论著

文章编号:1000-5404(2009)05-0398-04

磁标记反义探针对小鼠的急性毒理观察

文 明,欧阳羽,柏 玮,罗 戈,李少林 (重庆医科大学附属第一医院放射科,重庆 400016)

摘 要:目的 评价SPIO标记的c-erbB2反义寡脱氧核苷酸探针对小鼠的急性毒性,为进一步将该探针用于活体MR基因成像与靶向基因治疗奠定基础。**方法** 60只清洁级昆明种小鼠分为口服灌胃、静脉注射、腹腔注射3组,采用最大给药量法,口服灌胃:总剂量为2 104.8 mg/kg,给药容积40 ml/kg;静脉注射:总剂量为438.5 mg/kg,给药容积25 ml/kg;腹腔注射:总剂量为1 578.6 mg/kg,给药容积30 ml/kg;各组还另设20只小鼠按相应方式给予等量生理盐水作为对照。所有实验小鼠均在25 ℃室温下连续饲养14 d,观察并记录饲养期间小鼠的一般情况、主要脏器的病理学、血常规、凝血指标和血清主要生化指标改变。**结果** 在观察期间,各组小鼠均未出现死亡,仅个别出现食欲下降、饮水量增多、腹泻、嗜睡、活动增加等,但均在3 d内恢复正常。脏器系数无统计学差异,肝、脾、肾、心、肺、骨髓、生殖器等主要脏器颜色、形态未见明显异常改变,HE染色切片肝、脾、肾、心、肺、生殖器等细胞和Wright染色的骨髓细胞均无水肿、变性、坏死等改变,普鲁士蓝染色仅见肝、脾内分布少许蓝色铁颗粒。各组血常规、凝血指标及生化指标无统计学差异。**结论** SPIO标记的c-erbB2反义寡脱氧核苷酸探针对小鼠无急性毒性。

关键词:反义寡脱氧核苷酸;钠米粒子;超顺磁性氧化铁;毒理实验

中图法分类号:R-331; R81; R99 **文献标识码**:A

Acute toxicity in mice of antisense probe labeled with magnetism, c-erbB2 antisense probe labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles

WEN Ming, OUYANG Yu, BAI Wei, LUO Yi, LI Shao-lin (Department of Radiology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the acute toxicity in mice of an antisense oligodeoxynucleotide (ASODN) probes of oncogene c-erbB2 labeled by superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticle in order to make it be a target contrast agent for magnetic resonance (MR) imaging and targeting gene therapy. **Methods** Totally 60 health clean-grade Kunming mice were randomly and equally divided into oral administration, intravenous injection and intraperitoneal injection groups. All mice received the maximum dose although through different routes. The oral administration was given with a total dose of 2 104.8 mg/kg and a volume of 40 ml/kg, intravenous with a total dose of 438.5 mg/kg and a volume of 25 ml/kg, and intraperitoneal injection with a total dose of 1 578.6 mg/kg and a volume of 30 ml/kg respectively. Another 60 mice who received same dose of normal saline through same route served as the control group. All experimental mice were feed in 25 ℃ for 14 d. Their general condition, blood routine examination, coagulation indexes, main biochemical indexes and the pathological morphology of main viscera were tested and measured. **Results** During the observation period, there was no death in all mice, and only a few had appetite loss and increased water drinking, diarrhea, sleepiness, and more active, but all abnormalities disappeared in 3 d. There was no abnormality in gross observation and morphology of the liver, spleen, kidneys, heart, lungs, bone marrow and genitals. All cells of the liver, spleen, kidneys, heart, lungs, bone marrow and genitals had no edema, degeneration and

基金项目:国家自然科学基金(30070230);重庆市自然科学基金(CSTC2008BB5209);重庆市卫生局医学科研项目(062025);重庆医科大学优秀博士基金(2006-182)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070230), the Natural Science Foundation of Chongqing (2008BB5209), the Medical Scientific Research Project of Chongqing Health Bureau (062025) and the Excellent Doctor's Funds of Chongqing Medical University (2006-182)

作者简介:文 明,男,重庆市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肿瘤分子影像学方面的研究。电话:(023)89012558,E-mail:liuyucun65@163.com
通信作者:李少林,电话:(023)68485060;E-mail:shaolinli202@sina.com

收稿日期:2008-07-06;**修回日期**:2008-09-06

necrosis either in HE or in Wright staining. There was no significant difference in the blood routine examination, coagulation indexes and biochemical indexes in experimental groups and control group. **Conclusion** SPIO labeled c-erbB2 ASODN probe has no acute toxicity to mice, and belongs to nontoxic compound.

Key words: antisense oligodeoxynucleotide; nanoparticles; superparamagnetic iron oxide; toxicity test

在分子影像学研究中,制备特异性好、亲和力高的靶向探针是实现成像的关键因素[1,2]。探针制备后,除了检测其连接率、理化性质、稳定性等参数外,是否存在毒性也是必须评价的指标之一。本研究将超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide,SPIO)标记于 c-erbB2 癌基因反义寡脱氧核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide,ASODN),制成 ASODN 探针,通过不同的给药方式对小鼠进行急性毒理实验,观察小鼠主要脏器的病理学及血常规、凝血指标、血清主要生化指标改变,评价其急性毒性,为进一步用于活体成像与治疗靶向基因研究打下基础。

1　材料与方法

1.1　主要材料

1.1.1　实验材料　　SPIO 标记的 c-erbB2 癌基因 ASODN 探针采用化学交联法,粒径小, T_2 弛豫率高,具有超顺磁性[3-5]。

1.1.2　实验动物　　健康清洁级昆明种小鼠 120 只,1.5 ~ 2.0 月龄,体质量(15 ±2)g,雌雄各半,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2　实验方法

将实验小鼠分为口服灌胃、静脉注射、腹腔注射 3 组,每组 20 只。根据课题组的预实验数据,本实验采用最大给药量法进行,每只小鼠的给药剂量为:口服灌胃组 12 h 内分 3 次给药(8:00、13:00、18:00),总剂量为 2 104.8 mg/kg,以给药容积 40 ml/kg调整给药浓度,3 次共灌药 1 ml;静脉注射组总剂量为 438.5 mg/kg,以给药容积 25 ml/kg 调整给药浓度,从小鼠尾静脉一次性注射 0.4 ml;腹腔注射组 12 h 内注射 3 次(9:00、14:00、19:00),总剂量为 1 578.6 mg/kg,以给药容积 30 ml/kg 调整给药浓度,3 次共注射 0.8 ml。此外,各组还另设 20 只小鼠按同样方式、同样时间给予等量的生理盐水作为对照。所有实验小鼠均在 25 ℃室温下自由摄食、饮水,连续饲养 14 d 后处死。

1.3　观察指标

饲养期间观察并记录每只小鼠的食欲及活动状况,以及有无饮水增加、呕吐、腹泻、便血、嗜睡或死亡等出现。饲养期末从每只小鼠眼球采集血液,分别置于小试管,检测血常规(红细胞 RBC、白细胞 WBC、血小板 PLT、血红素 HGB、红细胞比积 HCT、平均红细胞体积 MCV、平均红细胞血红蛋白浓度 MCHC、红细胞分布宽度系数 RDW-CV)、凝血指标(凝血酶原时间 PT、活化部分凝血酶原时间 APTT、纤维蛋白原 FIB)和主要生化指标(谷草转胺酶 AST、谷丙转胺酶 ALT、肌酐 Cr、尿素氮 BUN、乳酸脱氢酶 LDH、尿酸 UA、总胆红素 TBIL、总胆汁酸 TBA 等)。随后计算每组的脏器系数(脏器湿质量/体质量),并在每组中随机抽取 4 只,对肝、脾、肾、心、肺、骨髓(取自股骨)、生殖器(睾丸或卵巢)进行病理学检查,大体标本重点观察脏器颜色、形态;组织切片染色均包括 HE 染色(其中骨髓为 Wright 染色)和普鲁士蓝染色 2 种方式,重点观察细胞有无水肿、变性、坏死以及铁颗粒沉着等情况。

1.4　统计学处理

脏器系数、血常规、凝血指标和血清生化指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异统计采用完全随机设计多元方差分析,数据处理用 SAS 8.0 软件。

2　结果

2.1　小鼠的一般急性毒理反应

在观察期间,实验组和对照组小鼠均未出现死亡。口服灌胃组当天有 16 只出现食欲下降和饮水量增多,3 只腹泻,2 只嗜睡,次日全部恢复正常;静脉注射组和腹腔注射组小鼠分别有 22 只、17 只出现活动增加、烦躁,3 d 内恢复正常;对照组小鼠无异常发现。

2.2　小鼠主要脏器的病理学改变

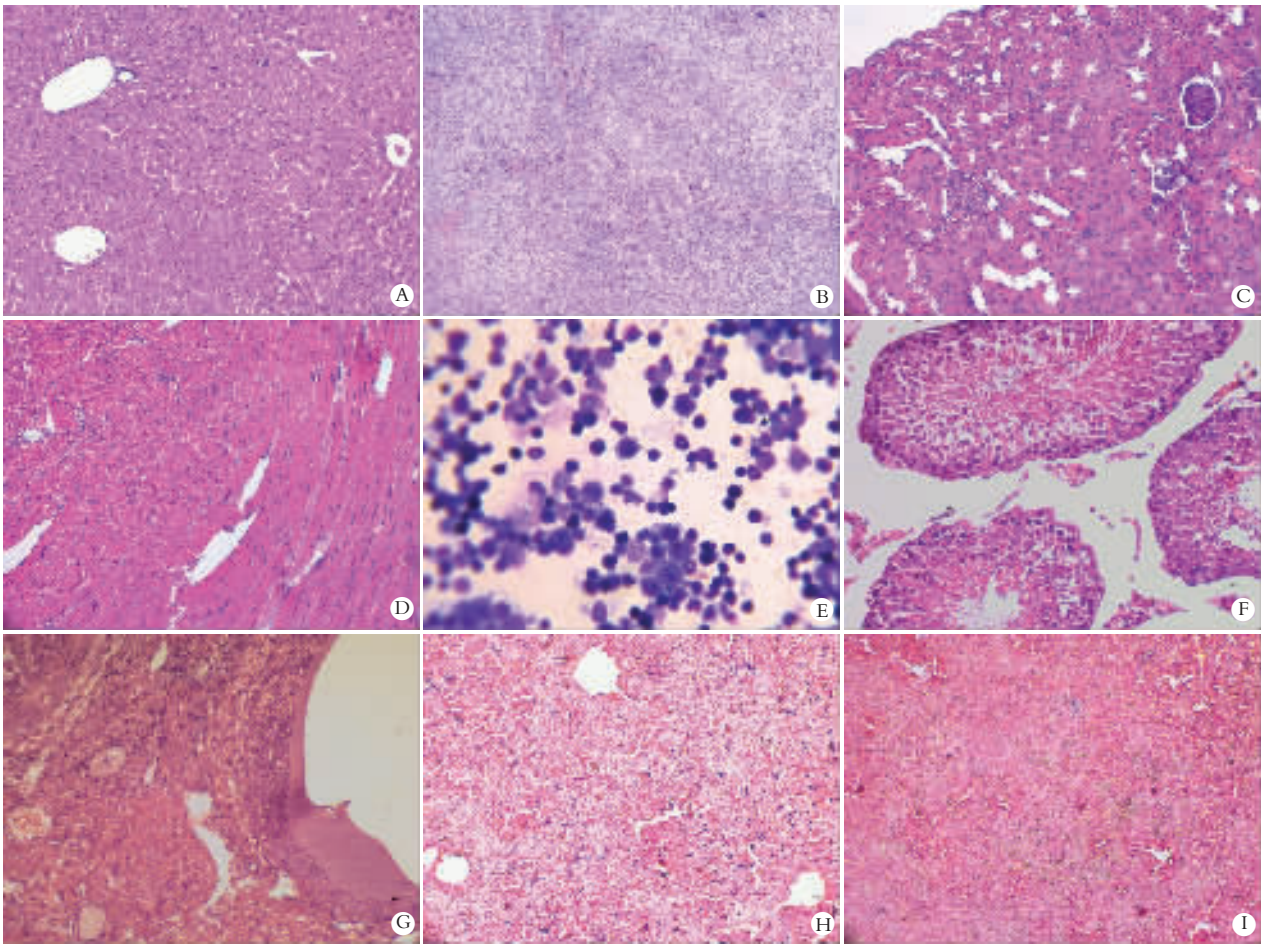
脏器系数:各组之间无统计学差别(表 1)。大体标本观察:4 组小鼠的肝、脾、肾、心、肺、骨髓、生殖器(睾丸或卵巢)组织颜色、形态未见明显异常改变。光学显微镜下观察:HE 染色切片 4 组小鼠肝、脾、肾、心、肺、生殖器(睾丸或卵巢)等细胞和 Wright 染色的骨髓细胞均无水肿、变性、坏死等改变(图 1A ~ G);普鲁士蓝染色切片见 3 组实验组小鼠肝、脾内均分布少许铁蓝色颗粒(图 1H、I),肾、心、肺、骨髓、睾丸或卵巢无异常发现。

2.3　小鼠血常规、凝血指标和血清主要生化指标

从表 2 ~4 可见,3 种给药方式对小鼠血常规、凝血指标和主要生化指标的影响不明显,组间无显著差异($P > 0.05$)。

表 1　3 种给药方式的反义探针对小鼠脏器系数影响($\bar{x} \pm s$)

组别	肝脏(n=20)	脾脏(n=20)	肾脏(n=20)	心脏(n=20)	肺组织(n=20)	睾丸(n=10)	卵巢(n=10)
口服对照组	32.1 ±1.33	4.64 ±0.71	7.52 ±0.90	3.36 ±0.70	3.04 ±0.07	0.95 ±0.07	0.22 ±0.17
口服灌胃组	31.5 ±1.83	4.59 ±0.83	8.01 ±1.09	3.62 ±1.03	3.13 ±0.11	0.83 ±0.10	0.18 ±0.05
静脉对照组	31.1 ±1.54	4.60 ±0.78	7.81 ±0.57	3.57 ±0.72	2.90 ±0.77	0.91 ±0.04	0.24 ±0.07
静脉注射组	30.4 ±3.02	4.71 ±0.07	7.66 ±0.63	3.45 ±0.59	3.05 ±0.31	0.88 ±0.09	0.24 ±0.03
腹腔对照组	31.9 ±1.21	4.65 ±0.29	7.77 ±0.94	3.51 ±1.01	2.81 ±0.79	0.84 ±0.13	0.21 ±0.05
腹腔注射组	30.9 ±2.89	4.65 ±0.34	7.67 ±0.53	3.86 ±0.27	3.22 ±0.29	0.93 ±0.02	0.19 ±0.03



A:肝脏(HE×400);B:脾脏(HE×200);C:肾脏(HE×400);D:心脏(HE×200);E:骨髓(Wright×1 000);F:睾丸(HE×400);G:卵巢(HE×400);H:肝脏(普鲁士蓝染色×400);I:脾脏(普鲁士蓝染色×200)

图1 小鼠主要脏器的病理学观察

表2 3种给药方式的反义探针对小鼠血常规影响($n=20,\bar{x}\pm s$)

组别	RBC(10^{12}/L)	WBC(10^9/L)	PLT(10^9/L)	HGB(g/L)	HCT(U/L)	MCV(fl)	MCHC(g/L)	RDWCV(%)
口服对照组	7.2±0.1	5.8±0.4	784±109	139±4.9	0.49±0.01	67.7±1.3	281±13	0.13±0.001
口服灌胃组	7.0±0.2	5.7±0.7	788±96	134±5.7	0.47±0.01	68.5±2.0	288±7	0.12±0.006
静脉对照组	6.9±0.4	5.7±0.1	779±112	136±7.1	0.42±0.02	69.0±1.9	285±12	0.12±0.002
静脉注射组	7.2±0.1	5.9±0.9	781±125	139±2.6	0.51±1.09	68.2±0. 6	288±14	0.11±0.013
腹腔对照组	6.8±0.6	5.7±0.7	796±56	137±8.2	0.44±1.27	68.8±1.2	293±5	0.12±0.003
腹腔注射组	6.8±0.1	5.6±0.2	785±103	137±5.3	0.43±1.18	67.7±1.4	289±11	0.11±0.001

表4 3种给药方式的反义探针对小鼠血清主要生化指标影响($n=20,\bar{x}\pm s$)

组别	AST(U/L)	ALT(U/L)	Cr(μmol/L)	BUN(mmol/L)	LDH(U/L)	UA(μmol/L)	TBIL(μmol/L)	TBA(μmol/L)
口服对照组	149.17±7.25	37.44±6.74	9.83±0.22	8.72±0.71	419.77±9.06	146.04±6.73	1.88±0.12	1.60±0.14
口服灌胃组	148.70±7.66	37.87±7.12	9.11±0.43	8.76±0.37	422.17±7.51	145.03±8.21	1.90±0.07	1.62±0.19
静脉对照组	141.59±7.58	38.49±4.29	9.19±0.09	8.66±0.61	427.20±9.57	144.82±5.71	1.87±0.41	1.60±0.24
静脉注射组	143.31±8.71	41.34±5.09	9.75±0.84	8.83±0.49	418.67±11.33	141.40±7.39	1.91±0.11	1.60±0.20
腹腔对照组	146.07±8.31	37.46±6.04	9.66±0.47	8.92±0.32	419.63±7.27	146.05±5.79	1.90±0.09	1.56±0.26
腹腔注射组	144.14±6.37	38.76±6.83	9.55±0.65	8.61±0.35	420.32±8.42	143.17±7.27	1.84±0.36	1.56±0.13

表3 3种给药方式的反义探针对小鼠凝血指标影响($n=20,\bar{x}\pm s$)

组别	PT(s)	APTT(s)	FIB(mg/dL)
口服对照组	9.24±0.27	22.1±1.4	167±39
口服灌胃组	8.89±0.29	21.7±1.1	165±21
静脉对照组	8.96±0.27	22.4±1.1	159±22
静脉注射组	9.17±0.24	23.0±0.9	161±15
腹腔对照组	9.08±0.19	21.5±1.7	166±26
腹腔注射组	9.18±0.26	21.6±0.2	160±33

3 讨论

本研究根据反义基因原理[6],选择 c-erbB2 癌基因作为靶基因[7],将 SPIO 标记于 ASODN 上制成探针[3,8,9],拟同时用于 MR 基因成像与靶向基因治疗。但该法为氧化还原反应,反应过程中是否会出现具有

毒性的氧化产物或羟基自由基等,从而造成细胞损伤或死亡[10]还未知,所以,对 ASODN 探针进行急性毒理检测十分必要。

急性毒理实验指对受试动物行一次或 24 h 内数次染毒后,观察其中毒表现的一种方法。考虑到染毒方式不同,毒物进入体内后被吸收的速度、吸收率和暴露量不同,可以表现出不同的中毒反应,所以本实验选择液体试剂 3 种常见使用方式,分别进行口服灌胃、静脉注射和腹腔注射染毒,连续观察 14 d[11],尽可能多角度、最大限度地客观评价探针对靶器官的毒性。

有关 SPIO 标记 ASODN 探针的急性毒理实验,国内外少见文献报道。仅有文献记载,SPIO 标记造血干细胞或胚胎干细胞,没有发现短期或长期毒性反应[12,13]。本研究在预实验基础上,采用最大给药量法进行,剂量远远高于临床及常见实验中所需的铁含量[14]。除了观察主要脏器标本并同时进行 2 种方式染色外,还通过检测血清生化指标以了解是否对小鼠脏器功能存在损害;此外,考虑到可能会影响血常规或凝血指标,故也将其纳入观察内容。实验结果显示,实验组仅在早期有部分小鼠出现轻度中毒症状,无 1 例死亡。另外,也将该探针用于体外转染高表达 c-erbB2 癌基因的 SK-Br-3 细胞,发现对细胞形态、生长曲线均无影响[5]。

铁是常见的无机类趋肝毒物,可造成多种多样的肝损害,故除了采用 2 种不同的染色方法重点观察外,还对血清学指标进行测定,期望从形态及代谢两方面了解对肝脏的毒理。同理,选择其他脏器观察是因为毒物容易使肾功能特别是分泌功能障碍,在血液循环中损害心脏、肺组织和生殖器;此外,本探针属于纳米级化合物,有可能在骨髓组织中沉积,故将骨髓也列为观察组织。通过对上述脏器或组织的病理观察,未见明显的损伤性改变,仅见到肝、脾内少量铁颗粒沉积;血常规、凝血指标和血清学指标检测显示各组间差异无显著性($P>0.05$),这一切说明探针对主要脏器功能无明显影响。

参考文献:

[1] Bellin M F. MR contrast agents, the old and the new[J]. Eur J Radiol, 2006, 60(3): 314 – 323.

[2] 文　明,李少林. 磁共振成像用于分子影像学研究[J]. 中国医学影像技术,2007,23(1):147 – 150.

[3] Wen M, Li B B, Bai W, *et al*. Application of atomic force microscopy in morphological observation of antisense probe labeled with magnetism [J]. Mol Vis, 2008, 14: 114 – 117.

[4] 文　明, 柏　玮, 李必波, 等. SPIO 标记的反义探针磁学性能检测[J]. 重庆大学学报, 2008, 31(8):956 – 960.

[5] 文　明, 李必波, 柏　玮, 等. 超顺磁性氧化铁标记反义寡脱氧核苷酸探针在转染细胞磁共振成像中的应用[J]. 中国医学科学院学报, 2008, 30(5): 554 – 558.

[6] 文　明, 柏　玮, 李少林. 分子影像学中的肿瘤反义基因显像[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(5):554 – 557.

[7] Ozkal S, Ozer E, Canda T, *et al*. Expression of c-erbB-2 gene product and hormone receptor status in phyllodes tumors and fibroadenomas: an immunohistochemical study [J]. Ann Med Sci, 2003, 12(1): 10 – 14.

[8] Talanov V S, Garmestani K, Regino C A, *et al*. Preparation and *in vivo* evaluation of a novel stabilized linker for 211At labeling of protein [J]. Nucl Med Biol, 2006, 33(4): 469 – 480.

[9] Hogemann D, Josephson L, Weissleder R, *et al*. Improvement of MRI probes to allow efficient detection of gene expression [J]. Bioconjug Chem, 2000, 11(6): 941 – 946.

[10] Emerit J, Beaumont C, Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury[J]. Biomed Pharmacother, 2001, 55(6):333 – 339.

[11] 国家食品药品监督管理局. 关于发布化学药物稳定性研究等 16 个技术指导原则的通知[S]. 国食药监注[2005]106 号.

[12] Daldrup-Link HE, Rudelius M, Oostendorp R A, *et al*. Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents[J]. Radiology, 2003, 228(3):760 – 767.

[13] Himes N, Min J Y, Lee R, *et al*. *In vivo* MRI of embryonic stem cells in a mouse model of myocardial infarction[J]. Magn Reson Med, 2004, 52(5): 1214 – 1219.

[14] Metz S, Bonaterra G, Rudelius M, *et al*. Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents *in vitro* [J]. Eur Radiol, 2004, 14(10): 1851 – 1858.

（编辑　吴培红）

《军医大学学报》(英文版)欢迎投稿

Journal of Medical Colleges of PLA 是由 3 所军医大学和南方医科大学共同主办的、国内外公开发行的综合性医学学术类英文期刊,是中国英文版科技论文统计源期刊,并被纳入中文科技期刊数据库、中国期刊网、万方数据库、重庆维普数据库。从 2007 年开始,本刊电子版由全球著名的科技出版集团爱思唯尔(Elsevier)负责海外发行,全文已进入 ScienceDirect 全文数据库,期刊网址 http://www.elsevier.com/locate/jmcpla。国内统一刊号:CN31 – 1002/R,国际标准刊号:ISSN 1000 – 1948。双月刊。设有论著、技术与方法、个案报道、交流等栏目。若无彩图,无需缴纳版面费;亦不收取审稿费;无稿酬。投稿要求:中(或大摘要)、英文稿各 1 份,照片提供 3 份。电子投稿 E-mail:gangela@mail.tmmu.com.cn。照片需以附件形式单独提供 JPG 或 TIF 格式。电子投稿请注明英文版。

联系地址:重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学学报编辑部(400038)　　**电话**:(023)68752782