

基于褪黑素的分子探针在胶质母细胞瘤成像中的研究

万家颖^a,王银^b

摘要 目的:探讨一种基于褪黑素(MT)的分子探针在胶质母细胞瘤的成像效果。方法:以5-甲氧基色胺(褪黑素)为原料,将其与荧光染料Cy5偶联制得探针Cy5-MT。采用MTT法测试探针Cy5-MT对胶质母细胞瘤细胞U87和正常的人脑胶质细胞HEB的细胞毒性;采用流式细胞实验测试探针Cy5-MT对胶质母细胞瘤细胞U87的靶向性;采用激光共聚焦实验测试探针Cy5-MT对U87的成像效果。结果:探针Cy5-MT的结构通过质谱进行确证。Cy5-MT对U87和HEB的毒性较小,Cy5-MT在U87细胞中的百分摄取率显著高于HEB细胞;Cy5-MT能够特异性地对U87细胞进行成像。结论:探针Cy5-MT能够特异性的靶向胶质母细胞瘤U87细胞,实现对U87的精准成像,且生物安全性高。

关键词 褪黑素;分子探针;成像;胶质母细胞瘤

中图分类号 R741;R741.02;R651.1 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20210872

本文引用格式:万家颖,王银.基于褪黑素的分子探针在胶质母细胞瘤成像中的研究[J].神经损伤与功能重建,2023,18(2):77-79.

作者单位

武汉市第一医院
(武汉市中西医结合医院)a.肾病内科,b.检验科

武汉 430022

收稿日期

2021-07-10

通讯作者

王银

591400@qq.com

Application of A Melatonin-Based Molecular Probe for Glioblastoma Imaging WAN Jia-ying^a, WANG Yin^b. a. Department of Nephrology, b. Department of Clinical Laboratory, Wuhan NO.1 Hospital (Wuhan Hospital Of Traditional Chinese And Western Medicine), Wuhan 710003, China

Abstract Objective: To explore the imaging effect of a melatonin-based molecular probe in glioblastoma. **Methods:** The probe Cy5-MT was prepared by coupling 5-methoxytryptamine with fluorescent dye Cy5. The *in vitro* MTT assay was used to evaluate the toxic effect of Cy5-MT on glioblastoma cell U87 and normal human glial cell HEB; Flow cytometry was used to evaluate the targeting ability of Cy5-MT to U87 and HEB; laser scanning confocal microscopy was used to evaluate the imaging effect of Cy5-MT on U87. **Results:** The structure of Cy5-MT was confirmed by mass spectrometry. *In vitro* cytotoxicity study showed that Cy5-MT had low toxicity to U87 and HEB, indicating high biosafety. Flow cytometry results showed that the percentage of cellular uptake and mean fluorescence intensity of the probe per U87 cells were significantly higher than the normal HEB cells. Imaging results showed that Cy5-MT can accurately image U87 tumor cells. **Conclusion:** The probe Cy5-MT can specifically target U87 glioblastoma cells to achieve accurate imaging of U87 and also demonstrates high biosafety.

Keywords melatonin; molecular probe; imaging; glioblastoma

胶质母细胞瘤是复发率、转移率和致死率极高的疾病^[1]。经过治疗患者的生存期大多仍然只有14个月,5年总体生存率不足5%^[2]。因此,早期精准诊断及评估肿瘤的侵袭性对提高患者生存率具有重要的临床意义。褪黑素(melatonin, MT)是由脑松果体分泌的激素之一,化学名为N-乙酰基-5甲氧基色胺(Methoxytryptamine, MT)。MT是一种胶质母细胞瘤靶向药物,能够有效的抑制胶质母细胞瘤细胞的侵袭和转移^[3],临床实验也证实了MT可以改善胶质母细胞瘤患者的生存率^[4]。因此,本研究选择MT作为胶质母细胞瘤的靶向配体,将其与近红外染料Cy5偶联制备胶质母细胞瘤成像探针,并在细胞水平评价探针对胶质母细胞瘤的靶向性以及成像效果,以期为胶质母细胞瘤的精准成像提供参考探针。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

1.1.2 主要试剂和仪器 5-MT和二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购于北京伊诺凯科技有限公司;DMEM培养基购于上海帝博思生物科技有限公司;胎牛血清购于美国Gibco公司;人神经胶质瘤细胞(U87)和人脑星型胶质细胞(HEB)分别购于国家生物医学实验室细胞资源库以及湖南丰晖生物科技有限公司;MTT试剂盒购于Sigma公司。ELx800型酶标仪购于Biotek公司;BSA124S型电子分析天平购于赛多利斯公司;C6型流式细胞仪购于BD公司;激光共聚焦显微镜购于蔡司公司。

1.2 方法

1.2.1 探针合成 将5-MT(3.8 mg, 20 μM)和Cy5-NHS(11.6 mg, 20 μM)溶解到2 mL DMSO

中,室温搅拌5 min后,加入三乙胺(6.1 mg, 60 μ M),在室温下继续反应12 h,然后将反应液进行冷冻干燥,粗产物用高效液相色谱进行分离(流动相:85%甲醇/15%水,V/V),得到绿色的粉末(12.1 mg,92.8%),见图1。

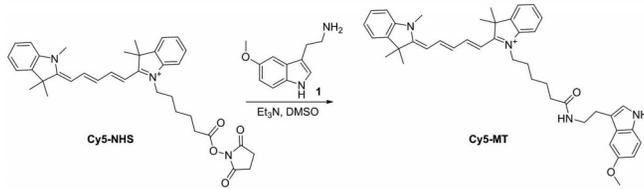


图1 探针Cy5-MT的合成路线

1.2.2 体外细胞毒性实验 取对数生长期的U87细胞以及HEB细胞,胰酶消化后接种到96孔板中,细胞密度约为 1×10^4 个/孔,每孔加入DMEM 100 μ L,空白对照不加入细胞。将96孔板置于5%CO₂和37 $^{\circ}$ C的培养箱中孵育12 h,弃去培养基,每孔分别加入200 μ L浓度为0、0.5、1、10、20、50、100和200 μ mol/L的探针,空白对照组只加入200 μ L的培养基。随后,将96孔板在细胞培养箱中分别继续孵育24 h和48 h,弃去培养液,每孔加入20 μ L 5 mg/mL的MTT溶液和100 μ L培养基,继续孵育4 h,弃去培养液,再在每孔加入150 μ L的DMSO,在摇床上震荡15 min,使结晶物充分的溶解。使用酶标仪在波长为490 nm处测定每孔吸光度(OD)值,计算细胞在不同浓度探针孵育下的存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{OD}_{\text{测试探针}} - \text{OD}_{\text{空白对照}}}{\text{OD}_{\text{阳性对照}} - \text{OD}_{\text{空白对照}}}\right) \times 100\%$$

1.2.3 流式细胞实验 取对数生长期的U87和HEB细胞,胰酶消化后接种到6孔板中,细胞密度约 5×10^5 个/孔,在培养箱中孵育12 h后加入浓度为0、0.25、0.50、1.00、5.00 μ M的探针Cy5-MT或Cy5孵育3 h,随后将细胞用PBS洗涤3次,用胰酶消化后离心收集细胞,用BD流式细胞仪进行测试,分析U87细胞和HEB细胞对Cy5-MT探针的百分摄取率。

1.2.4 激光共聚焦成像实验 取对数生长期的U87细胞,胰酶消化后接种到小皿中,细胞密度约为500个/皿。将细胞在培养箱中孵育12 h后加入0.25 μ M Cy5-MT或0.25 μ M Cy5孵育3 h,PBS洗涤3次,4%多聚甲醛固定细胞,PBS洗涤3次,0.2% Triton-100破膜20 min,PBS洗涤3次,3% BSA封闭1 h,PBS洗涤3次,5 g/mL的DAPI染核3 min,PBS洗涤3次,加入防淬灭剂。Zeiss710激光共聚焦显微镜进行观察。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0软件处理数据。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用

LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 探针体外细胞毒性

MTT实验结果显示,当U87和HEB细胞与探针Cy5-MT孵育24 h和48 h后,存活率均较高。即使在Cy5-MT浓度为100和200 μ mol/L的处理下,2种细胞的存活率仍可达到80%以上,见表1。

表1 U87和HEB细胞与Cy5-MT探针孵育的存活率($\bar{x} \pm s$)

探针浓度/ (μ mol/L)	细胞存活率/%			
	24 h		48 h	
	U87	HEB	U87	HEB
200	84.6 \pm 1.9	87.0 \pm 1.3	84.2 \pm 5.1	85.2 \pm 1.9
100	88.8 \pm 6.9	89.7 \pm 2.7	93.8 \pm 8.2	88.5 \pm 5.3
50	95.5 \pm 0.7	95.4 \pm 4.0	91.9 \pm 2.1	94.7 \pm 8.6
20	92.2 \pm 6.7	95.6 \pm 2.5	91.6 \pm 4.0	92.0 \pm 7.2
5	91.2 \pm 4.3	96.4 \pm 3.6	95.4 \pm 7.5	97.3 \pm 5.2
0	100.0 \pm 7.9	100.0 \pm 2.3	100.0 \pm 0.6	100.0 \pm 7.9

2.2 肿瘤细胞对探针的摄取率

流式细胞检测结果显示,U87细胞对Cy5-MT探针的摄取百分率显著高于Cy5(均 $P < 0.05$),且U87细胞对Cy5-MT探针的摄取百分率随着探针Cy5-MT浓度的增加而增加;当Cy5-MT的浓度为5 μ mol/L时,U87细胞对Cy5-MT摄取率为99.9%。HEB细胞对探针Cy5-MT和Cy5的摄取百分率低于U87细胞(均 $P < 0.05$),当探针浓度为5 μ mol/L和2.5 μ mol/L时,HEB对Cy5-MT的摄取百分率高于Cy5,见表2。

2.3 探针体外细胞成像

与Cy5-MT共同孵育后,U87细胞对探针Cy5-MT(绿色荧光)有着明显的摄取,实现了对肿瘤细胞成像;与Cy5共同孵育后,U87细胞对探针Cy5的摄取显著地减少,几乎没有摄取,见图2。

3 讨论

分子影像技术是在传统影像学基础上发展的新型成像技术,能够在疾病早期在分子水平和细胞水平观察体内的生物过程,能够实时无创的监测疾病的发展^[5]。这种技术通过借助分子探针和成像设备能够将肉眼不可见的病灶进行点亮,使得疾病组织能够被精准的检测,在术中病灶能够被精准的切除。若在疾病的早期阶段采用有效的分子影像技术提高疾病的诊断效率,将会显著的提高患者的存活率,该技术尤其是在肿瘤早诊的方面具有独特的优势。分子影像技术的关键是

表2 U87和HEB细胞对探针Cy5-MT和染料Cy5的摄取百分率($\bar{x}\pm s$)

探针浓度/ ($\mu\text{mol/L}$)	相对百分摄取率/%			
	U87		HEB	
	Cy5-MT	Cy5	Cy5-MT	Cy5
5.00	99.9 \pm 0.0 ^①	49.7 \pm 0.1	59.9 \pm 8.1 ^{①②}	13.6 \pm 0.7
2.50	98.5 \pm 0.3 ^①	2.8 \pm 0.6	15.6 \pm 0.6 ^{①②}	3.6 \pm 0.3
1.00	43.8 \pm 1.7 ^①	0.9 \pm 0.3	2.7 \pm 1.1 ^②	0.7 \pm 0.1
0.50	24.8 \pm 0.7 ^①	0.5 \pm 0.2	0.9 \pm 0.6 ^②	0.8 \pm 0.1
0.25	4.4 \pm 0.1 ^①	0.4 \pm 0.1	0.5 \pm 0.4 ^②	0.4 \pm 0.1
0	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.0

注:与同一组细胞Cy5比较,^① $P<0.05$;与U87细胞对相同浓度Cy5-MT的摄取百分率比较,^② $P<0.05$

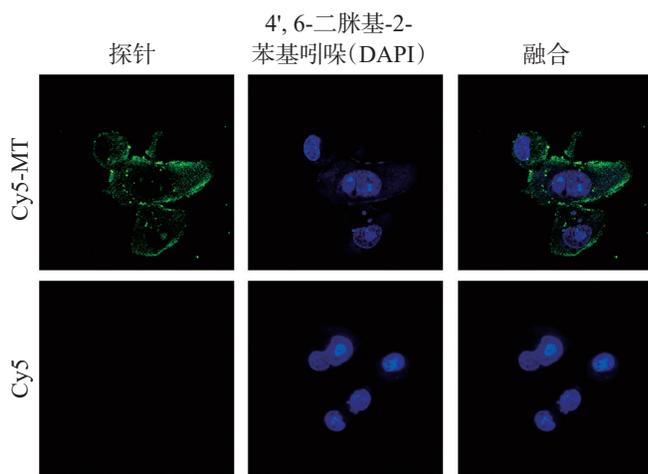


图2 探针Cy5-MT及Cy5对胶质母细胞瘤U87的成像效果

开发出肿瘤高特异性、高灵敏的靶向探针,能够精准的对肿瘤进行成像^[6]。目前已有数个探针被开发在临床上用于肿瘤的精准成像和手术导航。2011年 van Dam等^[7]开发了一种靶向叶酸 α 受体的近红外探针实现了对卵巢癌患者癌变组织的精准切除;2020年Hu等^[8]采用荧光染料吲哚青绿(ICG)对肝癌患者的微小病灶和部分转移灶组织实现了精准的切除。

针对胶质母细胞瘤的精准诊断,目前也有多个靶向探针被报道。例如,2018年有学者^[9]以尿激酶型纤溶酶原激活物受体(uPAR)为靶标,将uPAR的靶向配体多肽AE105与近红外二区染料CH1055偶联制得了探针CH1055-4Glu-AE105。该探针不仅能够精准的对胶质母细胞瘤进行成像,还能对胶质母细胞瘤的术中切除提供指导。2019年有学者^[10]以整合素 $\alpha v\beta 3$ 为靶点,将其配体多肽RWRNK与荧光染料Cy5制得了探针Cy5-RWRNK。在胶质母细胞瘤的动物模型上,探针

Cy5-RWRNK也准确地可视化了肿瘤组织。这些探针的研发有助于胶质母细胞瘤的诊疗。但目前能在临床用于胶质母细胞瘤诊疗的探针却很少,因为已报道的大部分探针存在生物相容性差、肿瘤成像对比度低等缺点。因此,临床上亟需胶质母细胞瘤的成像探针。

研究发现MT是对胶质母细胞瘤具有高亲和力的靶向配体^[11],本研究将其用荧光染料Cy5进行标记,构建出胶质母细胞瘤的成像探针Cy5-MT,并通过质谱确证结构。在细胞毒性实验中发现,即使探针在200 $\mu\text{mol/L}$ 的高浓度,对U87和HEB细胞的抑制率仍然低,提示探针Cy5-MT的毒性小,具有高的生物安全性。在流式细胞实验中发现,探针Cy5-MT在肿瘤细胞U87中的摄取率比正常细胞HEB高,表明探针Cy5-MT能够选择性的靶向胶质母细胞瘤细胞U87。在激光共聚焦实验中,探针Cy5-MT能够特异性对胶质母细胞瘤细胞U87进行精准成像。综上所述,本研究对胶质母细胞瘤的成像探针进行了探索,为该疾病的精准诊断提供了一定的参考意义。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71:209-249.
- [2] Tan AC, Ashley DM, López GY, et al. Management of glioblastoma: state of the art and future directions[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70: 299-312.
- [3] Wang C, Zhao Z, Qi Q, et al. miR-6858 plays a key role in the process of melatonin inhibition of the malignant biological behavior of glioma[J]. J Clin Neurosci, 2021, 87: 137-146.
- [4] Moretti E, Favero G, Rodella LF, et al. Melatonin's antineoplastic potential against glioblastoma[J]. Cells, 2020, 9: 599.
- [5] Palestro CJ. Molecular imaging of infection: the first 50 years[J]. Semin Nucl Med, 2020, 50: 23-34.
- [6] Yang M, Arsanjani R, Roarke MC. Advanced nuclear medicine and molecular imaging in the diagnosis of cardiomyopathy[J]. AJR Am J Roentgenol, 2020, 215: 1208-1217.
- [7] van Dam GM, Themelis G, Crane LMA, et al. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor-[alpha] targeting: first in-human results[J]. Nat Med, 2011, 17: 1315-1319.
- [8] Hu Z, Fang C, Li B, et al. First-in-human liver-tumour surgery guided by multispectral fluorescence imaging in the visible and near-infrared-I/II windows[J]. Nat Biomed Eng, 2020, 4: 259-271.
- [9] Kurbegovic S, Juhl K, Chen H, et al. Molecular targeted NIR-II probe for image-guided brain tumor surgery [J]. Bioconjugate Chem, 2018, 29: 3833-3840.
- [10] Zhang L, Meng X, Shan X, et al. Integrin $\alpha v\beta 3$ -specific hydrocyanine for cooperative targeting of glioblastoma with high sensitivity and specificity[J]. Anal Chem, 2019, 91: 12587-12595.
- [11] Doğanlar O, Doğanlar ZB, Delen E, et al. The role of melatonin in angio-miR-associated inhibition of tumorigenesis and invasion in human glioblastoma tumour spheroids[J]. Tissue Cell, 2021, 73: 101617.