

叶酸介导的靶向性钆造影剂的制备及弛豫性能研究

龙 娜¹ 项光亚^{*1} 唐大宗² 夏黎明² 崔 佳¹ 汤 军¹

(¹ 华中科技大学同济医学院药学院, 武汉 430030)

(² 华中科技大学同济医学院附属同济医院放射科, 武汉 430030)

摘要: 在弱碱性的条件下, 叶酸活化酯与牛血清白蛋白(BSA)反应生成叶酸-牛血清白蛋白偶联物(叶酸-BSA), 该偶联物再与二乙三胺五乙酸(DTPA)的酸酐反应, 最后与 GdCl_3 进行螯合制得叶酸-BSA-(Gd-DTPA)_n。配合物的结构通过紫外光谱法进行了鉴定, 并定量测定了配合物中叶酸、Gd-DTPA 对 BSA 的偶联率。通过测定配合物的体外弛豫时间 T_1 , 进一步分析其弛豫性能 R_1 。结果表明本研究制得的叶酸-BSA-(Gd-DTPA)_n 配合物中叶酸的偶联率约为 5, 体外弛豫性能 R_1 约为 $6 \times 10^{-3} \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{ms}^{-1}$, 与未偶联叶酸的 BSA-(Gd-DTPA)_n 的弛豫性能无显著性差异, 且比小分子 Gd-DTPA 的弛豫性能提高了 3 倍左右。

关键词: 叶酸受体; 靶向; 大分子造影剂; 体外弛豫性能

中图分类号: O614.33*9; R445.2; R981.9

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2007)05-0759-06

Preparation and Relaxivity of Folate-mediated Targeting Gd^{3+} Contrast Agent

LONG Na¹ XIANG Guang-Ya^{*1} TANG Da-Zong² XIA Li-Ming² CUI Jia¹ TANG Jun¹

(¹ Tongji Pharmaceutical College, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030)

(² Department of Radiology, Tongji Hospital Affiliated Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030)

Abstract: Under weak base condition, Bovine serum albumin (BSA) was reacted with the activated folate firstly; then the conjugates were coupled with Diethylene triamine pentaacetic dianhydride (cDTPAA) to form Folate-BSA-DTPA; finally, these coupled compounds were chelated with GdCl_3 . All complexes were characterized by UV, the ratios of folate and Gd-DTPA to BSA were determined by UV and ICP-AES methods, respectively. The spin-lattice relaxivity of the Gd complexes *in vitro* was analyzed. As a result, the ratio of folate to BSA was about 5, and the relaxivity was about $6 \times 10^{-3} \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{ms}^{-1}$ enhanced three times compared to the small molecular Gd-DTPA, though there was no difference in relaxivity between folate-BSA-(Gd-DTPA)_n and BSA-(Gd-DTPA)_n.

Key words: folate receptor; targeting; macromolecular contrast agent; relaxivity *in vitro*

随着肿瘤病例的逐年增加, 肿瘤的早期诊断和治疗变得尤为重要。磁共振成像(MRI)技术因无侵入性、信号对比度高等优点已成为临床上一种有力的肿瘤早期诊断技术^[1]。据估计, 30%以上的磁共振成像诊断必须使用造影剂。常用的造影剂为二乙三胺五乙酸钆(Gd-DTPA)和四乙酸四氮杂环十二烷钆

(Gd-DOTA)^[2], 由于属于非选择性的胞外试剂, 分子量小、半衰期短、体内信号弱, 因此其应用受到一定的限制。1987 年 Brasch 等将 Gd-DTPA 与血清蛋白(Albumin) 偶联制备大分子造影剂 Albumin-(Gd-DTPA), 实验证明 Albumin-(Gd-DTPA)具有较高的弛豫率, 而且能成功地得到心血管的清晰成像^[3]。但是

收稿日期: 2006-09-05。收修改稿日期: 2007-02-12。

国家自然科学基金(No.30300430)、湖北省自然科学基金(No.2006ABA123)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: gyxiang1968@hotmail.com

第一作者: 龙 娜, 女, 26 岁, 硕士; 研究方向: 靶向药物研究。

大多数造影剂,包括 Albumin-(Gd-DTPA),并不具有组织或器官的选择性。近年来造影剂研究的一个重要方向就是如何提高造影剂的选择性或靶向性,以提高病变检出和定性诊断的能力。例如磁共振受体显像,不仅可以提高 MR 对比剂的靶向分布性,还可利用强化程度反映受体的功能及数量变化,进而为更早期发现病变提供新的途径。

叶酸-叶酸受体靶向是近年来倍受青睐的一种新型抗肿瘤机制,其利用叶酸受体在某些肿瘤部位的过度表达而在正常组织低水平表达的特性实现叶酸偶联药物的靶向输送,且叶酸偶联物可通过叶酸受体介导途径内化进入细胞。与其他肿瘤靶向的配体和载体相比,叶酸具有分子量小、无毒、无免疫原性、生物相容性好、稳定性高、廉价易得、易于修饰等多种优势。所以,将叶酸复合物用于肿瘤的靶向诊断和治疗已成为当今研究的热点之一^[14]。叶酸介导的小分子造影剂叶酸-DTPA-Gd 已显示出对肿瘤的特异性,但小分子造影剂制备复杂、纯化困难^[5],而且小分子造影剂的血浆半衰期短、图像对比度低。

本研究就是基于叶酸-叶酸受体作用的高特异性,制备以叶酸-牛血清白蛋白(Folate-BSA)复合物为载体的肿瘤靶向性磁共振造影剂,并进行了体外弛豫性能的研究。

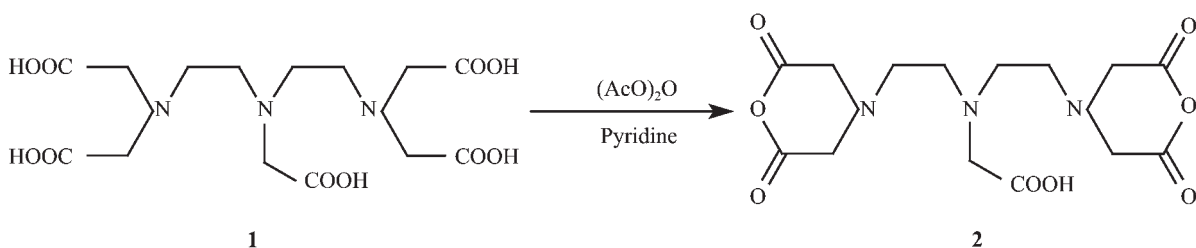


图 1 cDTPAA 的合成路线

Fig.1 Synthetic route of cDTPAA

1.3 BSA-(Gd-DTPA)_n(5)的制备(图 2)

称取 50 mg 的 BSA(3),加入 1 mL 的 0.05 mol·L⁻¹,pH=9 的磷酸缓冲液(PBS),分别加入 14、28、56 mg 的 cDTPAA(2),用 5 mol·L⁻¹的 NaOH 调节 pH 值,使 pH 值保持在 6~7,25 °C 搅拌 1 h 后,再加入与 cDTPAA 等物质的量的 GdCl₃ 溶液,继续搅拌 1 h。反应液用 Sephadex G-25 凝胶柱进行分离,用 pH=7.4 的 PBS 作为流动相进行洗脱,在 280 nm 处紫外监测洗脱过程,收集第一个峰的洗脱液,即为纯化的 BSA-(Gd-DTPA)_n 偶联物(5)。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

EXCITE II 1.5T 超导型磁共振扫描仪(美国 GE 公司);AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);756PC 紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);79-1 磁力加热搅拌器(江苏省金坛市正基仪器有限公司);BSZ-100 自动部分收集器(上海沪西分析仪器厂);OPTIMA 4300DV 全谱直读电感耦合等离子体发射光谱仪(美国 PE 公司)。

牛血清白蛋白(BSA,电泳纯 98%,上海柏奥);叶酸(中国医药集团上海化学试剂公司);二乙三胺五乙酸(DTPA,分析纯,中国医药集团上海化学试剂公司);GdCl₃(参照文献^[6]实验室自制);1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC,美国 Acros 公司);Sephadex G-25 葡聚糖凝胶(瑞典 AB 公司);无水二甲基亚砷(德国 Merck 公司);考马斯亮蓝 G-250(厦门星隆达化学试剂有限公司);其余试剂均为国产分析纯。

1.2 DTPA 环酸酐(cDTPAA)(2)的合成^[7](图 1)

称取 7.8 g 的 DTPA(1)置于 50 mL 的圆底烧瓶中,加入 8 mL 的乙酸酐和 12 mL 的吡啶,65 °C 回流 24 h,冷却至室温,抽滤,滤饼分别用乙酸酐及无水乙醚洗涤,真空干燥即得 DTPA 的环酸酐(2)。

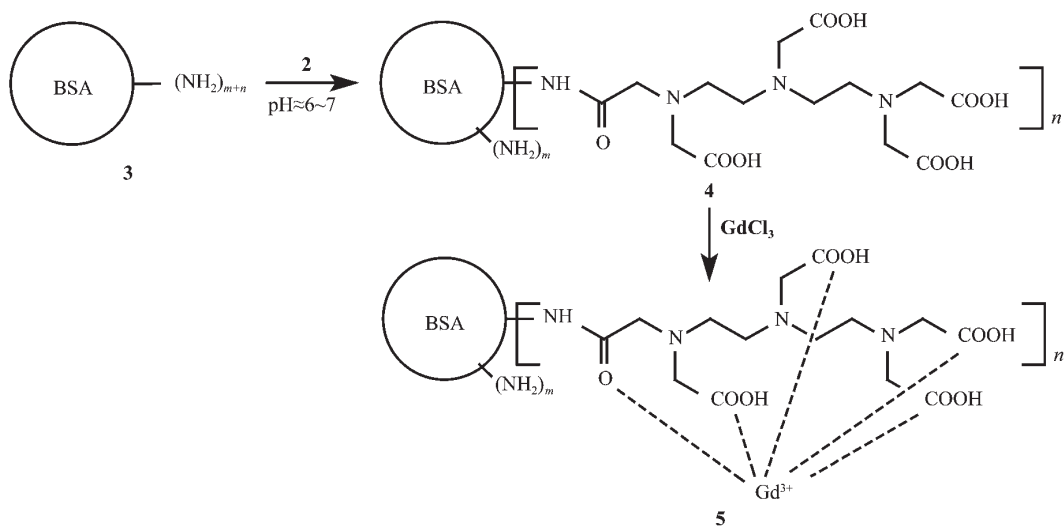
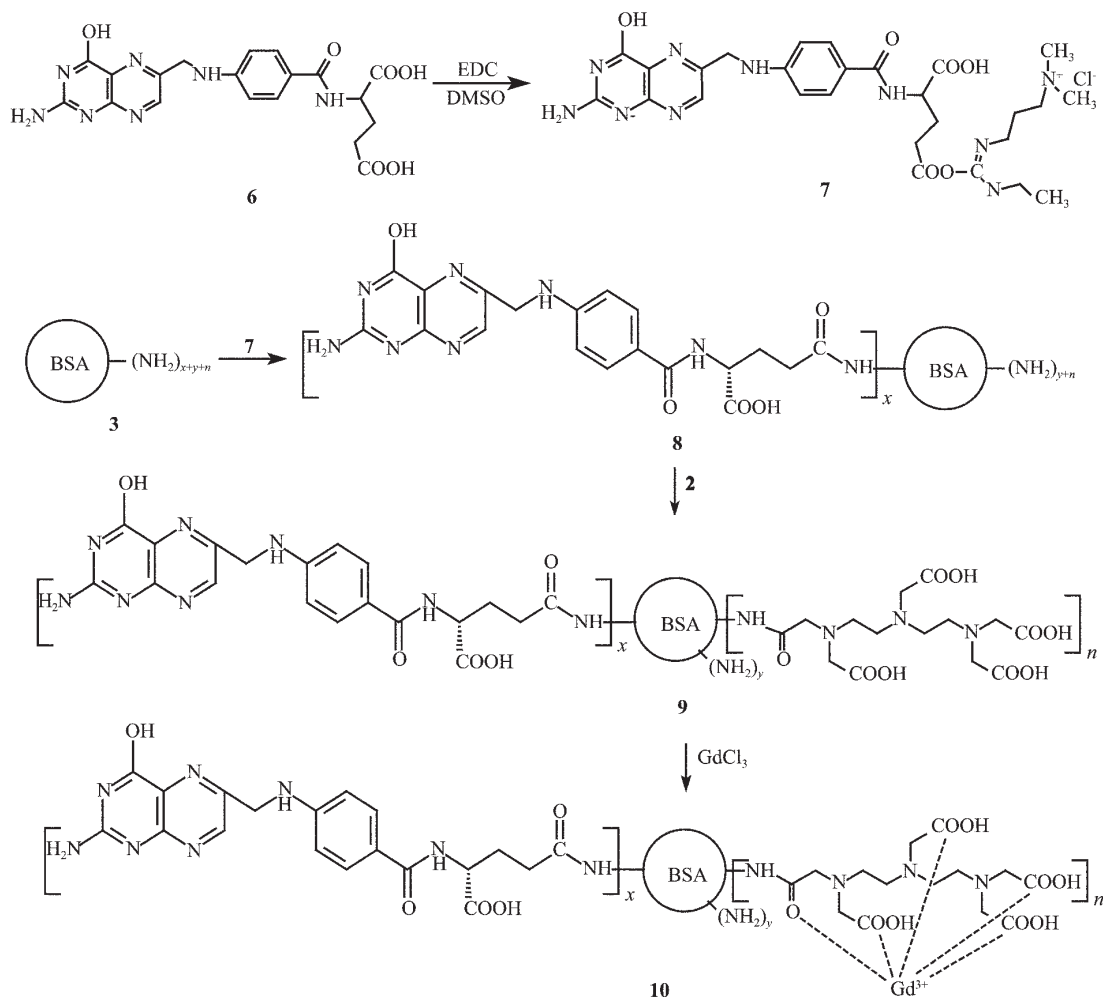
1.4 叶酸-BSA-(Gd-DTPA)_n(10)的制备(图 3)

1.4.1 叶酸活化酯(7)的制备^[8]

取 5 mg 叶酸(6),用 DMSO 溶解,再加入 5 倍量的 EDC,25 °C 避光搅拌 1 h,即得红棕色的叶酸活化酯的 DMSO 溶液。

1.4.2 叶酸-BSA-(Gd-DTPA)_n(10)的制备

称 50 mg 的 BSA(3),溶于 1 mL 的 0.05 mol·L⁻¹,pH=9 的 PBS 中,加入含 15 倍量的叶酸活化酯(7)的 DMSO 溶液,25 °C 暗处反应 1 h,即得叶酸-BSA 溶液^[9]。再分别加入 14 mg、28 mg 的 cDTPAA (2),用

图 2 白蛋白-(Gd-DTPA)_n 的合成路线Fig.2 Synthetic routes of BSA-(Gd-DTPA)_n图 3 叶酸-白蛋白-(Gd-DTPA)_n 的合成路线Fig.3 Synthetic routes of Folate-BSA-(Gd-DTPA)_n

5 mol·L⁻¹的NaOH调节pH值,使pH值保持在6~7,25℃搅拌1h,最后加入与cDTPAA等物质的量的GdCl₃搅拌螯合1h。用Sephadex G-25凝胶柱进行分离,并用紫外监测洗脱过程。收集第1个峰的洗脱液,即为纯化的叶酸-BSA-(Gd-DTPA)_n。

1.5 Gd-DTPA 的制备^[10]

取2.0 g的Gd₂O₃和4.4 g的DTPA,加入24 mL水,70℃搅拌回流20h,待反应物全部溶解后降至室温,过滤。在滤液中加入3倍体积的丙酮,析出白色沉淀,抽滤,以丙酮洗涤,烘干至恒重,得到Gd-DTPA的白色粉末。

1.6 造影剂偶联率的测定

按考马斯亮蓝染色法^[11]测定蛋白含量。根据叶酸在363 nm处的吸光度^[9,12]测定叶酸含量,计算叶酸对蛋白的偶联率。采用高频电感等离子体发射光谱法(ICP-AES)测量样品中Gd³⁺的含量^[6],并计算Gd-DTPA对蛋白的偶联率。

1.7 钆配合物体外弛豫时间T₁的测定

将BSA-(Gd-DTPA)_n、叶酸-BSA-(Gd-DTPA)_n和Gd-DTPA分别配制成一定浓度(约1 mmol·L⁻¹)的pH=7.4的PBS溶液,各取1.8 mL到2 mL的塑料离心管中,间隔放在塑料离心管盒上^[13],20℃下以反转恢复法在1.5 T超导型磁共振扫描仪上测定这些配合物溶液中水质子的自旋-晶格弛豫时间T₁。

2 结果与讨论

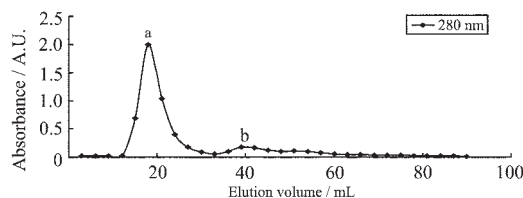
2.1 钆配合物的制备

本研究成功制备了大分子磁共振造影剂BSA-(Gd-DTPA)_n和叶酸-BSA-(Gd-DTPA)_n。在制备叶酸-BSA-(Gd-DTPA)_n的过程中,DTPA酸酐和叶酸活化酯都主要是与大分子白蛋白上活性最高的赖氨酸侧链氨基反应形成酰胺键,而每个白蛋白分子上只有59个赖氨酸残基,所以两个反应是相互竞争的,即与未加修饰的蛋白相比,经叶酸/cDTPAA修饰后的蛋白游离氨基的数量减少,从而影响cDTPAA/叶酸对蛋白的进一步修饰。所以合成时需考虑反应顺序的问题。考虑到叶酸活化酯与蛋白的反应可水解出高活性的EDC,而EDC可促进cDTPAA与蛋白的反应^[14],因此本文先将叶酸与蛋白反应制得叶酸蛋白复合物,再与酸酐反应。

2.2 钆配合物的分离纯化及紫外扫描图

以cDTPAA对蛋白的投料物质的量比为100:1的反应液的凝胶色谱洗脱图为例。由于凝胶色谱的

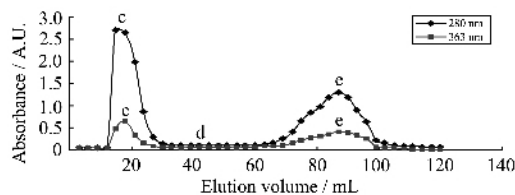
分子筛作用,图4中第一洗脱峰为大分子的BSA-(Gd-DTPA)_n(a),后面的为小分子的Gd-DTPA(b);图5中第一洗脱峰有叶酸363 nm的特征吸收,应为大分子的叶酸-BSA-(Gd-DTPA)_n(c),后面的分别为未反应的Gd-DTPA(d)和叶酸(e)。之后将纯化的配合物BSA-(Gd-DTPA)_n、叶酸-BSA-(Gd-DTPA)_n及Gd-DTPA进行紫外扫描(图6),叶酸-BSA-(Gd-DTPA)_n体现了叶酸的紫外吸收特性,说明叶酸已成功偶联到蛋白分子上。



a: BSA-(Gd-DTPA)_n; b: Gd-DTPA

图4 白蛋白-(Gd-DTPA)_n在Sephadex G-25葡聚糖凝胶柱上的凝胶色谱图

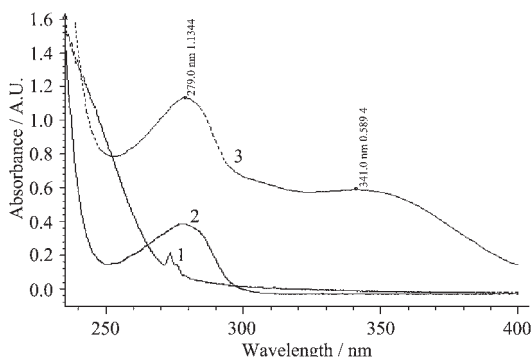
Fig.4 Gel filtration chromatogram of BSA-(Gd-DTPA)_n on a Sephadex G-25 column



c: Folate-BSA-(Gd-DTPA)_n; d: Gd-DTPA; e: folate

图5 叶酸-白蛋白-(Gd-DTPA)_n在Sephadex G-25葡聚糖凝胶柱上的凝胶色谱图

Fig.5 Gel filtration chromatogram of Folate-BSA-(Gd-DTPA)_n on a Sephadex G-25 column



1: Gd-DTPA; 2: BSA-(Gd-DTPA)_n; 3: folate-BSA-(Gd-DTPA)_n

图6 配合物的紫外光谱

Fig.6 UV spectra of compounds

2.3 配合物中偶联比的测定

根据考马斯亮蓝法测定的蛋白含量及363 nm紫外法测得的叶酸含量可计算出叶酸-BSA-(Gd-

DTPA)_n 中叶酸与蛋白的偶联比约为 5。有文献报道当叶酸对蛋白的偶联率大于或等于 3 时,便可较好地实现对叶酸受体表达阳性的肿瘤细胞的靶向输送^[15],因此本研究得到的叶酸配合物有望对叶酸受体阳性的肿瘤细胞有较好的靶向作用,这将在进一步的体外细胞靶向实验中进行探讨。

由经 ICP-AES 法测得的 Gd³⁺的含量可知,由不同的 cDTPAA 的投料比得到不同 Gd-DTPA 对蛋白偶联比的系列配合物,见表 1。从表 1 可看出,随着 cDTPAA 的加入量增多,每个蛋白分子上偶联的 Gd-DTPA 数目增大,且在同等条件下,Gd-DTPA 对

表 1 不同 DTPA 环酸酐对白蛋白或叶酸白蛋白物质的量比条件下每分子蛋白所结合的 Gd³⁺数目

Table 1 Number of BSA or Folate-BSA coupled Gd³⁺ at different cDTPAA to BSA molar ratio

substrates	cDTPAA to BSA molar ratio		
	50:1	100:1	200:1
BSA	8.20	20.77	45.35
*BSA+EDC	15.48	40.07	52.00
Folate-BSA	13.03	36.08	—

表 2 配合物的自旋-晶格弛豫性能

Table 2 Spin-lattice relaxivity (R₁) of chelates

Complex	Ratio of Gd-DTPA to BSA	C / (mmol·L ⁻¹)	T _{1obsd} / ms	R ₁ /(L·mmol ⁻¹ ·ms ⁻¹)	Relative enhancement
BSA-(Gd-DTPA) ₈	8.20	1.00	164.85±0.76	6.07×10 ⁻³	3.15
BSA-(Gd-DTPA) ₂₁	20.77	1.00	169.89±0.85	5.89×10 ⁻³	3.05
BSA-(Gd-DTPA) ₄₅	45.35	1.01	169.82±0.74	5.82×10 ⁻³	3.02
Folate-BSA-(Gd-DTPA) ₁₃	13.03	0.92	170.45±0.54	6.37×10 ⁻³	3.30
Folate-BSA-(Gd-DTPA) ₃₆	36.08	1.01	161.55±0.54	6.14×10 ⁻³	3.18
Gd-DTPA	—	1.00	518.13±6.00	1.93×10 ⁻³	1.00

本研究成功制得叶酸介导的大分子磁共振造影剂叶酸-BSA-(Gd-DTPA)_n。该配合物是一种有肿瘤靶向性和高弛豫性能的造影剂,可为进一步的肿瘤靶向性研究和实现体内肿瘤的高选择性、高对比度的磁共振成像打下基础,也显示出叶酸-叶酸受体给药系统在肿瘤诊断的广阔发展前景,值得更深入的研究。

参考文献:

[1] Barjor G, Arvind P P, Ellen A, et al. *Proceedings of the IEE*, **2005**,**93**(4):784~799
[2] WAN Fu-xian(万福贤), ZHOU Jin-Lan(周锦兰), YU Kai-Chao(俞开潮), et al. *Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue*

Folate-BSA 的偶联率比对 BSA 的大,考虑到可能是因为 EDC 的催化作用^[14],因此进行了一组对比实验(*),即在无叶酸存在条件下外加 EDC 以观察 Gd-DTPA 的偶联率是否有提高。从表 1 可看出 EDC 对 DTPA 与 BSA 的偶联确有催化作用。

2.4 钆配合物体外弛豫时间 T₁ 的测定

在忽略溶质分子相互作用的条件下,自旋-晶格弛豫性能 R₁ 可由下式表示:

$$1 / T_{1obsd} = 1 / T_{1d} + R_1 C$$

式中,1/T_{1obsd} 和 1/T_{1d} 分别为溶液和纯溶剂的质子的弛豫速率。R₁ 为弛豫性能,单位为 L·mmol⁻¹·ms⁻¹,反映造影剂的弛豫增强能力^[16]。本研究在室温下测得各配合物溶液中水质子自旋-晶格弛豫时间 T₁ 并列于表 2。从表中结果可知 Gd-DTPA 偶联比不同的大分子配合物的弛豫性能没有显著性差异,都约为 6×10⁻³ L·mmol⁻¹·ms⁻¹。但相比小分子 Gd-DTPA 而言,大分子的弛豫性能有明显提高,都约为小分子的 3 倍左右,这是因为分子体积增大使其旋转相关时间延长,并且偶联叶酸并不影响大分子造影剂的弛豫性能。

Ban(Acta Medicinae Universitatis Scientiae Et Technologiae Huazhong), **2005**,**34**(6):685~688
[3] Schmiedl U, Ogan M, Paaajanen H, et al. *Radiology*, **1987**,**162**: 205~210
[4] Andrew R H, Philip S L. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2005**,**94**:2135~2146
[5] DING Jian-Hui(丁建辉), ZENG Meng-Hu(曾蒙苏), XUE Qiong(薛琼). *Zhonghua Fangshexue Zazhi(Chinese Journal of Radiology)*, **2005**,**39**(8):882~886
[6] LIU Xian(刘岷), XU Yi-Kai(许乙凯), HUANG Qi-Liu(黄其璩), et al. *Di Yi Junyi Daxue Xuebao(Journal of First Military Medical University)*, **2004**,**24**(1):15~17
[7] LIU Ning(刘宁), JIN Jian-Nan(金建南), MO Shang-Wu(莫尚武), et al. *He Huaxue Yu Fangshe Huaxue (J. Nuclear and Radiochemistry)*, **1998**,**20**(3):158~163

- [8] Barbara S, Silvia A. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2000**, **89**(11):1452~1464
- [9] Zhang Q, Xiang G Y, Zhang Y J, et al. *J. Pharm. Sci.*, **2006**, **95**(10):2266~75
- [10] LI Tie-Fu(李铁福), LIU Jing-Ying(刘晶莹), WANG Yu-Qing(王雨青), et al. *Huaxue Shiji*(*Chemical Reagents*), **2004**, **26**(3): 190~191
- [11] CAI Wu-Cheng(蔡武成), YUAN Hou-Ji(袁厚积). *Common Chemical Analysis for Biological Substances*(生物物质常用化学分析法). Beijing: Science Press, **1982**.93~99
- [12] ZHANG Liang-Ke(张良珂), HOU Shi-Xiang(候世祥), MAO Sheng-Jun(毛声俊). *Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi*(*J. Biomedical Engineering*), **2004**, **21**(2):225~228
- [13] CHENG Fong-Yu, SU Chi-Hao, YAN Yu-Sheng, et al. *Biomaterials*, **2005**, **26**:729~738
- [14] MA Wan-Long, Karl J H, Vincent H. L. L. *Pharmaceutical Research*, **1993**, **10**(2):204~207
- [15] LU Ying-Juan, Philip S L. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2002**, **54**:675~693
- [16] FU Yan-Jun(傅雁军), ZHUO Ren-Xi(卓仁禧). *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao* (*Chem. J. Chinese Universities*), **1997**, **18**(7):1072~1079