◁实验研究▷

靶向血栓 MR 分子探针的构建及初步鉴定

张　瑜，郭大静*，周　君，郑元义，王志刚，赵建农

【摘要】 目的　构建一种靶向血栓 MR 分子探针并对其相关特性进行鉴定。 方法　采用双乳化法，以端羧基聚乳酸/羟基乙酸(PLGA-COOH)为载体包裹 MR 对比剂钆喷酸葡胺(Gd-DTPA)制备 Gd-PLGA 微球，再采用碳二亚胺法共价结合血小板膜上 GPⅡb/Ⅲa 受体拮抗剂精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸(Arg-Gly-Asp-Ser，RGDS)短肽片段，构建靶向血栓 MR 分子探针。观察其理化性质、体外靶向特异性，于 1.5 T MRI 测量并计算 MR 纵向弛豫率。 结果　采用本方法成功构建了靶向血栓 MR 分子探针，其形态规则，大小较均一，平均粒径为 2.04 μm，RGDS 携带率达 89.69%，Gd-DTPA 包封率为 39.53%；体外寻靶实验显示其对离体血栓具有较强的靶向性及稳定性；在 1.5 T MR 成像仪上能实现显像，同时随着 Gd-DTPA 浓度的增加，纵向弛豫率增加。 结论　成功构建靶向血栓 MR 分子探针，有望为分子水平诊断血栓提供新技术、新方法。

【关键词】 聚乳酸/羟基乙酸　RGDS 肽　磁共振　血栓　分子探针

Construction and Evaluation of MR Molecular Probes for Targeting Thrombus

ZHANG Yu，GUO Dajing，ZHOU Jun，et al.
Department of Radiology，the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University，Chongqing 400010，P. R. China

【Abstract】 **Objective** To construct a thrombus - targeted MR molecular probe and to evaluate its related characteristics. **Methods** Double emulsion solvent evaporation technique was used to encapsulate magnetic resonance contrast agent Gd DTPA in PLGA particles taking PLGA-COOH as the carrier. RGDS peptides were further immobilized by carbodiimide method on the surface of Gd PLGA particles to construct the thrombus - targeted MR molecular probe. The characteristics of the probes were tested and the ability to target thrombus was assessed by in vitro experiment. The longitudinal relaxation rate was measured and calculated by 1.5 T MR scanner. **Results** The thrombus - targeted MR molecular probe was successfully constructed. The probe had a mean diameter of 2.04 μm. The rate of carrying RGDS peptides was 89.69%. The encapsulation rate of Gd DTPA was 39.53%. In the in vitro experiment，the MR probe had successfully conjuncted to the thrombus. It can be imaged at 1.5 T MR scanner，and at the same time as Gd-DTPA concentration increased，the longitudinal relaxation rate increased. **Conclusion** The thrombus - targeted MR molecular probeis successfully constructed by this method. It could be helpful to provide a new method to diagnose thrombosis at the molecular level.

【Key words】 Poly lactic-co-glycolic acid　RGDS-peptides　Magnetic resonance　Thrombus　Molecular probes

随着纳米技术的发展及分子探针在影像学中的不断应用，影像医学已从对传统的解剖和生理功能的研究深入到分子水平成像。在该领域中，生物可降解、生物相容性材料高分子超声对比剂聚乳酸/羟基乙酸(poly lactic-co-glycolic acid，PLGA)作为纳米材料中的“新秀”已引起越来越多国内外学者的关注[1,2]，Ao 等[3]在前期研究中，已成功将 MR 对比剂钆喷酸葡胺(gadolinium diethylenetriamine pentaacetic acid，Gd-DTPA)包裹入 PLGA 中制成 Gd-PLGA 微球，实现了超声和 MR 显像。本实验拟采用端羧基聚乳酸/羟基乙酸(PLGA-COOH)为载体包裹 Gd-DTPA 再共价结合血小板膜上 GPⅡb/Ⅲa 受体拮抗剂精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸(Arg-Gly-Asp-Ser，RGDS)短肽片段，构建靶向血栓 MR 分子探针，从分子水平为血栓的早期诊断提供新技术及新方

本研究系国家自然科学基金面上项目(编号：81171332)、重点项目(编号：81130025)；重庆市自然科学基金资助项目(编号：2008BB5233)

作者单位：400010 重庆医科大学附属第二医院放射科(张　瑜、郭大静、周　君、赵建农)；超声影像研究所(郑元义、王志刚)；* 通讯作者

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

RGDS肽(杭州中肽生物制剂公司特约合成);PLGA-COOH(配比75:25,济南岱罡生物材料有限公司);Gd-DTPA(469.00 mg/ml,广州康臣药业);碳二亚胺盐酸盐/N-羟基丁二酰亚胺(EDC/NHS,Sigma);聚乙烯醇(polyvinyl alcohol,PVA,Sigma);2-吗啉乙磺酸缓冲液(2-morpholinoethanesulfonicacid,MES)(0.1 mol/L,用NaOH调节pH=6.0及pH=8.0的两种溶液待用);余为分析纯。

超声震荡仪器(VCX130,美国Sonic);数显高速均质分散机(FJ300-SH,上海标本模型厂);高速冷冻离心机(Centrifuge5804R,德国Eppendorf);光学显微镜(CKX41,日本Olympus);激光粒径仪(Zeta SIZER 3000HS,英国Malvern);透射电子显微镜(Hitachi600,日本Hitachi);激光共聚焦扫描显微镜(TCS SP2,德国徕卡仪器有限公司);全谱直读电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP,Optima 7000,PE公司);MRI仪(1.5 T,GE)等。

1.2 MR分子探针构建方法

Gd-PLGA微球的制备:采用双乳化溶剂挥发法(W/O/W),将100 mg PLGA-COOH溶于2 ml二氯甲烷(成有机相O),再加入0.1 ml Gd-DTPA(内水相W1),用超声振荡仪声振60 s。将上述乳液用注射器缓慢注入10 ml不断搅拌着的含5% NaCl及3% PVA的混合水溶液(外水相W2)中,用高速均质机均质5 min。再加入20 ml 2%异丙醇溶液,室温搅拌1 h,使微球表面固化,二氯甲烷尽量挥发。用双蒸水与正己烷洗涤、离心,去除二氯甲烷及游离的Gd-DTPA。弃去清液,收集得Gd-PLGA微球。以0.4 ml双蒸水取代Gd-DTPA作为内水相,用相同方法制得空白PLGA微球。

靶向血栓MR分子探针的构建:取少量制得的Gd-PLGA微球分散溶解在pH=6.0的MES缓冲液中,加入过量的偶联活化剂EDC/NHS常温孵育至少30 min。再用pH=6.0的MES缓冲液离心洗涤去除未反应的EDC/NHS。将离心后得到的活化Gd-PLGA微球分散溶解在pH=8.0的MES溶液中,加入RGDS短肽,冰水浴中孵育约1 h,用pH=8.0的MES缓冲液离心洗涤去除未反应的RGDS,弃去清液,收集即得靶向血栓MR分子探针(Gd-PLGA-RGDS)。

1.3 理化特性的检测

取适量靶向血栓MR分子探针用双蒸水溶解后于普通光学显微镜下观察其形态、表面、分散度;透射电镜观察Gd离子在靶向血栓MR分子探针内的分布。采用激光粒径仪测量其大小。

RGDS携带率的测定:以Gd-PLGA微球为对照组,靶向MR分子探针为实验组[RGDS用异硫氰酸(FITC)标记],然后采用流式细胞仪随机计数10 000个微球,测得RGDS携带率。

Gd-DTPA包封率的测定(重庆质量计量检测研究院):取Gd-DTPA标准品配成不同浓度标准溶液,以ICP测定并绘制标准工作曲线。将靶向MR分子探针构建过程中所有离心后的上清液收集起来,用ICP法测量其中钆离子谱线光强,并与标准曲线对比,测得溶液中游离Gd的含量,记为W游,总共加入的Gd的量记为$W_{总}$,计算包封率$EN\% = (W_{总} - W_{游})/W_{总} \times 100\%$。

1.4 体外寻靶实验

采集正常人外周静脉新鲜血液5 ml常温下涂片制备血栓模型[4],分别滴加10 μl靶向血栓MR分子探针和Gd-PLGA微球(二者的内水相均用罗丹明6G标记),5 min后用磷酸盐缓冲剂(phosphate buffer solution,PBS)(pH=7.4)缓冲液冲洗涂片数次,放盖玻片,用激光共聚焦扫描显微镜评价其对离体血栓的亲和性。

1.5 MRI

分为A、B、C、D 4组:A组为8%明胶溶液;B组为30 mg/ml空白PLGA微球;C组为靶向血栓MR分子探针(将C组分为C1、C2和C3,溶液浓度分别为7.5 mg/ml、15 mg/ml和30 mg/ml);D组为Gd-DTPA溶液(用双蒸水稀释100倍),由于微球在水中有沉淀趋势,故将B、C组用8%明胶溶液固定。采用1.5 T MRI仪,头部线圈,分别行快速自旋回波-T_1加权成像(fast spin echo-T_1 weighted imaging,FSE-T_1WI)和反转恢复(inversion recovery,IR)序列扫描。FSE-T_1WI扫描参数:TR 400 ms,TE 10.3 ms,矩阵320×192,激励次数(NEX) 1。IR序列扫描参数:TR 4500 ms;TI 50 ms,75 ms,100 ms,150 ms,200 ms,250 ms,300 ms,400 ms,500 ms,600 ms,700 ms,800 ms;层厚3.0 mm;层间隔0.5 mm;矩阵192×160;NEX 1。将IR序列扫描所得数据传入ADW4.1图像工作站,运用Functool 2.0 Research T_1mapping软件测出纵向弛豫时间T_1,每组测量3次,取平均值,计算纵向弛豫率$R_1 = 1/T_1$。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.6 统计学分析

纵向弛豫时间统计学分析使用 SPSS 17.0 软件，统计结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两个样本均数比较采用独立样本 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 靶向血栓 MR 分子探针的理化特性

采用双乳化法及碳二亚胺法构建的靶向血栓 MR 分子探针形态规则(呈球形)，表面光滑，大小较均一，分散度好，与空白 PLGA 微球相似，不同之处在于前者由于球心内包裹 Gd-DTPA 导致其透光性降低(图 1、2)。透射电子显微镜观察显示，靶向血栓 MR 分子探针球心可见大量电子致密物充填，透光性差，而空白 PLGA 微球球心未见电子致密物(图 3、4)。激光粒径仪测得靶向血栓 MR 分子探针平均粒径为 2.04 μm(图 5)。流式细胞仪检测: 与对照组比较，靶向血栓 MR 分子探针由于共价结合了 RGDS 短肽，其外壳波长发生了改变。随机计数 10 000个微球，测得 RGDS 携带率达 89.69%(图 6)。用 ICP 法测得游离 Gd 的量为 28.36 mg，总投入量为 46.90 mg，算出包封率为 39.53%。

2.2 体外寻靶实验

靶向血栓 MR 分子探针在反复 PBS 缓冲液冲洗的情况下仍能在激光共聚焦扫描显微镜下看到呈不规则团块状的红色荧光，表明构建的探针可聚集到血栓表面并与之牢固结合，而未结合及未被冲洗掉的仍维持原有的球形; Gd-PLGA 微球对照组未见微球聚集征象(图 7、8)。

2.3 MRI 结果

构建的靶向血栓 MR 分子探针能在 1.5 T MRI 仪上成像，其 T_1WI 图像信号高于对照组明胶溶液和空白 PLGA 微球(图 9)。

各组溶液 T_1 时间及 R_1 值见表 1。

表 1 各组溶液的 T_1 时间及 R_1 值

组别	T_1 弛豫时间(ms)			T_1 平均(ms)	R_1(s^{-1})
	1	2	3		
A	1210.40	1243.10	1248.50	1234.00 ± 20.61^a	0.81
B	1260.80	1269.40	1267.30	1265.83 ± 4.48	0.79
C1	919.28	920.40	892.30	910.66 ± 15.91^b★●	1.10
C2	823.48	826.45	829.95	826.63 ± 3.24^c★●	1.21
C3	718.00	713.00	705.05	712.02 ± 6.53^d★●	1.40
D	300.04	289.65	301.48	297.06 ± 6.45^e	3.37

注: 与 B 组比较，a: $P>0.05$，b: $P<0.05$，c: $P<0.05$，d: $P<0.05$，e: $P<0.05$; C1、C2、C3 组间比较，★: $P<0.05$; C 组与 D 组比较，●: $P<0.05$

3 讨论

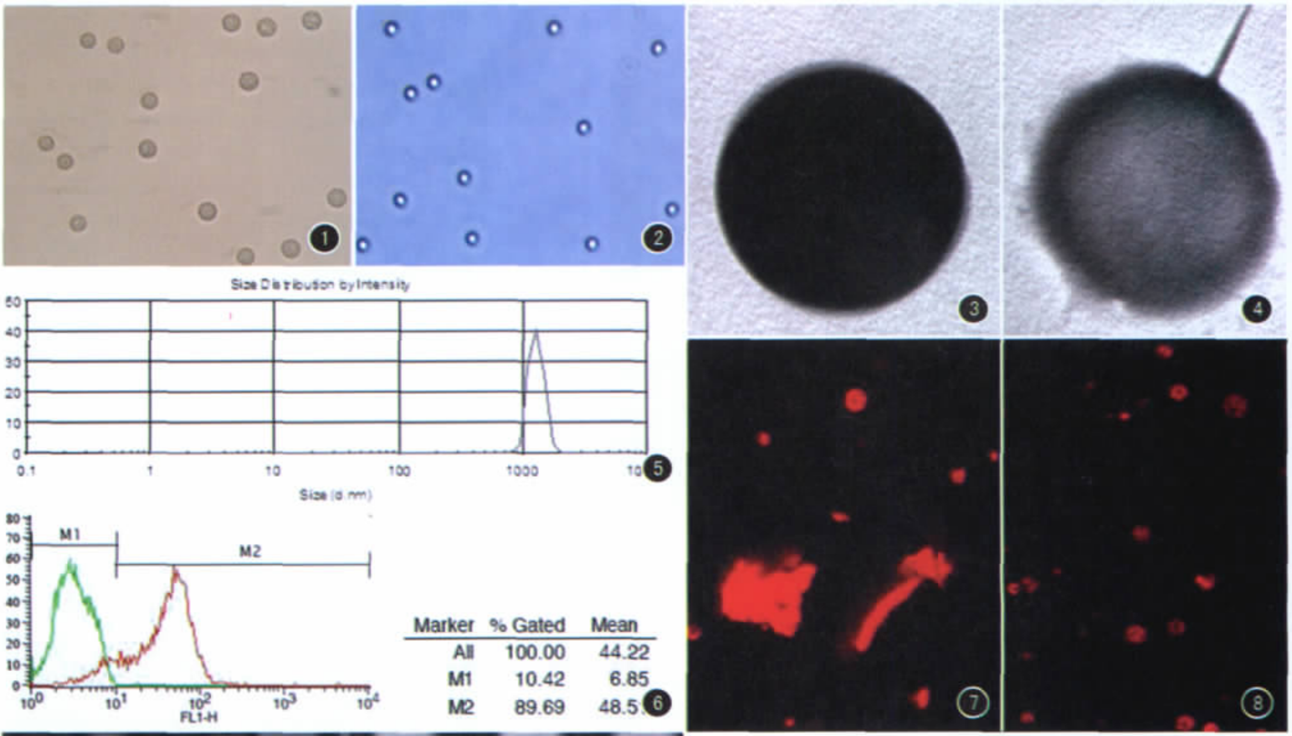
血栓是引发心肌梗死、缺血性脑卒中、肺栓塞等重大疾病的直接原因。目前，全球因血栓导致的死亡率正逐年增加。然而传统的影像学检查方法仍停留在解剖和生理功能的研究上，对它的早期诊断仍然有一定的局限性。分子影像学是传统的医学影像技术与现代分子生物学相结合而产生的一门新兴交叉学科，它可以在活体状态下对生物过程进行细胞和分子水平的定性和定量研究[5]。而在众多分子影像学技术中，MR 分子影像学近年来发展迅速[6]，它具有较高的组织分辨率、多参数、多方位成像等优点以及可同时获得解剖及生理信息，这些正是核医学、光学、超声成像等技术的劣势。MR 分子影像学的发展为血栓的早期诊断提供了一种新思路。

与其他纳米材料相比，PLGA 因其良好的生物相容性和生物可降解性、良好的成球或成膜性能以及生物体内半衰期长等优势已引起国内外学者的广泛关注并通过了美国食品及药物管理局(FDA)认证，被正式作为药用辅料收录进美国药典中。PLGA 通常用于制备静脉注射药物缓释制剂及仿生材料等，在给药、诊断、治疗、成像和组织工程中具有广阔的发展前景[7~10]。近年来，国外文献已成功将 Gd-DTPA 包裹入纳米微球中制备成 MR 分子探针，通过研究其理化特性、体外释放及在动物体内分布等特点，证实其生物毒性很低，而且在 1.5 T MR 可以显像，其显像能力类似于单独使用 Gd-DTPA 成像[11~14]。前期的研究亦得出相同的结论[3]。

大量研究证实活化血小板与纤维蛋白原(Fg)的特异结合是血栓形成的最后通路[15]。RGDS 肽为血小板膜糖蛋白 GPⅡb/Ⅲa 受体拮抗剂，由于其具有对血栓部位活化血小板的趋向性，能够通过与 Fg 竞争性抑制血小板积聚，黏附于血栓表面。国内学者曾将 RGDS 肽分别连接到脂质体及声诺维表面进行血栓靶向显像及超声介导助溶研究[4,16]。国外则将 RGDS 肽成功连接 PLGA，用于评价软骨细胞的黏附、增殖、活性及葡萄糖胺聚糖的分泌，但未见应用于靶向血栓的研究报道[17]。本实验先采用双乳化法制备 Gd-PLGA 微球，再采用碳二亚胺法构建靶向血栓 MR 分子探针[18,19]，并对构建的探针进行初步的体外寻靶实验研究，通过激光共聚焦显微镜证实其对离体血栓具有很强的亲和力，且在反复 PBS 冲洗的情况下，仍能与血栓稳定结合。

包封率是评价该分子探针性能的一个重要指

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



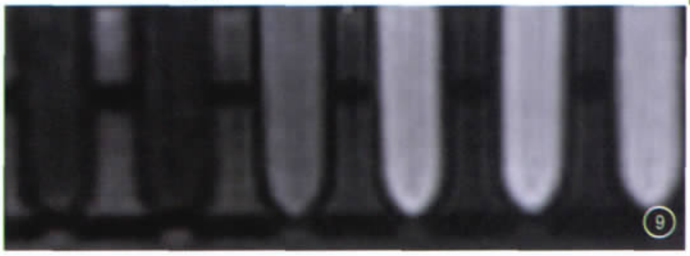


图1、2 普通光镜(×400)观察图。图1:靶向血栓MR分子探针;图2:空白PLGA微球 图3、4 透射电镜(×3200)观察图。图3:靶向血栓MR分子探针;图4:空白PLGA微球 图5 靶向血栓MR分子探针粒径分布图 图6 流式细胞仪检测图。绿线:对照组;红线:靶向MR分子探针 图7~8 激光共聚焦扫描显微镜(×400)观察图。图7:靶向血栓MR分子探针与血栓反应情况;图8:Gd-PLGA微球与血栓反应情况 图9 FSE-T_1WI。从左至右依次为8%明胶组、空白PLGA组、靶向血栓MR分子探针组(C1、C2、C3)、Gd-DTPA稀释100倍组

标,文献中测定包封率的常见方法有紫外分光光度法、高效液相色谱法(HPLC法)、原子吸收光谱法、电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP法)等。本实验采用ICP法,因为该方法快速简便,检测灵敏度高,精密度高,且无需使用危险的一氧化氮,不用钆灯。然而本实验测得的包封率并不高,可能与制备过程中不可避免的原材料损失、包裹药物释放等因素有关。笔者曾在前期研究中对Gd-PLGA微球制备工艺进行优化时发现外水相浓度与体积、内水相浓度与体积、超声的功率与作用时间、均质分散机转速等对包封率有影响,所以提高包封率是需要研究及解决的问题。

本研究在MR显影实验中,纵向弛豫时间的测量采用IR序列,它对分辨组织的T_1值极为敏感,反转时间(reversing time,TI)是IR序列图像对比的主要决定因素,尤其是T_1对比的决定因素,通过改变TI值最终可测得溶液的T_1值。笔者从实验结果发现空白PLGA微球组与8%明胶溶液组的差异无统计学意义,说明聚合物本身对纵向弛豫时间的影响可忽略不计;靶向血栓MR分子探针组与单纯的Gd-DTPA溶液相比,由于对比剂被包裹,阻碍了钆离子与周围水分子的相互作用,导致其弛豫性能下降,这与国外的研究结果相符[20]。有学者甚至采用了在微球表面共价结合Gd-DTPA和或Gd-DOTA的的方式来改善弛豫性能[21]。而采用双乳化溶剂挥发法制备的微球表面本身会形成很多孔隙,通过改变制备条件可以控制孔隙大小,有望实现在不影响水分子自由进出的同时对分子量为938的Gd-DTPA有阻挡作用,故尽管弛豫性能有下降,仍能满足MR显像,且随着Gd-DTPA浓度的增加,弛豫率亦有增加。

总之,采用双乳化法和碳二亚胺法可以成功构建靶向血栓MR分子探针,其对离体血栓具有较强的靶向性和稳定性,具备形态规则,显影效果较好等特点,有望为分子水平诊断血栓提供新技术、新方法。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献

1 Faisant N,Akiki J,Siepmann F,et al. Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: Experiment and theory. Int J Pharm,2006,314:189

2 Xie S,Wang S,Zhao B,et al. Effect of PLGA as a polymeric emulsifier on preparation of hydrophilic protein-loaded solid lipid nanoparticles. Colloids Surf B Biointerfaces,2008, 67:199

3 Ao M,Wang Z,Ran H,et al. Gd-DTPA-loaded PLGA microbubbles as both ultrasound contrast agent and MRI contrast agent-A feasibility research. J Biomed Mater Res B Appl Biomater,2010,93:551

4 杨钰楠,高云华,谭开彬,等. 超声介导携RGDS靶向超声造影剂对体外血栓的助溶研究. 中华超声影像学杂志,2006,15:624

5 林曰增,张雪林. 分子影像学研究进展. 临床放射学杂志,2003,22:77

6 Gore JC,Manning HC,Quarles CC,et al. Magnetic resonance in the era of molecular imaging of cancer. Magnetic Resonance Imaging,2011,29:587

7 Parveen S,Misra R,Sahoo SK. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. Nanomedicine,2012,8:147

8 Suri SS,Fenniri H,Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. J Occup Med Toxicol,2007,2:16

9 Doiron AL,Homan KA,Emelianov S,et al. Poly(Lactic-co-Glycolic) Acid as a Carrier for Imaging Contrast Agents. Pharmaceutical Research,2009,26:674

10 Tan H,Wu J,Lao L et al. Gelatin/chitosan/hyaluronan scaffold integrated with PLGA microspheres for cartilage tissue engineering. Acta Biomaterialia,2009,5:328

11 Liu Y,Chen Z,Liu C,et al. Gadolinium-loaded polymeric nanoparticles modified with Anti-VEGF as multifunctional MRI contrast agents for the diagnosis of liver cancer. Biomaterials,2011,32:5167

12 Doiron AL,Chu K,Ali A,et al. Preparation and initial characterization of biodegradable particles containing gadolinium-DTPA contrast agent for enhanced MRI. Proc Natl Acad Sci USA,2008,105:17232

13 Onuki Y,Jacobs I,Artemov D,et al. Noninvasive visualization of in vivo release and intratumoral distribution of surrogate MR contrast agent using the dual MR contrast technique. Biomaterials,2010,31:7132

14 Sitharaman B,Van Der Zande M,Ananta JS,et al. Magnetic resonance imaging studies on gadonanotube-reinforced biodegradable polymer nanocomposites. J Biomed Mater Res A,2010,93:1454

15 Gupta AS. Nanomedicine approaches in vascular disease: a review. Nanomedicine,2011,7:763

16 李玲,穆玉明,关丽娜,等. 携尿激酶靶向微泡造影剂的体外溶栓实验研究. 中国超声医学杂志,2009,25:628

17 Tan H,Huang D,Lao L,et al. RGD modified PLGA/gelatin microspheres as microcarriers for chondrocyte delivery,J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009,91:228

18 张瑜,郭大静,敖梦,等. 靶向血栓高分子超声造影剂的制备及其体外寻靶实验. 中国超声医学杂志,2012,28:289

19 孙昱飞,吴飞,邓小勇,等. 化学修饰方法对聚乙二醇功能化碳纳米管的影响. 无机化学学报,2008,24:98

20 Feshitan JA,Vlachos F,Sirsi SR,et al. Theranostic Gd(Ⅲ)-lipid microbubbles for MRI-guided focused ultrasound surgery. Biomaterials,2012,33:247

21 Ratzinger G,Agrawal P,Körner W,et al. Surface modification of PLGA nanospheres with Gd-DTPA and Gd-DOTA for high-relaxivity MRI contrast agents. Biomaterials,2010,31:8716

(收稿:2011-12-15 修回:2012-04-27)

◁消息▷

冯晓源教授连任国际放射学会执行委员会委员

第27届国际放射学大会(International Congress of Radiology)2012年5月初在巴西圣保罗市举行。会议期间,国际放射学会选举了新一届的执行委员会(Executive Committee of International Society of Radiology),中华放射学会主任委员、复旦大学医学院附属华山医院放射科主任冯晓源教授再次当选为执委会委员。

我国影像学家组团参会。冯晓源教授应邀在大会上作了两次主题报告。题目分别为“Health Care Reform in Asia”和“Clinical Application of MR Spectroscopy in Brain Tumors”。

(曹厚德)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net