

MRI 对比剂 Gd-DO3A-Ether-Rhein 的合成及其 坏死亲和性研究

张立邦^{1,2,3}, 张东建^{2,3}, 高萌^{2,3}, 金乔梅^{2,3}, 吴天泽^{1,2,3}, 杨阳^{2,3}, 张健^{2,3*}, 殷志琦^{1**}

¹中国药科大学中药学院中药制剂系 & 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 南京 210009;

²江苏省中医药研究院转化医学实验室, 南京 210028; ³南京中医药大学附属中西医结合医院 南京 210028)

摘要 以大黄酸为底物、醚链为连接臂合成磁共振成像(MRI)对比剂并评价其坏死亲和性。合成新的配体 10-[6-(1,8-二羟基蒽醌-3-甲酰氨基)乙氧基乙基]氨基}羧基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三乙酸(DO3A-Ether-Rhein, 即 E1), 再与 Gd³⁺ 配位得到顺磁性对比剂 10-[6-(1,8-二羟基蒽醌-3-甲酰氨基)乙氧基乙基]氨基}羧基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三乙酸合钆(Gd-DO3A-Ether-Rhein, 即 GdE1)。分别在高温诱导的人肝癌 HepG2 细胞坏死模型和微波消融诱导的大鼠肌肉坏死模型上评价探针的坏死亲和性。动物试验中, 分别在给予 GdE1 (0.1 mmol/kg) 前和给药后 0~9 h 进行 MRI 成像, Gd-DOTA(1,4,7,10-四乙酸-1,4,7,10-四氮杂环十二烷合钆)作为对照。MRI 成像结果表明, 坏死细胞的信号强度(4 369 ± 70)显著高于正常细胞(2 555 ± 84) ($P < 0.05$); 在 GdE1 给药后 3 h, 坏死肌肉与正常肌肉的对比度为 2.00 ± 0.12, 显著高于给药后 0 h (1.27 ± 0.03) ($P < 0.05$)。上述结果表明, GdE1 具有良好的坏死亲和性, 在坏死相关疾病的诊断上显示出良好的应用潜力。

关键词 大黄酸; Gd-DO3A-Ether-Rhein; 坏死亲和性; 对比剂; 磁共振成像

中图分类号 R445.2; R914.5 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2019)04-0444-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20190409

引用本文 张立邦, 张东建, 高萌等. MRI 对比剂 Gd-DO3A-Ether-Rhein 的合成及其坏死亲和性研究[J]. 中国药科大学学报, 2019, 50(4): 444–451.

Cite this article as: ZHANG Libang, ZHANG Dongjian, GAO Meng, et al. Synthesis and evaluation of necrosis avidity of MRI contrast agent Gd-DO3A-Ether-Rhein[J]. J China Pharm Univ, 2019, 50(4): 444–451.

Synthesis and evaluation of necrosis avidity of MRI contrast agent Gd-DO3A-Ether-Rhein

ZHANG Libang^{1,2,3}, ZHANG Dongjian^{2,3}, GAO Meng^{2,3}, JIN Qiaomei^{2,3}, WU Tianze^{1,2,3}, YANG Yang^{2,3}, ZHANG Jian^{2,3*}, YIN Zhiqi^{1**}

¹Department of TCMs Pharmaceuticals, School of TCM & State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²Laboratory of Translational Medicine, Jiangsu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028; ³Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract The aim of this study was to synthesize and evaluate the necrosis avidity of MRI contrast agent based on rhein and linked by ether. The novel ligand 10-[[6-(1,8-dihydroxyanthraquinone-3-carboxamido)ethoxyethyl]amino]carbonylmethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triacetic acid (DO3A-Ether-Rhein, E1) was syn-

收稿日期 2019-03-11 通信作者 * Tel: 025-52362107 E-mail: zhangjian@jstcm.com

** Tel: 025-86185371 E-mail: chyq2005@126.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81771870); 江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目(YY-011); 江苏省自然科学基金资助项目(No. 20171512); 高层次卫生人才“六个一工程”拔尖人才科研资助项目(No. LGY2018075); 双一流学科创新团队资助项目(No. CPU2018GF05, No. CPU2018GY31)

thesized by two steps of acylation and deprotection reaction. The paramagnetic gadolinium 10-[[6-(1, 8-dihydroxyanthraquinone-3-carboxamido) ethoxyethyl] amino] carbonylmethyl-1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecan-1, 4, 7-triacetic acid (Gd-DO3A-Ether-Rhein, GdE1) was obtained by coordination of Gd^{3+} with the above ligand. We examined the necrotic avidity of GdE1 in human hepatocellular carcinoma HepG2 cell necrosis induced by hyperthermia *in vitro* and in rat model with muscular necrosis induced by microwave ablation *in vivo* by MRI. The MRI was implemented before administration of GdE1 and during 0-9 h after administration of GdE1 (0. 1 mmol/kg), and Gd-DOTA (gadolinium 1, 4, 7, 10-tetraacetic acid-1, 4, 7, 10-tetraazacyclo dodecane) was used as control. The signal intensity of necrotic cells ($4\ 369 \pm 70$) was significantly higher than that of normal cells ($2\ 555 \pm 84$) ($P < 0. 05$). Similarly, the contrast ratio between necrotic and normal muscle at 3 h after administration of GdE1 ($2. 00 \pm 0. 12$) was remarkably higher than that at 0 h after administration of GdE1 ($1. 27 \pm 0. 03$) ($P < 0. 05$). Therefore, GdE1 presents good necrosis affinity and has the potential to be used in the diagnosis of necrosis-related diseases.

Key words rhein; Gd-DO3A-Ether-Rhein; necrosis avidity; contrast agent; magnetic resonance imaging

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81771870); the Six Talent Peaks Project of Jiangsu Province (YY-011); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. 20171512); the “Six one project” for High Level Medical Talents (No. LGY2018075); the Funding of Double First-rate Discipline Innovation Team (No. CPU2018GF05, No. CPU2018GY31)

坏死是一种由于急性物理化学损伤或突然的代谢失败(如机械损伤、感染、毒素和缺血)导致的细胞不可逆损伤的死亡形式^[1-2]。细胞坏死发生于多种疾病中,如肿瘤、心肌梗死和脑卒中等^[3-4]。同时,一些肿瘤治疗方法,如热消融、血管阻断剂等,主要通过诱导肿瘤细胞坏死达到杀伤肿瘤的目的^[5-6]。因此,非侵入性成像坏死组织对相关疾病的早期诊断、治疗效果评价及治疗方案的调整具有重要的意义^[7-8]。

坏死亲和性探针是一类能够特异性浓聚于坏死组织,从而对坏死组织进行可视化的化合物。本课题组前期研究发现单蒽醌类化合物具有良好的坏死亲和性和血浆药代动力学性质^[9],其中大黄酸(rhein)是一种有潜力的先导化合物。基于大黄酸构建的单光子发射计算机断层显像(SPECT)探针^{99m}Tc-HYNIC-Rhein,在心肌坏死的快速成像和肿瘤治疗反应早期监测方面显示出良好的应用潜力^[10-11],但是SPECT成像空间分辨率较低,难以准确评估坏死的边界。

磁共振成像(MRI)是临床常用的成像手段,该技术具有时空分辨率高且没有辐射的优点。因此,本课题组构建了基于大黄酸的不同长度烷烃链连接臂的MRI对比剂Gd-DO3A-Linker-Rhein(GdL₁₋₃),实验结果表明三者的弛豫率及水溶性表现出较大的差异,这说明连接臂的差异会对造影

剂本身的理化性质产生影响。同时,该研究发现GdL₁能够在给药后3 h对CA4P治疗导致的大鼠皮下W256肿瘤坏死区域进行成像^[12],GdL₃具有良好的成像坏死组织的潜力^[13]。MRI技术灵敏度较低,需要大量的对比剂才能显像,因此需要MRI对比剂具有良好的水溶性,但是GdL₃的油水分分配系数为 $-(0. 71 \pm 0. 01)$,其水溶性有待提高;另一方面,连接臂的差异会对造影剂的理化性质产生影响^[12,14],上述MRI对比剂仅以烷烃链为连接臂构建探针,因此更换不同种类的连接臂进行更深入的研究,可能得到水溶性更好且保留坏死亲和性的以大黄酸为基础的MRI对比剂。

近年来,醚链(ether)被广泛用于放射性探针的结构修饰中以改善药物的某些理化性质和药代动力学特性^[14-16],因此本研究以大黄酸为基础,以较短的醚链(乙氧基乙基)为连接臂构建坏死亲和性MRI对比剂Gd-DO3A-Ether-Rhein(GdE1),考察其水溶性和弛豫率的改变、体内外的坏死靶向性及MRI成像效果。

1 材 料

1. 1 药品与试剂

大黄酸(rhein,成都思天德生物有限公司);苯并三氮唑-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)、2-琥珀酰亚胺基-1,1,3,3-四甲基脲四氟

硼酸酯(TSTU)(上海毕得医药科技有限公司)、*N*-乙基二异丙胺(DIPEA)、三氟乙酸(TFA);[2-(2-氨基乙氧基)乙基]氨基甲酸叔丁酯(上海毕得医药科技有限公司);1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸三叔丁基酯[DOTA-*tris*(*t*-Bu) ester, 美国 Macro-cyclics 公司];其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

Echo speed Plus 1.5 T 磁共振仪(美国 GE 公司);AW 4.3 后处理工作站;NM120 核磁共振造影剂弛豫分析与成像系统(苏州纽迈分析仪器股份有限公司);Shandon 冰冻切片(英国 Thermo Fisher Scientific 公司);全波长多功能酶标仪(美国赛默飞世尔科技有限公司)。

1.3 细胞与动物

人肝癌 HepG2 细胞株和人正常肝 IO2 细胞株购自上海细胞库;雄性 SD 大鼠,体重(220 ± 10) g, 购买自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号:SCXK(沪)2017-0005。研究中大鼠的护理符合美国国立卫生研究院公布的《实验动物保健原则》No. 85-23(1996 年修订),该项研究得到动物使用委员会和保健机构的批准。

2 方法

2.1 10-[6-(1,8-二羟基蒽醌-3-甲酰氨基)乙氧基乙基]氨基}羧酸甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三乙酸合钆(Gd-DO3A-Ether-Rhein, 即 GdE1)的合成

2.1.1 化合物 1 的合成 在 500 mL 圆底烧瓶中加入大黄酸 1.24 g(4.36 mmol)和 130 mL 乙腈,缓慢滴加[2-(2-氨基乙氧基)乙基]氨基甲酸叔丁酯 863 μL(4.36 mmol),再加入 2-琥珀酰亚胺基-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸酯(TSTU) 1.45 g(4.82 mmol),并滴加 *N*-乙基二异丙胺(DIPEA) 2 mL(11.5 mmol)至反应液,室温搅拌 24 h,旋转蒸发除掉溶剂,经过硅胶柱纯化(二氯甲烷-甲醇,70:1)得到黄色固体化合物 1(1.08 g,52.43%)。

2.1.2 化合物 2 的合成 在 50 mL 圆底烧瓶中依次加入化合物 1 800 mg(1.70 mmol)、三氟乙酸 1 mL 和二氯甲烷 10 mL,室温条件下反应 6 h,旋转蒸发除掉溶剂,加入无水乙醚 10 mL,抽滤,滤饼经 45 °C 真空干燥得到黄色滤饼化合物 2 粗产物,粗产物不进行纯化。

2.1.3 化合物 3 的合成 称取苯并三氮唑-*N,N,N'*,*N'*-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU) 631 mg(1.66 mmol)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸三叔丁基酯 866 mg(1.51 mmol)于 50 mL 圆底烧瓶中,加入 DMF 5 mL 室温搅拌溶解,滴加 *N*-乙基二异丙胺(DIPEA) 527 μL(3.0 mmol),室温搅拌 5 ~ 10 min 后,将化合物 2 粗品(560 mg, 1.51 mmol)的 DMF(5 mL)溶液滴加到上述反应液中,室温搅拌 12 h,反应结束后,减压除去溶剂,得到褐色油状产物化合物 3,不进行纯化,直接进行下一步反应。

2.1.4 配体 10-[6-(1,8-二羟基蒽醌-3-甲酰氨基)乙氧基乙基]氨基}羧酸甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三乙酸(DO3A-Ether-Rhein, 即 E1)的合成 将上述褐色油状产物化合物 3 置于 250 mL 茄型瓶中,分别加入二氯甲烷 9 mL 和三氟乙酸 3 mL,室温条件下反应 6 h,旋转蒸发除掉溶剂得到粗产物,粗产物经过反相色谱柱纯化(流动相为甲醇-水,60:40)得到黄色固体 DO3A-Ether-Rhein(E1)(865.1 mg,74.82%,该产率由“2.1.2”中化合物 1 投料量计算得到)。

2.1.5 Gd-DO3A-Ether-Rhein(GdE1)的合成 将六水合氯化钆 250 mg(0.67 mmol)和 E1 500 mg(0.66 mmol)溶于去离子水 10 mL 中,用 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至近中性,室温搅拌 12 h 后停止反应,减压除去溶剂,所得产物经反相色谱柱纯化(流动相为甲醇-水,80:20)得到黄色固体 Gd-DO3A-Ether-Rhein(GdE1)(468.2 mg,77.79%)。

2.2 弛豫率测定及体外磁共振成像

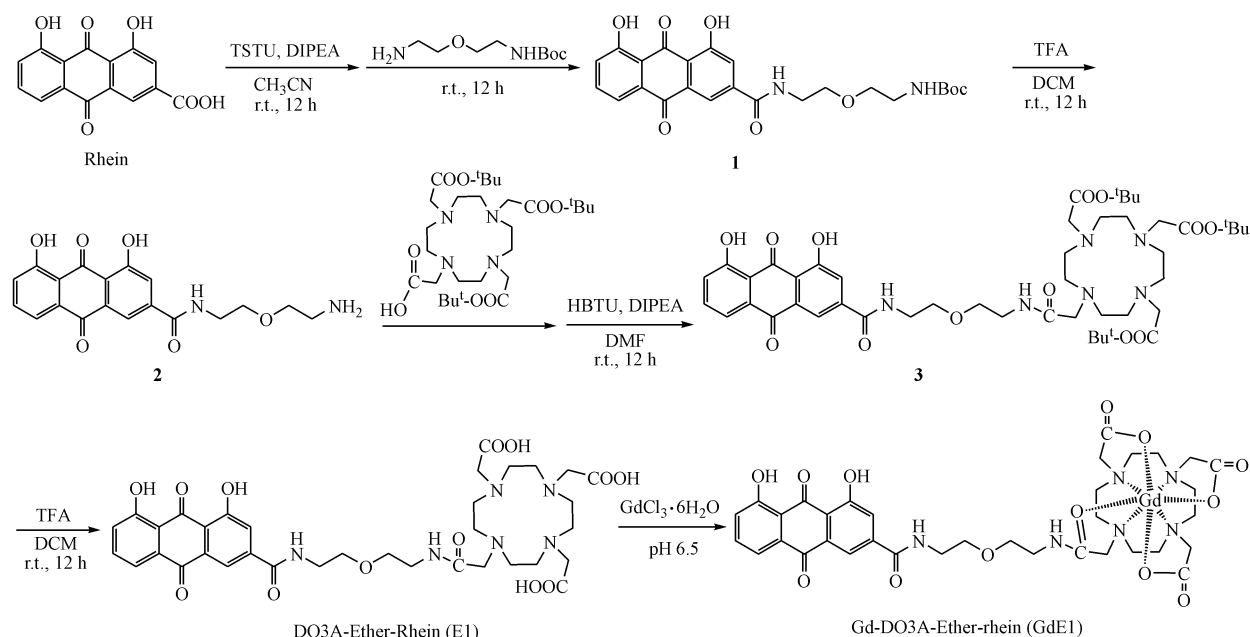
参考文献[13]的方法,以 PBS(pH 7.4)为溶剂,将 GdE1 配制成 5 个浓度(0.125,0.25,0.5,1.0,2.0 mmol/L)的样品,分别检测 5 个样品对应的纵向弛豫时间 t_1 ,以浓度为横坐标、 $1/t_1$ 为纵坐标拟合直线,得到直线的斜率即为 r_1 ,利用 NM120(0.5 T)核磁共振造影剂弛豫分析与成像系统对上述 5 个样品进行成像,设置参数:重复时间 160 ms,层厚 0.7 mm,回波时间 13.5 ms。Gd-DOTA 弛豫率的检测方法与 GdE1 相同。

2.3 油水分配系数($\lg P$)的测定

采用摇瓶法进行测量^[17],以 pH 7.4 正辛醇饱和的 PBS 为溶剂将 GdE1 配制成不同浓度的样品,从不同浓度的样品中各量取 3 mL 分别在 435 nm

下测量吸收度,标记为 A_0 。测量 A_0 后,再分别加入 PBS 饱和的正辛醇溶液 3 mL,在室温下剧烈涡旋 15 min,然后在 14 000 r/min 条件下离心 5 min,

测量 PBS 层吸收度,标记为 A_1 ,根据公式 $\lg P = \lg[(A_0 - A_1)/A_1]$ 计算油水分配系数 ($\lg P$),每个药物测量 3 次。



Scheme 1 Synthesis of Gd-DO3A-Ether-Rhein (GdE1)

2.4 细胞毒性实验

分别取人肝癌 HepG2 细胞和人正常肝 IO2 细胞进行消化传代,在 96 孔板中接种细胞 (1×10^4 个/孔),等细胞出现贴壁现象,吸走培养基,加入无血清组织的 DMEM 培养细胞 8 h,分别加入 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 GdE1,空白组 (Control) 加入无血清的 DMEM,孵育细胞 24 h,吸走培养基,每孔加入 MTT 20 μL (5 mg/mL),孵育细胞 4 h,将上清液除去,每孔加入 DMSO 150 μL ,在 490 nm 处用酶标仪测定吸收度,计算细胞活力,实验按照相同的方法进行 3 次。Gd-DOTA 的细胞毒检测方法与 GdE1 相同。

2.5 细胞体外磁共振成像实验

在 6 孔细胞培养板上加入人肝癌 HepG2 细胞,每孔 5×10^5 个,在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中培养,在培养箱中过夜 (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2)。

在 57 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 1 h 诱导细胞坏死^[18],将经高热处理的细胞与未经高热处理的细胞分别取出,离心后将上清液除去,分别加入不含血清的培养基 100 μL 和 GdE1 (3×10^{-3} mmol/L) 100 μL ,振荡混匀后在细胞培养箱中孵育 30 min,接下来离心 10 min (1 000 r/min),吸走上清液,用 PBS 洗涤

1 次,再加入干净的 PBS 充分混匀,放在样品瓶中进行磁共振成像。

2.6 大鼠肌肉坏死模型的制备

微波消融是一种常见的诱导组织坏死的手段,根据文献方法^[19],本次实验选取 6 只 220 ~ 240 g 大鼠,腹腔注射戊巴妥钠 (40 mg/kg) 麻醉,将微波消融针插入大鼠左腿的肌肉中,30 W 维持 20 s 引发大腿肌肉坏死,为避免感染,在每只大鼠的肌肉内注射了 1.6×10^5 IU 的青霉素。

2.7 肌肉坏死模型大鼠的 MR 成像及数据处理

将肌肉坏死模型大鼠分为两组:对照组 (Gd-DOTA) 3 只,给药组 (GdE1) 3 只。起初采用 $T_1\text{WI}$ 和 $T_2\text{WI}$ 扫描 6 只大鼠的腿部,两组均按照 0.1 mmol/kg 的浓度给药,给药后进行 CE- $T_1\text{WI}$ 扫描,扫描后利用 GE AW4.3 工作站处理数据。参数设置为^[13]: $T_1\text{W SE}$ 序列: TE 24 ms, TR 550 ms; CE- $T_1\text{W SE}$ 序列: TE 60 ms, TR 550 ms; $T_2\text{W FSE}$ 序列: TE 88 ms, TR 2920 ms。间隔 0.2 mm,层厚 3 mm,FOV $100 \times 100 \text{ cm}^2$,NEX 2 次,矩阵 224×192 。

在相同截面同一位置的肌肉 MRI 图像上挑选感兴趣区域 (ROI),对该区域不同时间点的信号值

(SI)进行测量,根据公式 $CR = SI_{\text{necrosis}}/SI_{\text{normal}}$ 计算坏死肌肉与正常肌肉的对比度(CR),分别计算给药后各时间点的CR。

2.8 大体切片及HE染色

在MRI扫描结束前6h每组取1只大鼠尾静脉注射0.05%伊文思蓝溶液0.4mL,扫描结束后将给予伊文思蓝的大鼠进行安乐死,使其平躺固定在大鼠纸板上,置于-20℃冰箱冰冻8h,随后在大体切片机上进行切片,当切到与MRI图像对应的层面时用数码相机进行拍照。

在上述冷冻大鼠体内取出部分相关肌肉组织,用冰冻切片机切成10μm薄片,将薄片进行HE染色,染色后用数码相机进行拍照,最后在显微镜下观察肌肉细胞的形态。

2.9 数据的统计学分析

实验结果中的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据在SPSS 11.0中进行统计学分析,采用单因素方差分析、*t*检验进行两组之间的比较, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 配体E1的结构鉴定

通过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、ESI-MS鉴定其结构。 ^1H NMR(300 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.80(2H, s, -OH), 8.99(s, 1H, -NH), 8.50(s, 1H, -NH), 7.85 ~ 7.72(m, 4H, Ar-H), 7.40(d, 1H, $J = 9.0$ Hz, Ar-H), 3.92(m, 2H, CH₂-O), 3.81(m, 2H, -OCH₂), 3.61 ~ 2.81(m, 12H, 6 × CH₂), 1.42 ~ 1.24(m, 16H, 8 × CH₂)。 ^{13}C NMR(75 MHz, DMSO- d_6) δ : 191.35, 171.37, 164.19, 161.23, 141.54, 137.51, 124.52, 122.42, 119.38, 117.55, 68.40, 54.84, 54.00, 53.10, 50.52, 48.77, 39.23, 38.78。分子式: C₃₅H₄₄N₆O₁₃。ESI-MS m/z : 757.3[M + H]⁺。

3.2 GdE1的弛豫测定及体外成像

图1-A呈现了不同浓度的GdE1以及Gd-DOTA的成像图,从左到右浓度逐渐增加,由此可知在0~2 mmol/L浓度范围内,随着造影剂的浓度的增加,信号逐渐增强。从图1-B可以看出GdE1在PBS中的 r_1 (5.45, $R^2 > 0.99$)显著高于临床上常用的磁共振对比剂Gd-DOTA(4.08, $R^2 > 0.99$)。

3.3 油水分配系数(lg *P*)的测定

测得GdE1的lg *P*为-(1.66 ± 0.09)。

3.4 细胞毒性实验

图2-A可以看出在12.5~200 μmol/L浓度范围内,GdE1组和Gd-DOTA组的HepG2细胞存活率均与空白组没有显著性差异($P > 0.05$),说明在此浓度范围内GdE1和Gd-DOTA对人肝癌HepG2细胞没有毒性。图2-B中可以看出,在12.5~25 μmol/L浓度范围内,GdE1组和Gd-DOTA组的IO2细胞存活率均与空白组没有显著性差异($P > 0.05$),说明在低浓度范围内GdE1和Gd-DOTA对人正常肝IO2细胞没有毒性。但是在50~200 μmol/L浓度范围内,GdE1组的IO2细胞存活率均与空白组相比具有显著性差异($P < 0.05$);在100~200 μmol/L浓度范围内,Gd-DOTA组的细胞存活率与空白组相比具有显著性差异($P < 0.05$)。因此,相比于肝癌细胞,GdE1与Gd-DOTA在正常肝细胞中的安全性较低。

3.5 体外细胞成像实验

图3显示,在与GdE1共同孵育30 min以后,坏死细胞的亮度明显比活细胞的亮度高,同时坏死细胞的信号强度(4 369 ± 70)显著高于活细胞(2 555 ± 84)($P < 0.05$),这些现象表明GdE1能够被坏死细胞特异性摄取。

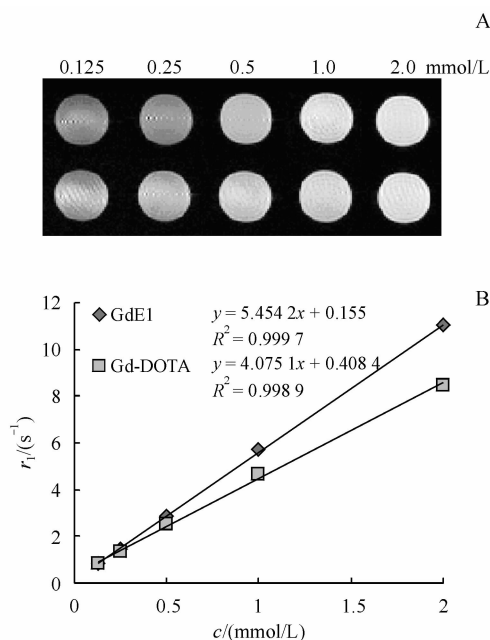


Figure 1 Relaxation measurement and images of GdE1 (upper panels) and Gd-DOTA (lower panels) in PBS (pH 7.4) with different conditions (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mmol/L)

A: Images of GdE1 and Gd-DOTA; B: Relaxivity of GdE1 and Gd-DOTA

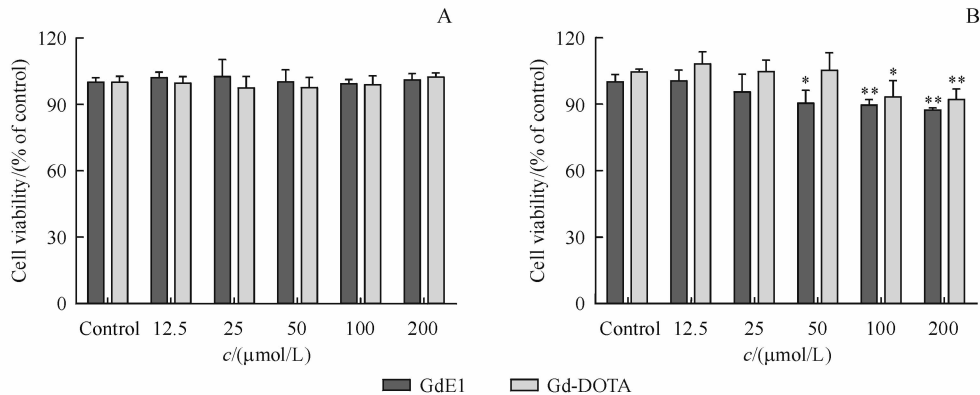


Figure 2 MTT assay of GdE1 and Gd-DOTA with different conditions (0, 12.5, 25, 50, 100, 200 μmol/L)

A: MTT in the human hepatocellular carcinoma HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$); B: MTT in the human normal hepatic IO2 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

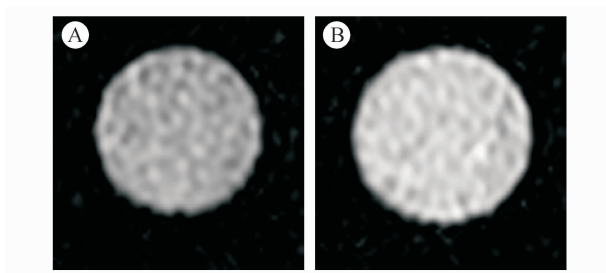


Figure 3 MR images of the human hepatocellular carcinoma HepG2 cells

A: HepG2 treated with GdE1 for 30 min; B: HepG2 heated in 57 °C for 1 h and then treated with GdE1 for 30 min

3.6 大鼠肌肉坏死成像、大体切片及组织化学染色结果

如图 4-A 所示, GdE1 组在给药后 1 h, 坏死肌肉信号强度明显高于正常肌肉, 但坏死组织的边界有些模糊; 等到了给药后 3 h, 坏死肌肉与正常肌肉信号的坏死比 (CR) 达到 2.00 ± 0.12 (图 4-B), 显著高于给药后 0 h (1.27 ± 0.03) ($P < 0.05$), 且坏死区域边界十分清晰; 给药后 3 ~ 9 h, CR 逐渐下降, 且给药后 3 ~ 5 h 内 CR 大于 1.71, 在这个时间范围内依然能够清楚区分坏死组织与正常组织, 但给药 9 h 后 CR 降低至 1.37 ± 0.23 (图 4-B), 此时坏死肌肉区域的信号强度已经与正常肌肉相差无几; 图 4-A 中 GdE1 组最右边一列大体切片图像表明成功制造了坏死肌肉模型, 伊文思蓝能够与体内坏死组织特异性结合, 并将坏死组织染成蓝色, 图片中蓝色区域为肌肉坏死部位。

图 4-A 中, Gd-DOTA 组最右边一列表明肌肉坏死模型的成功制造, 蓝色区域为肌肉坏死部位, 但在给药后 1 ~ 9 h 并没有观察到肌肉坏死区域有

明显的信号增强; 图 4-B 表明, Gd-DOTA 组的 CR 在给药后 0 h 达到最高为 1.23 ± 0.02 , 而在给药后 1 ~ 9 h 坏死比相差不大 (CR 都接近于 1.00), 可能是由于 Gd-DOTA 在体内代谢很快, 在给药后 1 h 内已经完全从坏死组织中清除, 失去了对坏死组织的成像能力。

图 4-C 的 HE 染色结果在组织化学层面证明了模型的成功, 正常肌肉区域细胞排列紧密, 细胞完整性较好, 而坏死肌肉区域细胞的完整性遭到破坏且排列顺序混乱。

以上结果表明, GdE1 能够被坏死肌肉特异性摄取, 且停留时间较长, 能够在给药后 3 ~ 5 h 对坏死区域进行成像; 而 Gd-DOTA 则在给药后 1 h 内快速从坏死组织中清除, 这进一步说明了 GdE1 具有坏死亲和性。

4 讨论

本研究以大黄酸为底物, 以较短的醚链 (乙氧基乙基) 为连接臂构建了 MRI 对比剂 Gd-DO3A-Ether-Rhein (GdE1)。研究结果表明, GdE1 水溶性良好且弛豫率较高, 在体内外均表现出良好的坏死靶向性, 能够通过 MRI 成像微波消融诱导的大鼠肌肉坏死部位, 在坏死相关疾病的诊断中表现出良好的应用潜力。

与之前报道的以烷烃链为连接臂的探针 GdL₁₋₃ 相比, GdE1 的理化性质显著发生改变。为提高磁共振对比剂水溶性, 可以在分子结构中引入极性基团, 有报道在疏水性基团与 Gd-DTPA 之间引入亲水性基团磷酸二酯能够降低化合物的疏水

性^[20]。本研究中 GdE1 ($\lg P = -1.66 \pm 0.09$) 水溶性高于以烷烃链为连接臂的 GdL₂ ($\lg P = -1.32 \pm 0.01$) 和 GdL₃ ($\lg P = -0.71 \pm 0.01$), 说明分子结构中引入亲水性的醚链能够提高分子探针的水溶性; 此外, 之前的研究中, 以乙基为连接臂的 GdL₁ ($\lg P = -2.15 \pm 0.01$) 水溶性最好, 以丁基为连接臂的 GdL₂ 次之, 以己基为连接臂的 GdL₃ 最差^[12], 而新构建的 GdE1 水溶性低于 GdL₁, 可能是因为连

接臂长度越短分子的水溶性越好。弛豫率方面, GdE1 ($r_1 = 5.45$) 显著低于 GdL₁₋₃ (r_1 分别为 7.28, 7.35 和 8.03), 可能是因为将烷烃链替换为醚链增加了顺磁性螯合物整体的旋转扩散速率^[20], 或者醚链在水中没有完全伸展导致水分子与 Gd³⁺ 的接触减少^[21], 这些因素都会导致弛豫率的降低, 具体的原因还有待深入的研究。

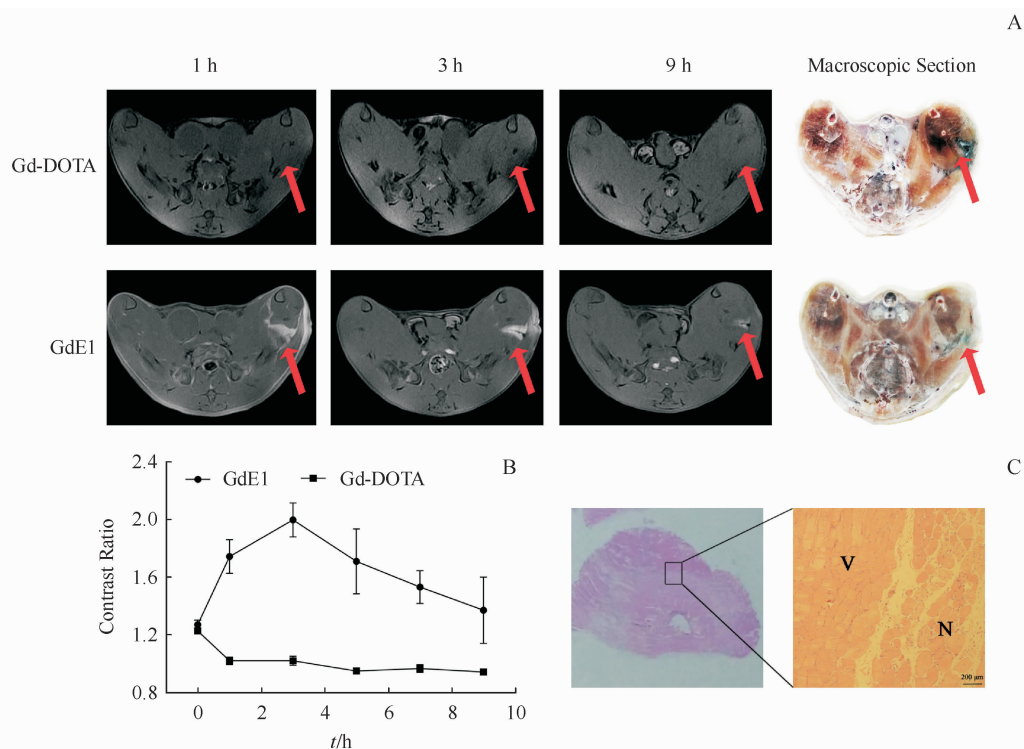


Figure 4 MR images, macroscopic section, contrast ratio and HE images of rat model with muscular necrosis induced by microwave ablation

A: Representative T1-weighted MR images at different time points and corresponding digital photographs of macroscopic section, red arrows indicate the necrotic area; B: Line chart of contrast ratio of necrotic and viable muscle post injection of GdE1 and Gd-DOTA at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 3$); C: HE images and micrograph of muscle (HE, $\times 100$)

与之前以烷烃链为连接臂的探针 GdL₁ 和 GdL₃ 相比, GdE1 在坏死组织中的保留时间明显减少。GdL₁ 能够在给药后 3 ~ 12 h 对坏死肝脏进行 MRI 成像, 该时段内的 CR 均大于 1.95 ± 0.15 ^[12]; 此外, GdL₃ 在给药后 12 h 坏死与正常肝脏的 CR 为 2.36 ± 0.20 ^[13], 依然维持在较高水平, 这表明两者在坏死组织中有很长的保留时间。本研究中, GdE1 成像时间窗仅为给药后 3 ~ 5 h, 可见将分子结构中的烷烃链替换为醚链会导致造影剂在坏死组织中被较快清除。之前的研究表明, 以大黄酸为基础构建的造影剂的坏死亲和性可能是由于分子与坏死组织中暴露的 DNA 结合所

致^[11-12], 因此, GdE1 在坏死组织中保留时间的减少可能是因为分子与坏死组织中的 DNA 结合能力下降, 目前 GdE1 与 DNA 的体外结合实验正在进行中。

本研究表明, 对于 Gd-DO3A-Linker-Rhein 探针, 更换连接臂种类会改变分子探针的理化性质及其在坏死组织中的保留时间, 后续可以将哌啶或甘氨酸链^[14]作为连接臂继续研究。此外, 本研究仅在细胞和肌肉坏死模型中评价了 GdE1 的坏死靶向性, 今后可以在心肌梗死模型^[11]、肝脏缺血再灌注模型或药物诱导的肿瘤坏死模型^[22]中进一步评价该探针的坏死亲和性。

参 考 文 献

- [1] Ke B, Tian M, Li J, *et al.* Targeting programmed cell death using small-molecule compounds to improve potential cancer therapy [J]. *Med Res Rev*, 2016, **36**(6): 983 – 1035.
- [2] Conrad M, Angeli JP, Vandenabeele P, *et al.* Regulated necrosis; disease relevance and therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, **15**(5): 348 – 366.
- [3] Madhuri D, Sungmun L, Jay S, *et al.* Hoechst-IR: an imaging agent that detects necrotic tissue *in vivo* by binding extracellular DNA [J]. *Org Lett*, 2010, **12**(15): 3300 – 3303.
- [4] Marie VDP, Marysael T, Fonge H, *et al.* Radiolabeled iodohipericin as tumor necrosis avid tracer; diagnostic and therapeutic potential [J]. *Int J Cancer*, 2012, **131**(2): 129 – 137.
- [5] Wan L, Pantel K, Kang Y. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic [J]. *Nat Med*, 2013, **19**(11): 1450 – 1464.
- [6] Siemann DW, Chaplin DJ, Walicke PA. A review and update of the current status of the vasculature disabling agent combretastating-A4 phosphate (CA4P) [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2009, **18**(2): 189 – 197.
- [7] Park D, Xie BW, Van Beek ER, *et al.* Optical imaging of treatment-related tumor cell death using a heat shock protein-90 alkylator [J]. *Mol Pharm*, 2013, **10**(10): 3882 – 3891.
- [8] Li JD, Zhang J, Yang SW, *et al.* Synthesis and preclinical evaluation of radioiodinated hypericin dicarboxylic acid as a necrosis avid agent in rat models of induced hepatic, muscular, and myocardial necroses [J]. *Mol Pharm*, 2015, **13**(1): 232 – 240.
- [9] Wang Q, Yang SW, Jiang CH, *et al.* Discovery of radioiodinated monomeric anthraquinones as a novel class of necrosis avid agents for early imaging of necrotic myocardium [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 21341.
- [10] Liang JJ, Luo Q, Zhang DJ, *et al.* SPECT imaging of treatment-related tumor necrosis using technetium-99m-labeled rhein [J]. *Mol Imaging Biol*, 2019, **21**(4): 660 – 668.
- [11] Luo Q, Jin QM, Su C, *et al.* Radiolabeled rhein as small-molecule necrosis avid agents for imaging of necrotic myocardium [J]. *Anal Chem*, 2016, **89**(2): 1260 – 1266.
- [12] Bian L, Gao M, Zhang DJ, *et al.* Synthesis and biological evaluation of rhein-based MRI contrast agents for *in vivo* visualization of necrosis [J]. *Anal Chem*, 2018, **90**(22): 13249 – 13256.
- [13] Bian L, Gao M, Huang DJ, *et al.* Synthesis and necrosis target of necrosis-avid MRI contrast agent Gd-DO3A-rhein [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2017, **48**(3): 282 – 288.
- [14] Amouroux G, Pan J, Jenni S, *et al.* Imaging bradykinin B1 receptor with ^{68}Ga -labeled [des-Arg10] kallidin derivatives; effect of the linker on biodistribution and tumor uptake [J]. *Mol Pharm*, 2015, **12**(8): 2879 – 2888.
- [15] Kim YS, Yang CT, Wang J, *et al.* Effects of targeting moiety, linker, bifunctional chelator, and molecular charge on biological properties of ^{64}Cu -labeled triphenylphosphonium cations [J]. *J Med Chem*, 2008, **51**(10): 2971 – 2984.
- [16] Guo H, Miao Y. Introduction of an 8-aminooctanoic acid linker enhances uptake of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled lactam bridge-cyclized alpha-MSH peptide in melanoma [J]. *J Nucl Med*, 2014, **55**(12): 2057 – 2063.
- [17] Glomme A, Marz J, Dressman JB. Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities [J]. *J Pharm Sci*, 2005, **94**(1): 1 – 16.
- [18] Perek N, Sabido O, Le Jeune N, *et al.* Could $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -glucarate be used to evaluate tumour necrosis? *In vitro* and *in vivo* studies in leukaemic tumour cell line U937 [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2008, **35**(7): 1290 – 1298.
- [19] Ni Y, Chen F, Mulier S, *et al.* Magnetic resonance imaging after radiofrequency ablation in a rodent model of liver tumor; tissue characterization using a novel necrosis-avid contrast agent [J]. *Eur Radiol*, 2006, **16**(5): 1031 – 1040.
- [20] Mcmurry TJ, Parmelee DJ, Hironao S, *et al.* The effect of a phosphodiester linking group on albumin binding, blood half-life, and relaxivity of intravascular diethylenetriaminepentaacetato aquo gadolinium(III) MRI contrast agents [J]. *J Med Chem*, 2002, **45**(16): 3465 – 3474.
- [21] Isaac Z, Avi W, Yoram C. Target-specific ligands and gadolinium-based complexes for imaging of dopamine receptors; synthesis, binding affinity, and relaxivity [J]. *J Org Chem*, 2013, **78**(14): 7001 – 7012.
- [22] Liang JJ, Sun ZP, Zhang DJ, *et al.* First evaluation of radioiodinated flavonoids as necrosis-avid agents and application in early assessment of tumor necrosis [J]. *Mol Pharm*, 2017, **15**(1): 207 – 215.