

细胞内不同形态 Gd 基 MRI 造影剂的 T_1/T_2 弛豫性能及造影效果

孙兴丽^{1,2} 张艳辉² 赵敏敏² 谭 波² 张海禄² 邓宗武^{*2}

(¹ 中国科学技术大学苏州纳米技术与纳米仿生学院, 合肥 230026)

(² 中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所, 苏州 215123)

摘要: 将具有良好生物膜穿透性的异烟肼(INH)和 Gd-DO3A 偶联, 合成了小分子 MRI 造影剂 Gd-DO3A-INH; 利用脉冲电转染技术标记间充质干细胞, 有效提高了进入细胞的 Gd-DO3A-INH 浓度, 并诱导部分游离态 Gd-DO3A-INH 在细胞质中自组装成纳米粒子。细胞样品的 TEM 观察到细胞内形成了 Gd-DO3A-INH 纳米粒子; 细胞传代实验和体外 MRI 揭示了 2 种不同状态的 Gd-DO3A-INH 对细胞水质子弛豫速率的影响机制, 以及细胞传代过程中细胞内 2 种不同状态 Gd-DO3A-INH 的浓度涨落引起的 MRI 造影效果的变化机制。

关键词: 磁共振成像(MRI); Gd 基造影剂; 弛豫速率; 脉冲电转染标记

中图分类号: O614.33+9 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2019)05-0780-07

DOI: 10.11862/CJIC.2019.100

T_1/T_2 Relaxation and MRI Contrast Effect of Gd Agent in Different Intracellular Forms

SUN Xing-Li^{1,2} ZHANG Yan-Hui² ZHAO Min-Min² TAN Bo² ZHANG Hai-Lu² DENG Zong-Wu^{*2}

(¹School of Nano Technology and Nano Bionics, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

(²Suzhou Institute of Nano-tech and Nano-bionics, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215123, China)

Abstract: Isoniazid (INH) was coupled with Gd-DO3A to yield Gd-DO3A-INH as a small molecule MRI contrast agent with good membrane penetration activity. Pulsed electroporation was used to introduce Gd-DO3A-INH into the cytosol of human mesenchymal stem cells in two different forms: free Gd-DO3A-INH and Gd-DO3A-INH nanoclusters. Cellular TEM demonstrated the formation of intracellular Gd-DO3A-INH nanoclusters. Cell proliferation and cellular MRI demonstrated that the two different forms of Gd-DO3A-INH exerted different effect on the longitudinal (T_1) and transverse (T_2) relaxations of cellular water protons. Free Gd-DO3A-INH is in favor of acceleration of T_1 relaxation, and exhibits fast exocytosis. Gd-DO3A-INH nanocluster is in favor of acceleration of T_2 relaxation, and exhibits a promoted cell retention time. As a result, cellular MRI exhibits a fast recovery of T_1 relaxation and T_1 -weighted signal intensity/contrast, and a delayed recovery of T_2 relaxation and T_2 -weighted signal intensity/contrast during cell proliferation.

Keywords: magnetic resonance imaging (MRI); Gd contrast agent; magnetic relaxivity; pulsed electroporation

0 引 言

磁共振影像(magnetic resonance imaging, MRI)是

在均匀磁场中不同生物组织中的水质子有序排列形成的磁矩受到特定的微波激发后, 其纵向(T_1)弛豫速率和横向(T_2)弛豫速率存在差异, 导致回波的

收稿日期: 2018-09-20。收修改稿日期: 2019-03-08。

国家自然科学基金(No.21673281、31371010), 中国科学院青年创新促进会(No.2012242)和中国科学技术部重点研究项目(No.2017YFA0104300)资助。

*通信联系人。E-mail: zwdeng2007@sinano.ac.cn

信号强度不同,在影像中形成对比度差异,实现对生物体的细胞、组织和器官的结构和功能成像^[1]。当不同组织的影像对比度接近时,通过引入造影剂来改变特定组织中水质子的弛豫速率,增强特定组织的对比度,可实现对该特定组织的成像^[2-5]。

MRI 信号强度由水质子的 T_1 和 T_2 弛豫速率共同决定,造影剂通过改变水质子的弛豫速率 T_1 和 T_2 来获得造影的效果。任何造影剂的引入既加速水质子的 T_1 弛豫速率,也加速其 T_2 弛豫速率,但是加速 T_1 弛豫速率导致 MR 信号增强,而加速 T_2 弛豫速率会导致 MR 信号减弱,最终的信号强度或造影效果取决于 2 个弛豫速率的变化对 MRI 信号强度影响的相对幅度^[1,6]。目前,Gd 基配合物由于 T_1 加速效应显著,是临床上使用最广泛的 T_1 型造影剂^[2-3,7-8];超顺磁氧化铁纳米粒子由于 T_2 加速效应显著,作为 T_2 型造影剂得到广泛的研究,并且有过有限的临床应用^[4-5]。

MRI 造影的物理机制赋予了其高度复杂性且难以预测的特点。造影剂对 T_1 和 T_2 弛豫速率的加速效应的相对强度一方面与造影剂的结构相关,如超小氧化铁纳米粒子可以呈现显著的 T_1 增强效应^[9-10],而 Gd 基配合物纳米粒子也可以呈现显著的 T_2 增强效应^[11-12]。另一方面,造影剂进入细胞或组织中,还与其在细胞中的聚集和运动状态高度相关,更增加了其复杂程度。近年来,虽然有些这方面的研究报道^[13-16],但对其认识还有待进一步深入。临床上,MRI 造影一方面主要应用于内源性的病变组织的诊断,另一方面在外源性移植细胞的示踪中也具有很大的应用前景。这些不同领域的应用要求进一步深入了解造影剂与细胞及组织的作用机制,以获得有价值的影像信息。

本文作者在前期研究中发现,特定结构的 Gd 基配合物通过脉冲电转染标记细胞,在将游离态造影剂引入细胞质的同时,也诱导部分造影剂组装成纳米粒子进入细胞质,2 种不同状态的造影剂分子对细胞水质子的弛豫速率影响机制存在显著的不同^[17-19]。在此基础上,我们利用异烟肼(INH)的良好生物膜穿透性^[20-21],将其与 Gd-DO3A 偶联,合成小分子造影剂 Gd-DO3A-INH。利用脉冲电转染技术标记间充质干细胞,有效提高进入细胞的 Gd-DO3A-INH 浓度,并诱导部分 Gd-DO3A-INH 在细胞质中自组装成纳米粒子。通过体外 MRI 清楚揭示 2 种不同状态的 Gd-DO3A-INH 对细胞水质子弛豫速率的影响

机制及其胞内浓度的涨落对 MRI 造影效果的影响机制。

1 实验部分

1.1 实验仪器与试剂

11.7 T 磁共振微成像系统(Bruker,德国);脉冲电转仪(壹达,中国);2535/2707 高效液相色谱仪(Waters,美国);X series 2 电感耦合等离子体发射质谱仪(ICP-MS)(Thermo,美国);Forma CO₂ 细胞培养箱(Thermo,美国)。

1,4,7,10-四氮杂环十二烷盐酸盐购自安耐吉化学公司(中国);细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(MTT)购自 Beyotime。血清、培养基 DMEM/F12、胰蛋白酶、双抗购自 Gibco 公司(美国);异烟肼,对羟基苯甲醛以及其他化学品购自国药化学试剂公司。

1.2 Gd-DO3A-INH 的合成

Gd-DO3A-INH 的合成步骤如图 1 所示。1,4,7-三(叔丁氧羰甲基)-10-(乙酸)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷[DO3A(OBu)₃]的合成由 1,4,7,10-四氮杂环十二烷盐酸盐经多步反应得到^[22-23]。在[DO3A(OBu)₃]上偶联对羟基苯甲醛和异烟肼(INH)后脱去叔丁基的保护,通过高效液相色谱仪分离得到纯度为 97%的配体 DO3A-INH。DO3A-INH 与 GdCl₃ 配位,反应完成后,利用 HPLC 分离得到 Gd-DO3A-INH,纯度为 90%。利用核磁共振波谱仪获得 DO3A-INH 的氢谱图(Supporting Information, Fig.S1);利用飞行时间质谱(TOF-MS)仪获得 DO3A-INH(Fig.S2)和 Gd-DO3A-INH 的质谱图(Fig.S3)。

DO3A-INH 的结构通过质谱和核磁共振氢谱表征。DO3A-INH(C₃₁H₄₃N₇O₉)的相对分子量为 657.31,质谱中质荷比(m/z) 658.4 为[M+H]⁺, 329.6 为[M+2H]²⁺, 220.1 为[M+3H]³⁺。氢谱中化学位移 6.8 和 7.7 处是苯环的特征峰,化学位移 8.1 和 8.7 处是异烟肼上吡啶环的特征峰。Gd-DO3A-INH(Gd(C₃₁H₄₀N₇O₉))相对分子量为 811.94,质谱中质荷比 811.8 为[M]⁺, 407.1 为[M+2H]²⁺, 271.7 为[M+3H]³⁺。

1.3 Gd-DO3A-INH 水溶液的弛豫率

配置一系列不同浓度(0~2.0 mmol·L⁻¹)的 Gd-DO3A-INH 水溶液,将配置好的溶液分别转入到 1.1 mm 内径的毛细管中。在 11.7 T 的 NMR 谱仪上,测量不同浓度 Gd-DO3A-INH 水溶液的 T_1 和 T_2 值,并通过电感耦合等离子体发射质谱仪(ICP-MS)测量 Gd 的浓度。

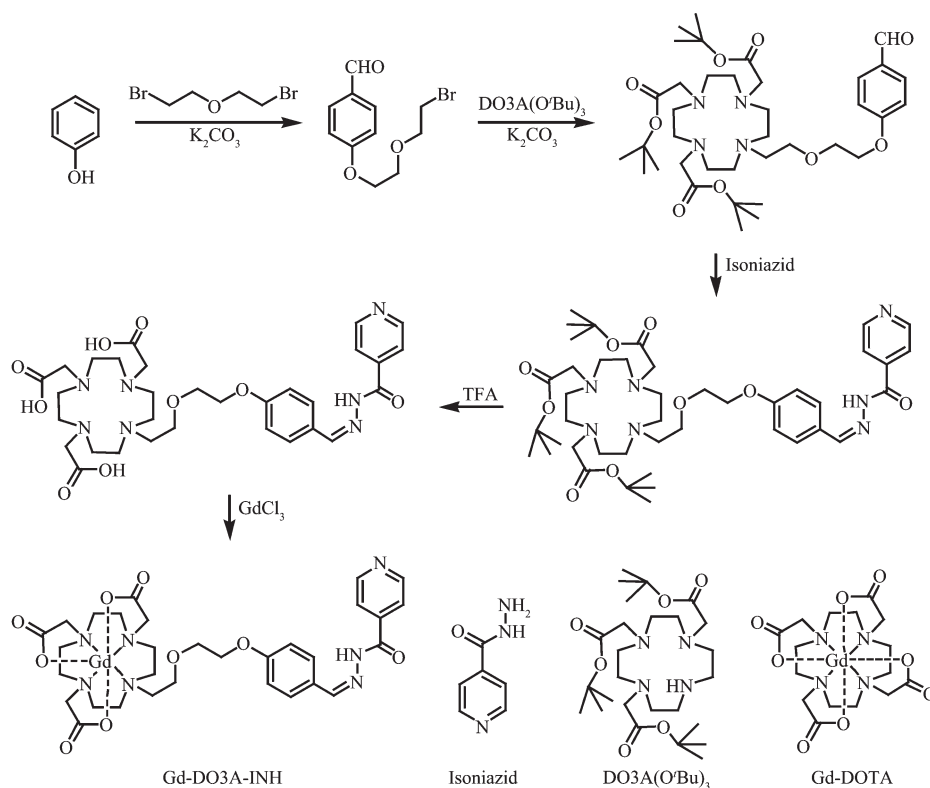


图 1 Gd-DO3A-INH 的合成步骤和 Gd-DOTA 的结构

Fig.1 Synthesis procedure of Gd-DO3A-INH and the structure of Gd-DOTA

1.4 人骨髓间充质干细胞(hMSCs)培养和脉冲电转染标记

将 hMSCs 接种在 100 mm×20 mm (每皿约 1×10^6 个细胞)培养皿中,在 37 ℃、5%(体积分数,下同) CO_2 培养箱中培养。使用电转液配置一系列浓度的 Gd-DO3A-INH 溶液 ($2, 4, 6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。将消化离心好的 hMSCs 分别重悬至 200 μL 的 Gd-DO3A-INH 电转染液中,随后转移到 96 孔板中进行脉冲电转染标记。将标记好的 hMSCs 转移到 15 mL 无菌离心管中, PBS 洗涤 3 次, 转入 100 mm×20 mm 培养皿中进行培养、传代,用于安全性实验或 TEM 实验。

1.5 Gd-DO3A-INH 电转染标记 hMSCs 的安全性

Gd-DO3A-INH 电转染标记 hMSCs 的安全性通过 MTT 试剂盒检测标记细胞的存活率进行评价,基于活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能够使外源性的 MTT 还原为蓝紫色甲瓞结晶并沉积在细胞中,而死细胞没有这个功能。用一系列不同浓度的 Gd-DO3A-INH($2, 4, 6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)通过电转染方法标记 hMSCs,按每孔 1×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板。未经任何处理的 hMSCs 以同样的密度接种于同一个 96 孔板中作为对照组。等量的培养基加入同

一 96 孔板中,作为空白组。将铺有细胞的 96 孔板置于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱培养,待细胞贴壁密度长至 80%后,每孔加入 100 μL 浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液,在 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养 3~4 h,缓慢吸出 MTT 溶液,每孔加 150 μL DMSO 溶液,放于摇床低速震荡 10 min。在酶标仪 490 nm 处测定蓝紫色甲瓞结晶的吸光度,以评估电转染标记和 Gd-DO3A-INH 对 hMSCs 的毒性。

1.6 TEM 观察 Gd-DO3A-INH 电转染标记的 hMSCs

采用透射电子显微镜(TEM)观察 Gd-DO3A-INH 电转染标记 hMSCs 24 h 后在细胞内的分布状态。用 2.5%(V/V)戊二醛将标记好的 hMSCs 在 4 ℃固定 6 h 以上,用 3%(w/w)的琼脂进行包埋,再用一系列体积分数为 30%,50%,70%,80%,90%,100%(3 次)的丙酮溶液脱水。脱水结束后,用 1:1(V/V)的包埋剂/100%丙酮浸泡细胞团块 1 h,然后用纯的环氧树脂包埋剂浸透 2 h 以上。随后放入模具中加热至 70 ℃聚合包埋 2 d。包埋好的细胞团块冷却后用超薄切片机(Leica UC6,美国)切成 70 nm 厚的细胞切片并负载到铜网支架上,用于 TEM 观察。

1.7 Gd-DO3A-INH 电转染标记 hMSCs 的细胞 MRI

将 Gd-DOTA(商用 Dotarem, 图 1)和 Gd-DO3A-INH 分别电转染标记 hMSCs 并转入 100 mm×20 mm 培养皿 (每皿约 1×10^6 个细胞) 中进行培养、传代。当细胞密度增殖到 80%时,使用胰蛋白酶消化 hMSCs, $1\,200\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 用 PBS 洗涤 2 次。离心所得的细胞沉淀一半用于增殖, 另一半用于体外 MRI。对于体外细胞 MRI, 将收获的细胞转移到内径为 1.1 mm 的毛细管中, 在 11.7 T NMR 谱仪 (Bruker-Biospin, 德国) 上采集 hMSCs 沉淀的 T_1 和 T_2 加权图像并测量 T_1 和 T_2 弛豫时间。将采集好 MRI 信息的 hMSCs 沉淀进行计数, 计数后将 hMSCs 沉淀进行消解至溶液清澈透明, 用超纯水定容至 5 mL, 然后用 ICP-MS 测定 Gd 含量。

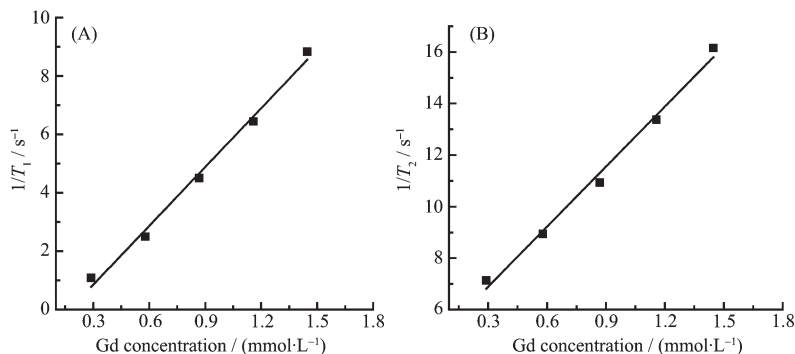


图2 Gd-DO3A-INH 溶液的 $1/T_1$ (A)和 $1/T_2$ (B)随 Gd 浓度的变化

Fig.2 (A) $1/T_1$ and (B) $1/T_2$ of Gd-DO3A-INH solutions as a function of Gd concentration

2.2 Gd-DO3A-INH 电转染标记 hMSCs 的安全性

MTT 实验结果表明(图 3), 将未标记的对照组 hMSCs 的存活率设为 100%, 经 T-TEST 方差分析,

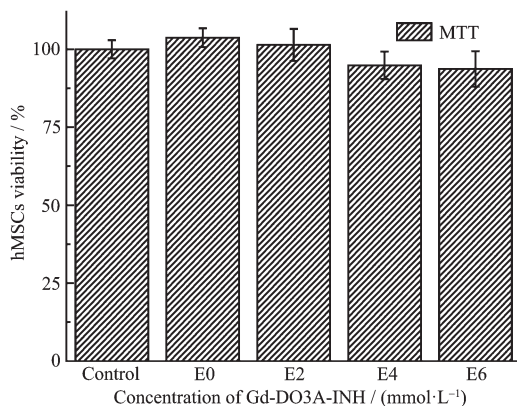


图3 Gd-DO3A-INH 脉冲电转染标记 hMSCs 的 MTT 实验结果

Fig.3 MTT assay of hMSCs labeled with Gd-DO3A-INH via electroporation

2 结果与讨论

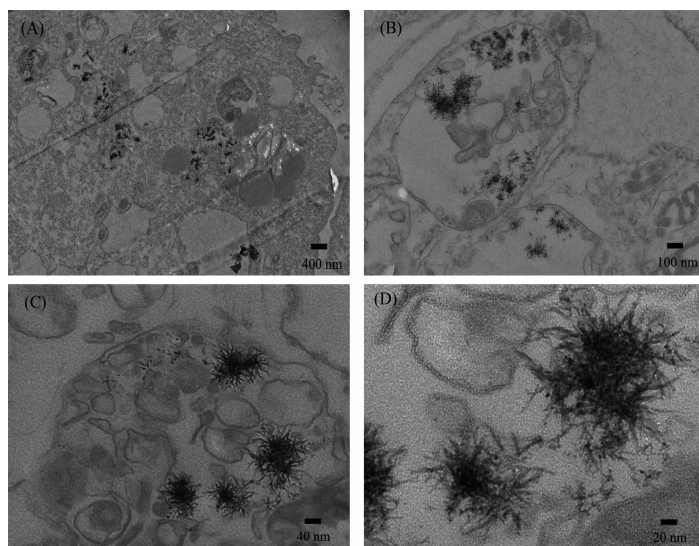
2.1 Gd-DO3A-INH 水溶液的弛豫率

Gd-DO3A-INH 的弛豫率以 Gd-DOTA ($r_1=3.74\text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$; $r_2=4.85\text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, 11.7 T) 作为对照。利用 11.7 T NMR 谱仪测量 Gd-DO3A-INH 溶液的纵向弛豫时间 T_1 和横向弛豫时间 T_2 值, 两者的倒数 $1/T_1$ 和 $1/T_2$ 分别定义为纵向弛豫速率和横向弛豫速率, 经线性拟合得到 Gd-DO3A-INH 在水溶液中的纵向弛豫率 r_1 和横向弛豫率 r_2 分别为 6.72 和 $7.77\text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ (图 2)。由于 Gd-DO3A-INH 在 Gd-DO3A 的基础上偶联了苯环和异烟肼, 增大了造影剂的分子量, 在一定程度上提高了其纵向弛豫率 r_1 和横向弛豫率 r_2 。

在本文实验条件下, 脉冲电转染过程对 hMSCs 的存活率与对照组无明显差异 (E0 vs Control), 电转染过程本身对 hMSCs 的存活率没有负面影响; 在 $0 \sim 6\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 实验浓度范围内, Gd-DO3A-INH 电转染标记 hMSCs, 与对照组相比, 标记的 hMSCs 存活率随 Gd-DO3A-INH 浓度的增加略有降低 (E2, E4, E6), 但均在 90% 以上。因此在本文实验条件下, Gd-DO3A-INH 电转染标记 hMSCs 具有较高的安全性。

2.3 Gd-DO3A-INH 标记 hMSCs 的细胞结合状态

通过 TEM 观察 Gd-DO3A-INH 在 hMSCs 中的聚集状态及分布 (图 4)。在 TEM 中清楚地观察到在细胞质中形成的 Gd-DO3A-INH 纳米团簇, 纳米团簇的尺寸为数百纳米到数微米, 由许多纳米针组成, 长度为 20~50 nm, 直径约为 5 nm。细胞内纳米团簇的形成过程在我们的前期工作中报道过: 探针首先聚集到细胞膜表面, 脉冲电转染诱导其在细胞膜进一步形成纳米团簇, 随后进入到细胞质中 [16-17]。



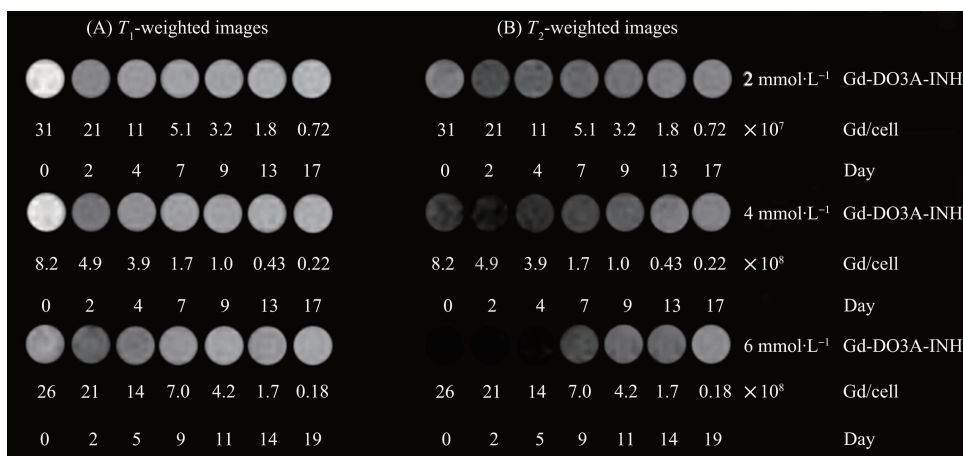
Bar size: (A) 400 nm, (B) 100 nm, (C) 40 nm, (D) 20 nm

图 4 浓度为 $6.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Gd-DO3A-INH 电转染标记 hMSCs 的 TEM 图像Fig.4 TEM images of hMSCs labeled with Gd-DO3A-INH via electroporation at $6.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

与此同时,在电转染标记过程中,一定量的游离 Gd-DO3A-INH 也被引入细胞质,特别是异烟肼还具有较强的生物膜穿透能力,更有利于游离态的 Gd-DO3A-INH 进出细胞,是本文选择 Gd-DO3A-INH 作为研究对象的主因,这点将在 MRI 结果中进一步讨论。因此,电转染将 2 种不同结合形式的 Gd-DO3A-INH 引入 hMSCs 的细胞质中,它们对细胞水质子的 T_1 和 T_2 弛豫过程呈现不同的影响,并最终反映到 MRI 信号强度即对比度中。与此同时,使用 Gd-DOTA 和电转染标记细胞时,没有观察到纳米团簇的生成。

2.4 Gd-DO3A-INH 标记 hMSCs 的体外 MRI

使用 $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Gd-DOTA 和不同浓度的 Gd-DO3A-INH (2.0 、 4.0 、 $6.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 电转染标记 hMSCs, 在标记后传代培养的不同时间点采集标记细胞的 T_1 和 T_2 加权信号强度并测量其 T_1 和 T_2 弛豫速率。图 5A 和 B 分别是 Gd-DO3A-INH 标记的 hMSCs 的 T_1 和 T_2 加权像;图 6A 和 B 分别给出 Gd-DOTA 和不同浓度的 Gd-DO3A-INH 相应的 T_1 和 T_2 加权信号强度随细胞传代培养时间的变化;图 6C 和 D 分别给出 Gd-DOTA 和不同浓度的 Gd-DO3A-INH 相应的 T_1 和 T_2 弛豫速率随细胞传代培养时间



Numbers in the first row below each image indicate the number of Gd atoms per cell; the numbers in the second row below each image indicate the time of cell proliferation

图 5 Gd-DO3A-INH 标记 hMSCs 的 11.7T 体外 (A) T_1 和 (B) T_2 加权 MR 像Fig.5 *In vitro* (A) T_1 - and (B) T_2 -weighted MR images of hMSCs labeled with Gd-DO3A-INH via electroporation at 11.7 T

的变化。

在 T_1 加权像中 (图 5A), Gd-DO3A-INH 标记的 hMSCs, 第 0 天(细胞标记当天)的 MRI 细胞影像中呈现出明显的信号增强效应, 在 2 天内呈现一个显著的降低, 在随后的传代培养中, 信号逐渐恢复到未标记细胞的信号强度水平(定量结果见图 6A); 在图 5B 的 T_2 加权成像中, Gd-DO3A-INH 标记的 hMSCs, T_2 加权成像呈现明显的暗信号减弱效应, 而且标记浓度越高, 信号减弱效应越显著, 持续的时间也越长(定量结果见图 6B)。从图 5B 中可以看到, 细胞内 Gd 浓度随转染液中 Gd-DO3A-INH 浓度增加而增加; 在随后的细胞传代过程中, 细胞分裂及胞吐等过程导致细胞内 Gd 含量逐渐降低。特别值得注意的是, 无论是 T_1 加权信号还是 T_2 加权信号, 从第 0 天到第 2 天都呈现了一个显著的信号突降的过程, 这个过程充分反映了 2 种不同结合状态 Gd-DO3A-INH 对细胞水质子的 T_1 和 T_2 弛豫过程的不同影响机制, 及其在随后的细胞传代培养过程中进出细胞效率的不同。图 6C 中 Gd-DOTA 的 T_1 弛豫速率在第 0 天显著加速, 在随后的 3 天加速效应快速地衰减, 由于 Gd-DOTA 电转染标记细胞时没有纳米团簇生成, 因此它主要反映了游离态 Gd-DOTA 的细胞稀释效应, 包括细胞增殖和胞吐 2 个

过程的贡献。同样 Gd-DO3A-INH 的 T_1 弛豫速率在第 0 天也显著加速, 在随后的第 2 天和第 4 天这一加速效应快速衰减, 基于其与 Gd-DOTA 结果的相似性, 我们认为它主要反映的也是游离态 Gd-DO3A-INH 的细胞稀释效应。由于脉冲电转染标记过程和异烟肼的性质都有利于游离态 Gd-DO3A-INH 进入细胞, 因此标记的 hMSCs 在第 0 天含有大量的游离态 Gd-DO3A-INH, 呈现出显著的 T_1 加速效应。在随后的细胞传代培养过程中, 同样由于异烟肼的穿膜性质, 游离态 Gd-DO3A-INH 会很快通过细胞的胞吐功能被排出细胞外, 并在细胞的后续处理过程中被清除, 因此传代培养的细胞水质子的 T_1 弛豫速率快速恢复。图 6D 中 Gd-DO3A-INH 的 T_2 弛豫速率也显著加速, 一方面其加速的幅度远大于 Gd-DOTA 电转染标记的细胞的 T_2 弛豫速率, 另一方面, 该加速效应衰减的速度要比后者慢很多, 也比其本身的 T_1 加速效应衰减的速度慢很多, 因此我们认为 T_2 加速效应主要反映的是 Gd-DO3A-INH 纳米簇引入的局部磁场不均匀对水质子 T_2 弛豫过程的加速效应; 而在随后的细胞增殖过程中, 它的衰减速度要比 T_1 加速效应慢得多, 主要反映了 Gd-DO3A-INH 纳米簇在细胞中滞留时间长的性质。

Gd-DO3A-INH 通过电转染进入细胞后, 一部分

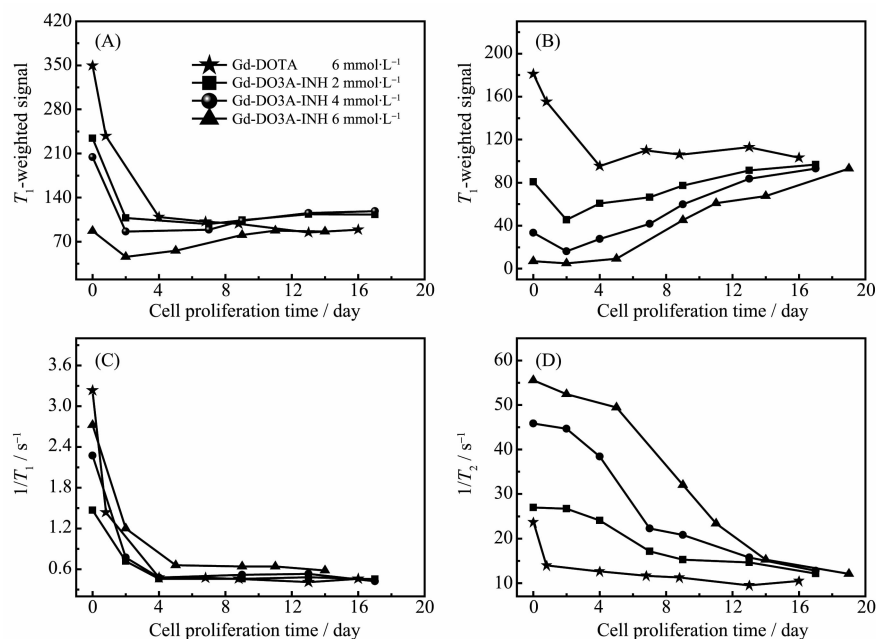


图 6 Gd-DOTA 和不同浓度 Gd-DO3A-INH 电转染标记 hMSCs 的(A) T_1 加权信号, (B) T_2 加权信号, (C) T_1 弛豫速率, (D) T_2 弛豫速率随传代培养时间的变化

Fig.6 (A) T_1 - and (B) T_2 -weighted MRI signal, (C) T_1 - and (D) T_2 -relaxation rates of hMSCs labeled with Gd-DOTA and Gd-DO3A-INH via electroporation at different concentration as a function of cell proliferation time

自组装成数百纳米到数微米的簇状结构分布在细胞质中,一部分以游离态分布在细胞质中。游离态 Gd-DO3A-INH 有利于加速细胞水质子的 T_1 弛豫速率, Gd-DO3A-INH 纳米团簇有利于加速细胞水质子的 T_2 弛豫速率。在第 0 天,胞内游离态 Gd-DO3A-INH 含量高, T_1 加速效应在 MR 信号强度中起主导作用,有利于信号增强。在传代培养 2 天后,大部分游离态 Gd-DO3A-INH 通过细胞的胞吐功能被排出细胞外,细胞内滞留的 Gd-DO3A-INH 纳米粒子与水分子的接触受到一定的限制,降低了其 T_1 效应,导致 T_1 加速效应在 MR 信号强度中的贡献快速衰减;同时处于聚集状态的造影剂使得细胞中的磁不均匀性显著增加,增强了其 T_2 效应, T_2 加速效应的贡献突显,有利于信号减弱。因此从第 0 天到第 2 天,出现 T_1 和 T_2 加权信号显著衰减(图 6A 和 B)。在随后的细胞传代过程中, T_2 加速效应在 MR 信号强度中起主导作用,且细胞中 Gd-DO3A-INH 纳米团簇浓度伴随细胞传代增殖过程逐渐降低,因此 T_1 和 T_2 加权信号逐渐恢复到无标记细胞水平(图 6A 和 B)。

3 结 论

利用异烟肼(INH)的良好生物膜穿透性,合成了小分子 MRI 造影剂 Gd-DO3A-INH,利用脉冲电转染技术标记间充质干细胞,可以有效提高游离态 Gd-DO3A-INH 进出细胞的效率,并诱导部分 Gd-DO3A-INH 在细胞质中自组装成纳米粒子。通过细胞传代实验和体外 MRI 清楚揭示了 2 种不同状态的 Gd-DO3A-INH 对细胞水质子 T_1 和 T_2 弛豫速率的不同影响机制:游离态 Gd-DO3A-INH 的 T_1 加速效应显著, Gd-DO3A-INH 纳米团簇的 T_2 加速效应显著;在细胞传代过程中细胞内 2 种不同状态 Gd-DO3A-INH 的浓度涨落引起的 MRI 造影效果的变化:游离态 Gd-DO3A-INH 在细胞标记及随后的传代培养过程中进出细胞效率高, T_1 加速效应衰减快, Gd-DO3A-INH 纳米团簇在细胞中滞留时间长, T_2 造影效果持续时间久。这些作用机制的揭示可以引导设计针对不同应用领域的 MRI 造影剂。

Supporting information is available at <http://www.wjhxsb.cn>

参考文献:

- [1] McRobbie D W. *MRI from Picture to Proton*. New York: Cambridge University Press, **2007**:394
- [2] Caravan P, Ellison J J, McMurry T J, et al. *Chem. Rev.*, **1999**, **99**(9):2293-2352
- [3] Villaraza A J L, Bumb A, Brechbiel M W, et al. *Chem. Rev.*, **2010**, **110**(5):2921-2959
- [4] Corot C, Robert P, Idée J M, et al. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2006**, **58**(14):1471-1504
- [5] Mahmoudi M, Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, et al. *Chem. Rev.*, **2011**, **111**(2):253-280
- [6] Cao L M, Li B B, Yi P W, et al. *Biomaterials.*, **2014**, **35**(13):4168-4174
- [7] ZHANG Chang-Li(张长丽), GU Fei-Chen(顾费晨), CHEN Chang-Yun(陈昌云), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2014**, **30**(12):775-2780
- [8] LONG Na(龙娜), XIANG Guang-Ya(项光亚), TANG Da-Zong(唐大宗), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2007**, **23**(5):759-764
- [9] Sandiford L, Phinikaridou A, Protti A, et al. *ACS Nano*, **2013**, **7**(1):500-512
- [10] Kim B H, Lee N, Kim H, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, **133**(32):12624-12631
- [11] El-Gendy A A, Harstad S M, Vijayaragavan V, et al. *IEEE Magn. Lett.*, **2017**, **8**:1507504
- [12] Ciofani G, Boni A, Calucci L, et al. *Nanotechnology*, **2013**, **24**(31):1-7
- [13] Terreno E, Geninatti C S, Belfiore S, et al. *Magn. Reson. Med.*, **2006**, **55**(3):491-497
- [14] Gianolio E, Arena F, Strijkers G J, et al. *Magn. Reson. Med.*, **2011**, **65**(1):212-219
- [15] Endres P J, MacRenaris K W, Vogt S, et al. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, **19**(10):2049-2059
- [16] Gregorio E D, Ferrauto G, Gianolio E, et al. *Contrast Media Mol. Imaging*, **2013**, **8**:475-486
- [17] Zhang Y H, Zhang H Y, Li B B, et al. *Nano Res.*, **2017**, **11**(3):1625-1641
- [18] Zhang Y H, Zhang H Y, Zhang H L, et al. *Mol. Med. Rep.*, **2017**, **16**(4):4068-4074
- [19] Zhang P L, Zhang Y H, Li B B, et al. *J. Pept. Sci.*, **2018**, **24**:1-10
- [20] Iqbal M, Ezzeldin E, Bhat M A, et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2016**, **117**(5):109-117
- [21] Chen S T, Han Y, Yu D P, et al. *Drug Deliv.*, **2017**, **24**(1):467-470
- [22] Grogna M, Cloots R, Luxen A, et al. *J. Mater. Chem.*, **2011**, **21**(34):12917-12926
- [23] Li C, Winnard P, Bhujwalla Z M. *Tetrahedron Lett.*, **2009**, **50**(24):2929-2931