

叶酸受体型 MR 对比剂对荷人肝癌裸鼠诊断意义的初步研究

丁建辉, 曾蒙苏, 顾海雁, 钟高仁, 薛琼, 周康荣, 沈继章, 陈财忠, 张澍杰

【摘要】 目的:探讨以叶酸介导的 MR 对比剂 Gd-DTPA-Folate 对裸鼠肿瘤信号改变的规律,评价其对肝肿瘤诊断的可行性及有效性。方法:将 DTPA-Folate 与 $GdCl_3$ 在一定条件下等摩尔反应,过滤后得到 Gd-DTPA-Folate;将 5~6 周龄 SPF 级 BALB/C 裸鼠皮下接种人肝癌细胞(SMMC-7721)作为动物模型;将裸小鼠随机分成实验组与对照组,前者注射 Gd-DTPA-Folate,后者注射含相同 Gd 离子浓度的 Gd-DTPA,注射部位为尾静脉,注射剂量 0.2 ml。观察注射前后两组 T_1 WI 瘤体信号改变情况,判断指标为对比信噪比(CNR)。注射后扫描时间点选为即刻、1、2、3、4、6、12 及 24 h。结果:注射对比剂后 2~3 h,实验组裸鼠瘤体信号强度较对照组升高明显,差异有统计学意义($t=4.2694/2.2977, P<0.05$)。结论:Gd-DTPA-Folate 对裸鼠肝癌模型(SMMC-7721)具有一定的靶向性。

【关键词】 受体,叶酸;对比剂;磁共振成像;肝肿瘤;小鼠,裸

【中图分类号】 R445.2; R735.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2004)11-0779-04

The folate-receptor MR contrast agent Gd-DTPA-folate for evaluation of transplanted human hepatoma (SMMC-7721) in nude mice; a preliminary study DING Jian-hui, ZENG Meng-su, GU Hai-yan, et al. Department of Radiology, the Affiliated Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, P. R. China

【Abstract】 Objective: To study the possibility and effectiveness of evaluating hepatic tumor with Gd-DTPA-folate by observing changes of signal intensities of the human hepatoma (SMMC-7721) transplanted in the nude mice. **Methods:** DTPA-folate and $GdCl_3$ were first conjugated under certain conditions. Then, Gd-DTPA-folate became available after filtering; nude mice transplanted with human hepatoma (SMMC-7721) were used as animal models, they were divided into experimental group and control group respectively. The former group was injected with Gd-DTPA-folate, the later was injected with Gd-DTPA (containing same concentration of gadolinium). Contrast agent was injected via tail vein. Tumor signal of experimental group was compared with that of control group. CNR (contrast-noise-ratio) was regarded as standard for evaluation. **Results:** Signal intensity of tumor in experimental group enhanced evidently between 2~3h after injection contrast agent, compared with that of control group. **Conclusion:** Gd-DTPA-folate presents certain characteristic of tumor targeting of nude mice transplanted with human hepatoma (SMMC-7721).

【Key words】 Receptors, folic acid; Contrast agent; Magnetic resonance imaging; Liver neoplasms; Mice, nude

MR 靶向对比剂是当今 MR 特异性对比剂研究领域的热点之一,国内、外文献已证实单克隆抗体 MR 对比剂(Gd-DTPA-MAb)在肝癌、大肠癌等模型中,对瘤体有特异性增强作用,并且其作用持续时间较长,可达 24 h 或以上^[1-3]。但是,单克隆抗体 MR 对比剂仍有较大局限性,如 Gd 离子含量低、螯合剂的不稳定性、抗体的免疫原性等因素,限制了其进一步临床应用。

研究表明,肿瘤组织在生长过程中较正常组织需要更多的叶酸,大部分上皮来源的肿瘤,其细胞表面叶酸受体较正常组织丰富^[4,5]。因此以叶酸为载体,可将顺磁性的钆离子运输到肿瘤局部,以缩短肿瘤组织

T_1 弛豫时间,从而提高肿瘤组织 MR 信号强度,有望提高某些肿瘤检出的敏感性和特异性。

叶酸作为自然物质,最主要优点是无单克隆抗体的免疫原性缺陷,同时既制备方便,又经济合理,不失为一种理想的 MR 对比剂中钆离子的载体。

肝癌属于腺上皮来源,Shen 等^[6]曾经指出,肝癌细胞表面叶酸连接蛋白因为转运氨甲蝶呤而急剧减少。Elwood 等^[7]的研究证实叶酸受体就是一种细胞表面的连接蛋白质。因此可以认为肝癌细胞表面有着丰富的叶酸受体。本实验采用荷人肝癌(SMMC-7721 细胞株接种)裸鼠模型,研究 Gd-DTPA-Folate 在肝肿瘤 MR 成像中的价值。

材料与方法

1. Gd-DTPA-folate 主要制备过程

试剂:DTPA-folate, $GdCl_3$, 由复旦大学药学院放

作者单位:200032 上海,复旦大学附属中山医院放射科(丁建辉、曾蒙苏、周康荣、沈继章、陈财忠、张澍杰);南通医学院医学统计教研室(顾海雁);复旦大学药学院放射药教研室(钟高仁);复旦大学肝癌研究所(薛琼)

作者简介:丁建辉(1969-),男,江苏南通人,主治医师,硕士,主要从事肿瘤靶向对比剂及腹部影像研究工作。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(397702340)

射药教研室提供。

反应:取 52.8 mg DTPA-folate,溶解于 4.4 ml 的水中,待完全溶解后,滴加等摩尔的 $GdCl_3$ 溶液 0.6 ml,滴加完后继续在室温下反应 1 h,然后用无菌过滤器过滤得到金黄色的 Gd-DTPA-Folate 溶液,共计 5.0 ml,4℃ 封存备用。

2. Gd-DTPA-Folate 浓度测定

浓度测定在华东理工大学分析测试中心完成,分析仪为 TJAS-IRIS1000 型 ICP 光谱仪,由复旦大学药学院放射医学教研室提供含钆 1887.6 $\mu g/ml$ 标准试剂配置成标准溶液进行测试。本实验所制备 Gd-DTPA-Folate 溶液中含 Gd 离子为 1.86 mg/ml。

3. 动物模型的制备及实验动物分组

本实验采用人肝癌细胞株 SMMC-7721 裸小鼠移植瘤模型,肝癌细胞株 SMMC-7721 由复旦大学肝癌研究所惠赠。取 5~6 周龄 BALB/C 裸小鼠 12 只,在无菌条件下,将 SMMC-7721 肝癌细胞悬液 0.2 ml (含 5×10^7 个瘤细胞)接种至裸小鼠皮下,每周至少 3 次观察瘤体生长情况,约 4~5 周,待肿瘤长到 1~1.5 cm 左右备用。实验前一天,停止啮齿类动物正常饮食,给予无叶酸食物。

随机将 12 只已接种人肝癌细胞株的裸小鼠分成实验组(编号 1A~6A)和对照组(编号 1B~6B)。实验组注射对比剂 Gd-DTPA-Folate,对照组注射含相同 Gd 离子浓度的常规对比剂 Gd-DTPA,通过裸鼠尾静脉注射,注射量为 0.2 ml。Gd-DTPA 是用钆喷酸葡胺注射液(含钆喷酸二葡胺 469 mg/ml,北京北陆药业有限公司生产)加生理盐水稀释而成。

4. 裸鼠扫描及瘤体信号强度测量方法

扫描仪器为 GE Signa Advantage 1.5T MR 仪,使用 5-GP 表面线圈,扫描序列选用 SE T_1 WI 横断位及冠状位扫描,扫描参数 TR 400 ms,TE 9 ms,层厚 3 mm(横断位)、2 mm(冠状位),层距 2 mm(横断位)、1 mm(冠状位),矩阵 256×160 ,视野 $14 \text{ cm} \times 14 \text{ cm}$ 。

每只裸鼠均先行平扫。注射对比剂后扫描时间的选择如下:即刻、1、2、3、4、6、12 及 24 h,即刻扫描指注射对比剂后 6~8 min。裸鼠麻醉方法为 3% 戊巴比妥钠溶液 0.04 ml 腹腔注射。

观察瘤体信号强度的变化。方法为分别测量瘤体信号强度(SI_T)、裸鼠腿部肌肉组织信号强度(SI_S),按下列公式计算对比信噪比(contrast noise ratio, CNR)。

$$CNR = \frac{SI_T - SI_S}{SD_{noise}}$$

SD_{noise} 代表背景相位编码的噪声^[8]。每只裸鼠 SI_T 及 SI_S 的测定分别选择五个大小一致的感兴趣区域(ROI),取其平均值。兴趣区面积不小于 5 mm^2 ,尽量取信号较均匀之处。

5. 统计学处理

实验组和对照组基线比较以及两组注射对比剂后各扫描点与注射前比较采用成组 t 检验,统计软件为 Stata 7.0。

结果

实验组和对照组基线比较无差异($P > 0.05$),实验组的 SI_T 、 SI_S 及 CNR 值见表 1。裸鼠瘤体信号强度在注射对比剂 3 h 内升高较明显(图 1); SI_T 在注射对比剂后即刻(以 t_1 表示)、1、2 及 3 h 升高,与注射对比剂前比较差异有统计学意义($t_1 = 6.2149/t_1 = 3.3036$, $P < 0.01$; $t_2 = 2.7963/t_3 = 2.5019$, $P < 0.05$), SI_S 在注射对比剂后即刻升高,与注射对比剂前比较差异有统计学意义($t_1 = 4.3190$, $P < 0.01$);CNR 变化与 SI_T 一致,即在注射对比剂后即刻、1、2 及 3 h 升高,与注射对比剂前比较差异有统计学意义($t_1 = 5.8746/t_1 = 3.9815/t_2 = 4.2694$, $P < 0.01$; $t_3 = 2.2977$, $P < 0.05$)。

表 1 6 例实验组注射对比剂前后 SI_T 、 SI_S 及 CNR($\bar{x} \pm s$)

时间	SI_T	SI_S	CNR
注射前	191.53±15.23	228.50±14.21	-3.22±1.66
Cst	320.63±48.55**	285.95±29.32**	2.94±1.96**
C1h	248.11±39.09**	231.05±19.68	1.55±2.42**
C2h	215.00±13.81*	210.85±21.47	0.34±1.19**
C3h	228.30±32.62*	219.05±7.33	-0.93±1.79*
C4h	210.07±14.00	238.77±7.46	-2.78±2.33
C6h	209.50±10.18	244.85±3.04	-2.94±0.52
C12h	182.7±21.77	229.26±3.04	-3.06±0.64
C24h	205.00±12.83	235.36±12.76	-3.30±0.75

注:C 表示注射对比剂后,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ (注射对比剂后各扫描时间点均与注射前比较)。

对照组的 SI_T 、 SI_S 及 CNR 值见表 2。 SI_T 在注射对比剂后即刻、1 h 升高,与注射对比剂前比较其差异有统计学意义($t_1 = 3.5456/t_1 = 4.5122$, $P < 0.01$)。

表 2 6 例对照组注射对比剂前后 SI_T 、 SI_S 及 CNR($\bar{x} \pm s$)

时间	SI_T	SI_S	CNR
注射前	209.12±23.78	213.72±17.85	-0.98±1.75
Cst	273.04±37.21**	259.12±26.64*	2.04±2.78*
C1h	277.48±28.49**	237.34±11.17	1.83±2.16*
C2h	235.46±19.29	229.78±14.38	0.32±1.42
C3h	230.38±20.68	226.53±17.39	0.12±1.36
C4h	228.49±16.46	220.67±22.35	0.18±1.87
C6h	226.86±17.52	228.97±13.69	-0.38±2.08
C12h	213.48±27.83	216.29±16.27	-0.28±1.49
C24h	220.49±23.45	215.36±25.35	0.39±1.57

注:C 表示注射对比剂后,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ (注射对比剂后各扫描时间点均与注射前比较)。

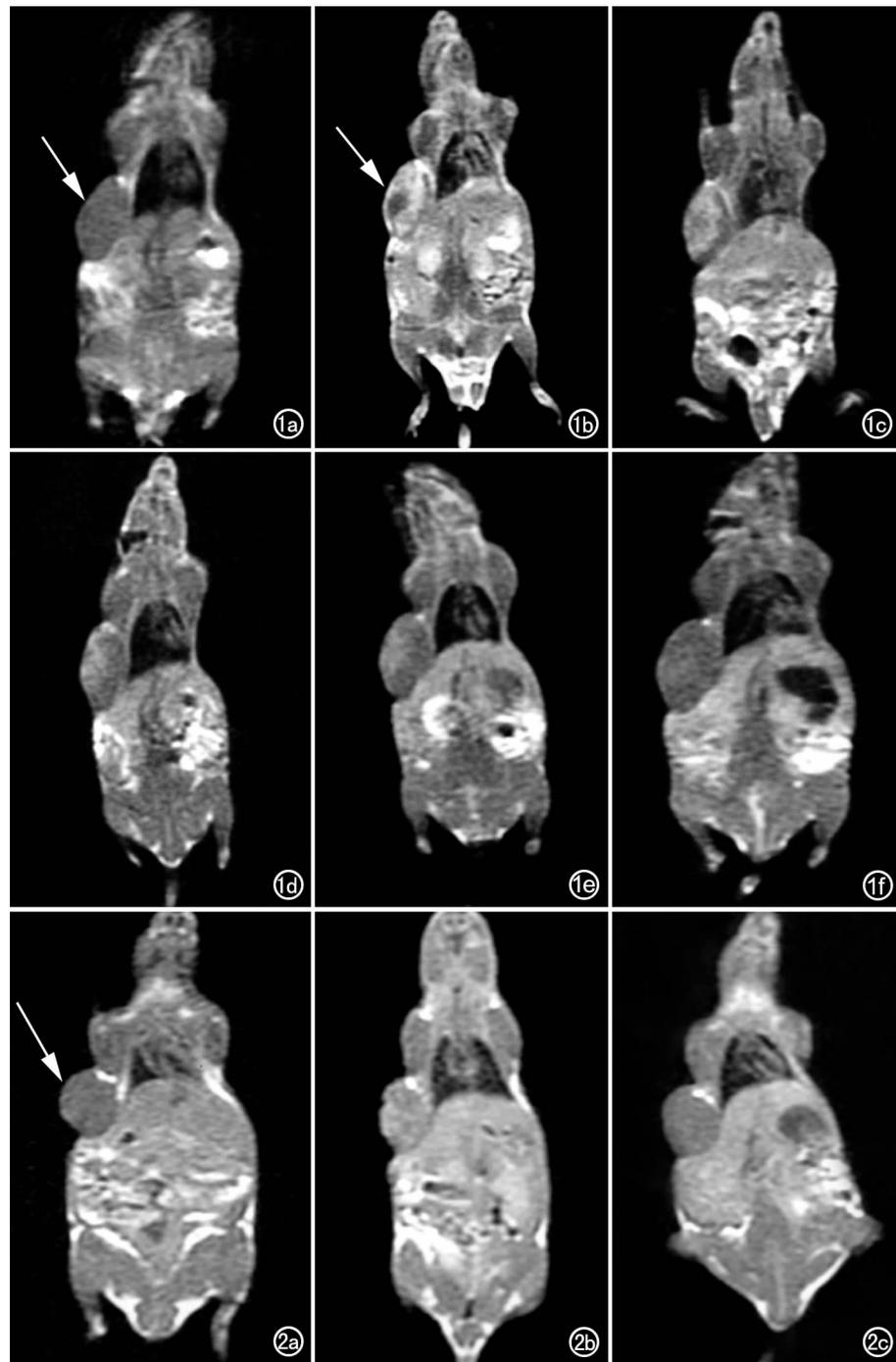


图 1 实验组裸小鼠,注射对比剂前后 T_1 WI 冠状位图。a) 注射 Gd-DTPA-Folate 前,肿瘤为低信号(箭); b) 注射对比剂后 0.5 h 肿瘤信号强度明显升高; c) 1 h 肿瘤仍为明显高信号(箭); d) 2 h,肿瘤信号较 1 h 略有降低; e) 3 h,肿瘤局部轻度高信号; f) 6 h,肿瘤信号基本降至正常。图 2 对照组裸小鼠,注射对比剂前及后 1~2 h T_1 WI 冠状位图。a) 注射 Gd-DTPA 前,肿瘤为低信号(箭); b) 注射对比剂后 1 h,肿瘤信号轻度升高; c) 2 h,肿瘤为低信号。

SI_s 变化与实验组一致,即在注射对比剂后即刻升高,与注射对比剂前比较其差别有统计学意义($t_1 = 3.4679, P < 0.05$)。CNR 的变化与 SI_T 一致,即在注射对比剂后即刻、1 h 升高,与注射对比剂前比较其差

异有统计学意义($t_1 = 2.2519/t_1 = 2.4760, P < 0.05$),注射对比剂后 2 h,肿瘤信号降至正常(图 2)。

两组对比 CNR 随时间变化趋势(图 3),显示从静脉注射对比剂后,在短时间内实验组与对照组裸鼠肿瘤信号都达到一个高峰,然后开始比较快速的下降,实验组下降过程中有一个小平台期,大约 3 h 后 CNR 降至注射对比剂前水平。而对照组,大约 1 h 左右 CNR 就在基线水平稍上方趋于平稳。

讨 论

在本组研究中,实验组与对照组瘤体信号强度的差异主要在注入对比剂后 2~3 h,而肿瘤-叶酸受体与叶酸-钆的特异性结合是肿瘤信号升高的关键。

肿瘤组织在生长过程中较正常组织需要更多的叶酸,尤以上皮来源的肿瘤更明显,其细胞表面有着丰富的叶酸受体,携带 Gd 离子的叶酸除了与肿瘤表面叶酸受体结合,引起肿瘤信号升高外,还可能有以下机制参与:①叶酸的內化、循环可将钆运输至细胞内,导致肿瘤信号进一步升高。②肿瘤表面的叶酸受体通过糖基-磷脂酰基醇与细胞膜相连,并被磷脂酶 C 裂开,这使肿瘤细胞间隙可形成高度集中的叶酸受体,从而使得钆靶向性地聚集在细胞间隙^[4],我们认为这可能是导致肿瘤延迟强化最主要的原因。

Konda 等^[5]的研究指出,叶酸受体型靶向对比剂在肿瘤部位的聚集程度介于 Gd-DTPA 和大分子量单克隆抗体介导的靶向对比剂之间,即在含 Gd 离子量相同的情况下,注射对比剂后 3h 内,以叶酸介导的靶向对比剂应该比单克隆抗体介导的靶向对比剂对肿瘤的强化作用要明显。

本研究发现,即使在 Gd 含量较高的情况下,叶酸

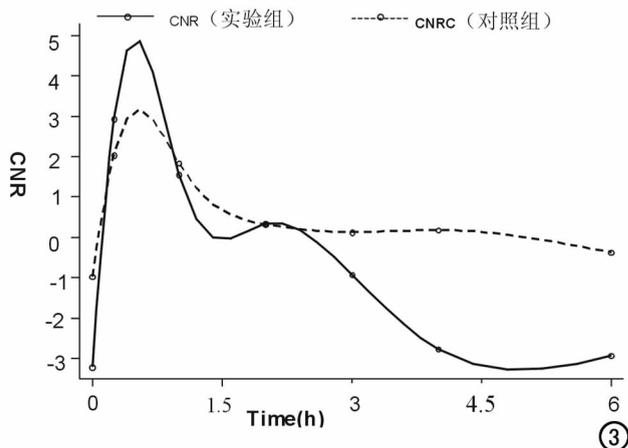


图 3 A、B 两组对比信噪比(CNR)随时间(Time)变化趋势图。

受体型靶向对比剂使肿瘤信号升高持续时间在注射对比剂后 3 h 左右,个别可延长至 5~6 h。而单克隆抗体靶向对比剂 Gd-DTPA-chTNT 尽管 Gd 含量较低,但使肿瘤强化可持续相对较长时间(48~72 h)^[1-3],这可能与以下原因有关:①叶酸受体介导 MR 靶向对比剂分子量远较单克隆抗体小,排泄较后者快;单抗 chTNT 需透过细胞膜与细胞核结合,又因分子量较大,清除慢,故在肿瘤组织内聚集时间相对较长。②尽管二者与靶细胞结合力均较强,但叶酸受体与叶酸结合以后解离也相对较快,从而影响 Gd-DTPA-Folate 在肿瘤组织的滞留时间。

叶酸较单抗有较小的分子量,前者 441,而单抗则高达 15 万;同时,叶酸价格较便宜,又是自然物质,不会引起机体的免疫反应,可以多次给药;叶酸在合成与储存过程中比较稳定,连接的化学成分和产物的纯化比较简单^[4]。所有这些优点,将预示着以叶酸作为运输中介的 MRI 靶向对比剂 Gd-DTPA-Folate 在肿瘤 MR 诊断方面有着巨大的潜力,值得做更广泛、深入的分析 and 研究。

近年来,国内、外学者开始对肿瘤细胞表面的叶酸受体做深入、科学地研究^[4-7,9-14],其目的不仅为了诊断,而且尝试利用叶酸-叶酸受体特异性结合的原理,对某些肿瘤实施靶向治疗的研究,使得药物的靶向作用拓展到诊断、治疗等多个领域,对以叶酸受体为传输中介的靶向诊断、治疗药物的研究将使医学界对肿瘤诊断及治疗有更加全面的认识。

参考文献:

- [1] 曾蒙苏,汪登彬,周康荣,等. 单克隆抗体磁共振造影剂在荷人肝癌裸鼠动物模型的初步研究[J]. 上海医学, 2001, 24(8): 467.
- [2] 王劲武,黄其鏊,许乙凯,等. 钆标记抗人大肠癌单克隆抗体 CL-3 对裸鼠肿瘤模型 MRI 诊断的实验研究[J]. 中华放射学杂志, 1998, 32(6): 419-422.
- [3] Curtet C, bourgoin C, Bohy J, et al. Gd-25DTPA-Mab, a potential NMR contrast agent for MRI in the xenografted nude mouse: preliminary studies[J]. Int J Cancer Suppl, 1988, 2(Suppl 2): 126-132.
- [4] Konda SD, Aref, Brechbiel, et al. Development of a tumor-targeting MR contrast agent using the high-affinity folate receptor: work in progress[J]. Invest Radiol, 2000, 35(1): 50-62.
- [5] Konda SD, Wang S, Brechbiel M, et al. Biodistribution of a ¹⁵³Gd-folate dendrimer, generation=4, in mice with folate-receptor positive and negative ovarian tumor xenografts[J]. Invest Radiol, 2002, 37(4): 199-204.
- [6] Shen D, Pastan I, Gottesman MM. Cross-resistance to methotrexate and metals in human cisplatin-resistant cell lines results from a pleiotropic defect in accumulation of these compounds associated with reduced plasma membrane binding proteins[J]. Cancer Res, 1998, 52(2): 68-75.
- [7] Elwood PC, Deutsch JC, Kolhouse JF. The conversion of the human membrane-associated folate binding protein (folate receptor) to the soluble folate binding protein by a membrane-associated metalloprotease[J]. J Biol Chem, 1991, 266(4): 2346-2353.
- [8] 刘定西. 医学影像技术丛书: MR 成像分册[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2000. 35.
- [9] Ross JF, Chaudhuri PK, Ratnam M. Differential regulation of folate isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. physiologic and clinical implications[J]. Cancer, 1994, 73(9): 2432-2443.
- [10] Gates SB, Mendelsohn LG, Grindley GB. Characterization of folate receptor from normal and neoplastic murine tissue: influence of dietary folate on folate receptor expression[J]. Clin Cancer Res, 1996, 2(7): 1135-1141.
- [11] Sudimack J, Lee RJ. Targeted drug delivery via the folate receptor[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2000, 41(2): 147-162
- [12] Lu Y, Low PS. Folate targeting of haptens to cancer cell surface mediates immunotherapy of syngeneic murine tumors[J]. Cancer Immunol Immunother, 2002, 51(3): 153-162.
- [13] Doucette MM, Stevens VL. Folate receptor function is regulated in response to different growth rates in cultured mammalian cells [J]. J Nutr, 2001, 131(11): 2819-2825.
- [14] 陆伟跃, 刘敏, 潘俊, 等. 叶酸-脂质体制备及对 HeLa 细胞靶向作用[J]. 上海医科大学学报, 2000, 27(1): 4-8.

(收稿日期: 2003-11-03 修回日期: 2004-02-05)