

网络出版时间:2024-12-05 15:27:30 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.004

成纤维细胞激活蛋白诱导胞内自组装 Gd-纳米粒子 对比剂的合成及 MR 成像研究

郭祥源,郑一凡,张曼琳,任怡博,蒋金辉

(安徽医科大学第一附属医院核医学科,合肥 230022)

摘要 目的 拟合成一种 Gd 标记的能够响应肿瘤相关成纤维细胞中高度表达的成纤维细胞激活蛋白(FAP)的分子探针,用于胰腺癌的 MR 显像研究。方法 化学合成 Z-Gly-Pro-Cys-Lys(Gd-DOTA)-CBT(下文简称对比剂 1)并对其进行了质谱分析以表征其化学结构;应用高效液相色谱体外验证对比剂 1 在 FAP 的作用下形成二聚体,透射电子显微镜验证酶切还原后自组装形成的“Gd-纳米粒子”;CCK-8 实验检测对比剂 1 的生物安全性;建立 BxPc-3 胰腺癌裸鼠模型,随机分为 3 组,静脉注射 0.08 mmol/kg 对比剂 1 作为实验组、0.08 mmol/kg Gd-DTPA 作为对照组和生理盐水作为空白对照组(每组 3 只),分别对其进行 0~3 h 的动态 MR 扫描,观察 T1 和 T2 加权成像的增强效果,并分析时间进程中肿瘤与肌肉灰阶比值(T/M)的变化率。结果 对比剂 1 在体外能够响应 FAP,在 FAP 的作用下能够形成二聚体,并自组装形成了纳米粒子结构。对比剂 1 具有良好的生物安全性。BxPc-3 肿瘤小鼠静脉注射对比剂 1 和 Gd-DTPA 后均在 2 h 时肿瘤的 T1 加权对比度达到最高:实验组在 T1 加权成像中 T/M 在 2 h 时为 0 h 的 135.20% ± 0.06%,Gd-DTPA 组为 115.70% ± 0.05%,生理盐水组为 113.50% ± 0.02%。实验组比 Gd-DTPA 对照组增强 T1 加权对比效果更明显($P < 0.01$)。T2 加权成像中,T/M 定量分析结果显示 3 组的肿瘤 T2 加权对比增强均较小,实验组、对照组和生理盐水组在 0.5 h 的 T/M 分别为 0 h 的 94.60% ± 0.03%、106.30% ± 0.04% 和 102.20% ± 0.002%,均未显示出明显的肿瘤 T2 磁共振对比度增强。结论 合成靶向 FAP 且能胞内自组装成 Gd-纳米粒子的新型 MR 对比剂,提高了 Gd 在靶区的富集,增强了胰腺癌 T1 加权磁共振成像,具有潜在的临床应用价值。

关键词 对比剂;点击反应;自组装;成纤维细胞激活蛋白;胰腺癌;T1 加权成像

中图分类号 R 445.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)12-2087-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.004

胰腺癌是恶性程度极高的消化道肿瘤,5 年生生存率低于 8%^[1]。超过 80% 的患者在确诊时处于临床晚期,错过手术治疗机会,因此致死率较高^[1]。磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)是临床中常用的疾病诊断成像技术,相较于 CT 软组织对比度更好,对于诊断胰腺中受限制的小胰腺癌以及是否存在胰周增生和血管侵犯具有明显优势^[2]。目前临床上多应用钆螯合物,如钆喷酸葡胺(gadopentetic acid, Gd-DTPA),作为造影剂来提高 MRI 对比度。钆基纳米粒子能够提高 Gd 在靶区的富集,从而获得更好的对比度^[3]。胰腺癌约 90% 是导管腺癌,其丰富的间质成分包含大量的肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs),成纤

维细胞激活蛋白(fibroblast activation protein, FAP)在 CAFs 中高度表达,而在正常组织中低表达或不表达^[4]。除此之外,FAP 还具有二肽基肽酶活性,能特异性剪切 N-末端被封闭的 Gly-Pro ↓ X 氨基酸序列^[5]。点击反应是发生于巯基的 2-氰基苯并噻唑(benzothiazole-2-carbonitrile, CBT)上的腈基和 D-半胱氨酸(D-cysteine, Cys)上的 1,2-氨基硫醇之间的化学反应,具有反应高效、选择性高和生物兼容性好等特点,已广泛应用于生物医学领域^[6]。该研究拟合成一种 Gd 标记的能够响应肿瘤相关成纤维细胞中高度表达的 FAP 的分子探针用于胰腺癌的 MR 显像研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 Fmoc-Lys(Boc)-OH(CAS 号:71989-26-9)、Fmoc-L-Cys(Stbu)-OH(CAS 号:73724-43-3)、Fmoc-Pro-OH(CAS 号:71989-31-6)、Fmoc-Gly(CAS 号:29022-11-5)购自上海吉尔生化公司;N,N-二甲基甲酰胺(CAS 号:68-12-12)、N,N-

2024-11-01 接收

基金项目:安徽省卫生健康科研项目(编号:AHWJ2023A20105)

作者简介:郭祥源,女,硕士研究生;

蒋金辉,男,助理研究员,硕士生导师,通信作者,E-mail:

jiangjinhui@ahmu.edu.cn

二异丙基乙胺 (CAS 号: 7087-68-5)、异丙醇 (CAS 号: 67-63-0)、正己烷 (CAS 号: 110-54-3)、氯甲酸异丁酯 (CAS 号: 543-27-1)、3-甲硫基丙醛 (CAS 号: 3268-49-3)、三氟乙酸 (CAS 号: 76-05-1)、哌啶 (CAS 号: 110-89-4)、乙腈 (HPLC)、甲醇 (HPLC)、三(2-巯基乙基)膦酸盐 (TCEP) 等化学合成试剂均购于上海毕得医药科技有限公司或上海阿拉丁生化科技; 高糖 DMEM 培养基 (货号: 319-006)、RP-MI1640 培养基 (货号: 350-006)、0.25% 胰酶 (货号: 325-040)、胎牛血清 (货号: 085-150) 等细胞培养试剂均购自维森特 (南京) 生物技术有限公司; Anti-GADPH (货号: WL01114); FAP 抗体 (货号: WL04890); 抗兔二抗 (货号: WLA024) 等细胞免疫印迹所需抗体试剂购于沈阳万类生物公司。

1.1.2 主要仪器 细胞恒温培养箱、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}/4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱 (日本三洋公司); 电子显微镜 (XTL-100, 长方光学仪器有限公司); 低温离心机 (Primo R, 德国 heraeus 公司); 高压蒸汽灭菌锅 (YXQ-LB-100SII, 上海博讯实验仪器公司); 高效液相色谱 (制备: Shimadzu UFLC, 分析: Agilent 1200, 美国安捷伦科技有限公司); 正电子发射计算机断层显像/核磁共振扫描仪 (PET/MR, 3.0T, 美国 General Electric 公司)。

1.1.3 实验细胞与动物 BxPc-3 人原位胰腺腺癌细胞由安徽医科大学第一附属医院药学院馈赠; 构

建皮下移植瘤的裸鼠 (9 只, 18 ~ 20 g, 5 周, 雌性, SPF 级动物房饲养) 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司。该研究动物实验方案经安徽医科大学动物实验伦理审查委员会批准 (伦理学批号: LLSC20232173)。

1.2 方法

1.2.1 对比剂 1 的化学合成 对比剂 1 的合成路线如图 1 所示, 首先通过固相肽合成法得到 Fmoc-Gly-Pro-Cys-Lys (以下简称为化合物 A) 肽段。化合物 A 溶于无水 THF 中, 冷却至 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、加入氯甲酸异丁酯和 4-甲基吗啉活化 40 min 后加入 CBT 反应生成 Fmoc-Gly-Pro-Cys-Lys-CBT (化合物 B), 化合物 B 用 95% TFA 脱除 Lys 侧链上的 Boc 保护基后 (化合物 C) 与 1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷-1, 4, 7, 10-四乙酸三叔丁酯 [(DOTA (OtBu) $_3$)] 反应生成 Fmoc-Gly-Pro-Cys-Lys [Gd-DOTA (OtBu) $_3$]-CBT (化合物 D), 用 50% TFA 室温下 3 h 脱去 DOTA 上的 OtBu 保护基 (化合物 E), 用 10% 哌啶在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 脱去 Gly 氨基上的 Fmoc 保护基获得化合物 F。F 再与苯甲氧羰琥珀酰亚胺在 $\text{pH} = 7.5$ 条件下快速反应得到对比剂前体分子 G, 前体分子 G 与 $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 反应螯合得到对比剂 1, 使用高效液相色谱对中间产物和终产物进行定性分析和纯化分离, 对比剂 1 用高分辨质谱验证其正确性。

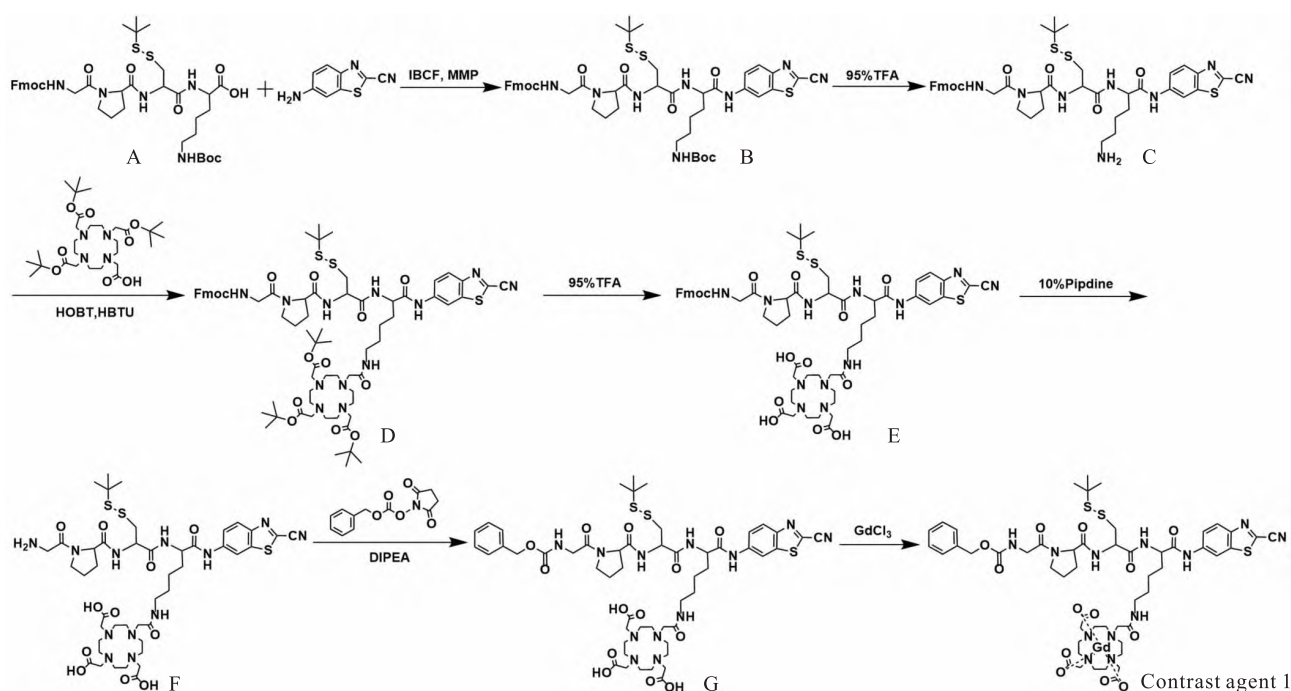


图 1 对比剂 1 的合成路线图

Fig. 1 Synthetic route for contrast agent 1

1.2.2 对比剂 1 的体外酶切实验 对比剂 1 的体外酶切自组装过程如图 2 所示。将得到的对比剂 1 配成 2 mmol 母液备用,利用 FAP 的二肽肽酶活性性能特异性裂解 Z-GP 肽段,将对比剂 1 与重组人 FAP 在特定的缓冲工作液(50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷,1 mol/L 氯化钠,1 mg/ml 牛血清蛋白,pH = 7.5)中 37 °C 条件下孵育 4 h,得到被 FAP 酶切后的产物;随后,向上述混合体系(1-Cleaved)中加入 1 mmol/L 的 TCEP 来还原肽链上的双硫键,孵育 2 h 得到点击缩合反应后的二聚体产物,应用高效液相色谱监测反应过程,并使用透射电子显微镜对形成的 1-NP 进行表征。

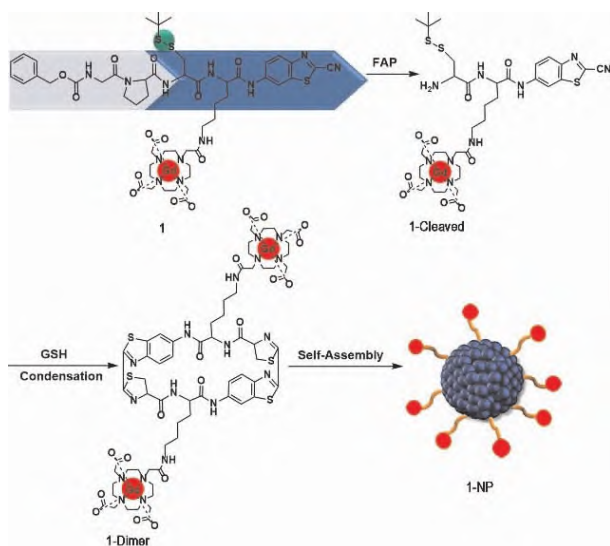


图 2 对比剂 1 自组装形成纳米粒子 1-NP 示意图
Fig.2 Schematic diagram of self-assembly of contrast agent 1 to form nanoparticles 1-NP

1.2.3 细胞毒性实验 采用 CCK-8 法测定细胞存活率。将处于对数生长期的 BxPc-3 细胞以每孔大约 3×10^4 个标准接种到无菌 96 孔板中,置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱孵育 24 h 后,分别加入不同浓度(50、100、200、400 μmol/L)的对比剂 1,继续分别孵育 4、8、12 h。然后每孔加入 10 μl CCK-8 检测试剂,在细胞培养箱中继续孵育,待出现橙黄色甲瓞结晶,用酶标仪测量在 450 nm 处 CCK-8 的吸光度,计算细胞的存活率,然后根据细胞存活率评估细胞毒性。

1.2.4 胰腺癌 BxPc-3 肿瘤模型的构建及 MR 显像研究 BxPc-3 细胞培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的 RPMI 1640 培养基中,当细胞处于对数增长长期时,用 0.25% 的胰酶消化细胞并离心(1 200

r/min, 3 min),制成 5×10^6 个细胞/100 μl 的细胞悬液。选用 5 周(18 ~ 20 g)雌性 BALB/c 裸鼠,于右侧腋下皮下注射 200 μl 上述细胞悬液,将接种好肿瘤细胞的老鼠饲养在 SPF 级动物房保持 12 h 光照黑暗交替,食物和水充足。记录肿瘤接种的时间并每日观察裸鼠生存状况以及肿瘤体积大小变化。

待肿瘤直径达到 0.5 ~ 0.8 cm 时,进行磁共振显像实验。参照 0.08 mmol/kg^[7] 的标准,随机将 BcPC-3 荷瘤鼠分为 3 组(每组 $n = 3$):尾微静脉注射 0.08 mmol/kg 对比剂 1 设为实验组;尾静脉注射 0.08 mmol/kg Gd-DTPA 设为对照组;注射生理盐水设为空白对照组。将以上 3 组模型鼠分别进行 0 ~ 3 h 的动态 MR 扫描,扫描时小鼠麻醉方式为腹腔注射 35 ~ 40 mg/kg 1% 的戊巴比妥;T1 扫描序列参数:TE = 9.0 ms,TR = 594 ms,FOV:12 mm × 12 mm, matrix size = 288 × 224, slice thickness = 2 mm (12 slices, gap = 0);T2 扫描序列参数:TE = 87.5 ms,TR = 2 405 ms,FOV:12 mm × 12 mm, matrix size = 288 × 224, slice thickness = 2 mm (12 slices, gap = 0)。在同一层面,同样大小进行肿瘤及肌肉组织的勾画。

1.3 统计学处理 用 Graphpad Prism 8.4.3 进行统计分析,结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间差异的比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对比剂 1 的化学合成结果 按照合成路线图所示方法得到对比剂 1,其高分辨质谱的表征结果如图 3 所示:对比剂 1 的理论量是 1 324.351,高分辨质谱测定的实际分子量是 1 324.262。

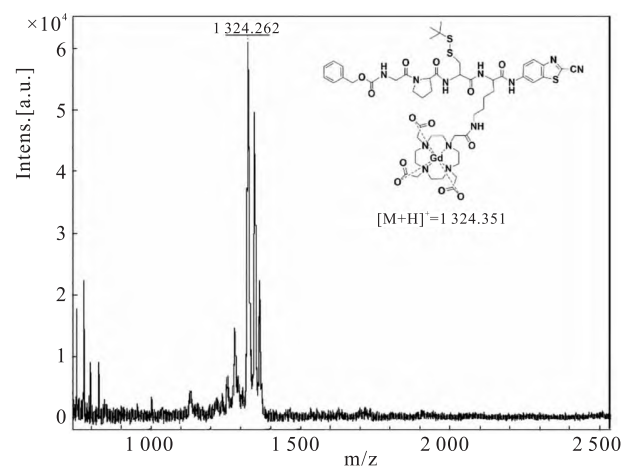


图 3 对比剂 1 的高分辨质谱图
Fig.3 HR-MALDI/MS spectrum of contrast agent 1

2.2 对比剂 1 在酶切作用下形成纳米粒子 1-NPs

高效液相色谱监测结果表明对比剂 1 在液相色谱谱图中的保留时间为 28.6 min,对比剂 1 在 37 °C 条件下与 500 U/ml FAP 孵育 4 h 得到酶切产物 1-Cleaved 的保留时间为 22.7 min,与还原剂 TCEP 反应 2 h 后得到二聚体产物 1-Dimer 的保留时间为 14.7 min(图 4A),高分辨质谱测定结果表明酶切产物 1-Cleaved 和二聚体产物 1-Dimer 的形成(图 4C、4D),透射电子显微镜说明自组装形成了纳米粒子 1-NP(图 4B)。

2.3 对比剂 1 细胞毒性实验 BxPc-3 细胞用不同浓度对比剂 1(50、100、200 和 400 $\mu\text{mol/L}$ 分别孵育 4、8、12 h 均未表现出明显的细胞毒性;50 $\mu\text{mol/L}$ 对比剂 1 孵育直到 12 h BxPc-3 细胞的存活率大于 92%,用高浓度(400 $\mu\text{mol/L}$)的对比剂 1 孵育直到 12 h BxPc-3 细胞的存活率仍在 70% 以上,说明对比

剂 1 具有良好的生物兼容性。见图 5。

2.4 对比剂 1 增强 BxPc-3 肿瘤模型鼠 T1 加权磁共振成像 对肿瘤模型鼠在 3.0T 的医用 PET/MR (配备了动物线圈)进行了 T1 和 T2 加权冠状位 MR 扫描。图 6A 显示尾静脉注射 0.08 mmol/kg 对比剂 1 的实验组和 0.08 mmol/kg Gd-DTPA 对照组都在 2 h 时肿瘤 T1 加权对比度增强达到最高,此时实验组的肿瘤与肌肉灰阶比值(T/M)是 0 h 的 135.20% \pm 0.06%(图 6C),Gd-DTPA 对照组 2 h 的 T/M 是 0 h 的 115.70% \pm 0.05%,说明对比剂 1 在相同的浓度下比 Gd-DTPA 增强 T1 加权对比度效果更好,差异具有统计学意义($t=4.170, P<0.01$)。注射生理盐水的空白对照组在 1 h 时 T/M 是 0 h 的 113.50% \pm 0.02%,其 T/M 曲线与 Gd-DTPA 对照组相差不大。在 3 组小鼠肿瘤 T2 加权成像中,T/M 定量分析结果显示 3 组的肿瘤 T2 加权对比增强都比较小,实验

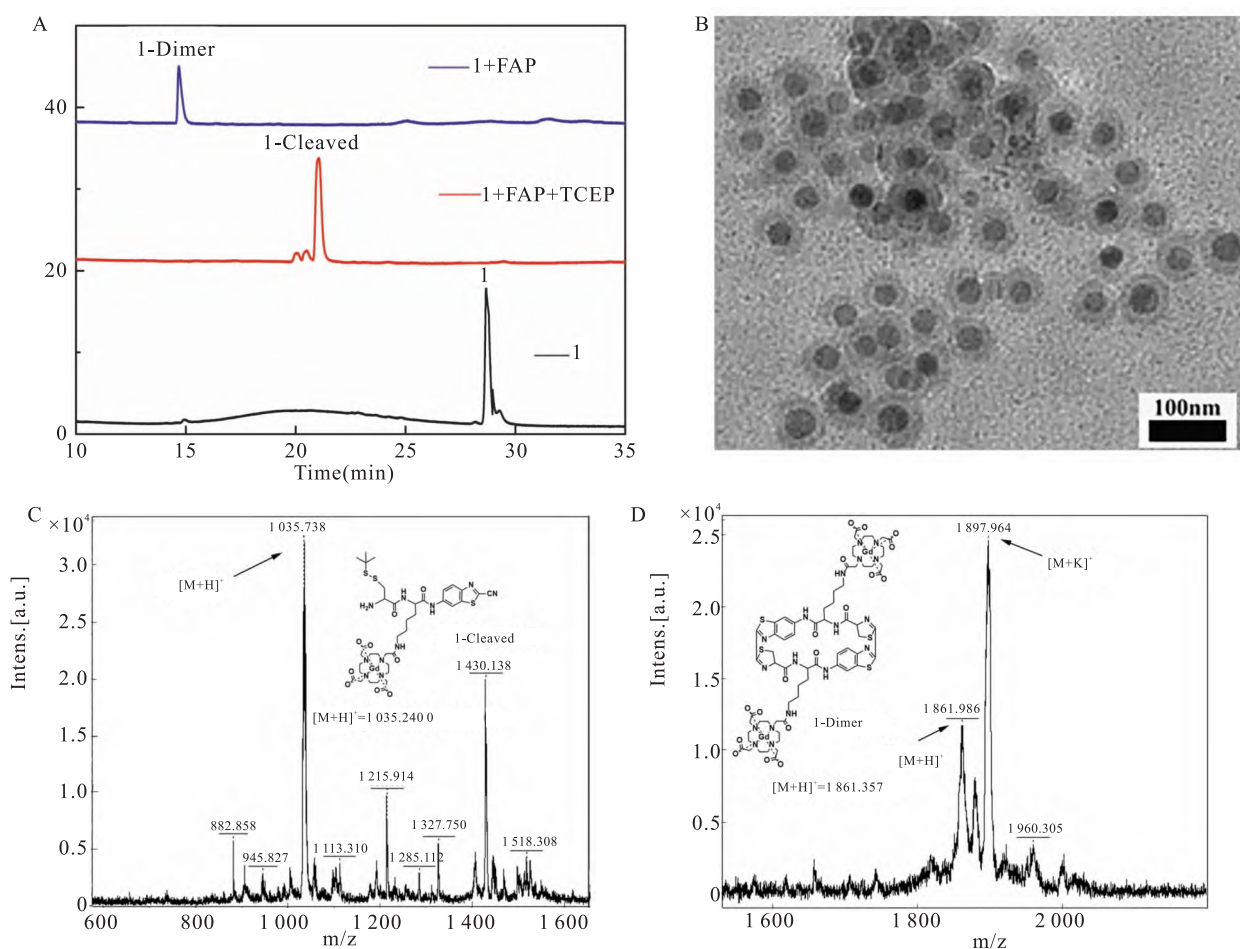


图 4 对比剂 1 的体外酶切实验

Fig. 4 *In vitro* digestion experiments with contrast agent 1

A: HPLC traces of 100 μmol contrast agent 1 in PBS buffer (black), incubated with 500 U/L FAP, and 1 mmol TCEP (red), or incubated with 500 U/L FAP (blue) at 37 °C for 2 h; B: TEM image of the 1-NPs nanoparticles formed by incubation of contrast agent 1 with FAP and TCEP; C: HR-MALDI/MS spectrum of 1-Cleaved; D: HR-MALDI/MS spectrum of 1-Dimer.

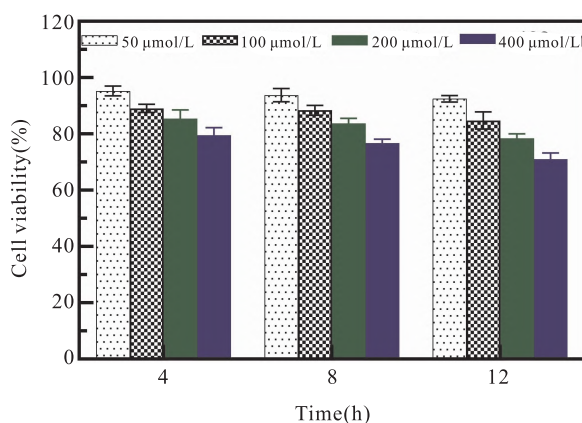


图5 BxPc-3 细胞用不同浓度对比剂 1 分别孵育 4、8、12 h 的细胞毒性
Fig. 5 Cell viability of BxPc-3 cells incubated with contrast agent 1 with 4 h, 8 h, and 12 h incubation time at different concentrations

组和对照组在 0.5 h 增强最大, T/M 分别为 0 h 的 $94.60\% \pm 0.03\%$ 和 $106.30\% \pm 0.04\%$, 生理盐水组 T/M 在 0.5 h 时为 0 h 的 $102.20\% \pm 0.002\%$ (差异不具有统计学意义), 均未显示出明显的肿瘤 T2 磁共振对比度增强(图 6B、6D)。以上结果表明, 对比剂 1 在 FAP 作用下发生点击缩合反应和自组装形成的 Gd-纳米粒子能够有效增强胰腺癌的 T1 加权 MR 对比度。

3 讨论

在肿瘤的发生过程中, 伴随着组织和体液中一些微量生物标志物(包括蛋白质、多肽和核酸)表达水平的异常, 对这些生物标志物精准检测可以特异性区分异常的病理学过程, 是实现癌症早期精准诊断的关键。FAP 是一种细胞表面的丝氨酸蛋白酶, FAP 参与肿瘤微血管的形成, 促进肿瘤的浸润、转移和生长^[8-9], 目前已经开发出多种应用 FAP 作为靶点进行胰腺癌诊疗的成像探针, 如 Watabe et al^[10] 使用放射性核素⁶⁴Cu 和²²⁵Ac 标记 FAP 的小分子抑制剂来实现胰腺癌的 PET 成像与治疗; Gao et al^[11] 研制了一种 FAP 靶向的香豆素准分子实现 FAP 过表达肿瘤细胞的荧光成像。但是, 到目前为止并未有基于识别 FAP 特异性肽段(Z-Gly-Pro↓X)的分子探针应用于肿瘤的 MR 成像。本研究设计和合成了 Z-Gly-Pro-Cys-Lys(Gd-DOTA)-CBT 这一可被 FAP 识别的对比剂用于胰腺癌的早期精准诊断研究。

点击反应可以由 pH、蛋白酶和还原剂等作用在体外缓冲溶液中进行, 也可以在细胞内控制缩合自

组装形成纳米粒子结构, 具有条件温和、反应高效、产物稳定和生物兼容性好等优点。目前, 经过多年的深入探索和发展, 该缩合反应已经广泛地用于细胞内生物分子的检测、肿瘤显像和药物递送等领域^[12-14]。本课题设计了一种基于 CBT-Cys 点击缩合反应的细胞内原位自组装分子探针并应用于胰腺癌的早期精准诊断研究, 利用载有 MR 造影剂 Gd 的分子探针在靶区发生酶切反应, 进入肿瘤细胞后在 GSH 的还原作用下暴露出 Cys, 然后与 CBT 发生点击缩合反应形成二聚体环状结构, 二聚体进一步通过 π - π 堆叠自组装成纳米粒子结构。体外酶切实验验证了构建的对比剂 1 能够高效响应 FAP, 在 FAP 的作用下可以发生点击缩合反应形成二聚体。TEM 表征实验验证了纳米粒子的形成(图 4B)。由于纳米粒子结构的疏水性不易被细胞膜泵出, 提高了 Gd 在靶区的富集。这种策略不仅极大地增强了 MR 显像和提高 MR 灵敏度, 同时有效降低了造影剂的用量和在正常组织中的分布。同时, 细胞毒性实验表明, 对比剂 1 对 BxPc-3 细胞在一定的浓度范围内毒性较小(图 5), 说明本实验中构建的对比剂 1 具有良好的生物兼容性。

本研究将构建的对比剂 1 用于胰腺癌 BxPc-3 模型鼠 MR 成像研究。在 T1 加权成像中, 静脉注射对比剂 1 和 Gd-DTPA 后均在 2 h 增强 T1 加权对比度最高(图 6), 前者在 2 h 比 0 h 肿瘤的 T1 加权对比度增加 35.2%, 而 Gd-DTPA 对照组 2 h 比 0 h 肿瘤的 T1 加权对比度只增加了 15.7%。注射生理盐水组在 2 h 比 0 h 肿瘤的 T1 加权对比度增加 13.5%。说明对比剂 1 比常规的磁共振造影剂 Gd-DTPA 能够更大地提高 T1 加权对比度。主要原因是对比剂 1 能够高效响应 FAP, 并在靶区发生点击缩合反应和自组装, 形成了“Gd-纳米粒子”结构, 纳米结构是疏水性的不易被细胞膜泵出, 提高了靶区造影剂的浓度。这种原位的“智能”组装策略, 不仅可以大大地提高造影剂在靶区的富集从而提高 MR 灵敏度, 同时能够有效减低正常组织的摄取, 在疾病诊治方面具有重要的临床应用价值。在 T2 加权成像中, 3 组的增强效果都比较弱(图 6B 和 6D), 这也与预期相符合。

综上所述, 本研究基于点击反应, 以胰腺癌肿瘤微环境高度表达的 FAP 作为靶点, 构建了一种 Gd 标记的对比剂用于胰腺癌的早期精准诊断研究。该对比剂在 FAP 的作用下能够在胰腺癌肿瘤细胞内原位自组装形成纳米粒子结构, 提高靶区 Gd 的浓

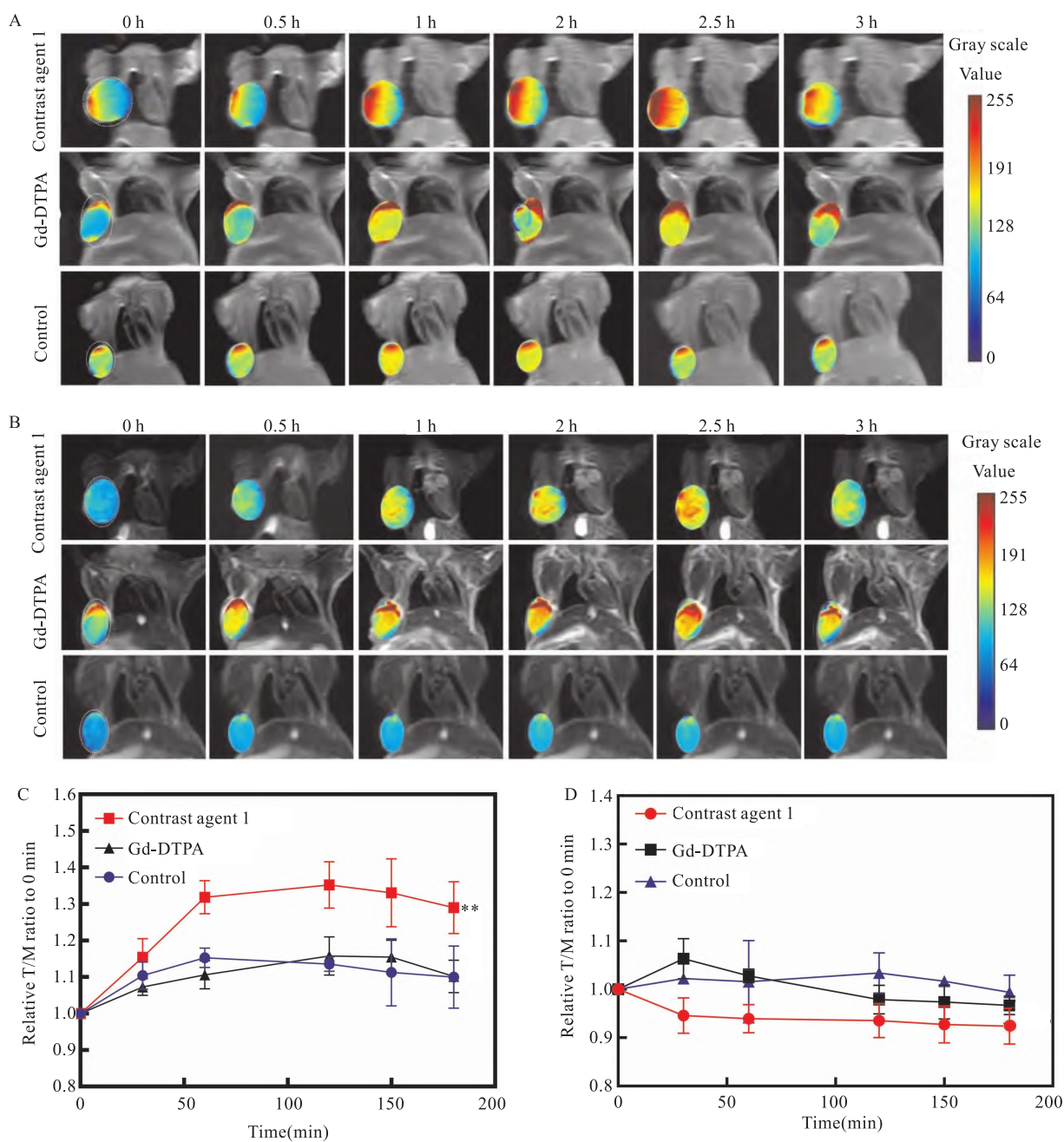


图6 BxPc-3 肿瘤模型鼠 T1、T2 加权磁共振成像

Fig. 6 T1-and T2-weighted magnetic resonance imaging of BxPc-3 tumor model mice

A, B: T1, T2 -weighted coronal MR images of BxPc-3 tumor-bearing mice intravenously injected with 0.08 mmol/kg contrast agent 1 (top row) and then 0.08 mmol/kg Gd-DTPA (middle row), and saline solution (bottom row) at 0 h (left column) from 3 h (right column); C, D: Normalized time course tumor-to-muscle (T/M) contrast ratios of T1 values and T2 values in panel A and panel B (Each error bar represents the standard deviation of three independent experiments; ** $P < 0.01$ vs Gd-DTPA).

度和滞留时间,从而极大提高 MR 成像的灵敏度和精准性,为临床胰腺癌的早期精准检测提供了新策略和思路。

参考文献

[1] 马丹丹, 张 翌, 林振宇, 等. PRC1 在胰腺癌中的细胞生物学功能及临床意义[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(2):

189 - 95. doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2023.02.003.

[1] Ma D D, Zhang Y, Lin Z Y, et al. The cell biological function and clinical significance of PRC1 in pancreatic carcinoma[J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(2): 189 - 95. doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2023.02.003.

[2] 寇红伟. CT 与 MRI 检查在胰腺癌中的应用进展[J]. 中国医疗器械信息, 2020, 26(10): 7 - 8, 20. doi:10.15971/j.cnki.cmdi.2020.10.005.

- [2] Kou H W. Application progress of CT and MRI in pancreatic cancer[J]. China Med Device Inf, 2020, 26(10): 7-8, 20. doi: 10.15971/j.cnki.cmdi.2020.10.005.
- [3] Ho S L, Yue H, Lee S, et al. Mono and multiple tumor-targeting ligand-coated ultrasmall gadolinium oxide nanoparticles: enhanced tumor imaging and blood circulation[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(7): 1458. doi:10.3390/pharmaceutics14071458.
- [4] Kuznetsova A, Popova O, Panchenkov D, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: tumor microenvironment and problems in the development of novel therapeutic strategies[J]. Clin Exp Med, 2023, 23(3): 619-43. doi:10.1007/s10238-022-00886-1.
- [5] Fu A, Wang H, Huo T, et al. A novel chemiluminescence probe for sensitive detection of fibroblast activation protein- α *in vitro* and in living systems[J]. Anal Chem, 2021, 93(16): 6501-7. doi:10.1021/acs.analchem.1c00413.
- [6] Xu H D, Cheng X, Sun X, et al. Caspase-3-triggered intracellular gadolinium nanoparticle formation for T1-weighted magnetic resonance imaging of apoptosis *in vivo*[J]. Nano Lett, 2023, 23(13): 6178-83. doi:10.1021/acs.nanolett.3c01787.
- [7] Chen P, Wang H, Wu H, et al. Intracellular synthesis of hybrid Gallium-68 nanoparticle enhances MicroPET tumor imaging[J]. Anal Chem, 2021, 93(16): 6329-34. doi:10.1021/acs.analchem.1c00747.
- [8] Liu Y, Watabe T, Kaneda-Nakashima K, et al. Fibroblast activation protein targeted therapy using [^{177}Lu]FAPI-46 compared with [^{225}Ac]FAPI-46 in a pancreatic cancer model[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2022, 49(3): 871-80. doi:10.1007/s00259-021-05554-2.
- [9] Fitzgerald A A, Weiner L M. The role of fibroblast activation protein in health and malignancy[J]. Cancer Metastasis Rev, 2020, 39(3): 783-803. doi:10.1007/s10555-020-09909-3.
- [10] Watabe T, Liu Y, Kaneda-Nakashima K, et al. Theranostics targeting fibroblast activation protein in the tumor stroma: ^{64}Cu and ^{225}Ac -labeled FAPI-04 in pancreatic cancer xenograft mouse models[J]. J Nucl Med, 2020, 61(4): 563-9. doi:10.2967/jnumed.119.233122.
- [11] Gao G, Sun X, Liu X, et al. FAP- α -instructed coumarin excimer formation for high contrast fluorescence imaging of tumor[J]. Nano Lett, 2022, 22(16): 6782-6. doi:10.1021/acs.nanolett.2c02540.
- [12] Yuan Y, Raj P, Zhang J, et al. Furin-mediated self-assembly of olsalazine nanoparticles for targeted Raman imaging of tumors[J]. Angew Chem Int Ed, 2021, 60(8): 3923-7. doi:10.1002/anie.202014839.
- [13] Zhu Y, Zhang X, You Q, et al. Recent applications of CBT-Cys click reaction in biological systems[J]. Bioorg Med Chem, 2022, 68: 116881. doi:10.1016/j.bmc.2022.116881.
- [14] Zhu J Q, Wu H, Li Z L, et al. Responsive hydrogels based on triggered click reactions for liver cancer[J]. Adv Mater, 2022, 34(38): e2201651. doi:10.1002/adma.202201651.

Synthesis of fibroblast activation protein-induced intracellular self-assembly Gd-nanoparticle contrast agent and study of MR imaging

Guo Xiangyuan, Zheng Yifan, Zhang Manlin, Ren Yibo, Jiang Jinhui

(Dept of Nuclear Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To synthesis a Gd-labeled molecular probe capable of responding to fibroblast activation protein (FAP) highly expressed in tumor-associated fibroblasts for magnetic resonance imaging studies of pancreatic cancer. **Methods** The chemical structure of Z-Gly-Pro-Cys-Lys(Gd-DOTA)-CBT (contrast agent 1) was characterized through mass spectrometry analysis. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to verify the contrast agent 1 formed a dimer under the cleavage of fibroblast activation protease (FAP) *in vitro*, and further self-assembled to form Gd-nanoparticles. The cell counting Kit-8 (CCK-8) assay was used for biological safety analysis. BxPc-3 tumor-bearing mice were established and randomly divided into three groups, 3 mice intravenously (i. v.) injected with 0.08 mmol/kg contrast agent 1 through tail vein were designated as the experimental group, 3 mice i. v. injected with 0.08 mmol/kg Gd-DTPA were designated as the control group, and 3 mice i. v. injected with normal saline were designated as the blank control group ($n = 3$). Dynamic MR scanning from 0 to 3 hours was performed for them, respectively. The enhancement effects of T1- and T2-weighted imaging were observed and the rate of change in the tumor-to-muscle ratio (T/M) over time was analyzed. **Results** Contrast agent 1 efficiently responded to FAP *in vitro*, forming dimers under the action of FAP, and further self-assembled to form nanoparticle structures. Contrast agent 1 has good biocompatibility. The BxPc-3 tumor-bearing mice showed that the T1-weighted contrast of the tumor reached its highest level at 2 h post injection of contrast agent 1 or Gd-DTPA. In T1-

原肌球蛋白调节蛋白3在肝细胞癌复发转移中的潜在作用分析

罗龙彪,蒋辉,马丹丹,付航玮,孙炜玮
(中部战区总医院普通外科,武汉 430070)

摘要 目的 探讨原肌球蛋白调节蛋白3(TMOD3)与肝细胞癌恶性生物学特征的关系及其对肝癌复发转移的预测潜力。方法 首先利用人类蛋白质组数据库获取 TMOD3 结构及其在细胞和组织中的定位。利用 TCGA 以及 GEO 数据集探究 TMOD3 在肝细胞癌组织与正常肝脏组织中的表达差异及其对临床病理特征及预后的影响。接着利用 STRING 数据库探究 TMOD3 的相互作用蛋白并利用 Metascape 数据库进行富集分析,最后利用 Logistic 回归分析肝细胞癌远处转移的独立危险因素,并利用受试者工作特征曲线(ROC)以及瓦尔德检验进行预测变量的重要程度评估。生存分析采用 Kaplan-Meier 曲线与 Log-rank 检验。**结果** TMOD3 定位于细胞中的肌动蛋白丝,且与癌旁组织相比,肝细胞癌组织中 TMOD3 表达水平更高($P < 0.05$),TMOD3 高表达与肝细胞癌患者的淋巴结转移及肿瘤远处转移密切相关($P < 0.05$)。富集分析结果显示 TMOD3 及其相互作用蛋白主要富集于肿瘤的侵袭转移的信号通路。Logistic 回归分析显示 TMOD3 是肝细胞癌复发转移的独立危险因素($OR:4.359, 95\% CI:1.235 \sim 15.384, P=0.022$)。生存分析显示高表达的 TMOD3 与肝细胞癌患者的不良总生存期(OS)、无病生存期(DFS)、无复发生存期(RFS)相关($P < 0.05$)。ROC 分析和瓦尔德检验均判断 TMOD3 具有良好的预测肝细胞癌发生远处转移的预测效能。**结论** TMOD3 与肝细胞癌的侵袭转移密切相关,是肝细胞癌发生远处转移的独立危险因素。TMOD3 对于预测肝细胞癌发生远处转移具有较好的效能,有潜力成为预测肝细胞癌发生远处转移的生物标志物。

关键词 原肌球蛋白调节蛋白3;肝细胞癌;转移;组织芯片;生物标志物;生物信息学

中图分类号 R 657.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)12-2094-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.005

肝癌是最常见的癌症类型之一。在肝癌中,肝

细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占75%~85%,肝内胆管癌占10%~15%,还有较少见的混合型肝细胞癌-胆管癌。HCC具有高度恶性的生物学特征,其复发和转移是导致高病死率的主要原因之一^[1]。因此,识别新的分子靶点可能会为HCC患者提供新的预后指标和潜在的治疗靶点,以降低

2024-10-20 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82300716)

作者简介:罗龙彪,男,主治医师;

孙炜玮,男,副主任医师,通信作者,E-mail:3295364@qq.com

weighted imaging, the T/M at 2 h in the experimental group was $135.20\% \pm 0.06\%$ of 0 h, the T/M at 2 h in the Gd-DTPA group was $115.70\% \pm 0.05\%$ of 0 h and the T/M at 2 h in the saline group was $113.5\% \pm 0.02\%$ of 0 h. Compared with Gd-DTPA control group, the experimental group had significantly enhanced T1-weighted MR contrast, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). In tumor T2-weighted imaging, the T/M quantitative analysis showed that the tumor T2-weighted contrast enhancement of the three groups was relatively small, and the T/M of the experimental group and the control group at 0.5 h was $94.60 \pm 0.03\%$ and $106.30 \pm 0.04\%$ of the 0 h, respectively. In the normal saline group, T/M at 0.5 h was $102.20 \pm 0.002\%$ of that at 0 h, and no significant enhancement of the T2-weighted MR contrast of tumor was observed. **Conclusion** Successfully construct a FAP-responsive molecular probe which can self-assemble to form a Gd-nanoparticle structure in tumor cells under the cleavage of FAP, effectively improving the enrichment of Gd in the target region, and enhancing T1-weighted magnetic resonance imaging of pancreatic cancer, which has potential clinical application value.

Key words contrast agent; click reaction; self-assembly; fibroblast activation protein; pancreatic cancer; T1 weighted magnetic resonance imaging

Fund program Health Research Project of Anhui Province (No. AHWJ2023A20105)

Corresponding author Jiang Jinhui, E-mail: jiangjinhui@ahmu.edu.cn