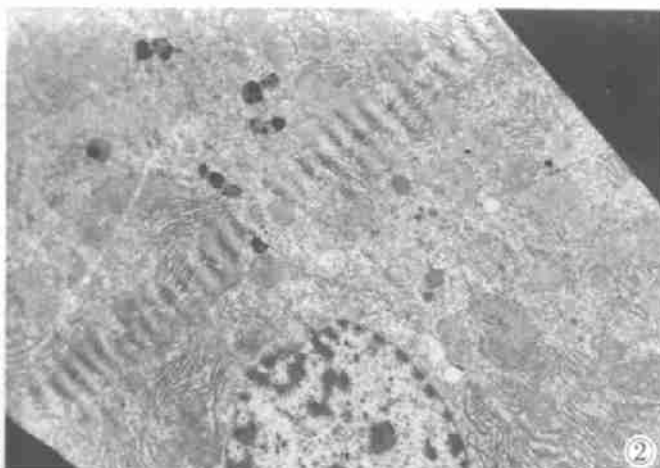


图2 肝细胞内证实有较多电子致密的SPIO粒子,提示LAC-HSA-SPIO受肝细胞膜ASG受体的介导而进入肝细胞内。

图3 预先注射D-半乳糖的大鼠组,LAC-HSA-SPIO使肝脏信号强度降低,但仍有小斑片状影,测定其信号强度(SI)为67。

图4 未预先注入D-半乳糖组,同剂量的LAC-HSA-SPIO使肝脏的信号强度降低更为明显,肝脏信号强度仅为40,接近于本底噪声水平。



应,产物对三蒸水透析,离心取上清液,进一步冻干,即得呈白色固体粉末状LAC-HAS。反应机理是:在合适pH条件下,乳糖中半缩醛基团与白蛋白分子中的氨基缩合,形成Schiff氏碱,同时被NaBH₃CN还原为稳定的C-N单键。

取适量LAC-HAS,溶于含有Fe³⁺和Fe²⁺的混合液中,在2mol/l NaOH液作用下生成LAC-HAS-SPIO胶体。透析除尽游离铁离子,离心13000转/分30min除去过大粒子,上清液浓缩至含铁量2mg/ml,4℃保存备用。透视电镜测得电子致密粒径在5~50nm,平均粒径为18.6±19nm。

2. ASG受体体外饱和试验

以一只SD大鼠取下3g肝组织,加4℃预冷的匀浆缓冲液(由CaCl₂·2H₂O 37.5mg和NaHCO₃ 420mg溶于5000ml蒸馏水,2mol/l NaOH或HCl调pH至7.45~7.55)50ml,匀浆后纱布过滤,滤液12000转/分离心20min,沉淀物富含各种细胞碎片及细胞膜,用预冷的0.1mol/l PBS稀释至10ml,超声波声振后,分成二个试管;第1管预先加入0.2mg/ml的半乳糖2ml,第2管加入蒸馏水作对照,随后各管分别加入0.3ml LAC-HAS-SPIO,37℃孵育30min,再次12000转/分20min,用0.1mol/l PBS洗3次除去未与细胞膜片断结合的游离

LAC-HAS-SPIO,再追加0.1mol/l PBS至各管总量为7ml,用我院1.5Tesla MR仪进行SE 2000ms/90ms扫描,比较二管信号强度差别。

3. 电镜观察LAC-HAS-SPIO在肝组织的分布

4只清洁级SD大鼠,体重140~160g。第1组(2例)大鼠从尾静脉注入2mgFe/100g普通SPIO(超磁显,包被低分子右旋糖酐)^[2],而第2组大鼠(2例)则注射2mgFe/100g LAC-HAS-SPIO,1min后分别处死二组大鼠,取肝组织作透视电镜检查,比较二组大鼠电子致密SPIO的分布差异。

4. 体内ASG受体饱和试验

8只清洁级SD大鼠,体重150~175g,雌雄各半数,随机分成二组,麻醉后(腹腔内注射苯巴比妥钠50mg/kg)分别获平扫T₂加权像(SE序列,TR/TE=2000ms/90ms,层厚5mm,FOV 200×200mm)。随后,第1组动物预先注射150mg/100g的D-半乳糖(预饱和肝细胞膜上ASG受体位点),再注射2mgFe/100g的LAC-HAS-SPIO,30min后获同样的增强T₂加权像;第2组则仅注射2mgFe/100g的LAC-HAS-SPIO,30min后获同样的T₂加权像。测量及比较二组动物中,肝脏的强化率(△E%)。

$$\Delta E = (SI_{\text{post}} - SI_{\text{pre}}) / SI_{\text{pre}}$$

式中 SI_{post} 和 SI_{pre} 分别增强后及增强前肝脏的信号强度值。

结果

1. ASG 受体体外饱和试验

第 1 管因预先加入 D-半乳糖饱和或封闭了肝细胞膜混悬液中的 ASG 受体, LAC-HSA-SPIO 与肝细胞膜片段的 ASG 受体结合的量明显减少, 故该管的信号强度值为 1020; 而第二管中, LAC-HSA-SPIO 与肝细胞膜片段大量结合, 因此, 该管信号强度明显下降(强度值为 485)。提示 LAC-HSA-SPIO 与肝细胞膜上的 ASG 受体有特异结合, 且能被 D-半乳糖所阻断或饱和。

2. LAC-HSA-SPIO 在肝脏的分布特点

透视电镜注射普通 SPIO 组, 电子致密影(SPIO 颗粒)仅出现在 kupffer 细胞内, 肝细胞内未见有 SPIO 粒子分布(图 1); 而注射 LAC-HSA-SPIO 组, 电子致密 SPIO 除出现在 kupffer 细胞外, 还广泛存在于肝细胞膜上及肝细胞膜内(图 2), 证实 LAC-HSA-SPIO 受肝细胞膜 ASG 受体的介导, 二者结合后随胞吞作用进入了肝细胞内。

3. ASG 受体体内饱和试验

预先注射 D-半乳糖组, 大鼠肝脏的强化率为 $60.3\% \pm 21.2\%$; 而未注射 D-半乳糖组, 肝脏强化率为 $-89.4\% \pm 25.8\%$, 二组强化率在显著差异($0.01 < P < 0.05$), 进一步说明, LAC-HSA-SPIO 具有与肝细胞膜上 ASG 受体特异结合的配体属性(图 3、4)。

讨论

正常肝细胞膜上有十分丰富的 ASG 受体, 每个肝细胞约有 50 万个结合位点^[3]。ASG 受体能特异性识别及清除血中富含乳糖或半乳糖基团的糖蛋白物质。随着人们对 ASG 受体研究的深入, 国内外均有一些修饰乳糖基的放射性显像剂(如^{99m}Tc 二乙酰三胺五乙酸半乳糖酰白蛋白)和药物(作为配体), 应用于肝脏疾病的定性、定位显像及靶向治疗的成功报道^[4,5]。1990 年 Weissleder 首先制备出标记去唾液酸胎蛋白(ASF)和阿拉伯半乳糖(AG)和 SPIO, 利用 ASF 或 AG 分子中富含半乳糖基团, 能被肝细胞膜上 ASG 受体专

一识别、介导, 从而大大提高了 SPIO 在肝组织靶向浓聚, 有效地提高了 SPIO 的造影效果, 在反映 ASG 受体空间分布解剖信息的同时, 又可根据肝脏强化程度, 间接地反映出肝细胞的功能状态, 因此, 受到医学影像工作者的高度重视。由于肝炎、肝再生、肝纤维化等均有 ASG 受体数目减少或受体功能障碍, 而肝癌细胞缺乏 ASG 受体, 因此, 利用 ASG 受体介导的 SPIO, 将可能对上述疾病作出早期、准确的诊断^[6,7]。

选择修饰乳糖基的白蛋白标记 SPIO, 用于 ASG 受体磁共振成像至今未见报道。我们认为白蛋白具有良好的水溶性、生物相容性和价格低廉的特点, 而 ASF 有较强免疫源性, AG 则价格昂贵。通过本文电镜下观察, 证实 LAC-HSA-SPIO 同样有受 ASG 受体介导而分布在肝细胞膜内外的特异性; 在体内 ASG 受体饱和和试验中也证明 LAC-HSA-SPIO 与 ASG 受体的结合, 可以被 D-半乳糖所预先阻断或饱和, 因此, 我们认为, LAC-HSA-SPIO 具有能与 ASG 受体特异结合配体的基本特征, 是一种新的肝细胞 ASG 受体磁共振显像剂。当然, 由于 LAC-HSA-SPIO 的粒子体积较大, 进入体内后仍有相当部分的粒子也被 kupffer 细胞吞噬, 这一现象也见于国外的 ASF 或 AG-SPIO^[1]。

参考文献

- 1 Weissleder R, Reimer P, Lee AS, et al. MR Receptor Imaging: Ultrasmall Iron Oxide Particles Targeted to Asialoglycoprotein Receptors. *AJR*, 1990, 155: 1161.
- 2 许乙凯, 刘杏元, 许璇, 等. 超顺磁性氧化铁粒子(SPIO)的弛豫率及磁化率研究. *中国医学物理学杂志*, 1998, 15(1): 9.
- 3 Schwartz A, Rup D, Lodisch H. Difficulties on the quantification of asialoglycoprotein receptors on the rat hepatocyte. *J Biol Chem*, 1980, 255: 9033.
- 4 Vera D, Standainik R, Krohn K. Technetium-^{99m}galactosyl-neoglycoalbumin: Preparation and preclinical study. *J Nud Med*, 1985, 10: 1157.
- 5 庞其捷, 贺于玲, 李铜铃, 等. 肝靶向抗疟药 NGA-PQ 的合成及抗疟作用. *中药药物化学杂志*, 1994, 14: 240.
- 6 Reimer P, Weissleder R, Lee AS, et al. Asialoglycoprotein Receptor function in Benign liver Disease: Evaluation with MR Imaging. *Radiology*, 1991, 178: 769.
- 7 Reimer P, Weissleder R, Lee AS, et al. Receptor imaging: application to MR imaging of liver cancer. *Radiology*, 1990, 177: 729.

(1999-01-05 收稿)