基于牛血清蛋白修饰的超顺磁性氧化铁双模态结直肠癌分子探针的制备及验证

邢晓宏，潘海滨
上海市奉贤区中心医院放射科，上海 201499

摘要：目的 制备一种细胞靶向超顺磁性氧化铁荧光-磁共振双信号分子探针Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs，评估其基本性质并探究细胞荧光及磁共振成像能力。**方法** 采用高温热注射法合成油溶性SPIONs；采用超声乳化法合成水溶性BSA·SPIONs探针前体；与抗肿瘤多克隆抗体（Glut1）和红外荧光素Cy5.5偶联后，制备出Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs靶向双信号分子探针。对Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs探针的形貌、粒径、光学性质、弛豫率等关键性质进行基本表征，并创新性地使用Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs分子探针在荧光共聚焦显微镜下观察Glut1在组织活检中肿瘤部位的表达和分布。**结果** 此分子探针直径为20~40 nm，在酸碱性条件下均具有胶体稳定性和生物相容性。它表现出强荧光性和高弛豫性（r2：每mmol/L Fe^{3+}为129.92 s^{-1}）。随着探针浓度的增加磁共振成像T2信号逐渐增强。通过细胞毒性和组织学毒性检测，该分子探针基本无毒性。**结论** Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs分子探针具有优良的荧光-磁共振双模态成像能力，对结直肠癌细胞HCT116具有特异靶向性，是用于结直肠癌细胞分子诊断和体外活检分析的有前途分子探针。

关键词：超顺磁性氧化铁；结直肠癌；葡萄糖转运蛋白；分子探针

Preparation and validation of bimodal molecular probe for colorectal cancer based on bovine serum albumin-modified superparamagnetic iron oxide

XING Xiaohong, PAN Haibin
Shanghai Fengxian District Central Hospital, Shanghai 201499, China

Abstract: Objective To developed a cell-targeted superparamagnetic iron oxide fluorescence-magnetic resonance dual-signal molecular probe, Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs was prepared. To evaluate its basic properties and explore cell fluorescence and magnetic resonance imaging capabilities. **Methods** Oil-soluble SPIONs were synthesized by high-temperature hot injection; The water-soluble BSA·SPIONs probe precursor was synthesized by phacoemulsification; After coupling with the anti-tumor polyclonal antibody (Glut1) and the infrared fluorescein Cy5.5, the Cy5.5-antiGlut1-BSA SPIONs targeted dual-signal molecular probe was prepared. The key properties such as morphology, particle size, optical properties and relaxation rate of the Cy5.5-antiGlut1-BSA · SPIONs probe were basically characterized. Furthermore, the Cy5.5-antiGlut1-BSA · SPIONs molecular probe was innovatively used to observe the expression and distribution of Glut1 at the tumor site in tissue biopsy under a fluorescence confocal microscope. **Results** This diameter of this molecular probe was 20-40 nm and it exhibited colloidal stability and biocompatibility under both acidic and alkaline conditions. It exhibited strong fluorescence and high relaxation (r2:129.92 s^{-1} per mmol/L Fe^{3+}). The T2 signal of magnetic resonance imaging gradually increased with the increase of probe concentration. Through cytotoxicity and histological toxicity tests, this molecular probe showed non-toxic. **Conclusion** The Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs molecular probe possessed excellent fluorescence-magnetic resonance dual-mode imaging capabilities and specific targeting ability for colorectal cancer cells HCT116. It was a promising molecular probe for *in vivo* MRI-fluorescent diagnosis and *ex vivo* biopsy analysis of colorectal cancer cells.

Keywords: superparamagnetic iron oxide; colorectal cancer; glucose transporter; nanoprobe

结直肠癌（CRC）是常见的全球癌症相关死亡的肿瘤[1]。CRC病理分期决定了患者的预后，I期患者的5年生存率超过90%，而IV期的5年生存率小于10%[2]。通过改进治疗方法和早期诊断可以提高生存率。MRI具有高分辨、无辐射、多功能成像等优势，已成为结直肠癌诊断、分期、和治疗规划的重要影像学评估手段，但同时它受到低敏感度和低特异度的限制，对于微小病灶，如早期诊断结直肠癌的效果也存在局限性[3-5]。分子影像纳米技术为改善目前早期诊断结直肠肿瘤提供新思路。由于纳米颗粒能够克服肿瘤间质屏障，通过与靶向物质如抗体、多肽和小分子结合[6]，从而靶向肿瘤组织，在结直肠癌早期诊断中有很好的应用潜力[7, 8]。超顺磁性氧化铁（SPIONs）是经过批准用于临床MRI检查的纳米颗粒阴性对比剂，它具有超顺磁响应性、可控表面功能化及优异生物相容性[9]，已广泛应用于磁共振成像、肿瘤热疗、靶向给药系统等领域[10, 11]，但容易被网状内皮系统吞噬细胞摄取[12, 13]。有团队率先开展SPIONs的肿瘤诊断研究[14, 15]，既往有研究对Fe_3O_4纳米颗粒与不同抗体偶联得到MR靶向分子影像探针，并在活体动物模型上

收稿日期：2025-12-05
基金项目：国家自然科学基金（81971714）；奉贤区科委社会类科技发展基金项目（奉科20221301）
Supported by National Natural Science Foundation of China (81971714).
作者简介：邢晓宏，硕士，主治医师，E-mail: xxh_fzx@163.com
通信作者：潘海滨，主任医师，E-mail: panine@sina.com

开展了磁共振成像[16]。此类分子探针存在成像模式单一、假阳性率高或制备方式过于复杂等缺点。研究表明牛血清蛋白(BSA)具有无毒、亲水、生物相容性好、并且降低特异性吸附等优点,已被广泛应用于纳米颗粒的表面修饰[17]。BSA表面修饰不仅赋予纳米颗粒亲水性和生物相容性,还为其提供与目标配体结合的活性化学基团,对于分子成像方面,以BSA为基础的纳米颗粒受到越来越多的关注[18]。本课题组前期在通过BSA对疏水性纳米颗粒进行表面工程开展了前瞻性工作[19]。油溶性的纳米粒子在应用于生物医学之前需要将其转移到水相中。然而传统的方法往往效率低下或者过程繁琐复杂。本研究使用牛血清蛋白BSA和超声波乳化技术,以一种更简单高效而且绿色环保的方式合成水溶性纳米探针。BSA扮演多个角色,即疏水性纳米颗粒表面工程的配体和其通过结合抗体或配体偶联,与肿瘤受体相互作用,提高成像特异性,减少非特异性吸附,为后续纳米医学发展提供新思路。基于此,本研究拟构建一种良好的水分散性、高弛豫性和强抗非特异性结合能力的Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs靶向荧光-磁共振双模态分子探针,有望成为结直肠癌早期诊断的有效手段。本研究创新性地在组织活检中使用Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs分子探针研究Glut1在肿瘤部位的表达和分布,获得影像—活检双功能探针,是一种"影像再确认"有效手段,对可促进纳米材料在生物标记和检测中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

$Fe(acac)_3$、1,2-十六烷二醇、油酸、油胺和苯醚、EDC/NHS(碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺)、荧光素Cy5.5(Sigma-Aldrich)。乙醇、氯仿、氩气(百灵威)。Glut1抗体(Millipore Corporation)。牛血清白蛋白(BSA,北京鼎国生物技术公司)。本实验使用去离子水(25 ℃时电阻率18.2 MΩ·cm)。人结直肠癌细胞HCT116及人正常成纤维细胞3T3购自中国科学院细胞库。

1.2 方法

1.2.1 *油溶性Fe_3O_4纳米粒子的制备* 油溶性Fe_3O_4纳米粒子是根据先前研究方法高温热注射法合成[20-22]。将$Fe(acac)_3$(2 mmol)、1,2-十六烷二醇(10 mmol)、油酸(6 mmol)、油胺(6 mmol)和苯醚(20 mL)混合,在氩气流下磁力搅拌。将混合物加热至200 ℃,保持30 min,然后在氩气保护下加热至回流(265 ℃),再保持30 min。移除热源,将黑褐色混合物冷却至室温。向混合物中加入乙醇(40 mL),黑色物质沉淀,通过离心分离。将黑色产物在油酸(约0.05 mL)和油胺(约0.05 mL)存在下溶解于氯仿中。以6000 r/min离心10 min,去除未分散的残留物。然后用乙醇沉淀产物,以6000 r/min离心10 min去除溶剂,并重新分散于氯仿中,保存备用。

1.2.2 *水溶性超顺磁性纳米颗粒BSA·SPIONs的制备* 水溶性纳米颗粒BSA·SPIONs是根据前期研究基础合成[19]:将8 mg/mL的SPION/氯仿溶液(3.5 mL)转移至干净的注射器中备用。称取0.52 g BSA完全溶解于50 mL烧杯中的15 mL DDW。将烧杯置于带有换能器的超声波装置下,换能器顶部置于BSA/水溶液液面下约0.5 cm处。注射器长针顶部紧挨换能器顶部。以300~500 W的功率在超声波装置下超声10 s。在超声过程中缓慢将SPION/氯仿溶液注入BSA/DDW中。注入后,烧杯中的溶液变得类似乳液。注入后,迅速搅拌溶液在减压条件下用旋转蒸发仪去除残留的氯仿。最后,将剩余溶液超速离心(65 000 *g*,15 min×2)用DDW洗涤数次后重新分散于硼酸盐缓冲液(50 mmol/L,pH=8.2)中,即水溶性BSA·SPIONs备用。

1.2.3 *双模态分子探针Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs的制备* 标记荧光素Cy5.5的Glut1抗体(Cy5.5-antiGlut1):取一定量的Cy5.5-antiGlut1,加入羧基和羟基反应的偶联剂EDC/NHS(碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺),置于恒温振荡器内,25 ℃振荡活化15~20 min。将活化后的Cy5.5-antiGlut1与BSA·SPIONs按不同摩尔量比例混合(1∶1、1∶10、1∶30、1∶50、1∶100),置于恒温振荡器内,25 ℃振荡2 h。将混合物用蒸馏水磁分离法洗涤3~4次,除去游离的未连接的抗体,最后重悬于MES缓冲液中(pH值约5.6),4 ℃保存备用,并用标记有二抗的试纸条测试抗体是否标记成功。

1.2.4 *体外弛豫率和MRI* 使用1.41 T minispec mq 60 NMR分析仪(Bruker)测定BSA·SPIONs的纵向和横向弛豫时间。通过拟合1/T1和1/T2弛豫时间(s^{-1})与Fe^{3+}浓度(mmol/L)的曲线,计算r1和r2的弛豫率值。使用MRI系统(MesoMR23-060H-I,上海纽马格公司)获得BSA·SPIONs样品的体外MR图像。测量条件如下:T1加权序列;多层自旋回波;TR/TE=1150/11.5 ms;基质采集256×192;NEX=8;FOV=80 mm×80 mm;FOV相位40%,厚度5.0 mm;0.5 T,32 ℃。

1.2.5 *细胞毒性研究* 使用MTT比色法研究BSA·SPIONs对3T3细胞的细胞毒性。以5×10^3/孔的细胞密度接种于96孔平底板中并过夜粘附。用PBS洗涤细胞2次,并与不同Fe^{3+}浓度的BSA·SPIONs孵育72 h;用PBS洗涤细胞2次,并添加新鲜培养基。加入20 μL/孔,MTT溶液(5 mg/mL在PBS中),并在37 ℃下再孵育4 h。去除培养基,并将细胞溶解在100 μL DMSO中。用酶标仪测量$A_{570\,nm}$。数据以可存活细胞的百分比与对照组的存活率进行比较(n=5)。

1.2.6 靶向细胞MRI和荧光共聚焦成像 采用激光共聚焦扫描显微镜成像中，将探针分为靶向Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs组、非靶向的Cy5.5-BSA·SPIONs组以及（抗Glut1抗体+Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs）组3组，分别与细胞共同孵育5 min，置于激光共聚焦显微镜下观察。

体外细胞MRI实验中，将HCT116细胞组分为2组。实验组：将HCT116细胞与不同浓度（0~4 mmol/L Fe^{3+}）靶向Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs纳米探针在37 ℃下同时孵育2 h。对照组：将HCT116细胞与非靶向Cy5.5-BSA·SPIONs在37 ℃下孵育2 h。然后用100 μL PBS洗涤并重新分散细胞，插入直径60 mm的MR线圈中。体外MR成像在NIUMAG MRI系统（NMI20）上进行。测量条件：T2加权序列MRI成像参数：场强3.0 T，成像序列为多平面自旋回波（MSE），层厚2 mm，TE 80 ms，TR 4800 ms，矩阵128×128，激励次数3，FOV 60 mm×60 mm。

1.2.7 肿瘤模型 Balb/c小鼠、Balb/c裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司。本实验采用HCT116结直肠癌荷瘤裸鼠模型，动物实验按照同济大学实验动物中心规定的标准进行。取约20 g的Balb/c裸鼠，在无菌条件下，将约1×10^9 HCT116细胞接种于裸鼠的背部，待肿瘤体积至50~60 mm^3的时候备用。本研究通过同济大学动物保护伦理委员会审批（审批号：TJBH24425101）。

1.2.8 肿瘤组织活检和免疫组化分析 在裸鼠尾静脉注射Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs纳米探针后对裸鼠皮下肿瘤组织上表达Glut1进行离体活检并用于免疫组化分析。实验组为靶向Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs探针与结直肠癌组织标本染色，对照组为非靶Cy5.5-BSA·SPIONs探针与结直肠癌组织标本免疫染色，于激光共聚焦显微镜下观察荧光成像。

1.2.9 体内毒性研究 小鼠注射BSA·SPIONs纳米探针后15 d，取下心肝脾肺肾器官，固定并包埋在石蜡中。将固定的器官切片，苏木精和伊红（HE）染色，并进行光学显微镜研究。1只未注射的小鼠作为空白对照。

1.2.10 表征 使用DX 2700透射电子显微镜（TEM）研究疏水性SPIONs和亲水性BSA·SPIONs的形态和大小。采用动态光散射（DLS, NanoZS90, Malvern）测量了BSA·SPIONs在水溶液中的水动力直径（HDs），在去离子水中记录了亲水Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs的吸光度和发射光谱，并用Cary 50光谱仪和LS-55分光光度计分别记录630 nm激发下的吸光度和发射光谱。

1.2.11 统计学分析 通过Origin2020软件进行绘图和统计分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差表示，两组间比较采用*t*检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BSA·SPIONs纳米颗粒的合成与表征

本研究成功合成纳米分子探针Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs，用于后续靶向分子成像和组织活检。实验设计示意图（图1）。X射线衍射测定XRD谱图结果分析通过高温热解法制得的产物为Fe_3O_4，从谱图来看，衍射峰的位置、强度结果与Fe_3O_4标准数据基本吻合（图2A）。磁滞曲线结果显示合成的Fe_3O_4具有超顺磁性行为（图2B）。疏水性SPIONs溶于氯仿在下层，亲水性BSA·SPIONs不溶于氯仿在上层（图2C）。透射电镜显示SPIONs呈球形，大小分布均一。而BSA·SPIONs未见形貌改变，大小均匀，呈球形，无明显聚集（图2D）。动态光散射结果显示BSA·SPIONs的平均粒径为20~40 nm（图2E）。胶体稳定性实验结果显示BSA·SPIONs在7 d内在不同的pH和NaCl浓度中稳定，没有沉淀迹象（图3）。

2.2 BSA·SPIONs纳米颗粒体外MRI成像性能

BSA·SPIONs水溶液具有较高的r2值和r2/r1比率，r2为每mmol/L Fe^{3+}为129.92/s，r2/r1为46.89（图4A）。BSA·SPIONs水溶液在T2-加权自旋回波序列成像中，其Fe^{3+}浓度范围为0.078~0.314 mmol/L，随着Fe^{3+}浓度的升高，BSA·SPIONs水溶液T2信号下降，图像变黑（图4B）。

2.3 Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs的合成及表征

纯化的Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs在630 nm激发下，其在680 nm处发射尖锐且高度对称的荧光。在紫外灯照射下，其荧光稳定性在7 d的DMEM储存中保持良好（图5）。

2.4 体外细胞荧光和MR靶向成像

激光共聚焦显微镜显示与Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs纳米探针孵育的HCT116细胞膜表面显示到强烈的红色荧光，与Cy5.5-BSA·SPIONs孵育的HCT116细胞膜表面显示出弱或无荧光，与游离抗Glut1抗体+Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs孵育的HCT116细胞膜表面同样显示出弱或无荧光（图6A）。对细胞进一步MR扫描，与相同浓度的非靶向Cy5.5-BSA·SPIONs相比，靶向的Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs孵育的HCT116细胞表现出显著的T2信号降低（图6B）。

2.5 免疫组化结果

在小鼠尾静脉注射Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs纳米探针后对裸鼠皮下结直肠肿瘤组织进行离体活检，荧光免疫分析结果显示了强烈的红色荧光分布在靶向Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs探针的结直肠癌细胞膜上，但非靶向Cy5.5-BSA·SPIONs探针中显示结直肠癌细胞膜没有荧光信号（图7）。

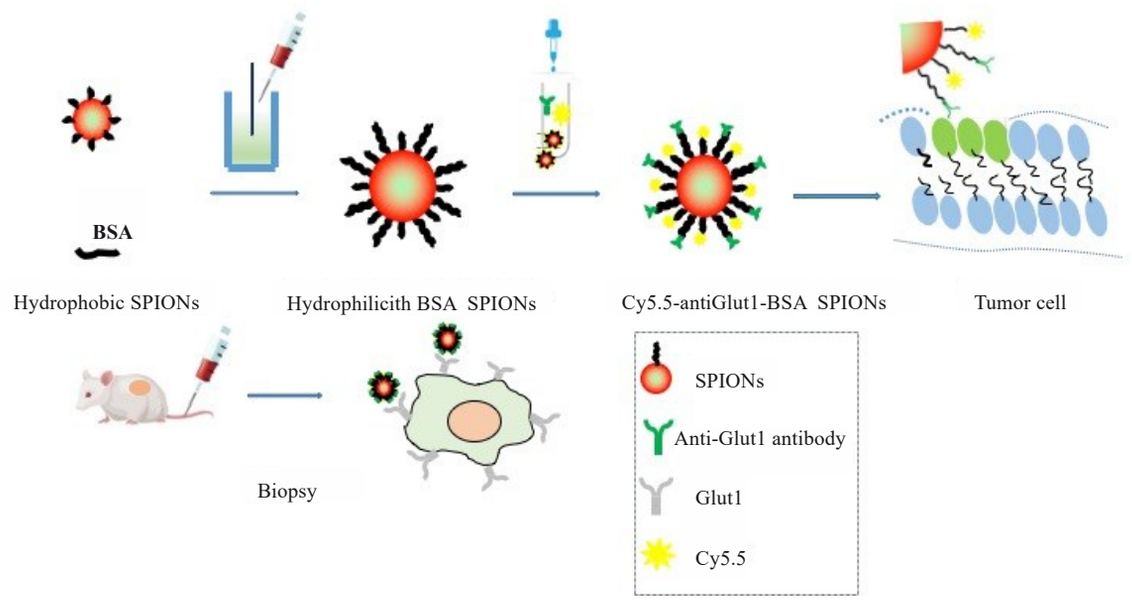

图1 Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs合成示意图和其应用于细胞肿瘤靶向分子成像和肿瘤组织活检的示意图

Fig.1 Schematic diagram of the synthesis of Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs and its application in targeted molecular imaging of cell tumors and tumor tissue biopsy.

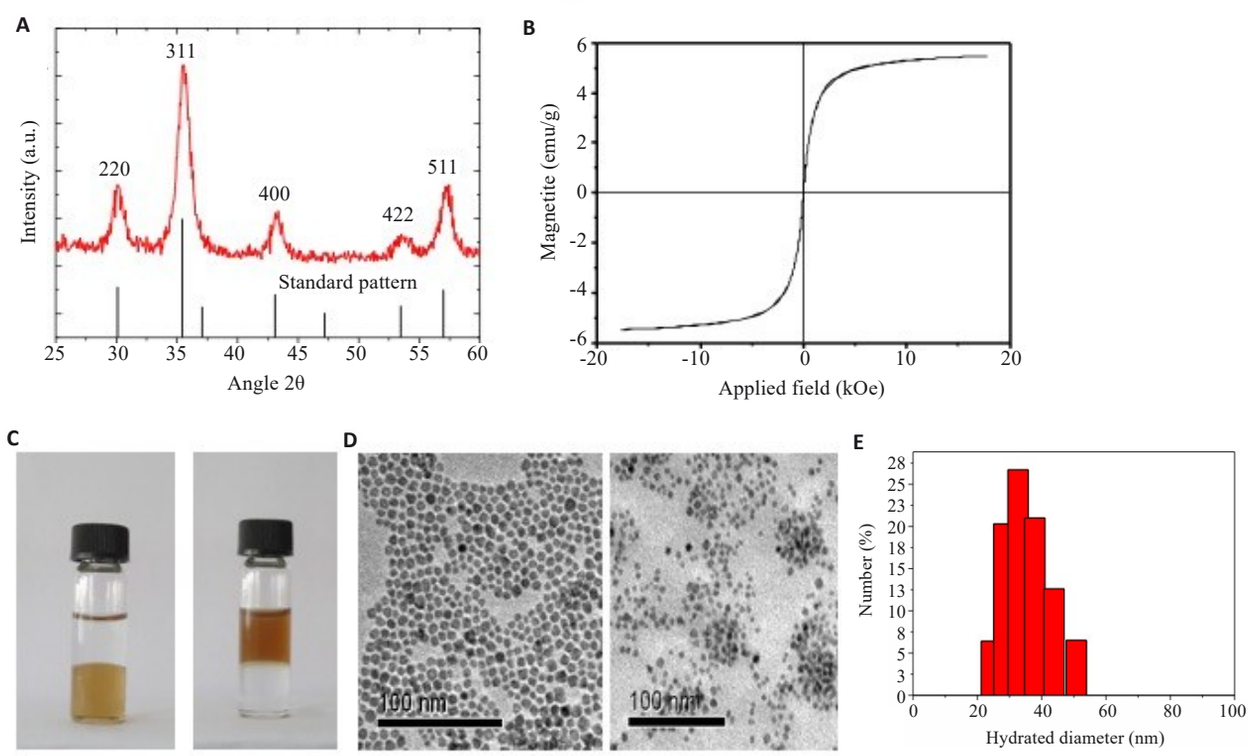

图2 BSA·SPIONs纳米颗粒的基本表征

Fig.2 Basic characterization of BSA·SPIONs nanoparticles. **A:** X-ray diffraction pattern of the SPIONs; **B:** Magnetic hysteresis curve of the SPIONs; **C:** Demonstration of successful phase transfer of the BSA·SPIONs. Upper layer: Water; Lower layer: Chloroform. hydrophobic SPIONs dissolve in chloroform (Lower layer). Hydrophilic BSA·SPIONs dissolve in water (Upper layer); **D:** TEM image of hydrophobic SPIONs and TEM image of hydrophilic BSA·SPIONs (scale bars=100 nm); **E:** Dynamic light scattering data of the BSA·SPIONs in borate buffer.

2.6 细胞毒性实验及组织学毒性分析

细胞毒性实验结果显示，随着Fe^{3+}浓度升高，细胞活性逐渐减低，但在3.2 μmol/L的Fe^{3+}浓度范围内，24 h内细胞活性仍在80%以上，而随着时间延长至72 h，但细胞活性并未降低（图8A）。HE染色和组织学分析结果显示，将BSA·SPIONs注射入小鼠体内15 d后，实验

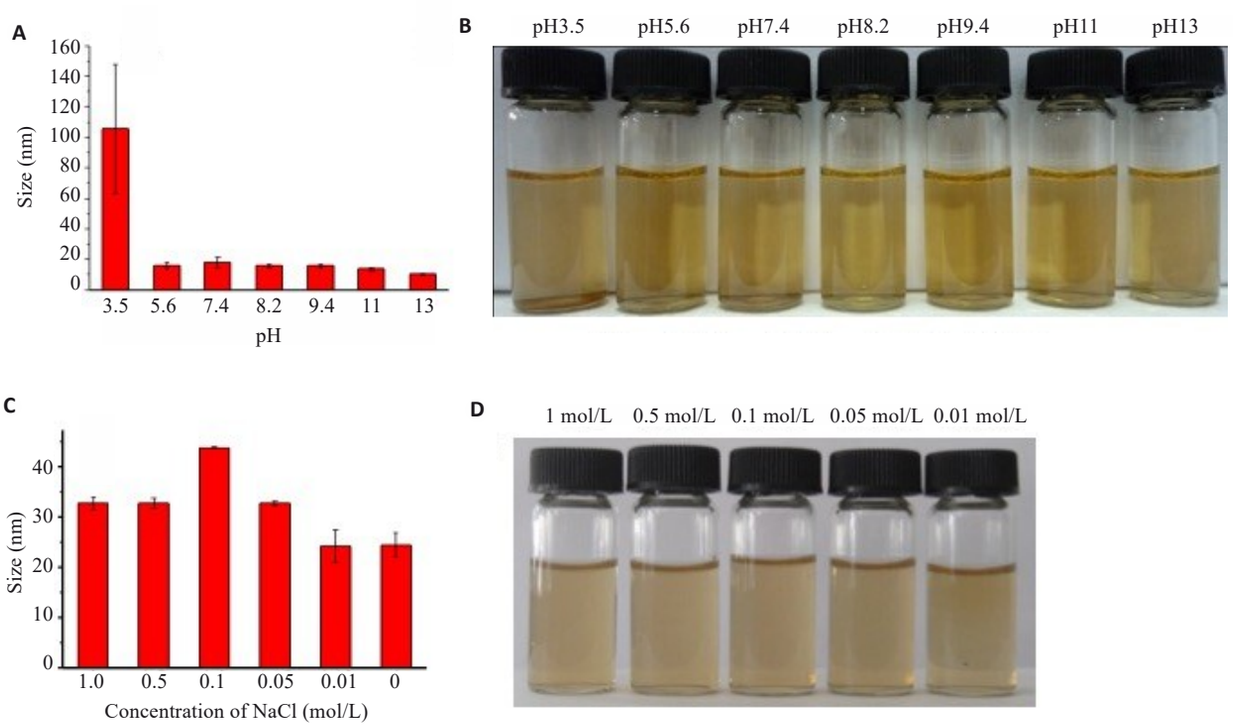

图3 BSA·SPIONs纳米颗粒在不同pH值和不同NaCl浓度的溶液中的数字图像

Fig. 3 Digital images of BSA · SPIONs nanoparticles in corresponding solutions with different pH values and NaCl concentrations. **A-B:** (BSA·SPIONs) at various pH buffer solutions; **C-D:** in sodium chloride water solutions with different ionic strengths analyzed by dynamic light scattering after 7 d of storage at room temperature.

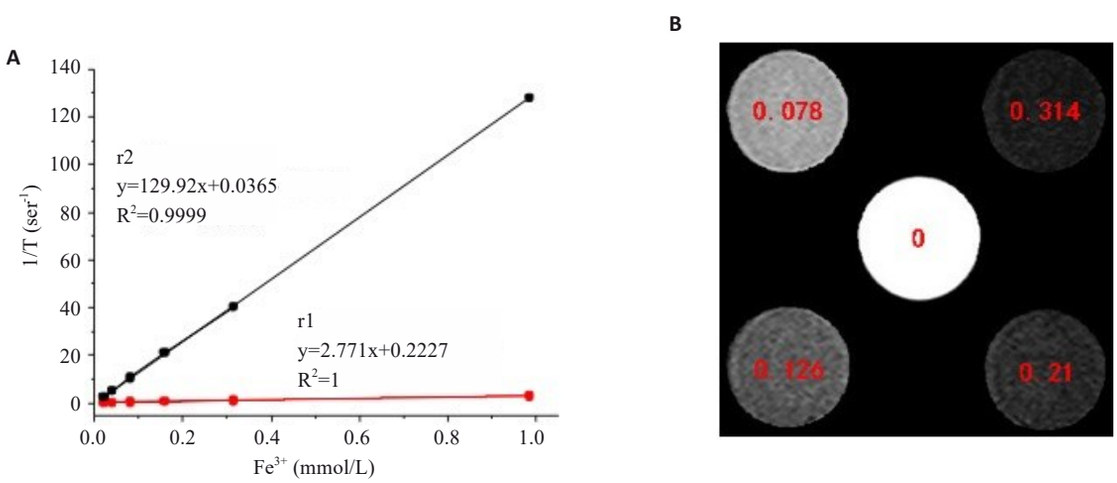

图4 BSA·SPIONs纳米颗粒的弛豫曲线和磁共振图像

Fig. 4 Relaxivity curves and magnetic resonance images of BSA · SPIONs. **A:** The r1 and r2 relaxivity curves obtained from water solutions of BSA·SPIONs nanoparticles; **B:** T2 MRI images of BSA·SPIONs nanoparticles at different concentrations (0.078-0.314 mmol/L Fe^{3+}), with deionized water (0 mmol/L) as a reference.

小鼠的所有受测器官均正常,保留了与对照组相同的结构,肝脏、肾脏和脾脏组仅观察到轻微的组织学变化,但未发现明显的毒性(图8B)。

3 讨论

近年来,肿瘤分子影像研究范围广泛,其中纳米颗粒分子探针在肿瘤检测及治疗中取得巨大进展。纳米材料通过提供传统影像增强的对比度、改进的靶向能力和多功能成像模式,建立了肿瘤分子成像的创新。尽管纳米颗粒具有多项优点,但它们存在缺乏选择性和特异性等不足[4, 23-25],这可以通过纳米颗粒表面修饰靶向小分子,多肽、抗体、叶酸等提高靶向精度来克服[6, 26]。有研究以钆离子、近红外低毒量子点等为原料,构建出MRI弛豫率/荧光效率高和生物相容性好的Gd^{3+}/量子点多模态纳米分子探针[23],但缺点是此类量子点探针存在毒性较大的局限性[10, 23]。有研究对Fe_3O_4纳米颗粒与抗

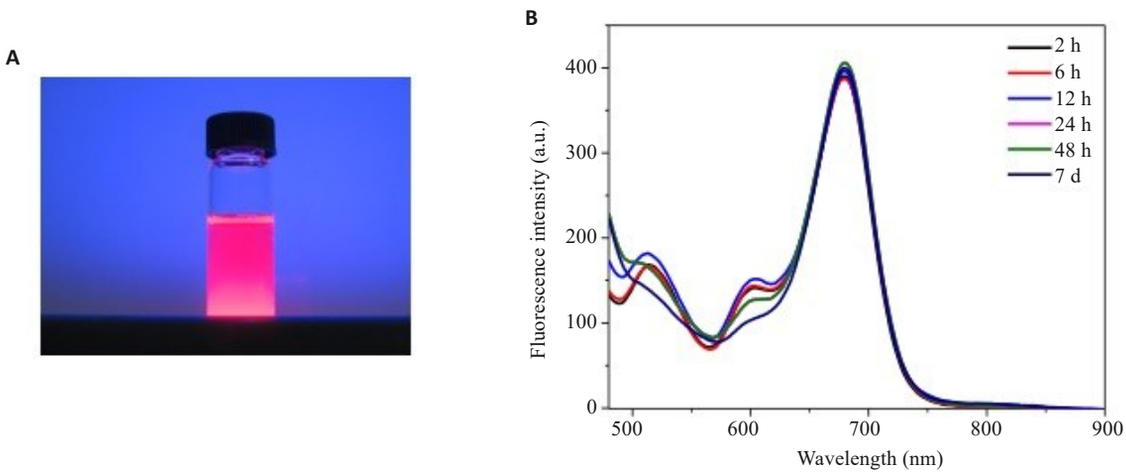

图5 Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs的光学性质

Fig.5 Optical properties of Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs. **A:** Fluorescence image of Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs in DMEM solution excited by ultraviolet lamp after 7 d of storage at room temperature; **B:** At different time points, the fluorescence quantification of Cy5.5-antiGlut1-BSA · SPIONs in DMEM solution was recorded at room temperature for different periods.

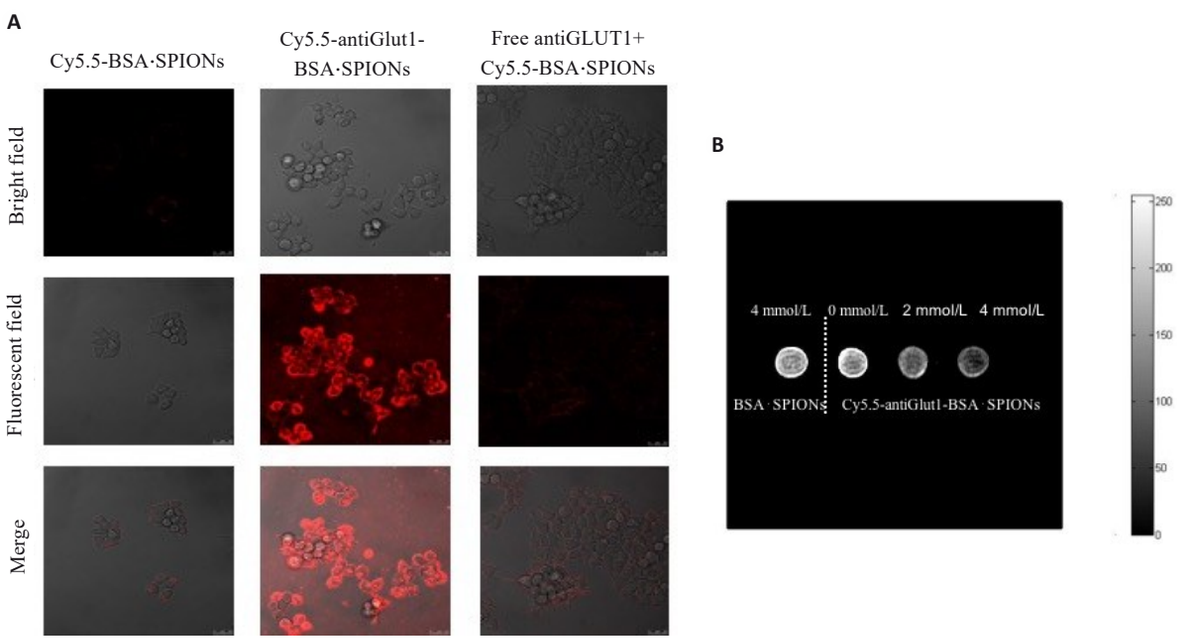

图6 激光共聚焦显微镜观察Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs纳米探针细胞靶向能力和细胞磁共振成像

Fig.6 The targeting ability of Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs nanoprobe were observed by laser confocal microscopy and the magnetic resonance imaging of targeted cells. **A:** The probes were divided into three groups, namely the Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs group and the non-Cy5.5-targeted group The BSA · SPIONs and free anti-GLUT1 antibody+Cy5.5-antiGlut1-BSA · SPIONs groups were respectively mixed with HCT116 cells for 5 min, and the fluorescence imaging was observed under a laser confocal microscope; **B:** HCT116 cells were incubated with the targeted probe (0-4 mm Fe^{3+}) for 2 h respectively and then scanned and imaged under 3.0T magnetic resonance. Another 0.5 mL of deionized water and 1×10^5 concentration of colorectal HCT116 cells were used as the control group (Cy5.5-BSA·SPIONs), and 1×10^5 colorectal HCT116 cells in the experimental group were labeled with targeted probes (0-4 mmol/L Fe^{3+}). Magnification: ×100.

CEA单抗偶联，得到MR分子影像探针，并在活体动物模型上开展了磁共振成像，研究结果显示分子探针能特异性识别皮下种植的结直肠癌肿瘤病灶，产生T2成像对比增强信号[16]。有研究借鉴这些优点，采用化学交联法构建EGFR抗体MR靶向超顺磁性分子探针，并证明该探针可增强体内原位移植胰腺癌模型的磁共振成像，肿瘤诊断的敏感性以及特异性增强[27]，虽然这些超顺磁性分子探针毒性较量子点大大减弱，但制备工艺仍然复杂，易被体内网状内皮系统吞噬，半衰期短等缺点[7, 8]。

相比既往研究，本研究通过多次尝试改性方案，多次试验后发现用BSA进行修饰SPIONs，运用超声乳化法成功制备出一种无毒、亲水、生物相容性好、并且降低特异性吸附等优点的靶向结直肠癌双模态分子探针的BSA·SPIONs纳米探针前体，该改性过程简单有效而且

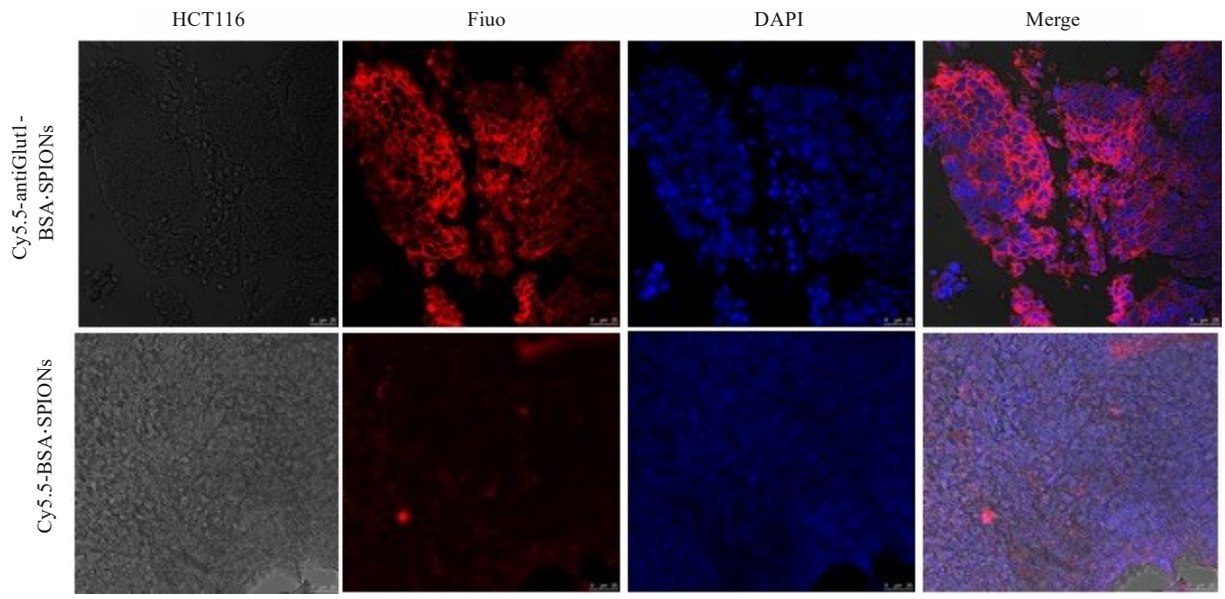

图7 通过免疫组化分析检测Glut1表达,于激光共聚焦显微镜下观察荧光成像

Fig.7 The expression of Glut1 was detected by immunohistochemical analysis, and fluorescence imaging was observed under a laser confocal microscope. Laser confocal microscope images of HCT116 cells incubated with Glut1-targeted Cy5.5-BSA·SPIONs-PcAb and non-targeted Cy5.5-BSA·SPIONs for 30 min. To further determine targeting specificity, cells were preincubated with free Glut1 antibodies before adding Glut1-targeted Cy5.5-BSA·SPIONs-PcAb nanoprobes. Magnification: ×100.

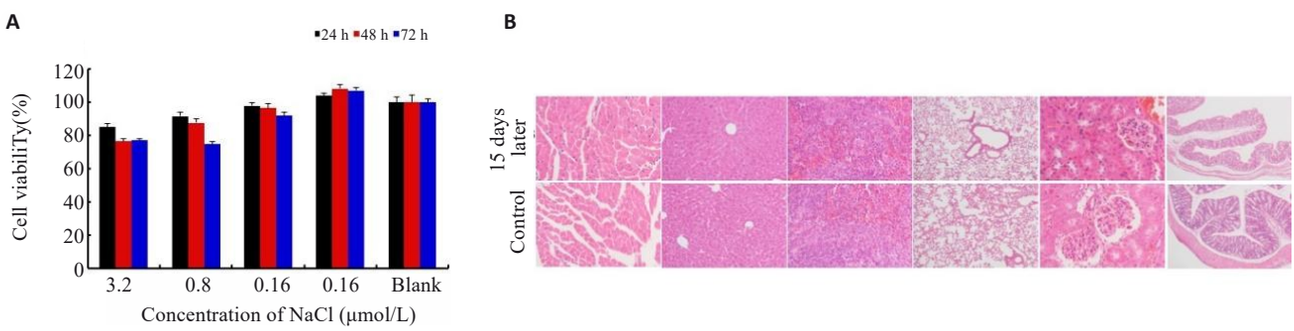

图8 BSA·SPIONs的细胞毒性和组织毒性分析

Fig. 8 Cytotoxicity and histological toxicity analysis of BSA · SPIONs. **A:** Growth inhibition rate of mouse fibroblasts (3T3) under different Fe^{3+} concentrations of BSA·SPIONs; **B:** HE staining images of major organs (heart, liver, spleen, lung, kidney and intestine) in normal mice and mice injected with BSA·SPIONs 15 days later, magnification: ×200.

绿色环保的方式,解决了以上纳米探针毒性较大及存在特异性吸附等诸多问题。这是因为BSA水溶性及生物相容性极佳,可以抑制疏水相互作用;其在水溶液中表面带负电荷,而大部分蛋白及生物膜表面也呈负电荷,可以通过静电排斥作用,减少非特异性吸附;同时由于BSA本身常用作封闭剂,可以通过平衡纳米颗粒表面的惰性和活性官能团的比例,减少活性官能团的数量以达到减少非特异性吸附的目的。本文利用BSA这些特性,用BSA作为纳米颗粒的配体,不但保证了纳米颗粒良好的水溶性,同时又减少了非特异性吸附,解决了纳米颗粒在生物应用过程中的一个难题。

本文通过动态光散射和透视电镜结果进行分析,检测合成过程中的粒径变化,证明了的BSA·SPIONs纳米探针前体合成。此分子探针直径为20~40 nm,在酸碱性条件下均具有胶体稳定性和生物相容性。此分子探针表现出强荧光性和高弛豫性(r2:每mmol/L Fe^{3+} 为129.92 s^{-1})。随着探针浓度的增加磁共振成像T2信号逐渐增强。在体外细胞磁共振成像和激光共聚焦荧光成像性能方面,Glut1-靶向Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs与HCT116细胞具有显著的特异性结合。这证明光学和MRI成像的结合对临床诊疗有利,因为MRI提供了体内的分析研究,而光学成像提高了成像敏感度。这些结果证明通过受体介导的反应,结合具有高特异性的多克隆抗Glut1抗体,Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs可有效靶向结直肠肿瘤,提供体内增强MRI,可以实现对结直肠癌的精准定位。但本研究中没有进一步进行活体动物成像,是本文的局限性所在。最后,本研究创新性地在组织活检中使用Cy5.5-antiGlut1-BSA

·SPIONs分子探针，尝试研究Glut1在肿瘤部位的表达和分布。若与术中冰冻或者常规病理检查结合，则可以从分子病理角度判断组织细胞是否高表达Glut1，与细胞水平特异性监测Glut1的表达结果高度一致，即所谓“成像活检-再确认策略”，可以提供准确的病理诊断。本研究中，Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs探针所用标记的特异性蛋白的活检组织标本提供了潜在的免疫方法、为病理诊断提供更精准的微观依据，显著提高检测的准确率，具有较高的临床意义。

综上，本研究制备的Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs纳米探针，可以在体外细胞成像、体外组织活检诊断CRC。基于本研究的实验结果，Cy5.5-antiGlut1-BSA·SPIONs纳米探针在CRC肿瘤靶向MRI和肿瘤组织活检分析中显示出较大的潜力。

参考文献：

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA A Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[2] O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American joint committee on cancer sixth edition staging[J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96(19): 1420-5.

[3] Xie J, Chen K, Lee HY, et al. Ultrasmall c(RGDyK) -coated Fe_3O_4 Nanoparticles and their specific targeting to integrin $\alpha_v\beta_3$-rich tumor cells[J]. J Am Chem Soc, 2008, 130(24): 7542-3.

[4] Lee HY, Li ZB, Chen K, et al. PET/MRI dual-modality tumor imaging using arginine-*Glycine*-aspartic (RGD) - conjugated radiolabeled iron oxide nanoparticles[J]. J Nucl Med, 2008, 49(8): 1371-9.

[5] Shi XY, Wang SH, Swanson SD, et al. Dendrimer-functionalized shell-crosslinked iron oxide nanoparticles for *in-vivo* magnetic resonance imaging of tumors[J]. Adv Mater, 2008, 20(9): 1671-8.

[6] Drevs J, Schneider V. The use of vascular biomarkers and imaging studies in the early clinical development of anti-tumour agents targeting angiogenesis[J]. J Intern Med, 2006, 260(6): 517-29.

[7] Airley R, Evans A, Mobasheri A, et al. Glucose transporter Glut-1 is detectable in peri-necrotic regions in many human tumor types but not normal tissues: Study using tissue microarrays[J]. Ann Anat Anat Anz, 2010, 192(3): 133-8.

[8] Sakashita M, Aoyama N, Minami R, et al. Glut1 expression in T1 and T2 stage colorectal carcinomas its relationship to clinicopathological features[J]. Eur J Cancer, 2001, 37(2): 204-9.

[9] Li H, Yan K, Shang YL, et al. Folate-bovine serum albumin functionalized polymeric micelles loaded with superparamagnetic iron oxide nanoparticles for tumor targeting and magnetic resonance imaging[J]. Acta Biomater, 2015, 15: 117-26.

[10] Kang HY, Xiao HL, Chen JH, et al. Comparison of the effect of vessel size imaging and cerebral blood volume derived from perfusion MR imaging on glioma grading[J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2016, 37(1): 51-7.

[11] 王高强, 卯明艳, 余开湖. 磁性四氧化三铁纳米粒的制备、表面改性及表征[J]. 湖北科技学院学报: 医学版, 2022, 36(6): 466-70.

[12] Wei H, Hu YN, Wang JG, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: cytotoxicity, metabolism, and cellular behavior in biomedicine applications[J]. Int J Nanomed, 2021, 16: 6097-113.

[13] Shilo M, Sharon A, Baranes K, et al. The effect of nanoparticle size on the probability to cross the blood-brain barrier: an *in-vitro* endothelial cell model[J]. J Nanobiotechnol, 2015, 13(1): 19.

[14] Qiao R, Jia Q, Zeng J, Gao M. Magnetic iron oxide nanoparticles and their applications in magnetic resonance imaging[J]. Acta Biophysica Sinica, 2011, 27(4): 272-88.

[15] Qiao RR, Zeng JF, Jia QJ, et al. Magnetic iron oxide nanoparticle: an important cornerstone of MR molecular imaging of tumors[J]. Acta Phys Chim Sin, 2012, 28(5): 993-1011.

[16] Hu FQ, Wei L, Zhou Z, et al. Preparation of biocompatible magnetite nanocrystals for *in vivo* magnetic resonance detection of cancer[J]. Adv Mater, 2006, 18(19): 2553-6.

[17] Wang J, Zhang BB. Bovine serum albumin as a versatile platform for cancer imaging and therapy[J]. Curr Med Chem, 2018, 25(25): 2938-53.

[18] Meng H, Chen JY, Mi L, et al. Conjugates of folic acids with BSA-coated quantum dots for cancer cell targeting and imaging by single-photon and two-photon excitation[J]. J Biol Inorg Chem, 2011, 16 (1): 117-23.

[19] Zhang BB, Li Q, Yin PH, et al. Ultrasound-triggered BSA/SPION hybrid nanoclusters for liver-specific magnetic resonance imaging [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2012, 4(12): 6479-86.

[20] Zlateva G, Zhelev Z, Bakalova R, et al. Precise size control and synchronized synthesis of six colors of CdSe quantum dots in a slow-increasing temperature gradient[J]. Inorg Chem, 2007, 46(16): 6212-4.

[21] Peng ZA, Peng XG. Formation of high-quality CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals using CdO as precursor[J]. J Am Chem Soc, 2001, 123 (1): 183-4.

[22] Sun SH, Zeng H, Robinson DB, et al. Monodisperse MFe_2O_4 (M = Fe, co, Mn) nanoparticles[J]. J Am Chem Soc, 2004, 126(1): 273-9.

[23] Zhang J, Hao GY, Yao CF, et al. Albumin-mediated biomineralization of paramagnetic NIR Ag_2S QDs for tiny tumor bimodal targeted imaging *in vivo*[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 8(26): 16612-21.

[24] Laffon B, Fernández-Bertólez N, Costa C, et al. Cellular and molecular toxicity of iron oxide nanoparticles[M]//Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles. Cham: Springer International Publishing, 2018: 199-213.

[25] Gao XH, Cui YY, Levenson RM, et al. *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(8): 969-76.

[26] Xing Y, Chaudry Q, Shen C, et al. Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry[J]. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1152-65.

[27] Jaidev LR, Chellappan DR, Bhavsar DV, et al. Multi-functional nanoparticles as theranostic agents for the treatment & imaging of pancreatic cancer[J]. Acta Biomater, 2017, 49: 422-33.

（编辑：郎 朗）