

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2023.02.015

新型聚合物纳米造影剂的合成及 体内磁共振成像研究

孙天赐¹, 杨怀¹, 闫旭¹, 方蔚伟¹, 张培松², 何涛¹

(1. 合肥工业大学 化学与化工学院, 安徽 合肥 230009; 2. 武警安徽省总队医院 普外三科, 安徽 合肥 230061)

摘要:文章采用可逆加成-断裂链转移聚合(reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization, RAFT)方法, 聚合得到以疏水性共聚物链段作为内核, 亲水性共聚物链段作为支链的两亲性聚合物纳米颗粒, 与氯化钆(III)六水合物进行螯合反应后合成了一种新型的支化结构聚合物磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)纳米造影剂 P(DO3A-Gd³⁺)。安全性试验结果表明, P(DO3A-Gd³⁺)具有良好的生物安全性。体外 MRI 测试结果表明: P(DO3A-Gd³⁺)的弛豫率为 5.30 (mmol/L)⁻¹ · s⁻¹, 高于临床造影剂 Magnevist(2.94 (mmol/L)⁻¹ · s⁻¹); P(DO3A-Gd³⁺)具有显著的 MRI 造影增强效果。研究结果表明 P(DO3A-Gd³⁺)是一种优异的 MRI 造影剂, 具有临床转化的潜力。

关键词:聚合物纳米; 磁共振成像(MRI); 纳米造影剂; 生物安全性; 临床转化

中图分类号:O63 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-5060(2023)02-0241-05

Synthesis of novel polymer nano-contrast agents and study of *in vivo* magnetic resonance imaging

SUN Tianci¹, YANG Huai¹, YAN Xu¹, FANG Weiwei¹, ZHANG Peisong², HE Tao¹

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China; 2. The Third Department of General Surgery, Anhui Provincial Armed Police Corps Hospital, Hefei 230061, China)

Abstract: In this paper, a reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization (RAFT) method was used to polymerize amphiphilic polymer nanoparticles with hydrophobic copolymer segments as the core and hydrophilic copolymer segments as the branched chains. A new branched structure polymer magnetic resonance imaging(MRI) nano-contrast agent P(DO3A-Gd³⁺) was synthesized after chelating reaction of GdCl₃ · 6H₂O. The safety test results show that P(DO3A-Gd³⁺) has good biosafety. *In vitro* MRI test results show that the relaxation rate of P(DO3A-Gd³⁺) is 5.30 (mmol/L)⁻¹ · s⁻¹, which is higher than that of the clinical contrast agent Magnevist(2.94 (mmol/L)⁻¹ · s⁻¹). *In vitro* MRI test results show that P(DO3A-Gd³⁺) has a significant MRI contrast enhancement effect. The results show that P(DO3A-Gd³⁺) is an excellent MRI contrast agent and has the potential for clinical transformation.

Key words: polymer nanoparticles; magnetic resonance imaging(MRI); nano-contrast agent; biosafety; clinical transformation

磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)无辐射、安全性高、软组织分辨能力较强, 在临床影像医学肿瘤检测上应用广泛^[1]。MRI 通

常需要使用造影剂(contrast agent)进行高分辨的影像学诊断^[2]。临床上一般用低分子量的钆(Gd)类螯合物造影剂来提升磁共振信号, 如

收稿日期:2021-04-03; 修回日期:2021-05-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21574035)

作者简介:孙天赐(1995—), 男, 安徽阜阳人, 合肥工业大学硕士生;

何涛(1975—), 男, 安徽合肥人, 博士, 合肥工业大学教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: taohe@hfut.edu.cn.

Magnevist、Omniscan 等,但这些造影剂具有体内循环时间短、弛豫率低、用药量大等缺点^[3-5]。近年来,为了克服现有造影剂的缺点,纳米技术被广泛应用于 MRI 造影剂的研究中,相关研究表明尺寸小于 20 nm 的纳米造影剂具有较低的细胞摄取水平以及更长的体内滞留时间^[6-7]。两亲性聚合物纳米颗粒是良好的药物传递载体,将钆融入聚合物纳米中制备的纳米造影剂有良好的弛豫性能^[8]。两亲性聚合物纳米颗粒一般基于树枝状聚合物、星状聚合物等结构,或者是由两亲性共聚物自组装得到^[9]。但是树枝状聚合物、星状聚合物纳米合成步骤繁琐,提纯困难^[10];由两亲性共聚物自组装得到的聚合物纳米结构不稳定^[11]。因此,制备合成过程简单、无需自组装的两亲性聚合物纳米载体具有重要的科研和利用价值。

本文直接合成不需要自组装的两亲性支化共聚物纳米颗粒,并用于合成纳米造影剂。采用可逆加成-断裂链转移聚合(reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization, RAFT)方法,以疏水性单体甲基丙烯酸正丁酯(*n*-BMA)与交联剂乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)共聚物链段作为疏水性内核,亲水性单体寡聚乙二醇甲基丙烯酸酯(OEGMA)与含 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三乙酸三叔丁酯(DO3A)结构的单体共聚物链段作为亲水性支链形成两亲性支化聚合物纳米颗粒(P(DO3A)),与氯化钆(Ⅲ)六水合物($GdCl_3 \cdot 6H_2O$)进行螯合反应后合成了一种新型的 MRI 纳米造影剂 P(DO3A- Gd^{3+});研究了 P(DO3A- Gd^{3+})生物安全性以及 MRI 造影性能,结果表明:P(DO3A- Gd^{3+})具有良好的生物安全性以及显著的 MRI 造影增强效果;P(DO3A- Gd^{3+})纳米颗粒由单个支化聚合物纳米颗粒 P(DO3A)螯合 Gd^{3+} 构成,无需自组装,合成方法简单,可大量制备,有临床转化的潜力。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

4-氰基-4-(苯基碳硫硫基硫代)戊酸 N-琥珀酰亚胺酯(CTA-NHS)购于 Aldrich;寡聚乙二醇甲基丙烯酸酯(OEGMA, M_w 为 300)、甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)、溴乙酸(BA)、甲基丙烯酸正丁酯(*n*-BMA)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三乙酸叔丁醇乙酯(TBTT)、乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA),均购于 Aladdin;三氟乙酸

(TFA)、氯化钆(Ⅲ)六水合物($GdCl_3 \cdot 6H_2O$)、二氯甲烷(DCM)、乙腈、甲醇、N,N-二甲基甲酰胺(DMF),均购于国药集团。

采用安捷伦 VNMR S600 型核磁共振仪进行核磁共振氢谱(1H nuclear magnetic resonance, 1H NMR)测试;采用马尔文 MS-2000 型激光粒度分析仪进行动态光散射(dynamic light scattering, DLS)测试;采用日本 JEM-2100F 型场发射透射电子显微镜(field emission transmission electron microscope, FETEM)分析样品形貌结构。

1.2 实验过程

1.2.1 聚合物纳米造影剂的合成

聚合物纳米造影剂的合成过程如图 1 所示。

将 HEMA(1 mmol/L)与 BA(1.5 mmol/L)溶解在 20 mL DCM 中,反应 24 h,通过纯化得到产物 HEMA-BA。将 HEMA-BA(1 mmol/L)与 TBTT(1 mmol/L)溶解在 20 mL 乙腈中,反应 24 h,通过纯化得到产物 HEMA-TBTT。

链转移剂 CTA-NHS(0.1 mmol/L),单体 OEGMA(1 mmol/L)、HEMA-TBTT(0.5 mmol/L),引发剂 AIBN(0.01 mmol/L)在反应管中溶解于 3 mL DMF,随后在无氧条件下 70 °C 反应 12 h。反应结束后,减压除去溶剂,粗产物在甲醇中沉降 3 次,干燥得到共聚物 P1(POEGMA-HEMA-TBTT)。

将 P1(0.8 g, 1 mmol/L),单体 *n*-BMA(10 mmol/L),引发剂 AIBN(0.01 mmol/L),交联剂 EDGMA(0.15 mmol/L)溶解于 4 mL DMF 中,液氮冷冻脱气,70 °C 下反应 10 h。反应结束后,减压除去溶剂,粗产物在甲醇中沉降 3 次,干燥得到支化共聚物纳米颗粒 P2(PEGDMA-*n*-BMA-OEGMA-HEMA-TBTT)。

上述支化聚合物 P2(2.00 g)与 TFA(10 mL)溶解在 20 mL DCM 中,0 °C 下反应 4 h,切断 HEMA-TBTT 链段中的叔丁基。反应结束后,粗产物去除溶剂,用 5 mL THF 复溶,随后在冰的正己烷中沉降,真空干燥后得到产物 P3(PEGDMA-*n*-BMA-OEGMA-HEMA-DO3A),简称 P(DO3A)。

将 P3(1 g)溶解在 15 mL 异丙醇中,将 $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ (1.86 g, 5 mmol)溶解在 50 mL 乙酸铵中后与上述溶液混合,55 °C 下反应 24 h。反应结束后,混合溶液在水中透析 48 h,干燥后用 THF 复溶,随后在冰的正己烷中沉降,真空干燥后得到纳米造影剂 P4(P(DO3A- Gd^{3+}))。

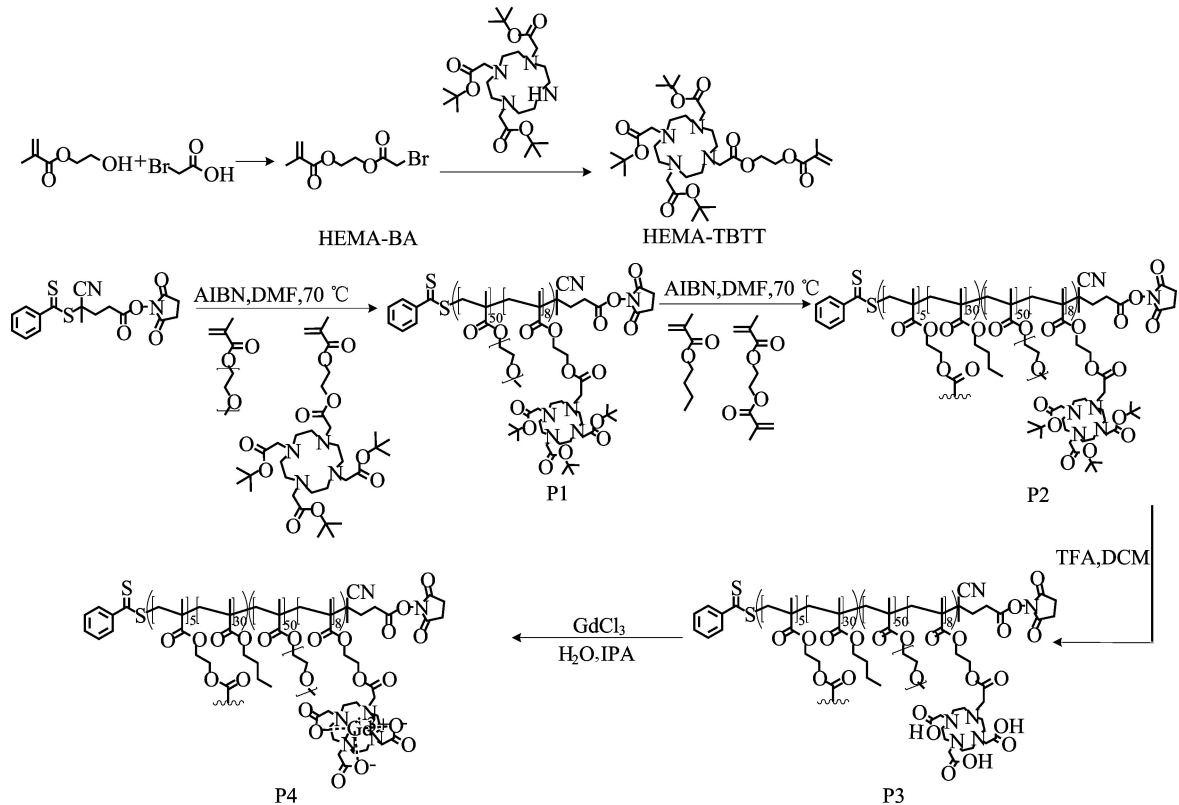


图1 聚合物纳米造影剂的合成过程

1.2.2 细胞安全性测试

细胞安全性的测试采用标准的3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)法^[12]。将小鼠乳腺癌细胞(4T1)以 5×10^4 个/孔接种于含有细胞培养基的96孔板中,然后加入不同浓度Gd³⁺的P(DO3A-Gd³⁺),在37 °C、5% CO₂环境下共培养24 h。采用PBS洗涤细胞3次,再在每个孔板中加入50 μL MTT(1 mg/mL),于37 °C继续培养4 h。接着去除上清液,加入100 μL二甲亚砜后摇匀,用分光光度酶标仪(Elx800, BioTek, USA)测定570 nm处的吸光度,相对细胞活性计算公式为:

$$\text{相对细胞活性} = (A_{\text{treated}} / A_{\text{control}}) \times 100\%$$

其中: A_{treated} 为P(DO3A-Gd³⁺)共培养后的吸光度; A_{control} 为培养液的吸光度值。

1.2.3 生物安全性测试

将10只新西兰小鼠(雄性,24 g)分为2组:一组通过尾静脉注射P(DO3A-Gd³⁺)作为实验组;另一组不做任何处理作为对照组。将2组小鼠在相同的环境下培育14 d,通过观察2组小鼠的生理状况来评估P(DO3A-Gd³⁺)的生物安全性。

1.2.4 体外弛豫率的测定

将P(DO3A-Gd³⁺)溶液以及Magnevist注射

液各稀释至含Gd³⁺浓度为0.025、0.050、0.100、0.200、0.400、0.800 mmol/L的水溶液,移至离心管中并置于临床Siemens Magnetom Trio 3.0T MR成像仪中扫描,测得不同浓度的纵向弛豫时间 T_1 ,仪器参数为:回波时间 T_E 为7 ms;重复时间 T_R 为31、300、700、1 400、2 500、3 500、5 500、7 500 ms。弛豫率 r_1 由纵向弛豫时间 T_1 的倒数对Gd³⁺浓度进行线性拟合得到。

1.2.5 体内MRI测试

用10%的水合氯醛麻醉25 g的小鼠后,尾静脉注射P(DO3A-Gd³⁺)水溶液(Gd约0.05 mmol/kg),置于临床Siemens Magnetom Trio 3.0T MR成像仪中扫描。分别收集0、60、120 min时的 T_1 加权图像。

2 结果与讨论

2.1 P(DO3A)的合成

聚合物纳米P(DO3A)的¹H NMR谱图如图2所示。

从图2可以看出,P2链段中各单体的主要氢质子的化学位移有 $\delta = 1.38$ 处表示HEMA-TBTT链段上叔丁基的质子峰; $\delta = 0.93$ 处表示聚合物主链上甲基的质子峰; $\delta = 1.80$ 处表示聚合物主链上亚甲基的质子峰; $\delta = 3.64$ 、 3.53 处表

示 POEGMA 链段上亚甲基的质子峰; $\delta=3.64$ 处归属于 POEGMA 链段上末端甲基的质子峰; $\delta=3.92, 1.59, 1.31$ 处表示 *n*-BMA 链段上亚甲基的质子峰; $\delta=0.85$ 处为 *n*-BMA 链段末端甲基的质子峰, 表明聚合物纳米 P(DO3A) 的成功合成。

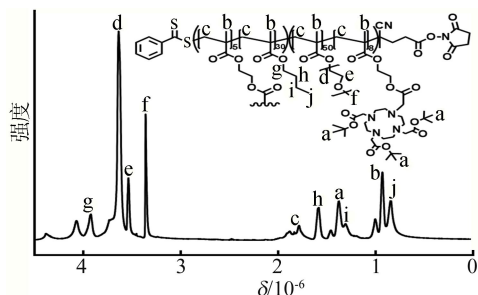


图 2 聚合物纳米 P(DO3A) 的 ^1H NMR 谱图

2.2 P(DO3A-Gd³⁺) 的形貌和尺寸分析

对螯合钆后的 P(DO3A-Gd³⁺) 纳米颗粒水溶液进行形貌和尺寸分析, 如图 3 所示。

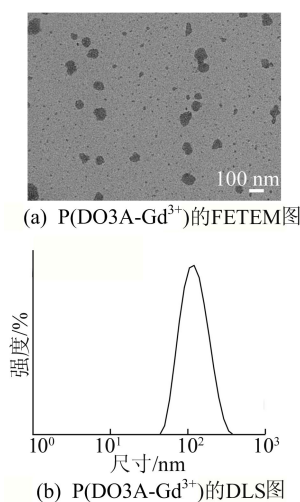


图 3 P(DO3A-Gd³⁺) 纳米颗粒水溶液形貌和尺寸

从图 3a 可以看出, 纳米颗粒的尺寸在 100 nm 左右, 呈单分散状态且形貌比较均一。从图 3b 可以看出, 纳米颗粒的尺寸在 110 nm 左右, 且分布均匀。一个 P(DO3A-Gd³⁺) 纳米颗粒由单个超支化聚合物纳米颗粒 P(DO3A) 螯合若干 Gd³⁺ 构成, 无需自组装, 因此呈单分散状态且形貌比较均一。Gd³⁺ 能稳定螯合在纳米颗粒内部, 不易泄露, 因此相对于小分子造影剂, P(DO3A-Gd³⁺) 具有更好的稳定性。均一的纳米尺寸能够提高 P(DO3A-Gd³⁺) 的细胞摄取性, 延长其在体内的循环时间。

2.3 P(DO3A-Gd³⁺) 的安全性分析

P(DO3A-Gd³⁺) 的细胞安全性用 MTT 法进

行衡量, 如图 4 所示。

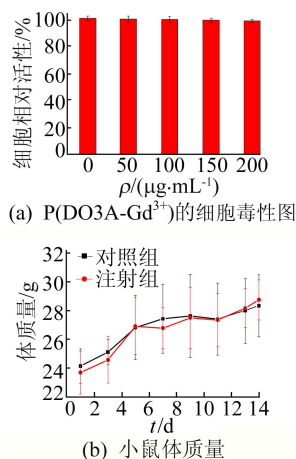


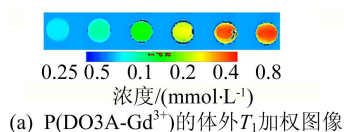
图 4 P(DO3A-Gd³⁺) 的细胞安全性 MTT 法衡量

从图 4a 可以看出, 当 P(DO3A-Gd³⁺) 的质量浓度大于 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 4T1 细胞相对细胞活性仍然高于 95%, 表明 P(DO3A-Gd³⁺) 具有很高的细胞安全性。

从图 4b 可以看出, 在相同环境下培养 14 d 内, 注射 P(DO3A-Gd³⁺) 的小鼠与未处理的正常小鼠体质量没出现明显差别。在实验过程中, 2 组小鼠生理状况良好, 全部存活, 表明 P(DO3A-Gd³⁺) 具有良好的生物安全性。

2.4 P(DO3A-Gd³⁺) 的体外弛豫率

P(DO3A-Gd³⁺) 的体外 T_1 加权图像和 P(DO3A-Gd³⁺)、Magnevist 的弛豫率 r_1 拟合图如图 5 所示。



(a) P(DO3A-Gd³⁺) 的体外 T_1 加权图像

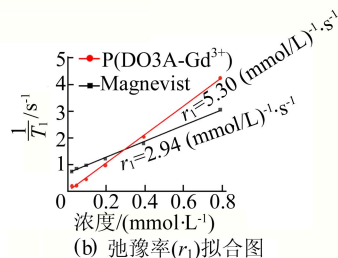


图 5 P(DO3A-Gd³⁺) 的体外 T_1 加权图像和弛豫率 r_1 拟合图

体外 MRI 成像结果表明 P(DO3A-Gd³⁺) 有显著的 MRI 增强效果; P(DO3A-Gd³⁺) 的弛豫率为 5.3 $(\text{mmol}/\text{L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 比临床造影剂 Magnevist (约 2.94 $(\text{mmol}/\text{L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 的高, 表明 P(DO3A-Gd³⁺) 弛豫性能更强, 从而能够在一定程度上降低用药量, 有良好的临床应用前景。

P(DO3A-Gd³⁺)中亲水的 POEGMA 和内部交联纳米结构能够有效地提高造影剂的水交换速率,进而提高弛豫率^[13-14]。

2.5 P(DO3A-Gd³⁺)的体内 MRI 成像

为进一步验证 P(DO3A-Gd³⁺)在体内的造影增强效果,采用尾静脉注射法将 P(DO3A-Gd³⁺)注射到已长出肿瘤的老鼠体内,在不同时间点对老鼠的肿瘤部位进行 MRI 扫描。不同时间点的 T₁ 加权图像如图 6 所示。从图 6 可以看出,在注射 P(DO3A-Gd³⁺)60 min 后肿瘤部位明显变亮,120 min 后仍然具有明显的造影效果,表明 P(DO3A-Gd³⁺)具有很好的 MRI 造影功能。

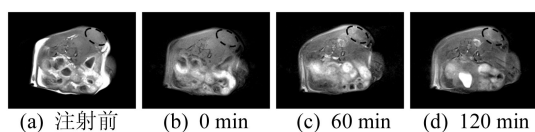


图 6 肿瘤鼠在注射 P(DO3A-Gd³⁺)后体内 T₁ 加权图像

3 结 论

本文通过可逆加成-断裂链转移聚合方法合成了一种不需要复杂自组装的两亲性支化共聚物纳米颗粒(PEGDMA-*n*-BMA-OEGMA-HEMA-DO3A),以该共聚物作为基体螯合 GdCl₃·6H₂O,制备了一种新型的聚合物 MRI 纳米造影剂 P(DO3A-Gd³⁺)并对其性能进行表征。其结构与尺寸测试结果表明,P(DO3A-Gd³⁺)纳米结构稳定;细胞安全性以及生物安全性测试结果表明,P(DO3A-Gd³⁺)具有良好的生物安全性;体外弛豫率测试结果表明,P(DO3A-Gd³⁺)具有很好的 MRI 造影增强效果。P(DO3A-Gd³⁺)的合成方法简单,可大量制备,相比于临床造影剂有更好的弛豫性能以及稳定性,同时体内循环时间更长、用量更低,有向临床转化的潜力。

[参 考 文 献]

- [1] SHERRY A D, WU Y. The importance of water exchange rates in the design of responsive agents for MRI[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2013, 17(2): 167-174.
- [2] 刘瑞清, 梁爽, 江存, 等. 含钆温度敏感高分子核磁共振成像(MRI)造影剂的制备及研究[J]. *高分子学报*, 2016, 47(2): 173-178.
- [3] FU Y J, RAATSCHEN H, NITECKI D E, et al. Cascade polymeric MRI contrast media derived from poly (ethylene glycol) cores: initial syntheses and characterizations[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(5): 1519-1529.
- [4] AIME S, BOTTA M, TERRENO E. Gd (III)-based contrast agents for MRI [J]. *Adv Inorg Chem* 2005, 57: 173-237.
- [5] CARAVAN P. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents[J]. *Chem Soc Rev*, 2006, 35(6): 512-523.
- [6] WANG T, HOSSANN M, RBINL H M, et al. In vitro characterization of phosphatidylglycerol-based thermo-sensitive liposomes with encapsulated 1H MR T1-shortening gadodiamide[J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2008, 3(1): 19-26.
- [7] ZHANG G D, ZHANG R, WEN X X, et al. Micelles based on biodegradable poly (L-glutamic acid)-b-poly lactide with paramagnetic gd ions chelated to the shell layer as a potential nanoscale mri-visible delivery system[J]. *Biomacromolecules*, 2008, 9(1): 36-42.
- [8] LI Y, LAYRENT S, ESSER L, et al. The precise molecular location of gadolinium atoms has a significant influence on the efficacy of nanoparticulate MRI positive contrast agents [J]. *Polym Chem*, 2014, 5(7): 2592-2601.
- [9] NICOLAS J, MURA S, BRAMBILLA D, et al. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery[J]. *Chem Soc Rev*, 2013, 42(3): 1147-1235.
- [10] LAUS S, SOUR A, RULOFF R, et al. Rotational dynamics account for Ph-dependent relaxivities of PAMAM dendrimeric, Gd-based potential MRI contrast agents [J]. *Chemistry*, 2005, 11(10): 3064-3076.
- [11] LI Y, BEIJA M, LAURENT S, et al. Macromolecular ligands for gadolinium MRI contrast agents[J]. *Macromolecules*, 2012, 45(10): 4196-4204.
- [12] LIU K, DONG L, XU Y, et al. Stable gadolinium based nanoscale lyophilized injection for enhanced MR angiography with efficient renal clearance[J]. *Biomaterials*, 2018, 158: 74-85.
- [13] PARAC-VOGT T N, KIMPE K, LAURENT S, et al. Synthesis, characterization, and pharmacokinetic evaluation of a potential MRI contrast agent containing two paramagnetic centers with albumin binding affinity[J]. *Chemistry*, 2005, 11(10): 3077-3086.
- [14] JACKSON A W, CHANDRASEKHARAN P, RAMASAMY B, et al. Octreotide functionalized nano-contrast agent for targeted magnetic resonance imaging[J]. *Biomacromolecules*, 2016, 17(12): 3902-3910.

(责任编辑 张 镗)