

◆ 实验研究

Preparation of gadolinium-loaded stearic acid grafted chitooligosaccharide and application in pancreatic tumor imaging

ZHANG Weihua¹, ZHENG Shuangshuang¹, YAO Xiuzhong², DU Bin¹, WENG Weiyu^{1*}

(1. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Department of Radiology, Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective** To prepare gadolinium-loaded stearic acid grafted chitooligosaccharide (COSSA-DTPA-Gd) and evaluate its micelle properties, cytotoxicity, relaxation rate in vitro, and pancreatic tumor in vivo imaging. **Methods** Stearic acid grafted chitooligosaccharide (COSSA) was synthesized by acetylation reaction between stearic acid and chitooligosaccharide. Diethylenetriaminepentaacetic dianhydride (DTPA) was conjugated to the residual amino groups of COSSA, then Gd^{3+} was chelated to obtain the final product. The micelle properties were measured using an electron microscopy and a laser particle sizer. The MTT assay was adopted to determine cytotoxicity. The in vitro relaxation rate and in vivo imaging of pancreatic tumor were evaluated using an MR scanner. **Results** COSSA-DTPA-Gd could self-assemble into stable micelles in aqueous solutions with a critical micelle concentration of $(5.12 \pm 0.43) \mu\text{g/ml}$. The micelles had positive charge and exhibited roughly spherical shape with a mean diameter of $(58.3 \pm 5.7) \text{nm}$. The content of Gd^{3+} in COSSA-DTPA-Gd was $330.31 \mu\text{mol/g}$. The nanoprobe and Magnevist, the commercial formulation, showed similar cytotoxicity ($P > 0.05$). The cell survival rate within 24 h were higher than 85%. The in vitro relaxation rate of COSSA-DTPA-Gd was $8.23 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. After intravenous injection, COSSA-DTPA-Gd showed a better positive contrast-enhancing effect for pancreatic tumor than Magnevist. The MR images at the tumor periphery was rapidly enhanced, while a slow increase in image quality was observed in tumor core. **Conclusion** The prepared COSSA-DTPA-Gd can be used for efficient MR imaging of pancreatic tumor.

[Key words] Gadolinium; Chitooligosaccharide; Micelles; Magnetic resonance imaging; Pancreatic neoplasms

DOI: 10.13929/j.1003-3289.201609159

荷钆硬脂酰壳寡糖的制备及其在胰腺癌成像中的应用

张炜华¹, 郑双双¹, 姚秀忠², 杜斌¹, 翁伟宇^{1*}

(1. 华东理工大学药学院, 上海 200237; 2. 复旦大学附属中山医院放射科, 上海 200032)

[摘要] **目的** 制备荷钆硬脂酰壳寡糖(COSSA-DTPA-Gd), 评价其胶束性质、细胞毒性、体外弛豫率和在胰腺肿瘤中的 MR 成像效果。**方法** 利用酰化反应合成硬脂酰壳寡糖, 再枝接螯合剂 DTPA 并与 Gd^{3+} 螯合得到最终产物。采用电镜和激光粒度仪等测定产物胶束性质; 噻唑蓝法测定产物细胞毒性; 在 MR 上测定体外弛豫率, 评估其在原位胰腺肿瘤成

[基金项目] 上海市自然科学基金(16ZR1405900)。

[第一作者] 张炜华(1987—), 女, 河北张家口人, 在读硕士。研究方向: 纳米磁共振对比剂。E-mail: 285149731@qq.com

[通信作者] 翁伟宇, 华东理工大学药学院, 200237。E-mail: wyweng@ecust.edu.cn

[收稿日期] 2016-09-30 **[修回日期]** 2017-01-05

像强化中的效果。结果 合成的 COSSA-DTPA-Gd 在水中可自发形成胶束, 临界胶束浓度为 $(5.12 \pm 0.43) \mu\text{g}/\text{ml}$, 外观近似球形, 粒径 $(58.3 \pm 5.7) \text{nm}$, 带正电荷, 含钆量为 $330.31 \mu\text{mol}/\text{g}$ 。产物的细胞毒性与市售对比剂马根维显相似 ($P > 0.05$), 24 h 内细胞存活率 $> 85\%$ 。COSSA-DTPA-Gd 的体外纵向弛豫率为 $8.23 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 静注后对胰腺肿瘤的成像效果优于马根维显, 肿瘤周边首先强化, 肿瘤内部渐进性强化。结论 COSSA-DTPA-Gd 胶束对比剂对胰腺肿瘤具有良好的成像效果。

[关键词] 钆; 壳寡糖; 胶束; 磁共振成像; 胰腺肿瘤

[中图分类号] R332; R445.2 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2017)04-0499-05

胰腺癌是一种恶性程度高、预后差的消化系统恶性肿瘤, 术后 5 年生存率仅 5% 左右^[1]。缺乏早期诊断手段是胰腺癌高死亡率的主要原因^[1-2]。目前 CT 是胰腺癌诊断和分期的常规影像学方法^[3]。与之相比, MRI 具有更高的软组织对比度, 在小胰腺癌、等密度胰腺癌等的诊断方面更具优势^[3]。MRI 常需使用对比剂来增强成像对比度, 而目前尚无针对胰腺癌的特异性对比剂。为提高 MRI 诊断胰腺癌的敏感度和准确率, 有学者^[4-10]尝试采用纳米对比剂对动物胰腺癌进行检查, 取得了初步效果。本研究旨在制备一种荷钆硬脂酰壳寡糖 (gadolinium-loaded stearic acid grafted chitooligosaccharide, COSSA-DTPA-Gd) 纳米胶束作为 MRI 对比剂, 评价其体外弛豫率和体内原位胰腺肿瘤的成像效果, 以期对胰腺癌的 MR 检查提供一种可行的优良对比剂。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雌性无胸腺裸鼠 8 只, 体质量 18~20 g; 雌性 SD 大鼠 2 只, 体质量 160~200 g, 均由复旦大学实验动物科学部提供 [实验动物使用许可证号 SYXK(沪)2014-0029]。本研究方案经复旦大学附属中山医院伦理学委员会批准。所有动物进行实验前均在动物房适应 1 周。

1.2 仪器与材料 壳寡糖 (COS, 平均分子量 5 kDa, 脱乙酰度 $\geq 95\%$, 青岛宇宙生物科技有限公司)、硬脂酸 (SA, 上海凌峰化学试剂有限公司)、二乙烯三胺五乙酸 (DTPA) 和无水三氯化钆 (GdCl_3 , 国药集团化学试剂有限公司)、1-(3-二甲氨基丙基)-3 乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC · HCl, 上海源聚生物科技有限公司)、N-琥珀酰亚胺 (NHS) 和茈 (梯希爱上海化成工业发展有限公司)、马根维显 (Bayer Schering Pharma AG)、噻唑蓝 (MTT, Sigma-Aldrich 公司); GIBCO RPMI 1640 培养液 (Invitrogen 公司); 人胰腺癌细胞株 MIA PaCa-2 (复旦大学附属肿瘤医院)。UV-5100B 型紫外/可见分光光度计 (上海元析仪器有限公司); Cary Eclipse 荧光分光光度计和 Varian 710 全谱直读电感

耦合等离子体发射光谱仪 (美国安捷伦科技公司); JY92-2 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝科器研究所); Zetasizer Nano ZS 激光粒度仪 (英国马尔文仪器有限公司); JEM-1400 透射电子显微镜 (日本电子株式会社); Siemens Verio 3.0T MR 扫描仪; HERAcell 150i CO_2 培养箱和 Multiskan MK3 全自动酶标仪 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]; XD-202 倒置光学显微镜 (南京江南永新光学有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 COSSA-DTPA-Gd 的合成 取 COS 2 g (约含氨基葡萄糖单体 12.4 mmol), 加二甲基亚砜 (DMSO) 30 ml 溶解备用。另取 SA 0.6 g、EDC · HCl 0.8 g, 加无水乙醇 10 ml, 加热至 70°C 使之溶解, 并活化 40 min。将活化后的溶液加入 COS/DMSO 溶液中, 于 45°C 持续搅拌 12 h。取反应液离心, 4 000 转/分, 10 min, 上清液加三倍量乙腈沉淀, 抽滤, 滤饼用热无水乙醇洗涤 3 次, 于 45°C 减压干燥, 获得硬脂酰壳寡糖 (COSSA)。

取 COSSA 1.5 g, 加水 30 ml 溶解备用。取 DTPA 0.95 g, 加水 90 ml, 加热至 70°C , 待溶解后加入 EDC · HCl 0.92 g, NHS 0.56 g, 于 70°C 活化 40 min。将 DTPA 活化酯溶液缓慢加入到 COSSA 溶液中, 室温下持续搅拌 12 h。将反应液装入透析袋 (截留分子量 3 500), 用水透析 3 天。取透析袋中溶液, 加乙腈沉淀, 抽滤。取滤饼, 45°C 减压干燥, 获得产物 COSSA-DTPA。

取 COSSA-DTPA 1 g, 加水 20 ml 溶解, 用 NaOH 溶液 (0.2 mol/L) 调节 pH 值至 6.5 ± 0.05 。取 GdCl_3 280 mg, 加水 4 ml 溶解。将 GdCl_3 溶液缓慢滴入 COSSA-DTPA 溶液, 并在室温下搅拌 2 h, 期间应使溶液 pH 值始终维持在 6.50 ± 0.05 。将溶液装入透析袋 (截留分子量 3 500), 用水透析 3 天, 取透析袋中溶液, 冷冻干燥, 即得最终产物 COSSA-DTPA-Gd。用等离子体发射光谱仪测定产物中 Gd 的含量。

1.3.2 临界胶束浓度 (CMC) 的测定 采用荧光分光

光度法,以芘为分子探针,测定 COSSA-DTPA-Gd 在水中的 CMC^[11]。称取芘,以甲醇溶解,配制浓度为 6×10^{-5} mol/L 的溶液。取产物加水溶解并稀释至适当浓度作为供试液。精密量取芘溶液 100 μ l 置 10 ml 离心管中,氮气吹干后加入各浓度的供试液 10 ml,超声(400 W)20 s。以激发波长 334 nm,扫描发射波长 350~450 nm,测定芘在各溶液中的发射荧光强度。以芘的第一特征峰 I_1 ($\lambda=373$ nm) 与第三特征峰 I_3 ($\lambda=384$ nm) 的比值 (I_1/I_3) 对供试液浓度的对数作图,图中曲线转折点对应的浓度即为 CMC。

1.3.3 对比剂胶束的粒径、电荷与外观 取 COSSA-DTPA-Gd 适量,加水溶解并适当稀释,超声(400 W)20 s,激光粒度仪测定胶束的粒径、多分散指数和 Zeta 电位。将 COSSA-DTPA-Gd 胶束溶液滴于有碳膜的铜网,采用 2% 的磷钨酸对聚合物胶束进行负染,于红外线灯下干燥,透射电子显微镜观察外观形态。

1.3.4 对比剂的体外细胞毒性检测 取 COSSA-DTPA-Gd 和马根维显,用 pH 7.4 的无菌磷酸盐缓冲液溶解、稀释至所需浓度,作为供试液。肝脏原位灌注消化法分离 SD 大鼠肝细胞,培养于 RPMI 1640 培养液。取肝细胞(细胞浓度为 2×10^5 cell/ml)接种于 96 孔培养板中,每孔接种体积为 100 μ l,培养至贴壁。每孔加入系列浓度的供试品溶液 100 μ l,用空白磷酸盐缓冲液作为阴性对照组。在温度 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的培养箱内培养 24 h。将培养液吸出,每孔中加入 0.5% MTT 溶液 100 μ l,培养 4 h。按 MTT 试剂盒说明书方法测定细胞成活率。

1.3.5 对比剂的体外弛豫率检测 取 COSSA-DTPA-Gd 和马根维显,用水配制成 Gd^{3+} 浓度为 0.036 7~0.5 mmol/L 的系列溶液,采用 Siemens Verio 3.0T MR 仪及机器自带头颅容积线圈,测定各溶液的体外纵向弛豫时间。仪器参数设置为:3D VIBE 序列(volume interpolated body examination),TE 1.73 ms,TR 5.32 ms,FOV 100 mm,第 1 和第 2 翻转角分别为 2° 和 14° ,层厚 1.5 mm,体素大小 0.5 mm \times 0.4 mm \times 1.5 mm。采用 Syngo MR B17 软件进行成像信号分析。以超纯水为对照,计算体外弛豫率^[11]: $1/(T_1)_{obs} = 1/(T_1)_d + r_1 \times [C]$,其中 $(T_1)_{obs}$ 为样品弛豫时间, $(T_1)_d$ 为溶剂水的弛豫时间, $[C]$ 为样品中 Gd^{3+} 的浓度, r_1 为对比剂的弛豫率(单位: $mM^{-1} \cdot s^{-1}$)。

1.3.6 荷瘤动物的 MR 成像 无胸腺裸鼠左腹切口 2~3 cm,暴露胰腺,采用注射法将事先培养好的 MIA

PaCa⁻² 细胞以 2×10^6 cells/0.1 ml 浓度接种于胰腺,建立胰脏原位荷瘤裸鼠模型。模型建立约 21 天,在体外可以触摸到肿块后用于 MR 检查。

荷瘤裸鼠腹腔注射浓度为 20% 的氨基甲酸乙酯溶液 8 ml/kg 体质量进行麻醉。取 COSSA-DTPA-Gd 以生理盐水配制 Gd^{3+} 浓度为 12.5 mmol/L 的溶液,经超声(400 W,20 s)形成自组装纳米胶束。马根维显稀释至相同浓度作为对照。将两种对比剂按 Gd^{3+} 剂量 0.1 mmol/kg 体质量^[12] 经荷瘤裸鼠尾静脉注射。采用 4 通道动物线圈,在 5 min、30 min、1 h、2 h 分别进行增强 T1WI,由具有 10 年以上 MRI 阅片经验的医师评估肿瘤对比剂强化分布情况。仪器参数设置为:SE 序列 T1WI,TR 400 ms,TE 12 ms,FOV 100 mm,层厚 1.2 mm,体素大小 0.3 mm \times 0.3 mm \times 1.2 mm。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计分析软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

合成的 COSSA-DTPA-Gd 中钆的含量为 330.31 μ mol/g。该产物具有两亲性结构,在水性介质中可自发形成以 SA 为疏水内核的胶束,其可能的结构见图 1A,电镜照片见图 1B,粒径分布见图 1C。胶束外观近似球形,临界胶束浓度 $(5.12 \pm 0.43) \mu$ g/ml,粒径 (58.3 ± 5.7) nm,多分散指数为 0.22 ± 0.08 ,Zeta 电位 (12.1 ± 1.9) mV。

COSSA-DTPA-Gd 与马根维显的细胞毒性实验结果见图 2。当 Gd^{3+} 浓度相同时,两者的细胞存活率差异无统计学意义 ($P > 0.05$),24 h 内各 Gd^{3+} 浓度的存活率均 $> 85\%$ 。

对比剂的体外 T1WI 伪彩图见图 3A。随 Gd^{3+} 浓度增加,T1 逐渐变小;当 Gd^{3+} 浓度相同时,COSSA-DTPA-Gd 的弛豫时间较马根维显短。以 Gd^{3+} 浓度 (mmol/L) 对弛豫时间的倒数 ($1/T_1$) 作图(图 3B),算得马根维显弛豫率为 $4.37 mM^{-1} \cdot s^{-1}$,COSSA-DTPA-Gd 的弛豫率为 $8.23 mM^{-1} \cdot s^{-1}$ 。

荷瘤裸鼠 T1WI 图像见图 4。结果显示,在未注射对比剂时,原位胰腺癌在 T1WI 显示低信号。静注马根维显 5 min 后可见肿瘤不均匀强化,随时间推移,马根维显迅速从体内消除,2 h 时的信号强度下降。静脉注射 COSSA-DTPA-Gd 后可迅速显示胰腺肿瘤组织的边界;随时间推移,肿瘤内部结构亦逐渐清晰,但信号强度弱于边界;2 h 时可观察到对比剂已排泄

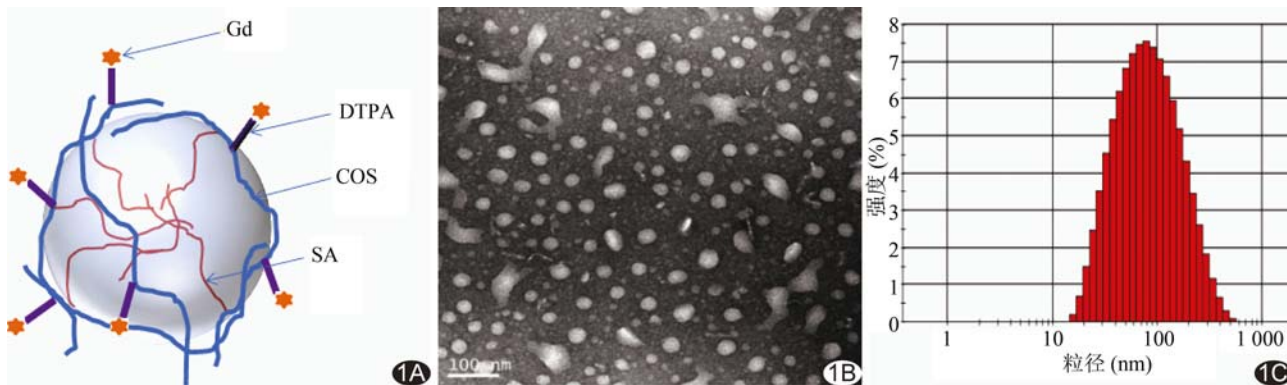


图 1 胶束基本性状 A. 胶束结构; B. 电镜照片; C. 粒径

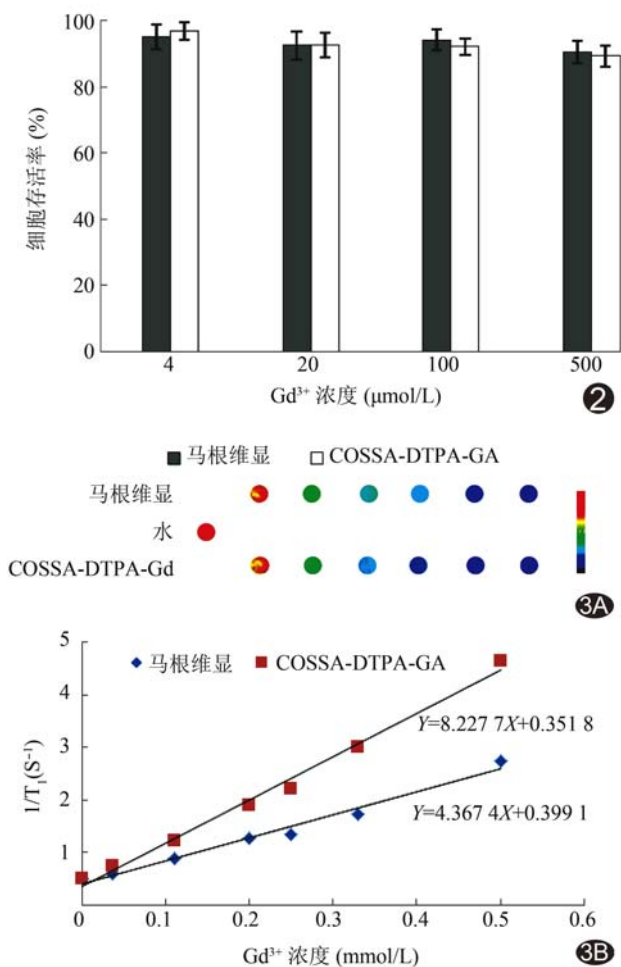


图 2 对比剂的细胞毒性 (n=5) 图 3 对比剂的体外成像效果 A 伪彩图; B 弛豫率拟合图

至膀胱处,但肿瘤处的 MR 成像依旧清晰。

3 讨论

胰腺癌属乏血供肿瘤,不成熟肿瘤新生血管和肿瘤间质所组成的微环境构成了诊疗药物输送的屏障,对比剂不易渗入,故 MR 检查时常无法获得清晰图

像。本实验选用的对照马根维显是应用最广泛的 MRI 对比剂,属于非特异性细胞外间隙对比剂。给药后可见裸鼠整体的 MR 信号增强,但并不能显示清晰的肿瘤图像。此外,还常用 Mn-DPDP 增强正常胰腺信号,以区分正常胰腺组织与肿瘤组织。可见目前临床常用的 MR 对比剂并不能显著增强胰腺癌的信号水平。

为提高 MR 对胰腺癌的成像效果,研究者尝试采用纳米对比剂。纳米对比剂不仅可提高弛豫率,延长成像时间,而且可利用实体瘤的高通透性和滞留效应实现对肿瘤的靶向富集,还可做表面修饰,进一步提高对肿瘤细胞的识别力。目前用于体内胰腺癌 MR 检查的纳米对比剂载体有:脂质体^[4]、胶束^[5]、树枝状聚合物^[6]、纳米氧化铁^[7-9]、量子点^[10]。

本研究所采用的载体材料 COS 是由壳聚糖降解生成的一类低聚糖,既保留了壳聚糖生物相容性好的优点,又具有良好的水溶性,且溶液黏度低。基于 COS 的含钆对比剂研究始于 2013 年^[13-15],尚未涉及肿瘤的 MR 检查。本研究发现以两亲性 COS 衍生物——COSSA 为载体的含钆对比剂对胰腺肿瘤有良好的成像效果,注射给药后肿瘤边缘首先被清晰显现,且随时间推移,内部结构亦可被对比剂逐渐充填。究其原因,有以下 4 点:① COSSA-DTPA-Gd 具有两亲结构,在体液中可自组装成纳米胶束且临界胶束浓度低(约 5 μg/ml),有利于机体内胶束的稳定;② 该胶束对比剂粒径仅 60 nm 左右,适合于利用 EPR 效应溢出并富集于肿瘤周围;③ 该胶束对比剂具有正电荷,有利于溢出的对比剂通过电性吸附于带负电荷的肿瘤细胞,并逐步向肿瘤内部渗透;④ 该胶束对比剂有较高的弛豫率(约为马根维显的 2 倍),有利于提高组织对比度。

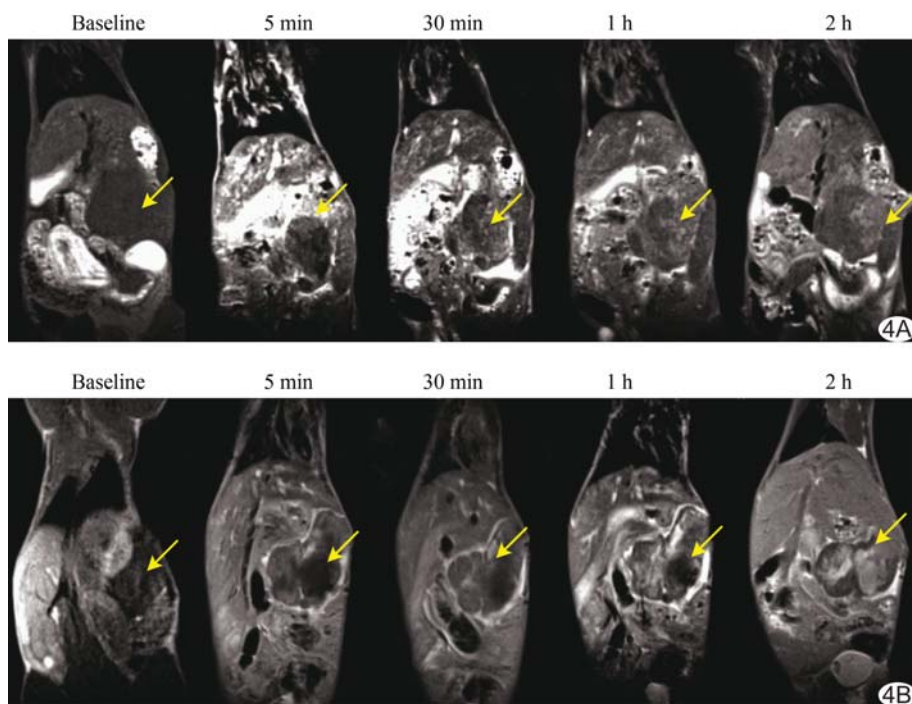


图 4 不同时间原位胰腺癌(箭)的 MR 成像图 A. 马根维显; B. COSSA-DTPA-Gd

[参考文献]

[1] 王理伟, 陈栋晖, 李琦, 等. 胰腺癌综合诊治中国专家共识(2014 年版). 临床肿瘤学杂志, 2014, 19(4): 358-370.

[2] Stathis A, Moore MJ. Advanced pancreatic carcinoma: Current treatment and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, 7(3): 163-172.

[3] Raman SP, Horton KM, Fishman EK. Multimodality imaging of pancreatic cancer-computed tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography. *Cancer J*, 2012, 18(6): 511-522.

[4] Pirollo KF, Dagata J, Wang P, et al. A tumor-targeted nanodelivery system to improve early MRI detection of cancer. *Mol Imaging*, 2006, 5(1): 41-52.

[5] Kaida S, Cabral H, Kumagai M, et al. Visible drug delivery by supramolecular nanocarriers directing to single-platformed diagnosis and therapy of pancreatic tumor model. *Cancer Res*, 2010, 70(18): 7031-7041.

[6] Wang Q, Li J, An S, et al. Magnetic resonance-guided regional gene delivery strategy using a tumor stroma-permeable nanocarrier for pancreatic cancer. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10(1): 4479-4490.

[7] Shen JH, Li YF, Zhu YH, et al. Multifunctional gadolinium-labeled silica-coated Fe₃O₄ and CuInS₂ nanoparticles as a platform for in vivo trimodality magnetic resonance and fluorescence imaging. *J Mater Chem B*, 2015, 3: 2873-2882.

[8] Zhou H, Qian W, Ueckun FM, et al. IGF1 receptor targeted theranostic nanoparticles for targeted and Image-Guided therapy of pancreatic cancer. *ACS Nano*, 2015, 9(8): 7976-7991.

[9] Rosenberger I, Strauss A, Dobiasch S, et al. Targeted diagnostic magnetic nanoparticles for medical imaging of pancreatic cancer. *J Control Release*, 2015, 214: 76-84.

[10] 曹凯, 戎庭军, 魏慧敏, 等. 基于 NaGdF₄:Yb,Er 纳米颗粒的磁共振/上转换发光双模态探针的构建及胰腺癌体内成像研究. 影像诊断与介入放射学, 2016, 25(2): 91-97.

[11] Molina-Bolivar JA, Hierrezuelo JM, Carnero Ruiz C. Self-Selfassembly, hydration, and structures in N-decanoyl-Nmethylglucamide aqueous solutions: Effect of salt addition and temperature. *J Colloid Interface Sci*, 2007, 313(2): 656-664.

[12] Shalviri A, Foltz WD, Cai P, et al. Multifunctional terpolymeric MRI contrast agent with superior signal enhancement in blood and tumor. *J Control Release*, 2013, 167(1): 11-20.

[13] Huang Y, Cao B, Yang X, et al. Gd complexes of diethylenetriaminepentaacetic acid conjugates of low-molecular-weight chitosan oligosaccharide as a new liver-specific MRI contrast agent. *Magn Reson Imaging*, 2013, 31(4): 604-609.

[14] Termsarasab U, Cho HJ, Moon HT, et al. Self-assembled magnetic resonance imaging nanoprobe based on arachidyl chitosan for cancer diagnosis. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 109: 280-286.

[15] Huang Y, Cao J, Zhang Q, et al. Chitosan oligosaccharide based Gd-DTPA complex as a potential bimodal magnetic resonance imaging contrast agent. *Magn Reson Imaging*, 2016, 34(1): 1-7.