双亲性葡聚糖/氧化铁纳米复合物磁共振造影剂

王巧英*, 苏红莹*, 林玲, 夏春潮, 孙家瑜, 刘琛, 王志勇, 龚启勇, 宋彬, 郜发宝, 艾华†, 顾忠伟

四川大学国家生物医学材料工程技术研究中心, 成都 610064;

四川大学华西医院放射科, 成都 610041

* 同等贡献

† 联系人, E-mail: huaai@scu.edu.cn

2008-11-30 收稿, 2009-02-26 接受

新世纪人才计划(编号: NCET-06-0781)、四川省杰出青年基金(编号: 06ZQ026-007)、国家自然科学基金(批准号: 30570514, 50603015 和 508301017)和国家重点基础研究发展计划(编号: 2005CB623903)资助项目

摘要 超顺磁氧化铁(SPIO)纳米颗粒是一种高效的影像造影剂, 广泛应用于组织、细胞甚至分子水平的核磁共振显影中. 虽然在高温有机相条件下可合成粒度均一、尺寸可控的 SPIO 纳米粒, 但是需要将其转移至水相才能进一步用于生物体系. 本研究将聚己内酯接枝的葡聚糖(Dex-g-PCL)作为载体包裹多个 SPIO 纳米粒子, 并形成稳定的水相纳米复合物(直径 64 ± 22 nm). 在室温下(300 K)这种纳米复合物具有超顺磁性, 其饱和磁化强度为 88 emu/g Fe; 在外加磁场强度为 1.5 T 时, T_2 弛豫效能达到 $363 \text{ Fe (mmol/L)}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. 小鼠体内显影结果表明: 该纳米复合物能产生明显的肝脏对比效果, 静脉注射后 5 min, 肝脏信号强度显著降低了 60%. 普鲁士蓝染色结果显示肝脏枯否细胞在短时间(<4 h)只摄入较少剂量的造影剂, 相比之下, 注射后 24 h 枯否细胞内铁染色明显增强. 动态跟踪发现肝脏信号强度随着时间的推移逐渐回复, 注射后 24 h 和 10 d 的肝脏信号强度分别恢复至注射前 56% 和 69%. 该纳米复合物经注射后至少能持续 12 d 的肝脏显影效果, 并在 16 d 后恢复注射前的水平. 这种高灵敏度的磁共振探针有望在发现肝脏微小病变如早期肿瘤中起到关键作用.

关键词

超顺磁氧化铁
葡聚糖
胶束
磁共振
造影剂

超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)纳米颗粒不仅在电子领域而且还在磁共振成像、生物传感器、癌症热治疗和药物输送等生物医学领域得到了广泛的应用^[1~4]. 在高温条件下利用有机相合成方法, 可以获取大小均一、形态可控的高质量氧化铁纳米颗粒^[5~7]. 虽然这些纳米颗粒可以均匀分散在有机溶剂中, 但是为了能进一步应用在生物医学研究领域, 它们必须在水溶液中也取得均匀分散. 此外, 这些纳米颗粒还应满足以下两个基本条件: 首先, 相转移后分散于水相中的纳米粒子必须保持原有的磁学性质; 其次, 为了进一步应用于体内, 包被

材料应具有良好的生物相容性和生物降解性. 目前, 不同种类材料如小分子配体^[8,9]和基于聚乙二醇的聚合物^[10]已成功用于相转移. 转移后的水溶性 SPIO 纳米粒表现出良好的影像对比效应和生物相容性. 然而, 开发高灵敏度 SPIO 纳米复合物的探索工作仍在继续.

目前在影像探针的研究领域中, 可用作药物载体的聚合物胶束已受到越来越多的关注. 这些聚合物胶束通过双亲性两嵌段聚合物在水溶液中自组装而形成核-壳结构^[11,12]. 经自组装形成的聚合物胶束体系具有较低临界胶束浓度(CMC)、较低药物毒副作

引用格式: 王巧英, 苏红莹, 林玲, 等. 双亲性葡聚糖/氧化铁纳米复合物磁共振造影剂. 科学通报, 2009, 54(9): 1173~1180

Wang Q Y, Su H Y, Lin L, et al. Amphiphilic dextran/magnetite nanocomposites as magnetic resonance imaging probes. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0255-7

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2009-54-9-1173>

用和较长血液循环时间等优点,是包裹疏水性抗癌药物的良好载体^[13-16]. 聚合物胶束不仅可以作为小分子药物的载体,而且还能包裹功能性纳米粒子如磁性粒子^[14,17]和量子点等^[18,19],用于生物成像的研究. 聚合物胶束包裹纳米粒子所形成的纳米复合物除了保留纳米粒子原本的磁学和光学特性以外,还提高了它在体内体外的生物相容性. 尤其突出的是多个磁性纳米颗粒可在胶束疏水核内形成致密的团簇结构,从而在同样铁浓度下产生比单个氧化铁粒子更强的 T_2 效应^[17]. 这一独特结构是开发高灵敏度磁共振影像探针的重要基础.

多糖是一类具有良好生物相容性的天然聚合物,其中葡聚糖、透明质酸、硫酸软骨素和壳聚糖等目前均已在药物和基因转导中有广泛应用. 临床上,葡聚糖因其具有良好生物安全性而作为一种临时性的血浆替代品. 它也是 Feridex 和 Resovist 两种 SPIO 造影剂的包被材料. 然而,葡聚糖本身并不能够使疏水性 SPIO 颗粒在水溶液中稳定分散.

本研究选用双亲性葡聚糖作为载体包裹 SPIO 纳米粒子而形成纳米复合材料,其中双亲性多糖即以葡聚糖为主链并以聚己内酯作为疏水侧链而形成. 合成过程简述如下:用硅烷基化葡聚糖上游离的羟基引发,通过开环聚合而形成聚己内酯-葡聚糖聚合物. 聚己内酯接枝的葡聚糖在水溶液中包裹了多个疏水性超顺磁性氧化铁纳米粒子而形成稳定的胶体溶液. 用动态光散射、磁化强度和 T_2 弛豫效能(relaxivity)等参数来表征胶束的物理特性. 通过小鼠肝脏造影来评价该纳米复合材料的体内显影效果;通过静脉注射造影剂后在不同时间点对肝脏、脾脏进行组织病理学切片和染色,检测磁共振造影剂在体内的分布、细胞吞噬情况.

1 材料和方法

( ) 材料. 葡聚糖(Dextran T10, Pharmacia, Mw 10300, Mn 5900), 真空烘箱 90 °C 干燥后与干燥吡啶共沸除水 3 次; 六甲基二硅氮烷(HMDS, 科龙化学)减压蒸馏纯化; 三甲基氯硅烷(TMSCl, Sigma, 99%); 辛酸亚锡($\text{Sn}(\text{Oct})_2$, Fluka); 己内酯(CL, Fluka)经 CaH_2 处理过夜后减压蒸馏纯化; 甲苯、二甲亚砜(DMSO)经干燥重蒸处理. 乙酰丙酮铁($\text{Fe}(\text{acac})_3$)、1,2-十六烷醇、苯二甲醚、油酸和油胺购于 Aldrich 公司.

( ) SPIO 纳米颗粒的制备. 根据 Sun 等人^[21]的方法合成 SPIO 纳米粒. 将 1 mmol $\text{Fe}(\text{acac})_3$ 与 5 mmol 1,2-十六烷醇、3 mmol 油酸及 3 mmol 油胺混合于 10 mL 苯醚, 氩气保护下加热至 300 °C 回流 1 h. 溶液冷却至室温后用甲醇沉淀得到黑色固体, 将沉淀回溶于混合了油酸油胺的正己烷中, 再用甲醇沉淀, 得到的产物溶于正己烷中保存.

( ) 硅烷化葡聚糖(TMSD)的制备. Dex-g-PCL 的制备过程包括: 葡聚糖的硅烷化、CL 开环聚合和脱保护 3 个步骤(式 1). 根据文献^[20]报道, 将 0.25 g 干燥葡聚糖溶解于 10 mL DMSO 中, 氩气保护下加入适量的 HMDS 和 TMSCl, 反应 4 h 后加入 4 mL 甲苯, 使反应体系均匀清亮. 氩气保护下 50 °C 反应 20 h, 产物用冰庚烷沉淀后, 真空烘箱干燥. 硅烷化葡聚糖保护率计算公式如下^[21]:

$$\text{产量}(\%) = \frac{A_{\text{OSiMe}_3}}{A_{\text{glucosidicH}}} \times \frac{6 \times 100}{27}, \quad (1)$$

其中 A_{OSiMe_3} 表示三甲基硅烷在 0.15×10^{-6} 处的峰面积, $A_{\text{glucosidicH}}$ 表示糖单元上质子氢在 $3.0 \sim 4.0 \times 10^{-6}$ 的峰面积. 葡聚糖羟基取代度根据(2)式计算:

$$\text{DS} = \frac{3 \times \text{产量}(\%)}{100}. \quad (2)$$

( ) CL 的开环聚合. 根据文献^[22]报道, 实验采用 $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ 引发 CL 开环聚合合成 Dex-g-PCL. 将

式 1 Dex-g-PCL 合成示意图

甲苯共沸干燥后的硅烷化葡聚糖溶于干燥甲苯中,加入一定量的CL和 $\text{Sn}(\text{Oct})_2$,氩气保护下105℃反应48 h,冰庚烷沉淀得到产物。

TMSD-g-PCL中PCL的质量分数可以根据 ^1H NMR数据计算^[22]:

$$F_{\text{PCL}} = I_{\text{PCL}} \text{MW}_{\text{CL}} / \{ (I_{\text{PCL}} \text{MW}_{\text{CL}}) + ((I_{\text{dextran}} / 3) [\text{MW}_{\text{GL}} + (\text{DS} \times \text{MW}_{\text{SiMe}_3}) + [(3 - \text{DS}) \times (\text{MW}_{\text{H}})]) \} \quad (3)$$

其中 I_{PCL} 表示 4.00×10^{-6} (“ $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$ ”)和 2.27×10^{-6} (“ $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ ”)处亚甲基质子氢峰面积的平均值; I_{dextran} 表示糖单元上质子氢在 $3.0 \times 10^{-6} \sim 4.0 \times 10^{-6}$ 的峰面积;DS为硅烷取代度; MW_{CL} , $\text{MW}_{\text{SiMe}_3}$, MW_{H} 和 MW_{GL} 分别为114.1, 73.2, 1.0和159.1。

( ) 硅烷化Dex-g-PCL的脱保护。将上述方法合成的TMSD-g-PCL分散在含0.1 M HCl的二氧六环中,室温搅拌2 h后用冰庚烷沉淀,于真空烘箱中干燥。

( ) 双亲性葡聚糖的表征。以 d_6 -DMSO, CDCl_3 (TMS为内标)和 D_2O 为溶剂,用Bruker AM 400 (400 MHz)获得不同反应阶段聚合物的核磁氢谱。用Perkin-Elmer红外光谱仪获得聚合物的红外吸收光谱。

( ) Dex-g-PCL/SPIO纳米复合物的制备。用乳液挥发法^[17]可获得Dex-g-PCL/SPIO纳米复合物。按照聚合物/SPIO等于3的质量比,将适量的聚合物和SPIO分散于0.5 mL氯仿,并将其加至5 mL纯水中,用探头超声(SONICS, US)分散,氯仿挥发后即得到水相中的Dex-g-PCL/SPIO纳米复合物。该纳米复合物的粒度分布和形貌分别通过Malvern Nanosizer粒度仪和扫描电子显微镜(Hitachi S-4800, Japan)进行表征。

( ) 磁化强度和 T_2 弛豫效能(relaxivity)。用原子吸收仪(AA800, Perkin-Elmer, US)的元素分析法测量聚己内酯-葡聚糖纳米复合材料中的铁含量。样品冻干后在室温下通过超导量子干涉磁量仪(Quantum Design, San Diego, US)检测纳米复合物的磁学特性($-10 \sim 10$ kOe范围内4个象限)。按文献所述方法^[17]利用临床1.5 T磁共振扫描仪(Siemens)在室温条件下测量样品的 T_2 弛豫效能。

( ) 体内磁共振成像研究。实验中所有动物方案均已通过实验动物研究委员会许可。在临床3T磁

共振扫描仪(Philips)上,使用小鼠专用线圈作为信号发射和接收系统进行磁共振图像信号采集。所有图像采集过程均使用同样的 T_2 加权TSE序列,参数如下:重复时间(TR) = 1000 ms,回波时间(TE) = 80 ms,FOV = $25 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$;层厚 = 1.6 mm;偏转角 = 90° 。用戊巴比妥钠按40 mg/kg体重的剂量腹腔注射麻醉小鼠后,在注射造影剂(注射剂量:铁浓度为2.5 mg Fe/Kg体重)之前进行磁共振平扫,注射后从5 min到16 d中的不同时间点进行磁共振扫描。分别测量注射前和注射后不同时间点肝脏的信号强度,然后以相对信号强度为纵轴,以时间为横轴作图。

( ) 组织学分析。尾静脉注射Dex-g-PCL/SPIO纳米复合材料后,在不同时间点分别将小鼠的肝脏和脾脏组织取下,用中性福尔马林固定组织48 h后,进行组织学包埋和切片。相邻组织切片分别进行苏木素-伊红(HE)组织染色和普鲁士蓝(Prussian blue)铁染色。

2 结果和讨论

2.1 Dex-g-PCL的合成和表征

双亲性梳状接枝共聚物的合成路线如示意式1所示。主要包括3个步骤:( )以HMDS为保护基团,

图1 葡聚糖(1), TMSD-g-PCL(2)和Dex-g-PCL(3)的 ^1H NMR谱图

溶剂分别为 D_2O (1), CDCl_3 (2), d_6 -DMSO (3); 室温

将葡聚糖上的大部分羟基硅烷化; ( ) 硅烷化葡聚糖上的游离羟基引发 PCL 单体开环聚合; ( ) 硅烷化羟基的脱保护. 为了控制 PCL 的接枝率和硅烷化葡聚糖在有机溶剂中的溶解性, 硅烷保护率控制在 80% 以上.

图 1 显示了葡聚糖、TMSD-g-PCL 和 Dex-g-PCL 的核磁图谱. 相对于纯葡聚糖, TMSD-g-PCL 的氢谱中出现了与 PCL 和 -OSiMe₃ 质子氢对应峰: ($\times 10^{-6}$) 1.39 (PCL-COCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂O-), 1.66 (PCL-COCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂O-), 2.27 (PCL-COCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂O-), 4.00 (PCL-COCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂O-), 0.15 (-OSi(CH₃)₃). 根据三甲基硅烷在 0.15×10^{-6} 处的峰面积和糖环上质子氢在 $3.0 \times 10^{-6} \sim 4.0 \times 10^{-6}$ 的峰面积, 可由(1)式计算出葡聚糖的硅烷保护率为 91.5%; (2)式计算出取代度为 2.7; (3)式计算出 PCL 占 TMSD-g-PCL 质量分数约为 0.55(氘代氯仿为溶剂). 另外, 硅烷化保护羟基的可逆性也可从图 1(2)和(3)中得到证明.

图 2 为葡聚糖、TMSD 和 Dex-g-PCL 的 FT-IR 谱图. 相对于纯的葡聚糖, TMSD 在 748, 844, 874, 1020, 1164, 1252 cm⁻¹ 处出现了三甲基硅烷的吸收峰, 而这些峰在脱保护的 Dex-g-PCL 谱图上的消失, 再次说明了硅烷化保护羟基的可逆性, 与文献[22]报道相符. 此外, 脱保护后的 Dex-g-PCL 在 3500 cm⁻¹ 处的羟基吸收峰又恢复到与纯葡聚糖相似的水平. 再有, Dex-g-PCL 谱图上 1726 cm⁻¹ 处的 C=O 特征峰也证明了 PCL 与葡聚糖的成功接枝.

图 2 葡聚糖、TMSD 及 Dex-g-PCL 的 FT-IR 谱图

2.2 Dex-g-PCL/SPIO 纳米复合物的制备

通过 Sun 等人[21]的 One-pot 反应所得到的单分散 SPIO 纳米晶体易与副产物和溶剂分离. 图 3(a) 为溶于

正己烷的 SPIO 纳米粒动态光散射粒度分布数据, 结果显示 SPIO 粒径为 (10.1 ± 2.5) nm. 相比之下, 包裹了多个 SPIO 晶体的胶束粒径为 (64.2 ± 22.2) nm (图 3(b)), 明显大于有机溶剂中单个 SPIO 纳米粒, 粒径的增加主要是由于双亲葡聚糖的包裹和多个 SPIO 的装载. 从电镜照片中可以看到 (图 3(c)), 球形胶束的平均尺寸有所增加, 这主要由样品干燥过程中胶束的塌陷所致.

图 3 有机相(正己烷)SPIO 纳米晶体(a)及水相 Dex-g-PCL/SPIO 纳米复合物的粒径分布图(b)和扫描电子显微镜图(c)

2.3 Dex-g-PCL/SPIO 纳米复合物的磁学性能和横向弛豫效能

SPIO 纳米晶体在室温下呈超顺磁状态, 饱和磁化强度为 102 emu/g Fe^[23]. SPIO 纳米粒不同于顺磁材

料,其磁化强度不随外加磁场的改变而发生线性变化.通过对冻干纳米复合物的磁性测量发现:撤去外加磁场后其剩余净磁为0,这说明 $T = 300\text{ K}$ 时Dex-g-PCL/SPIO纳米复合物是超顺磁的(图4),其中 $1\text{ Oe} = 79.5775\text{ A/m}$.在外加磁场的作用下,纳米晶体由无序排列状态变成与外加磁场方向相同的排列,并且很快达到其饱和度(σ_s),即稍大于 88 emu/g Fe . Dex-g-PCL/SPIO纳米复合物的饱和磁场强度低于单个SPIO纳米晶体,这一现象与文献报道的聚合物包裹多个亲水磁性纳米粒子^[25]结果一致,其确切机制还有待于进一步研究.

图4 Dex-g-PCL/SPIO 纳米复合材料的磁滞回线(300 K)

为了解Dex-g-PCL/SPIO纳米复合材料作为MRI造影剂的效果,我们进一步在临床磁共振扫描仪上测量了其弛豫效能.这种SPIO造影剂明显缩短了横向弛豫时间,其显影能力主要表现为横向弛豫效能,即单位铁浓度的弛豫效率,表达为 $\text{Fe mmol/L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. SPIO纳米胶束在不同铁浓度下的横向弛豫效率见图5(a).在 1.5 T 磁场强度和室温下,包裹多个SPIO纳米粒胶束的横向弛豫效能为 $363\text{ Fe mmol/L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,这种高弛豫效能主要归于SPIO粒子在胶束内的独特聚集结构.自旋-自旋弛豫(spin-spin relaxation)反映了磁性粒子改变局部磁场均匀程度的能力^[24].包裹多个SPIO纳米粒子的复合材料在相同单位铁浓度时比单一SPIO纳米粒子具有更高的磁矩,能够增加局部磁场的均匀程度.聚乙二醇-聚己内酯/SPIO纳米粒复合物和中性聚电解质/SPIO复合物也存在类似的现象^[17,26].目前有多种理论解释单一包裹的SPIO纳米粒子的弛豫机制^[27],但多个SPIO纳米粒聚集结构的弛豫机制还有待探讨.

为了检测该造影剂的显影对比能力,我们将

图5 Dex-g-PCL/SPIO 纳米复合材料在室温、不同铁浓度下的 T_2 弛豫效率/铁浓度曲线(a)和显影效果(b)

Dex-g-PCL/SPIO 纳米复合材料在 T_2 加权序列上的灵敏度作了如下定义:使水溶液磁共振信号强度降低50%时复合材料的铁浓度(磁场强度 1.5 T ,自旋回波序列: $\text{TR} = 5000\text{ ms}$, $\text{TE} = 35\text{ ms}$).实验中我们发现包裹多个SPIO纳米粒子胶束的探测灵敏度是 0.06 Fe mmol/L .该灵敏度对于在分子和细胞水平发现微小病理改变具有非常重要的意义.

2.4 体内磁共振成像研究

SPIO类造影剂经静脉注射后,很快会被肝脏枯否细胞吞噬,从而造成局部磁场的不均匀,明显缩短肝脏组织横向弛豫时间;肿瘤组织因不含有枯否细胞而信号强度保持不变.因此可有效提高病灶和正常组织之间的信号对比度.这种特点使它在诊断肝脏小肿瘤、转移性病灶、肝脏纤维化、肝硬化和其它肝脏病变方面具有广阔的应用前景^[28-30].磁共振扫描图像的信号强度主要取决于以下因素:造影剂的 T_2 弛豫效能、药代动力学和注射剂量,以及线圈类型和扫描序列参数. Dex-g-PCL/SPIO复合物横向弛豫效能为 $363\text{ Fe mmol/L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,远远高于目前市场上的SPIO类造影剂如 Feridex ($98\text{ Fe mmol/L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)和 Resovist ($151\text{ Fe mmol/L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)^[31].此外,脉冲序列的选择对造影剂的诊断效果也起着至关重要的作用.在诊断肝脏疾病方面,快速自旋回波序列(turbo spin-echo, TSE)和快速梯度回波序列 (gradient-recalled echo, GRE)是目前被认为是最常用的两种脉冲序列.

本研究最初使用 T_2^* 加权GRE序列和 T_2 加权TSE序

列进行预实验. 结果发现: 与 T_2^* 加权GRE序列相比, T_2 加权TSE序列能够获取高质量的影像图片. 类似结果也有相关文献报道: T_2^* 加权GRE序列对运动伪影如呼吸更加敏感^[30,32], 而呼吸运动可以严重影响图片的质量. 所以本研究整个实验过程中均使用 T_2 加权TSE序列. 为了在同一标准下获取肝脏信号强度, 本实验过程使用同样的序列参数: TR = 1000 ms, TE = 80 ms. 分别采集注射前和注射后从5 min到16 d的肝脏图像(图6(a)). 从图中我们可以看出: 与胆囊的高信号相比, 尾静脉注射纳米复合物5 min后开始出现肝脏信号强度明显降低, 该对比度可持续很长时间.

图6 小鼠在注射造影剂前后不同时间点肝脏 T_2 加权TSE序列扫描所得到的图片(a)和相对信号强度变化图(b)

注射后不同时间点的平均相对信号强度见图6(b). 根据文献报道相对信号强度变化可以定义为: ((注射前信号强度-注射后信号强度)/注射前信号强度)*(-100)^[33]. 注射纳米胶束复合物5 min后出现明显的肝脏显影对比度提高, 肝脏信号强度改变为-60%. 注射

后3 h和24 h, 肝脏信号强度分别恢复到注射前的51%和56%, 肝脏信号强度的改变随着时间的推移逐渐减少, 最终肝脏信号强度在注射后16 d恢复到注射前水平. 临床常用肝脏SPIO造影剂如Feridex和Resovist在注射后也会在很短时间内产生明显的信号改变^[30,34]. 据报道: 注射Resovist后, 肝脏信号强度在10 min内迅速降低, 相对信号强度变化为-57.7%, 在注射后10~40 min期间, 这种强对比度有利于观察肝脏病变^[30,35]. Dex-g-PCL/SPIO造影剂所引起的显著信号变化对于发现肝脏微小病变有较好的应用前景.

Dex-g-PCL/SPIO造影剂能持续12 d的肝脏显影效果. 临床研究表明: Resovist的肝脏显影效果持续至少1 d, 有的病人可达到4 d, 而Feridex能持续一周^[30]. 长期以来一直认为SPIO造影剂是网状内皮特异性对比剂^[31]. 许多因素包括粒子大小、表面包被材料、表面电荷等都可以影响其药代动力学参数, 从而决定在血液循环中的时间长短和与枯否细胞的作用方式. Feridex的表面包被材料是葡聚糖, Resovist以羧基化的葡聚糖作为表面包被物质, 本研究选用聚己内酯接枝的葡聚糖来包被SPIO纳米粒子, 和商品化的SPIO造影剂具有相似的包被物质. 静脉注射造影剂4 h后, 普鲁士蓝染色发现: 只有少数的蓝色颗粒沉积在肝脏和脾脏组织, 这表明此时的肝脏对比效应主要是因为纳米粒子分布、停留在细胞外液如血液循环中所致. 注射造影剂后24 h, 在组织切片中发现枯否细胞内有更多的纳米铁粒子沉积(图7(a)). 这

图7 注射Dex-g-PCL/SPIO造影剂24 h后小鼠肝脏((a)普鲁士蓝染色; (b) HE染色)、脾脏((c)普鲁士蓝染色; (d) HE染色)的相邻组织切片

(a) 中短箭头所指铁染色为枯否细胞, (c) 短箭头所指铁染色在脾脏的红髓区(WP = 白髓; RP = 红髓)

些结果表明: 在注射后较长时间的肝脏对比效应可能主要与网状内皮系统细胞的吞噬作用有关, 同时也归结于分布在细胞外液的一小部分纳米粒子。有文献报道: 按 $150 \mu\text{mol Fe/kg}$ 剂量注射大鼠后, 发现网状内皮系统的吞噬作用主要发生在注射后 8~24 h 之间, 与本研究结果相似^[36]。脾脏组织普鲁士蓝染色结果发现: 蓝色颗粒大部分沉积在红髓(图 7(c)), 主要因为红髓内的巨噬细胞具备吞噬和排出异物的功能^[37]。本研究中铁运输和代谢的确切机制尚不完全清楚, 而以羧基化葡聚糖和葡聚糖为包被物质的 Resovist 或 Feridex 被细胞吞噬后在水解酶的作用下氧化铁失去其晶体结构, 从而降低横向弛豫效能^[24]。

3 结论

总之, 通过有机相合成的疏水性超顺磁氧化铁 (SPIO) 纳米晶体, 可以借助聚己内酯接枝的葡聚糖 (Dex-g-PCL) 进行自组装而均匀分散于水相。在水溶液中, SPIO 纳米晶体装载于 Dex-g-PCL 胶束核内并形成稳定的复合胶束体系, 其平均直径小于 100 nm。该纳米复合材料在室温下具有超顺磁性, 其横向弛豫效能为 $363 \text{ Fe mmol/L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 高于目前市场上的 SPIO 类造影剂。体内磁共振显影结果表明: 静脉注射造影剂 5 min 后, 在 T_2 加权 TSE 序列上小鼠肝脏信号强度较注射前降低大约 60%, 显影对比效果可持续至少 12 d。这种新型纳米复合材料有望用于肝脏微小病变的早期诊断。

参考文献

- 1 冯琳, 宋延林, 万梅香, 等. 磁性氧化铁纳米粒子的研究进展. 科学通报, 2001, 46(16): 1321—1324
- 2 鄢国平, 卓仁禧. 磁共振成像造影剂的研究进展. 科学通报, 2001, 46(7): 531—538
- 3 Bulte J W, Kraitchman D L. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. NMR Biomed, 2004, 17: 484—499[doi]
- 4 Weissleder R, Mahmood U. Molecular Imaging. Radiology, 2001, 219: 316—333
- 5 Jana N R, Chen Y, Peng X. Size- and shape-controlled magnetic (Cr, Mn, Fe, Co, Ni) oxide nanocrystals via a simple and general approach. Chem Mater, 2004, 16: 3931—3935[doi]
- 6 Park J, An K, Hwang Y, et al. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. Nat Mater, 2004, 3: 891—895[doi]
- 7 Sun S H, Zeng H, Robinson D B, et al. Monodisperse MFe_2O_4 (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. J Am Chem Soc, 2004, 126: 273—279[doi]
- 8 Jun Y W, Huh Y M, Choi J S, et al. Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. J Am Chem Soc, 2005, 127: 5732—5733[doi]
- 9 Song H T, Choi J S, Huh Y M, et al. Surface modulation of magnetic nanocrystals in the development of highly efficient magnetic resonance probes for intracellular labeling. J Am Chem Soc, 2005, 127: 9992—9993[doi]
- 10 Kim S W, Kim S, Tracy J B, et al. Phosphine oxide polymer for water-soluble nanoparticles. J Am Chem Soc, 2005, 127: 4556—4557[doi]
- 11 Kakizawa Y, Kataoka K. Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54: 203—222[doi]
- 12 Kwon G S, Okano T. Polymeric micelles as new drug carriers. Adv Drug Deliv Rev, 1996, 21: 107—116[doi]
- 13 Croy S R, Kwon G S. Polymeric micelles for drug delivery. Curr Pharm Des, 2006, 12: 4669—4684[doi]
- 14 Nasongkla N, Bey E, Ren J, et al. Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems. Nano Lett, 2006, 6: 2427—2430[doi]
- 15 Nasongkla N, Shuai X, Ai H, et al. cRGD-functionalized polymer micelles for targeted doxorubicin delivery. Angew Chem Int Ed Engl, 2004, 43: 6323—6327[doi]
- 16 Shuai X, Ai H, Nasongkla N, et al. Micellar carriers based on block copolymers of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) for doxorubicin delivery. J Control Release, 2004, 98: 415—426[doi]
- 17 Ai H, Flask C, Weinberg B, et al. Magnetite-loaded polymeric micelles as ultrasensitive magnetic-resonance probes. Adv Mater, 2005, 17: 1949—1952[doi]
- 18 Dubertret B, Skourides P, Norris D J, et al. *In vivo* imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. Science, 2002, 298: 1759—1762[doi]
- 19 Gao X, Cui Y, Levenson R M, et al. *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. Nat Biotechnol Rev, 2004, 22: 969—976[doi]

- 20 Nouvel C, Dubois P, Dellacherie E, et al. Silylation reaction of dextran: Effect of experimental conditions on silylation yield, regioselectivity, and chemical stability of silylated dextrans. *Biomacromolecules*, 2003, 4: 1443—1450[[doi](#)]
- 21 Bajgai M P, Aryal S, Lee D R, et al. Physicochemical characterization of self-assembled poly(epsilon-caprolactone) grafted dextran nanoparticles. *Colloid Polym Sci*, 2008, 286: 517—524[[doi](#)]
- 22 Ydens I, Rutot D, Degee P, et al. Controlled synthesis of poly(epsilon-caprolactone)-grafted dextran copolymers as potential environmentally friendly surfactants. *Macromolecules*, 2000, 33: 6713—6721[[doi](#)]
- 23 Xie J, Peng S, Brower N, et al. One-pot synthesis of monodisperse iron oxide nanoparticles for potential biomedical applications. *Pure Appl Chem*, 2006, 78: 1003—1014[[doi](#)]
- 24 Josephson L, Lewis J, Jacobs P, et al. The effects of iron oxides on proton relaxivity. *Magn Reson Imaging*, 1988, 6: 647—653[[doi](#)]
- 25 Ditsch A, Laibinis P E, Wang D I C, et al. Controlled clustering and enhanced stability of polymer-coated magnetic nanoparticles. *Langmuir*, 2005, 21: 6006—6018[[doi](#)]
- 26 Berret J F, Schonbeck N, Gazeau F, et al. Controlled clustering of superparamagnetic nanoparticles using block copolymers: Design of new contrast agents for magnetic resonance imaging. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 1755—1761[[doi](#)]
- 27 Koenig S H, Kellar K E. Theory of $1/T_1$ and $1/T_2$ NMRD profiles of solutions of magnetic nanoparticles. *Magn Reson Med*, 1995, 34: 227—233[[doi](#)]
- 28 Aguirre D A, Behling C A, Alpert E, et al. Liver fibrosis: Noninvasive diagnosis with double contrast material-enhanced MR imaging. *Radiology*, 2006, 239: 425—437[[doi](#)]
- 29 Kato N, Ihara S, Tsujimoto T, et al. Effect of resovist on rats with different severities of liver cirrhosis. *Invest Radiol*, 2002, 37: 292—298[[doi](#)]
- 30 Reimer P, Balzer T. Ferucarbotran (Resovist): A new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications. *Eur Radiol*, 2003, 13: 1266—1276
- 31 Wang Y X, Hussain S M, Krestin G P. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: Physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol*, 2001, 11: 2319—2331[[doi](#)]
- 32 Kim S H, Choi D, Lim H K, et al. Detection of hepatic VX2 carcinomas with ferucarbotran-enhanced magnetic resonance imaging in rabbits: Comparison of nine pulse sequences. *Eur J Radiol*, 2006, 59: 413—423[[doi](#)]
- 33 Reimer P, Muller M, Marx C, et al. Evaluation of the time window for Resovist-enhanced T2-weighted MRI of the liver. *Acad Radiol*, 2002, 9(Suppl 2): S336—338[[doi](#)]
- 34 Weissleder R, Hahn P F, Stark D D, et al. Superparamagnetic iron oxide: enhanced detection of focal splenic tumors with MR imaging. *Radiology*, 1998, 169: 399—403
- 35 Shamsi K, Balzer T, Saini S, et al. Superparamagnetic iron oxide particles (SH U 555 A): evaluation of efficacy in three doses for hepatic MR imaging. *Radiology*, 1998, 206: 365—371
- 36 Van Beers B E, Sempoux C, Materne R, et al. Biodistribution of ultrasmall iron oxide particles in the rat liver. *J Magn Reson Imaging*, 2001, 13: 594—599[[doi](#)]
- 37 Moghimi S M, Hunter A C, Murray J C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacol Rev*, 2001, 53: 283—318