

文章编号:1674-2869(2016)05-0436-06

含卟啉基葡聚糖大分子磁共振成像造影剂的研究

柯希骏, 刘凡, 徐琼楠, 鄢国平*, 韩林, 涂圆圆, 蒋灿, 郑华明, 彭永利, 杨隽
武汉工程大学材料科学与工程学院, 湖北 武汉 430074

摘要:将肿瘤靶向基团 5-(4-氨基苯基)-10, 15, 20-三(4-磺酸苯基)卟啉钠 (APTSP) 与二乙三胺五乙酸 (DTPA) 分别键接在葡聚糖侧链上, 再与钆 Gd(III) 离子配合, 从而研制出一种新型含卟啉基葡聚糖大分子磁共振成像造影剂 (APTSP-Dextran-DTPA-Gd). 对所合成的配体及钆配合物分别进行了核磁共振氢谱、紫外可见光谱、傅里叶变换红外光谱等结构表征, 分析了钆配合物在水溶液中的粒径分布和 Zeta 电位, 测试了钆配合物的体外弛豫率与新西兰大白兔体内肿瘤磁共振成像性能. 与 Gd-DTPA 相比, 所得钆配合物具有较高的弛豫率, 对 VX2 肿瘤有良好的磁共振成像性能与靶向性, 能对磁共振成像的对比度与清晰度有较好的提高.

关键词:磁共振成像; 造影剂; 二乙三胺五乙酸钆; 肿瘤靶向; 卟啉; 葡聚糖

中图分类号: R445.2 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.1674-2869.2016.05.005

Dextran Gadolinium Complex Containing Porphyrin Groups for Using as Potential Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent

KE Xijun, LIU Fan, XU Qiongnan, YAN Guoping*, HAN Lin, TU Yuanyuan, JIANG Can,
ZHENG Huaming, PENG Yongli, YANG Jun

School of Materials Science and Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China

Abstract: The macromolecular ligand containing porphyrin groups (APTSP-Dextran-DTPA) were synthesized by the incorporation of water-soluble 5-(4'-aminophenyl)-10, 15, 20-tris(4'-sulfonatophenyl) porphyrin trisodium salt (APTSP) and diethylenetriamine-pentaacetic acid (DTPA) to dextran. Dextran gadolinium complex APTSP-Dextran-DTPA-Gd was further prepared by the reaction of APTSP-Dextran-DTPA. The ligand and gadolinium complex was characterized by Nuclear magnetic resonance hydrogen spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, and Ultraviolet spectroscopy. The relaxivity, magnetic resonance imaging, average particle sizes and Zeta potential were evaluated in vitro and in vivo. Compared with Gd-DTPA, the dextran gadolinium complex APTSP-Dextran-DTPA-Gd shows high relaxation effectiveness and good imaging performance, which improves the contrast and resolution of magnetic resonance imaging.

Keywords: magnetic resonance imaging; contrast agent; gadolinium diethylenetriamine-pentaacetic acid; tumor-targeting; porphyrin; dextran

1 引言

磁共振成像 (Magnetic Resonance Imaging,

MRI) 是根据核磁共振原理, 采用傅立叶图像重建及空间定位等技术而形成的一种新型的无创伤的医用影像诊断技术^[1-2]. 与超声波成像、CT 等其它

收稿日期: 2016-05-15

基金项目: 国家自然科学基金(51373128, 51173140); 武汉市高新技术产业科技创新团队培养计划项目(2015070504020217); 武汉市科技计划项目(2013010501010131); 武汉工程大学研究生教育创新基金项目(CX2015007, CX2014058); 武汉工程大学第十期大学生校长基金项目(2015004)

作者简介: 柯希骏, 硕士研究生. E-mail: kxj258@qq.com

*通讯作者: 鄢国平, 博士, 教授. E-mail: guoptyan2006@163.com

临床影像技术相比,磁共振成像具有以下优点:①多核与多参数成像;②无电离辐射,无创伤;③可实现任意方位层面的扫描,无须改变体位;④软组织对比度及空间分辨率均较高;⑤能获取组织水质子周围环境的生理化信息.自从Lauterbur^[3]于1973年首次实现了磁共振成像以来,随着纳米、超导、低温、电子和计算机等相关技术的进步,MRI技术得到了飞速发展,目前已广泛应用在医学、生物化学、材料科学等领域.

磁共振成像可检测组织坏死、各种恶性病变,其信号强弱取决于组织或器官内水的含量和水分子中质子的弛豫时间^[4].为了确保磁共振成像在临床诊断的准确性,30%以上的诊断都须使用磁共振成像造影剂(MRI contrast agent)来缩短体内局部组织中水质子的弛豫时间,从而达到提高成像的灵敏度和清晰度的目的^[5-6].

一种先进的造影剂必须具有低毒、稳定、高弛豫率、良好的靶向性以及体内有适当的停留时间又易于排除等特点^[7-8].临床上广泛使用的小分子钆造影剂Gd-DTPA^[9-10],虽能缩短成像 T_1 弛豫时

间,提高成像对比度和清晰度,但在体内停留时间短,且对组织或器官不具有靶向性.若将小分子Gd-DTPA与生物相容性好的大分子载体键连在一起,再在配体上连接具有组织或器官靶向性的基团,则可制备出靶向性大分子造影剂.

本文将肿瘤靶向性小分子5-(4-氨基苯基)-10,15,20-三(4-磺酸苯基)卟啉钠(APTSPP)、二乙三胺五乙酸(DTPA)分别键接在葡聚糖大分子载体侧链上,合成大分子配体,再与Gd(III)离子进行配合,从而制备一种新型的含卟啉基葡聚糖大分子造影剂(APTSPP-Dextran-DTPA-Gd).对所合成的配体及钆配合物分别进行了核磁共振氢谱(nuclear magnetic resonance hydrogen spectroscopy, ^1H NMR)、紫外可见光谱(ultraviolet spectroscopy, UV)、傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)等结构表征及粒径和Zeta电位分析,测试了钆配合物的体外弛豫率与新西兰大白兔体内肿瘤磁共振成像性能.其合成路线见图1.

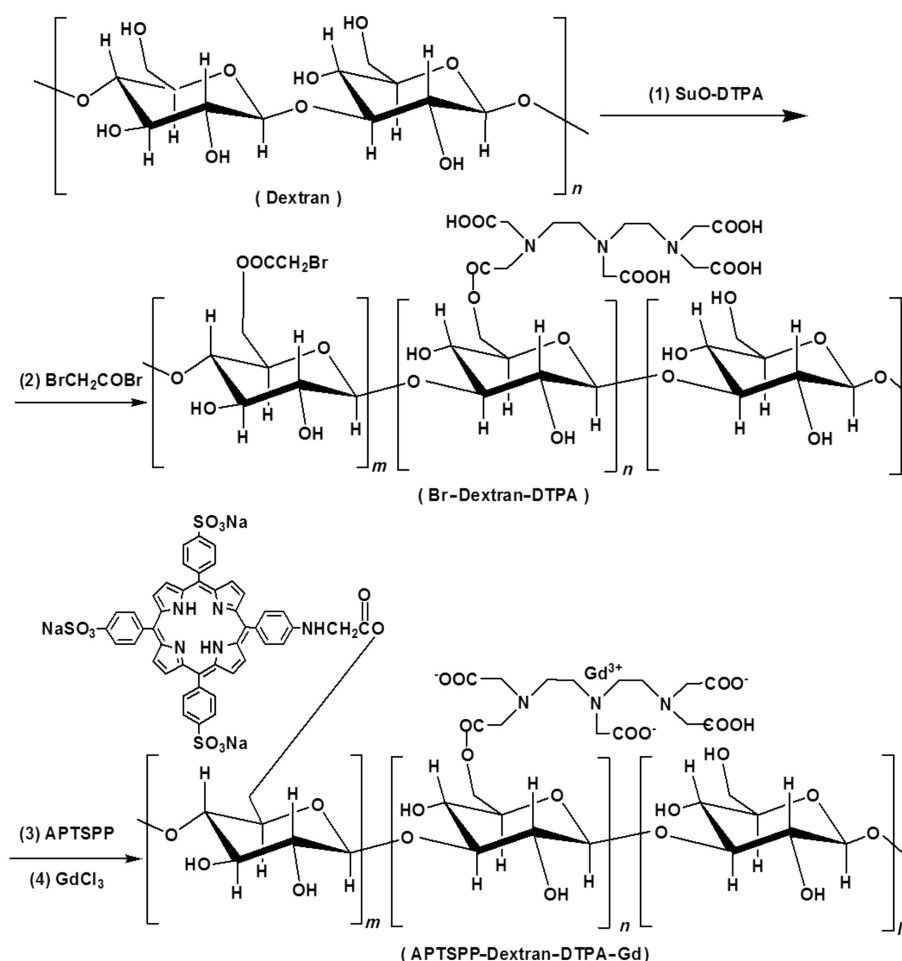


图1 APTSPP-Dextran-DTPA-Gd的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of APTSPP-Dextran-DTPA-Gd

2 实验部分

2.1 测试仪器及试剂

葡聚糖(Dextran, 分子量为4万)、二乙三胺五乙酸(DTPA)、N-羧基琥珀酰亚胺(SuOH)、二环己基碳亚胺(DCC)均为生化试剂;4-硝基苯甲醛、氧化钆(Gd_2O_3)、二氯二腈基苯醌、乙酸酐、三氟化硼乙醚络合物、三氯甲烷、无水乙醇、无水乙醚、浓盐酸、浓硝酸、浓硫酸均为分析纯试剂. 乙三胺五乙酸单 N-羧基琥珀酰亚胺活性酯(DTPA-OSu)和5-(4-氨基基)-10, 15, 20-三(4-磺酸苯基)卟啉(APTSPP)的合成与结构表征均按照文献报告^[11]的实验方法进行实施.

Nicolet Impact 420型傅立叶红外分析仪(KBr压片法);PSS NICOMP380型粒径仪;Varina Mercury Vx-300NMR (300 MHz)型核磁共振仪测定自旋-晶格弛豫时间(T_1); Varina Mercury Vx-300型核磁共振波谱仪; UNIC-2802H UV/Vis Spectrophotometer紫外光谱仪; 3.0T磁共振成像仪(德国 Trio Tim, 协和医院). VX2瘤株与右侧大腿肌肉种植 VX2 肿瘤转移模型的新西兰大白兔(体重为2.0 kg ~3.0 kg, 华中科技大学同济医学院附属协和医院核医学科提供).

2.2 实验方法

2.2.1 葡聚糖大分子配体 Dextran-DTPA 的合成 取2.06 g 葡聚糖(12.7 mmol)溶于150 mL DMSO 中于60℃搅拌溶解, 过滤, 冷却至室温, 在磁力搅拌条件下加入上述制备好的二乙三胺五乙酸单 N-羧基琥珀酰亚胺活性酯(DTPA-OSu)的DMF溶液, 反应2 h. 将温度升至60℃继续反应7 d. 反应结束后, 浓缩反应液, 随后将反应液缓慢倒入 $V(\text{无水乙醇}):V(\text{无水乙醚})=1:2$ 的混合溶剂中进行沉淀, 抽滤, 得白色固体. 再用DMF-无水乙醇进行重沉淀, 真空干燥后, 将固体溶于蒸馏水中, 用蒸馏水透析. 然后将透析液过滤, 减压蒸干, 真空干燥, 得浅黄色固体 Dextran-DTPA 2.2 g, 产率32%.

2.2.2 配体 APTSPP-Dextran-DTPA 的合成 取2.0 g 大分子配体(12.35 mmol)溶于20 mL 二甲亚砜中, 室温搅拌下, 加入0.43 mL 溴乙酰溴(4.94 mmol, 占葡聚糖单元摩尔数的40%)和0.977 g 吡啶(12.35 mmol), 搅拌反应3 d. 反应液用无水乙醇沉淀, 抽滤得淡黄色固体, 再将产物溶于少量蒸馏水中, 用二次蒸馏水透析, 除去未反应的小分子. 将透析液减压蒸干, 真空干燥至恒重得黄

色固体2.126 g, 产率85.42%.

将1.0 g 溴代产物(6.17 mmol)溶于20 mL 二甲亚砜中, 加入2.31 g 5-(4-氨基苯基)-10, 15, 20-三(4-磺酸苯基)卟啉钠(2.47 mmol), 以质量分数25%四丁基氢氧化铵为催化剂, 室温搅拌反应2 d. 反应液用无水乙醇沉淀, 抽滤, 干燥, 所得固体用二次蒸馏水透析完毕后, 减压蒸干至恒重, 称得1.832 g 黄色晶体, 产率88.6%.

2.2.3 钆配合物 APTSPP-Dextran-DTPA-Gd 的合成

取2.0 g 大分子配体 APTSPP-Dextran-DTPA, 溶于30 mL 去离子水中, 加入6.5 g $GdCl_3 \cdot H_2O$ 水溶液(24.69 mmol), 室温反应12 h. 抽滤, 得棕色溶液, 将溶液透析, 每隔1 h 换水, 直到透析外液检测不到 Gd^{3+} . 将透析液减压蒸干, 真空干燥得到黄色钆配合物 APTSPP-Dextran-DTPA-Gd 2.3 g, 产率为38.7%.

2.3 大分子钆配合物中 Gd^{3+} 含量的测定

Gd^{3+} 标样溶液的配制: 用25 mL 容量瓶配制浓度为100 mg/L 的标样溶液. 称取2.9 mg 纯度为99.9%的 Gd_2O_3 , 用3 mL 王水对 Gd_2O_3 进行酸化, 然后用二次蒸馏水进行定容, 配制成25 mL Gd^{3+} 标样溶液.

钆配合物溶液的制备: 制备方法同上, 先计算出配制相同质量浓度(100 mg/L)的溶液所需钆配合物 APTSPP-Dextran-DTPA-Gd 的理论上所需质量. 然后用王水对大分子钆配合物进行降解, 再定容. 以标样溶液为参照, 用 ICP Atomscan-2000 原子发射光谱仪测定钆配合物溶液中钆离子的浓度.

2.4 钆配合物弛豫时间的测定

配制一组钆离子浓度分别为0.15 mmol/L、0.4 mmol/L、0.8 mmol/L、1.2 mmol/L、1.6 mmol/L 的 APTSPP-Dextran-DTPA-Gd 水溶液和钆离子浓度为0.15 mmol/L 的 Gd-DTPA 水溶液, 在 Varian Mercury Vx-300 NMR (300 MHz) 磁共振仪上使用反转恢复法对溶液中质子的自旋-晶格弛豫时间 T_1 进行测定, 并计算得出弛豫率 R_1 .

2.5 配体及钆配合物在水溶液中的粒径和 Zeta 电位的测定

将配体 APTSPP-Dextran-DTPA 和钆配合物 APTSPP-Dextran-DTPA-Gd 配成 0.001 mg/L、0.000 1 mg/L 及 0.000 01 mg/L 三种不同质量浓度的水溶液. 然后在 PSS NICOMP380 型粒径仪上测定其粒径分布和 Zeta 电位.

2.6 磁共振成像试验

采用3.0T 磁共振成像仪对右侧大腿肌肉种植

VX2 肿瘤转移模型的新西兰大白兔(体重为 2.0 kg~3.0 kg)进行磁共振成像测试. 其测量参数为:表面线圈内径为 12.7 cm;视野(FOV)为 14 cm×14 cm;激励次数为 2~4;层厚为 5 mm;扫描矩阵为 332×332;测量信号强度感兴趣区(ROI)设为 20 mm². 成像序列:自旋回波(SE)脉冲序列为 T₁WI,重复时间(TR)为 400.0 ms,回波时间(TE)为 17.9 ms,反转角为 90°.

3 结果与讨论

3.1 大分子配体及钆配合物的结构表征

Dextran-DTPA 与 APTSPP-Dextran-DTPA 的 FT-IR 图谱对比见图 2. 在 1 730 cm⁻¹处的峰消失,变成 1 640 cm⁻¹处的一个宽峰,葡聚糖配体上的羰基峰向低波数方向移动. 钆配合物 APTSPP-Dextran-DTPA-Gd 在紫外可见光区有一个很强的吸收带(Soret 带)以及 4 个较弱的吸收带(Q 带). Soret 带吸收峰位于 416 nm 处;Q 带归吸收峰值分别为 519 nm、560 nm、590 nm、648 nm. APTSPP-Dextran-DTPA-Gd 的紫外图谱见图 3,与纯 APTSPP 的紫外图谱对比,APTSPP-Dextran-DTPA-Gd 的紫外吸收峰红移.

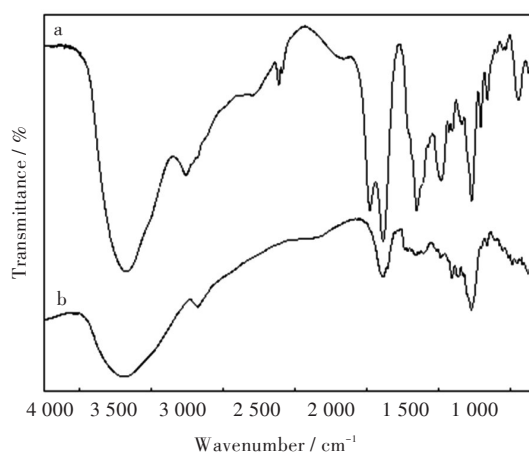


图2 (a)Dextran-DTPA 与(b)APTSPP-Dextran-DTPA 的 FT-IR 图谱

Fig. 2 FT-IR spectra of (a)Dextran-DTPA and (b)APTSPP-Dextran-DTPA

取适量配体 APTSPP-Dextran-DTPA,以氘代 DMSO 作溶剂,在 Varina Mercury VX-300 型核磁共振仪上测得配体的核磁图谱,其核磁共振氢谱见图 4. 其核磁共振吸收峰数据及其归属为: ¹H NMR (DMSO-d₆, δ, ppm): 8.93 (br, 2H, b-pyrrole), 8.83 (br, 6H, b-pyrrole), 8.17 (m, 6H, orthotriphenyl), 8.06 (m, 6H, metatriphenyl), 7.94 (br, 2H, 4-amionphenyl), 7.05 (br, 2H,

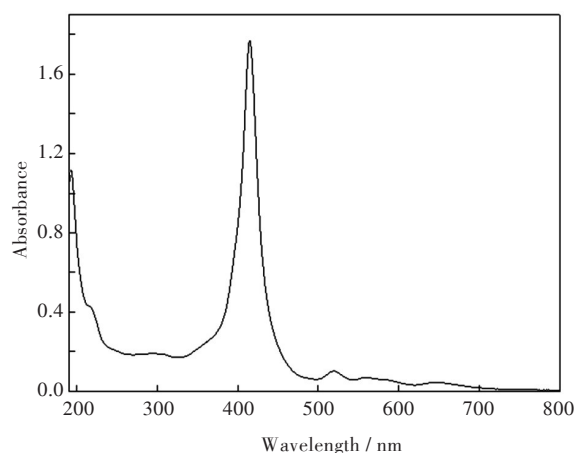


图3 APTSPP-Dextran-DTPA-Gd 的 UV-Vis 谱图

Fig. 3 UV-Vis spectrum of APTSPP-Dextran-DTPA-Gd

4-amionphenyl), 4.69 (1H, C₆H₄-NH), 4.51 (2H, -NH-CH₂), 2.39 (2H, CH₂-N), 1.23 (2H, CH₂-CH₂O), -2.88 (s, 2H, pyrrole). 由此可进一步证明,APTSPP 已成功链接接枝到了葡聚糖大分子上. 根据葡聚糖单元结构上 H 吸收峰的积分面积与 5-(4-氨基苯基)-10,15,20-三(4-磺酸苯基)卟啉钠上氢吸收峰的积分面积之比,可计算得到 APTSPP 的单元摩尔接枝率为 8.14%.

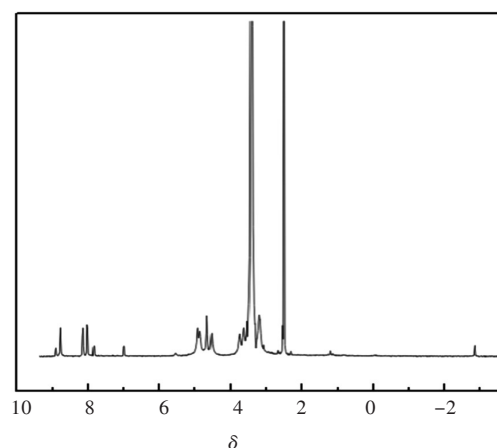


图4 APTSPP-Dextran-DTPA 的 ¹H NMR 谱图

Fig. 4 ¹H NMR spectrum of APTSPP-Dextran-DTPA

3.2 钆配合物中 Gd³⁺含量的测定及 DTPA 接枝率的计算

首先按照理论上配制质量浓度为 100 mg·L⁻¹ 的大分子钆配合物溶液,然后用等离子体发射光谱测定溶液中 Gd³⁺的含量(0.68 mmol·g⁻¹),再根据 Gd³⁺与 DTPA 以摩尔比 1:1 进行配合作用的关系计算出 DTPA 在 Dextran 侧链中的单元摩尔接枝率为 14.68%.

3.3 钆配合物弛豫率的测定

钆配合物弛豫率的测定如图 5 所示,X 轴为水溶液中配合物的摩尔浓度,Y 轴为弛豫时间 T₁ 的倒

数,即弛豫速率,单位为 s^{-1} 。随着配合物摩尔浓度 C 的变化,弛豫速率 A (即溶剂水分子中质子的弛豫速率)变化显著。经公式计算得到, APTSPP-Dextran-DTPA-Gd的弛豫率为 $8.01 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$,该计算值高于同等条件下测得的Gd-DTPA的弛豫率($3.63 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$)。

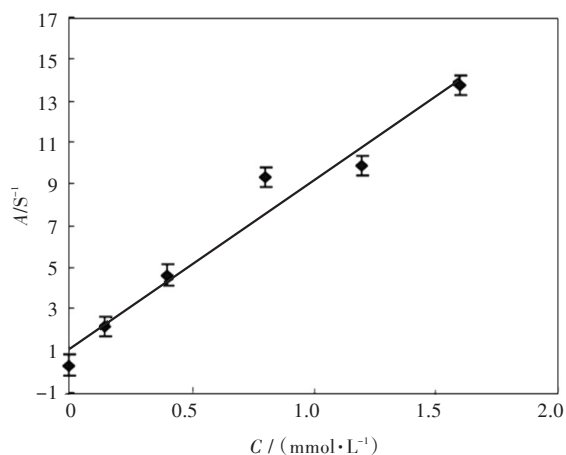


图5 APTSPP-Dextran-DTPA-Gd溶液中水分子氢核的弛豫性能

Fig. 5 Relaxation properties of water molecules in APTSPP-Dextran-DTPA-Gd aqueous solution

3.4 钆配合物在水溶液中的粒径和Zeta电位分析

钆配合物在水溶液中的粒径和Zeta电位分析见图6。APTSPP-Dextran-DTPA-Gd质量浓度为 0.001 g/mL 时,平均粒径为 138 nm ,如图6(a)所示;质量浓度为 0.0001 g/mL 时,其平均粒径为 223 nm ,如图6(b)所示;质量浓度为 0.00001 g/mL 时,其平均粒径为 280 nm ,如图6(c)所示;钆配合物 APTSPP-Dextran-DTPA-Gd 电位呈电中性如图6(d)所示。

3.5 APTSPP-dextran-DTPA-Gd的MRI成像

新西兰大白兔注射造影剂 APTSPP-Dextran-DTPA-Gd溶液(Gd注射剂量为 0.004 mmol/kg)之前和注射 30 min 之后的后大腿肿瘤的磁共振成像如图7所示, APTSPP-Dextran-DTPA-Gd能提高VX2肿瘤组织的成像对比度与清晰度。APTSPP-Dextran-DTPA-Gd能在卟啉APTSPP基团对肿瘤组织的特异亲和性的作用下,主动进入肿瘤组织内部,因此APTSPP-Dextran-DTPA-Gd对肿瘤的成像性能增强较明显。

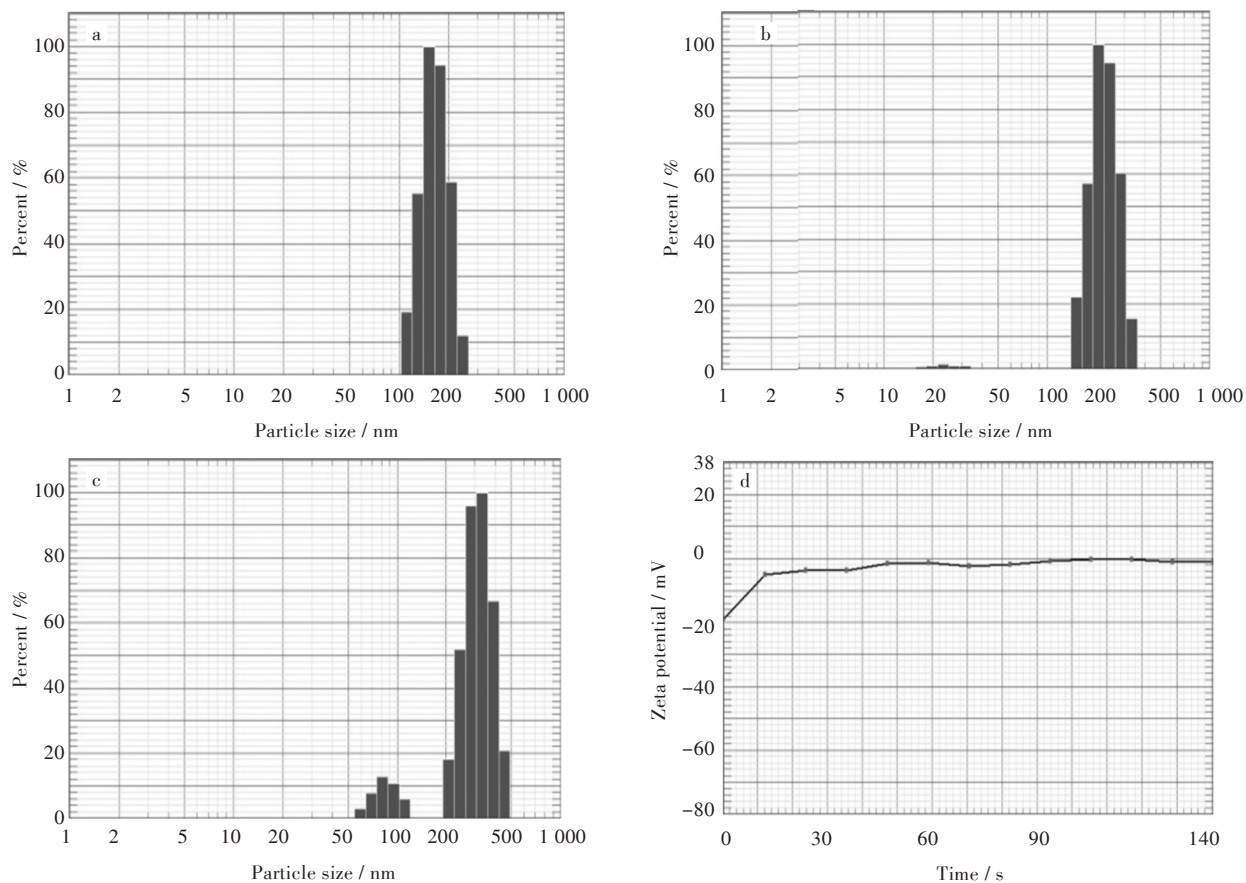


图6 APTSPP-Dextran-DTPA-Gd在水溶液中的(a,b,c)粒径分布和(d)Zeta电位图

Fig. 6 (a, b and c) Particle size distribution and (d) Zeta potential of APTSPP-Dextran-DTPA-Gd in aqueous solution

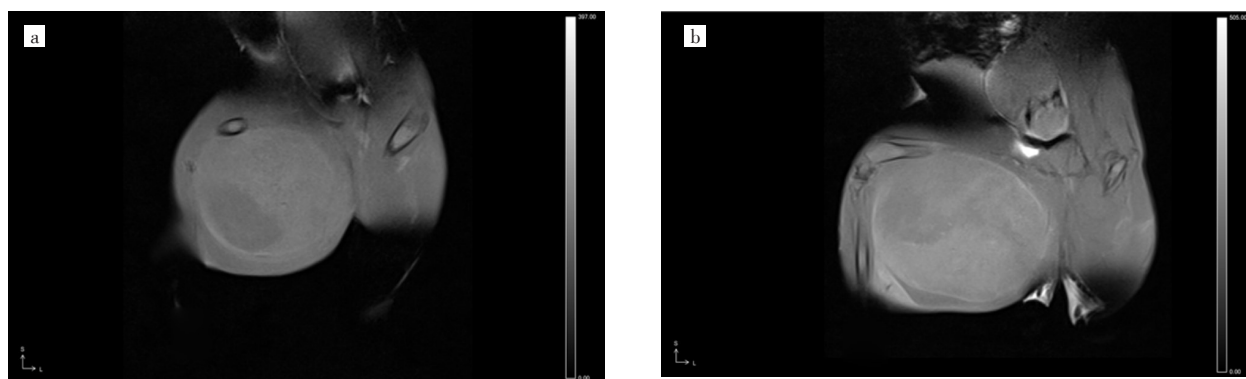


图7 新西兰大白兔(a)注射造影剂 APTSP-Dextran-DTPA-Gd 溶液之前和(b)注射 30 min 之后的后大腿肿瘤的磁共振成像 (Gd 注射剂量为 0.004 mmol/kg)

Fig. 7 MR images of VX2 tumors in the thigh muscles of rabbit (a) before and (b) after 30 min receiving APTSP-Dextran-DTPA-Gd injection at Gd dosage of 0.004 mmol/kg

4 结 语

水溶性卟啉化合物对肿瘤细胞具有较好的亲和性,可被肿瘤组织选择性摄取.本文以卟啉化合物作为肿瘤靶向基团,以葡聚糖作为大分子载体,成功合成了肿瘤靶向性大分子磁共振成像造影剂 APTSP-Dextran-DTPA-Gd,并进行了结构表征及体内外性能研究.研究结果表明,这种造影剂具有较高的弛豫率,对 VX2 肿瘤有良好的磁共振成像性能,能提高磁共振成像的对比度与清晰度,有望用于临床肿瘤的 MRI 靶向检测与诊断.

参考文献:

- [1] WILSON W R, HAY M P. Targeting hypoxia in cancer therapy[J]. Nature reviews cancer, 2011, 11(6): 393-410.
- [2] QIAO Z, SHI X. Dendrimer-based molecular imaging contrast agents [J]. Progress in polymer science, 2015, 44: 1-27.
- [3] LAUTERBUR P C. Image formation by induced local interaction: examples employing nuclear magnetic resonance [J]. Nature, 1973, 242: 190-191.
- [4] VAQUERO J J, KINAHAN P. Positron emission tomography: current challenges and opportunities for technological advances in clinical and preclinical imaging systems [J]. Annual review of biomedical engineering, 2015, 17: 385-414.
- [5] NA H B, SONG I C, HYEON T. Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents [J]. Advanced materials, 2009, 21(21): 2133-2148.
- [6] CARAVAN P. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents [J]. Chemical society reviews, 2006, 35(6): 512-523.
- [7] GIANOLIO E, CABELLA C, SERRA S C, et al. B25716/1: a novel albumin-binding Gd-AAZTA MRI contrast agent with improved properties in tumor imaging [J]. Journal of biological inorganic chemistry, 2014, 19 (4/5): 715-726.
- [8] NAKAMURA T, OHANA T, YABUNO H, et al. Simple fabrication of Gd (III) - DTPA - nanodiamond particles by chemical modification for use as magnetic resonance imaging (MRI) contrast agent [J]. Applied physics express, 2013, 6(1): 015001-1-015001-3.
- [9] DURMUS T, VOLLNBERG B, SCHWENKE C, et al. Dynamic contrast enhanced MRI of the prostate: comparison of gadobutrol and Gd-DTPA [J]. RöFo: fortschritte auf dem gebiete der röntgenstrahlen und der nuklearmedizin, 2013, 185(9): 862-868.
- [10] MI P, CABRAL H, KOKURYO D, et al. Gd-DTPA-loaded polymer-metal complex micelles with high relaxivity for MR cancer imaging [J]. Biomaterials, 2013, 34 (2): 492-500.
- [11] YAN G P, LI Z, XU W, et al. Porphyrin-containing polyaspartamide gadolinium complexes as potential magnetic resonance imaging contrast agents [J]. International journal of pharmaceutics, 2011, 407(1): 119-125.

本文编辑:张 瑞