DOI: 10.3724/SP. J. 1096.2012.20380

评述与进展

钆基富勒烯磁共振成像分子影像探针的研究进展

郑俊鹏 甄明明 王春儒 舒春英^{*}

(中国科学院化学研究所,分子纳米结构与纳米技术院重点实验室,北京100190)

摘 要 含有顺磁性金属钆离子及钆团簇的内嵌金属富勒烯(如 Gd@ C_{s2},Gd@ C₆₀和 Gd₃N@ C₈₀)及其衍生物 是一类高效的 MRI 分子影像探针,其造影效率远优于传统钆基螯合物造影剂。重要的是,碳笼的高度稳定性 保护了内嵌团簇,使之免受体内代谢物质的进攻和防止了外泄,从而大大提高了其生物安全性。同时,碳笼还 是其它生物活性物质或分子影像探针的有效载体,易赋予其多功能性,从而提高疾病检测的灵敏度和准确性。 本文介绍了多种钆内嵌金属富勒烯分子影像探针的研究进展,讨论了内嵌金属团簇和笼外化学修饰对其弛 豫性能的影响,以及不同的功能基团对其生物相容性和动物体内分布的影响,并展望了其兼具多功能分子影 像探针载体的应用前景。

关键词 分子影像探针;内嵌金属富勒烯;磁共振成像;综述

1 引 言

1999 年 美国哈佛大学 Weissleder 等最早提出分子影像学概念,旨在细胞和亚细胞水平上定性或定量地实现生物有机体生理和病理变化的实时、动态以及无创的三维成像^[1]。融合不同影像学手段的双、 多模态技术,如光学、磁共振和核医学成像等,可实现不同影像设备的优势互补,使获取的诊断结果更为精 准^[2~6]。高灵敏分子影像探针的构筑则是有效提高成像质量及肿瘤早期精准诊疗的基础和关键。

在多种影像技术中,磁共振成像(Magnetic resonance imaging, MRI) 是一种无损伤和无电离辐射的、 高分辨影像学检查方法,是诊断肿瘤、指导外科手术最为有效的方法之一,但灵敏度较低^[7]。目前,约 40%~50%的 MRI 诊断需要使用 MRI 增强剂(造影剂),这些造影剂通常利用顺磁性物质影响体内局 部组织中水质子弛豫时间,改变信号强度,与周围组织形成对比而产生造影作用^[8]。根据作用原理不 同,可将造影剂分为阳性对比剂(T_1 加权像中增强信号强度)和阴性对比剂(T_2 加权像中降低信号强 度)。弛豫效率(r_i ,单位为(mmol/L)⁻¹s⁻¹)用于评价造影剂的效果,用式(1)表示:

 $(1/T_i)_{obsd} = (1/T_i)_d + r_i [M], i = 1, 2$ (1) 其中, [M]为造影剂的浓度(mmol/L) (1/T_i)_{obsd}为顺磁性物质存在时的弛豫率 (1/T_i)_d 为无顺磁性物

目前,临床使用 MRI 造影剂主要是小分子量的 Gd 螯合物阳性对比剂^[9,10],如 Gd-DTPA-BMA(商 品名 Omniscan)和 Gd-DTPA(商品名 Magnevist)等。这些造影剂仅限于细胞外液造影,且弛豫效率较低、没有组织靶向性。除了 Primovist^[11]和 Multihance^[12]具有部分肝脏特异性外,其它的细胞外造影剂只能在体内被动累积并且快速通过肾脏代谢排出体外,很难应用于细胞及亚细胞水平的检测,有时还会因造影剂的大量使用导致肾功能不健全者肾源纤维化^[13]。因此,开发新型的具有高效性和组织特异性的磁共振成像造影剂(磁性分子影像探针)是目前 MRI 分子影像探针的研究热点。一系列以磁性纳米粒子^[14-18]、脂质体^[19]、胶束^[20]等为载体的分子影像探针被广泛报道。

钆基富勒烯是指碳笼(C₆₀,C₈₀和C₈₂等)内嵌金属钆原子或团簇的一类内嵌金属富勒烯,这些富勒 烯不仅保持了内嵌钆的顺磁特性,还保持了碳笼的特性,如比表面积大、稳定、易被多功能化等。这类富

本文系国家自然科学基金(Nos. 21121063, 51072200)和 NSAF 联合基金(No. 11076027)资助

* E-mail: Shucy@ iccas. ac. cn

质存在时的弛豫率。

²⁰¹²⁻⁰⁴⁻¹¹ 收稿; 2012-06-06 接受

勒烯作为新型的 MRI 分子影像探针,其弛豫水分子的机理不同于传统的钆基螯合物,是一种间接相互 作用,即内嵌的钆原子或钆团簇通过外包碳笼来间接弛豫水分子,作用面积大,效率高;分子间的偶极--偶极相互作用进一步提高了其弛豫效能。更重要的是,与传统钆基螯合物相比,碳笼的稳定性保护了内 嵌团簇,使之免受体内代谢物质的进攻和防止了外泄,从而大大提高了其生物安全性^[21]。此外,内嵌钆 原子或团簇的碳笼还提供了可进一步多功能化的纳米平台,为疾病早期精准检测和诊疗一体化提供了 可能。因此,钆基富勒烯作为新型高效、多模态 MRI 分子影像探针的研究被广泛关注^[22-24]。

2 钆基富勒烯分子影像探针

内嵌金属富勒烯因兼具内嵌金属原子的金属特性和碳笼的特性,使其在材料科学和生物医学领域 具有巨大的应用前景。富勒烯金属包合物的高产率合成和高效提取极大地加快了其应用研究的进程。 近年来,基于钆内嵌金属富勒烯(钆基富勒烯)水溶性衍生物的磁共振(MRI)造影剂被广泛报道。由于 钆基富勒烯的高效性、低毒性和多功能化特性,使其成为新一代 MRI分子影像探针的有力竞争者。图1

为 Gd@ C₈₂ Gd@ C₆₀ Gd₃N@ C₈₀ 3 种钆基富勒 烯的结构示意图。

2.1 钆基富勒烯的制备

1985 年, Heath 等^[25] 在激光蒸发掺有 LaCl₃ 的石墨靶时,在烟炱的质谱分析中检测 到 LaC₆₀的存在。此后,各种各样的金属原子 或金属团簇内嵌的金属富勒烯被制备和表 征^[26~31]。目前,Krastchmer 等^[32]发展的直流 电弧放电法是制备各种新结构富勒烯与金属 富勒烯效率最高的方法,因而被广泛使用。其



Fig. 1 Schematic structure of (a) Gd@ C_{82} , (b) Gd@ C_{60} and (c) Gd_3N@ C_{80}

基本过程是: 石墨/金属合金组成的复合石墨棒作为消耗电极在氦气气氛中电弧放电 收集含有富勒烯与 金属富勒烯的烟炱 用溶剂萃取得到的可溶性富勒烯与金属富勒烯母液 再用化学反应法或高效液相色谱 法进行分离 即可得到纯的内嵌金属富勒烯。与激光法、高温高压法等方法相比,直流电弧放电法具备 操作简单、安全可靠、造价低、产量大等优点。

Gd@ C₈₂是最早发现可被应用于磁共振成像造影剂的钆基富勒烯^[33]。Tsuchiya 等^[34]发明了先使用 溶剂提取得到富勒烯与金属富勒烯的混合溶液,再通过先氧化后还原的方法富集钆基富勒烯 Gd@ C₈₂ 和 Gd₂@ C₈₀,显著提高了 Gd@ C₈₂的产量。最近,孙宝云等^[35]发展了一种适用于内嵌单金属富勒烯的 提取方法,直接对烟炱进行内嵌金属富勒烯的选择性反应,使得金属富勒烯在提取液中含量达到50% ~ 80%,有效提高提取效率。他们将该提取方法应用到 Gd@ C₈₂的宏量制备,实现了 Gd@ C₈₂产量的重大 突破。实际上,Gd@ C₆₀产率远高于 Gd@ C₈₂,但是由于溶解性差、在空气中稳定性差等原因难以被分离 得到。Bolskar 等^[36]发明了一种先真空升华得到富勒烯与金属富勒烯混合物,再用氧化还原的方法得到了 克量级 Gd@ C₆₀,但是这种方法需要在无氧条件下操作,对仪器设备要求较高,因此没有被广泛推广。

 $Gd_{3}N@C_{s0}$ 是一种内嵌三金属氮化物团簇的钆基富勒烯,由于在一个碳笼中嵌入了 3 个 Gd^{3+} , $Gd_{3}N@C_{s0}$ 比 Gd@C_{s2}和 Gd@C_{60</sub>具有更强的顺磁性^[37],可在单位碳笼浓度的条件下得到性能更优的 MRI 分子影像探针。此外,由于内嵌的 Gd_{3}N 团簇向 C_{s0</sub>碳笼转移了 6 个电子得到闭壳层结构的富勒烯, 使得碳笼的稳定性相对单金属富勒烯大大提高^[38]。但是,内嵌的 Gd_{3}N 团簇尺寸较大,在形成Gd_{3}N@C_{s0} 富勒烯时被碳笼捕获的几率较小,因此产率相对其它内嵌三金属氮化物富勒烯如 Sc_{3}N@C_{s0}^[39]大大降低。 Zhang 等^[40]在金属钆中掺杂更容易被捕获的钪,首次合成了两种混合型内嵌金属富勒烯Sc_2GdN@C_{s0}和 ScGd_N@C_{s0},其产率是 Gd_3N@C_{s0} 50 倍,为大量制备钆基富勒烯提供了一种新的思路。

钆基富勒烯产量上的提高使其用于分子影像探针的应用成为可能。但是,富勒烯碳笼本身的疏水 特性阻碍其直接应用,需要在其表面进行修饰,使其具有好的生物相容性。

2.2 钆基富勒烯分子影像探针的结构设计与功能的关系

2.2.1 单一官能团修饰的钆基富勒烯分子影像探针 多羟基衍生化反应最早应用于钆基富勒烯中 得 到一系列 Gd@ Cs:多羟基衍生物(钆富勒醇),是一类具有高弛豫效率的磁性分子影像探针。1997年, Zhang 等^[41]首先合成了 Gd@ C₂(OH), 及各种空心富勒烯多羟基衍生物的混合物,在室温、9.4 T 磁场 条件下测得其纵向弛豫效率 (r_1) 为 47 (mmol/L)⁻¹ s⁻¹,比临床使用造影剂 Gd-DTPA 高出 10 倍以上 (r_1)

≈4 (mmol/L)⁻¹s⁻¹)。随后,Wilson 等^[42]用相转移 催化法合成了 Gd@ Cs, 的多羟基衍生物 Gd@ Cs, (OH),,并在 20 MHz、40 ℃条件下测得其纵向弛豫 效率为20 (mmol/L)⁻¹ s⁻¹。Mikawa 等^[43] 对 Gd 富 勒醇的弛豫性能进行了更加深入细致地研究。他 们合成了 Gd@ C_s,(OH) ₄0 ,在 25 ℃、3 种不同的磁 场强度下测定了它的弛豫效率,发现在1.0T的磁 场强度下弛豫能力最强,纵向弛豫效率高达81 (mmol/L)⁻¹ s⁻¹。图 2 为相转移催化法合成钆富勒 醇的示意图。

随后 刘凯敏等^[44]合成了羟基数较少的钆富勒 醇 Gd@ C₈₂(OH) 16 A.7 T 磁场下纵向弛豫效率为 19.3 (mmol/L)⁻¹ s⁻¹。文献 [44 45] 合成了带有 20 个羟基的钆富勒醇 Gd@ Cg2(OH) 20,在 1.0 T 磁场 下弛豫效率为 42.3 (mmol/L)⁻¹ s⁻¹。以上研究表 明 钆富勒醇的弛豫效率与笼外修饰上的羟基数目 和磁场强度等因素密切相关。表1对比了几种钆 富勒醇的弛豫效率。尽管增大外磁场强度会导致 r1 降低,但还是可以明显看出 r1 随着外接羟基数目的 减少而降低。

为了探寻富勒烯多羟基衍生物具有高弛豫效率 的原因 Kato 等^[47]合成了一系列稀土包合物的水溶 性多羟基衍生物 M@ C₈₂(OH), ,(M = La, Ce, Dy, Er),并在不同场强下测定了各物质的弛豫效率。 结果显示 这些包合物的多羟基衍生物都表现出了 一定的弛豫能力,而在同样实验条件下,上述4种稀 土金属的三价阳离子或 EDTA 配合物不具有或只有很



图 2 相转移催化法合成 Gd@ C₈₂(OH) "的示意图^[43] Fig. 2 Scheme of synthesis of water-soluble polyhydroxylated Gd@ C82, Gd@ C82 (OH) (Gd-fullerenols) by the tetrabutylammonium hydroxide (TBAH 40% in water) phase transfer reaction^[43]

表 1	不同] Gd@	C ₈₂ ₿	羟基衍生	E物的引	也豫	效率	
Fable	1 F	Relativit	ties of	different	Gd@ (d	erivativ	<i>ie</i>

造影剂 Contrast agent	场强 Magnetic field strength (<i>T</i>)	弛豫效率 r ₁ Relaxivity (mmol/L) ⁻¹ s ⁻¹
Gd@ C ₈₂ (OH) x[41]	0.47	20
Gd@ C $_{82}$ (OH) $_{40[42]}$	1.0	81
Gd@ C ₈₂ (OH) _{20[44]}	1.5	42.3
Gd@ C $_{82}($ OH) $_{16[45]}$	4.7	19.3

低的弛豫效能。富勒烯多羟基衍生物具有的高弛豫能力是通过多羟基富勒醇分子表面羟基的水质子交 换作用和分子间偶极-偶极相互作用来实现的,而水质子交换速率、转动相关时间和顺磁性金属离子电 子自旋的弛豫速率是影响弛豫时间的3个重要因素^[9,10,48]。

Savers 等^[49]发现富勒醇表面修饰的羟基数直接影响其生物活性,所以精确计算羟基数目在羟基富 勒烯的生物医学研究中意义重大。Chen 等^[50]合成并分离得到了窄分布的钆富勒醇 Gd@ C_{sp} (OH) $_{2p}$, 发现其可以有效抑制恶性肿瘤在小鼠体内的生长,并且比普通抗肿瘤药 CTX 具有更低的毒性。对其抑 制肿瘤生长机理的研究结果表明,Gd@C_{so}(OH),不仅可以有效激活 CCL5 树突状细胞转化为 CCL19 表型的成熟型淋巴细胞,而且可以增加体内 IFNg、IL-1b 和 IL-2 的表达,并导致卵蛋白素特异的 Th-1 型 免疫反应^[51]。Liang 等^[52] 发现 $Gd@C_{s}$ (OH),还可以改善耐药肿瘤细胞对顺铂的内吞功能,从而有效 地解决了肿瘤细胞的耐药性问题,为恶性肿瘤的有效治疗开辟了一条新的途径。最近,Meng 等^[53]又发 现Gd@C_s,(OH) "可以在基因和蛋白水平同时调控肿瘤血管新生因子的表达,通过抑制肿瘤增殖所必 须的新生血管生成而阻断肿瘤的生长。

由于钆基富勒醇很难进一步修饰使其多功能化,Bolskar 等^[36] 得到了 Gd@ C_@的水溶性衍生物

 $Gd@C_{60}[C(COOH)_2]_{10}$ 如图3所示。弛豫效率测试结果 表明: 钆富勒酸 $Gd@C_{60}[C(COOH)_2]_{10}$ 的弛豫效率 $(4.6(mmol/L)^{-1}s^{-1})$ 明显低于钆富勒醇 $Gd@C_{60}(OH)_x$ $(83.2(mmol/L)^{-1}s^{-1})$,说明同种钆基富勒烯使用不同的 修饰方法得到的衍生物具有截然不同的理化性质。这种性 质上的明显差异主要源于顺磁性钆间接弛豫水分子的有效 距离不同和分子间的相互作用力不同。弛豫效率与顺磁性 中心离子和交换水距离的六次方成反比,钆基富勒酸的有 效作用距离远大于钆基富勒醇,结果导致弛豫效率的迅速 降低。钆基富勒醇羟基间及其与水的相互作用力不同于钆 基富勒酸羧基间的相互作用力,结果导致聚集体的水合半 径不同,进而影响转动相关时间和最终弛豫效率。Sitharaman 等^[54,55]详细研究了离子强度、pH 值、温度和浓度对两 种造影剂的聚集尺寸以及弛豫效率的影响。结果发现,上 述两种分子影像探针的聚集行为和弛豫效率受温度和浓度



图 3 Gd@ C_{60} [C(COOH) $_2$] $_{10}$ 的球棍模型^[36] Fig. 3 Ball-and-stick depiction of Gd@ C_{60} [C(COOH) $_2$] $_{10}$, illustrating a possible arrangement of 10 C(COOH) $_2$ addends on a single C_{60} cage (light blue, C; red, O; white, H; dark blue, Gd) ^[36]

影响不大,但是对 pH 值和电解质 NaCl 等比较敏感。对 Gd@ C₆₀(OH)_x和 Gd@ C₆₀ [C(COOH)₂]₁₀的聚 集体和解聚体进行不同温度下的¹⁷O 和¹H 的弛豫效率测定,进一步探讨了富勒烯造影剂的弛豫机理,即 增加磁性纳米颗粒的大小,可以增加分子的转动相关时间,进而提高弛豫效率^[56]。钆富勒醇由于分子 间作用力较大,在溶液中易形成较大的聚集体,显著降低了转动相关时间,因此表现出了较高的弛豫效 率。相反,钆富勒酸由于分子间相互作用较弱,在溶液中形成的聚集体尺寸较小,同时羧基与水质子的 交换能力也弱于羟基,导致弛豫效率的大幅度降低。

2.2.2 混合官能团修饰的 Gd 基富勒烯分子影像探针 通过上述对比可以看到 羟基化的钆富勒醇具 有很高的弛豫效率,但不易被进一步功能化;羧基化的钆富勒酸易于与生物活性分子偶联,但弛豫效率 大幅度降低。因此,研究人员希望在碳笼表面同时引入羟基和羧基等官能团,使这两类衍生物优势互 4.5 (mmol/L)⁻¹ s⁻¹ ,与 Gd-DTPA 相当。Shu 等^[57]利用 Gd@ C_s,与 β-丙氨酸反应得到一种既含有羟基又 含有羧基的水溶性衍生物 Gd@ C₈,O₆(OH) 16(NHCH₂CH₂COOH) 3测得弛豫效率为 9.1 (mmol/L)⁻¹ s⁻¹ (1.5 T) 和16.0 (mmol/L)⁻¹ s⁻¹(0.35 T)。对其聚集行为的研究发现,该衍生物在酸性、中性和碱性条 件下具有不同的聚集行为,并推测了不同的聚集机理,探讨了粒径大小分布与质子弛豫效率的关系^[58]。 尽管羟基数目的减小,使得含羟基和羧基混合官能团的钆基富勒烯衍生物的弛豫效率低于 Gd 富勒醇, 但还是明显优于富勒酸 Gd@ C_@ [C(COOH) 2] (0, 笼外修饰的羧基还可以作为前驱体进一步功能化,得 到具有组织靶向性的分子影像探针。Shu 等^[59]利用 Gd@ C₈₂O₆(OH) _16(NHCH₂CH₂COOH) _8 的羧基 与绿色荧光蛋白抗体的氨基残基反应得到偶联物 通过单分子水平检测绿色荧光蛋白分子同抗体或偶 联物作用后的荧光强度,确定了绿色荧光蛋白抗体的偶联率,为实现肿瘤的靶向性检测做出了有意义的 探索(图 4)。Shu 等^[60] 还通过改进的 Bingel 反应 将具有趋骨性的磷酯基直接修饰到 Gd@ C₈₂上 得到 在骨疾病诊断中具有潜在靶向性检测功能的 Gd@ C₈₂O 2(OH) 6(C(PO Et 2) 2) 10 · 体外水质子弛豫 率的测定表明,其造影效率是临床使用 Gd-DTPA 的近 20 倍,是一种高效的磁性分子影像探针。

上述修饰方法引入的羟基数量有限 提高羟基数量将有效改善钆基富勒烯分子影像探针的灵敏度。 Fatouros 等^[61] 合成了聚乙二醇(PEG) 修饰的多羟基水溶性 $Gd_3N @ C_{so}$ 分子影像探针 $Gd_3N @ C_{so}$ [DiPEG5000(OH)_x] 弛豫效率为商用试剂钆双胺(Gadodiamide) 的 30 倍以上(143 (mmol/L)⁻¹ s⁻¹ vs. 4 (mmol/L)⁻¹ s⁻¹ 2.4 T) 是一种非常灵敏的 MRI 分子影像探针。Zhang 等^[62] 通过改变聚乙二醇链的 分子量(350~5000 Da) 得到了一系列聚乙二醇修饰的多羟基水溶性 $Gd_3N@ C_{so}$ 衍生物 他们发现衍生



图 4 GFP-抗体-钆基富勒烯分子影像探针的构筑^[59]

Fig. 4 Conjugation reaction of carboxylated gadofullerene aggregates with antibodies to produce specific targeting diagnostic agent^[59]

物的弛豫效率与 PEG 链长的大小密切相关,当 PEG 的分子量为 350 时,弛豫效率最高 r_1 与 r_2 可以达到 237 和 460 (mmol/L) $^{-1}$ s⁻¹(2.4 T),这也是目前报道的弛豫效率最高的纵向弛豫造影剂。

Shu 等^[63] 发展了衍生化的方法 通过 Gd₃N[@] C₈₀ 与丁二酸酐过氧化物反应得到了含有羟基和羧基的 Gd₃N[@] C₈₀(OH)₂₆(CH₂CH₂COOM)₁₆ ,其 r_1 和 r_2 分别达到 207 和 282 (mmol/L)⁻¹s⁻¹(2.4 T) ,是临床 造影剂 Gd-DTPA-BMA 的 50 倍(4.1 (mmol/L)⁻¹s⁻¹)。值得注意的是 通过自由基反应在碳笼表面引入 的羟基较多 ,所以保持很高的弛豫效率 ,这与单金属内嵌富勒烯通过氨基酸反应得到的类似物性能不同。此外 ,引入的羧基已证明可以与生物活性分子或其它分子影像探针进一步反应 ,实现靶向的荧光/磁^[64] 和核素/磁双模态分子影像探针^[65 66] 的构筑。

研究结果表明, 碳笼表面修饰的羟基促进了钆基富勒烯衍生物的聚集, 提高了水/质子交换速率, 对 提高钆基富勒烯分子影像探针的弛豫效率起关键作用; 另一方面, 羧基等基团的引入虽然会降低弛豫效 率,但是对进一步的功能修饰十分重要。因此, 如何优化引入的羟基和羧基比例, 使其在保持 MRI 造影 高效性的同时还具有良好的生物相容性和稳定性是设计钆基富勒烯分子影像探针亟待解决的问题。 2.3 钆基富勒烯分子影像探针的细胞水平及动物体内外可视化

传统的钆基螯合物造影剂弛豫效率较低 除了 Primovist 和 Multihance 具有部分肝脏特异性外,其它 造影剂都是细胞间质造影剂,只能在体内被动累积,且快速通过肾脏代谢排出体外,很难应用于细胞及 亚细胞水平的检测。钆基富勒烯分子影像探针由于在生物体系中聚集成纳米颗粒,可以通过胞吞作用 被细胞摄取,因而使得细胞水平上的 MRI 成像成为可能。

Anderson 等^[67]使用 Gd@ C₈₂(OH) _x 与细胞间质干细胞孵育,在转染试剂硫酸鱼精蛋白的作用下首 次实现 Gd@ C₈₂(OH) _x 的细胞 MRI 标记,并且在 T_1 加权像中可见明显的信号增强,克服了传统 Gd 螯 合物造影剂的缺陷。Sitharaman 等^[68]将 Gd@ C₆₀ [C(COOH) ₂]₁₀直接用于细胞 MRI 标记,发现其标记效 率高达 98% ~100% Gd@ C₆₀ [C(COOH) ₂]₁₀标记的细胞 T_{1x} 成像信号有 250% 的增强。与羟基化的钆 富勒醇不同 ,Gd@ C₆₀ [C(COOH) ₂]₁₀进行标记时更容易被细胞所摄取,无需使用转染试剂,也表明笼外 修饰手段的不同可直接影响细胞的摄取率,从而实现特异组织的选择性造影。

钆基富勒烯分子影像探针易被细胞摄取和较长的动物体内循环性,使其可以更好地在肿瘤部位富 集,因此在活体水平上的成像效果比钆基螯合物造影剂具有更明显的优势。Mikawa 等^[43]发现剂量为 5 mmol Gd/kg 的 Gd@ C₈₂(OH) 40 对肝,脾和肾脏有良好的造影效果,且用量只有 Gd-DTPA 的 1/20。动 物体内分布实验表明,Gd@ C₈₂(OH) 40 容易被内皮网状组织摄取,这与 Ho 富勒醇的动物体内分布^[69]相 似,说明碳笼表面修饰的羟基对动物体内的分布起关键作用。与之相反,Bolskar 等^[36]报道的富勒酸 Gd @ C₆₀ [C(COOH) 2]10</sub>则是一种非内皮网状组织造影剂,这种区别源于它们不同的聚集尺寸,大尺寸的 Gd 富勒醇聚集体更容易被内皮网状组织摄取。

Shu \$^{[63]} 报道的 Gd_3N@ C_{80}(OH) _{26}(CH_2CH_2COOM) _{16}分子影像探针具有更为持久的造影效果。将 36 mL 0.0475 mmol/L 造影剂直接注射到嫁接 T9 肿瘤的小鼠脑部 /MRI 成像结果表明 在如此低的剂量 下可以得到很好的造影效果,并且在注射 7 d 后依然能观察到肿瘤部位的信号增强,说明其可能更容易被 细胞摄取 从而延长代谢时间。定量的扩散速率实验表明,Gd_3N@ C_80(OH) _26(CH_2CH_2COOM) _16 在琼脂 凝胶 中 扩 散 时 间 是 商 用 试 剂 Gd-DTPA-BMA 的 40 ~50 倍,与 荷 瘤 鼠 的 成 像 一 致,说 明 Gd_3N@ C_80(OH) _26(CH_2CH_2COOM) _16 是一种长效、灵敏的磁性分子影像探针。Fillmore 等^[64] 使用 Gd_3N@ C_80(OH) _26(CH_2CH_2COOM) _16 是一种长效、灵敏的磁性分子影像探针。Fillmore 等^[64] 使用 Gd_3N@ C_80(OH) _26(CH_2CH_2COOM) _16 进一步与标记荧光染料的 IL-13 多肽偶联,得到了靶向 IL-13 受体 过表达肿瘤细胞的磁/荧光双模态靶向探针,并且在细胞水平定量测定了细胞摄取率。结果显示,IL-13 受体过表达脑胶质瘤 U87MG 细胞对 Gd_3N@ C_80(OH) _26(CH_2CH_2COOM) _16 本体摄取量为 13.6 pmol,而 对靶向探针摄取量可达 882.3 pmol。对脑部嫁接 U87MG 肿瘤的荷瘤鼠直接灌注新型分子影像探针 结 果表明: 注射商用试剂 Omniscan 后肿瘤部位只有微弱的信号增强,12 h 后信号就完全消失; 而注射靶向 探针后 肿瘤部位信号明显增强,并且在 24 h 后依然可见,同时通过共聚焦荧光成像也可在相同位置清 楚地观察到肿瘤。Zheng 等^[70]制备了水溶性钆基富勒烯衍生物Gd@ C_82(OH) _24(COOM) _22 并将其与荧 光染料与肿瘤靶向分子叶酸偶联 /得到靶向叶酸受体过表达肿瘤细胞的双模态分子影像探针,并通过荧 光成像与细胞透射电镜观察到这种靶向探针对 HeLa 细胞具有良好的靶向性。



图 5 用 Gd₃N@ C₈₀构筑靶向双模态分子影像探针的示意图^[63]

Fig. 5 Schematic process of $Gd_3 N@ C_{80}$ functionalization and conjugation^[63] The first step involves the addition of carboxyl groups for conjugation and hydroxyl groups for MRI contrast , both groups provide aqueous colloidal stability. The second step links the $Gd_3 N@ C_{80}$ molecules to the fluorescent-tagged glioma-targeting peptide through amide bond formation.

通过对比各类 Gd 基富勒烯的磁性分子影像探针,可以看到不同修饰方法得到的钆基内嵌金属富 勒烯分子影像探针在造影性能上具有很大差异。羟基化修饰的钆富勒醇由于形成较大的聚集体,是一 种良好的内皮网状组织造影剂,并且可以用于细胞水平的标记成像。羧基化的 Gd@ C₈₂和 Gd@ C₆₀由于 聚集尺寸和羟基数的减小,表现为非内皮网状组织特异性造影,羧基的引入还为进一步偶联生物活性分 子或其它分子影像探针、构筑多功能靶向分子影像探针提供了一个全新的平台。而基于 Gd₃N@ C₈₀多 官能团修饰的 MRI 分子影像探针在保留了前两者优点的同时,还显示了更高的灵敏度,将在长期跟踪 诊断方面表现出更大的优势,更适合用来构筑高灵敏度的多功能靶向分子影像探针,在细胞和活体水平 上实现磁/荧光的肿瘤靶向成像。 第10期

3 展 望

钆内嵌金属富勒烯作为解离常数为零的稳定 MRI 分子影像探针 造影效率远高于商用钆螯合物造影剂 但是其造影效率受笼内团簇和笼外修饰手段的影响很大 因此 发展新型衍生化方法 得到具有准确结构式的高效低毒和组织靶向性的分子影像探针意义深远。更重要的是 通过合适的修饰方法可使外包碳笼兼具纳米载体的功能 与其它靶向分子或分子影像探针如荧光/核素等偶联 得到优势互补的靶向双模或多模态分子影像探针 实现肿瘤的早期精准检测或诊疗一体化。但是 对于进一步的临床前实验 基于 Gd 内嵌金属富勒烯的分子影像探针尚存如下不足:(1)目前,钆基金属富勒烯只能通过电弧放电法制备并且主要依靠高效液相色谱进行纯化 因此产量很低 限制了其广泛深入的研究。因此 利用金属富勒烯与富勒烯在氧化还原性质和溶解性上的差异 发展无需色谱分离制备钆基富勒烯的方法 真正实现量产意义重大。(2)大部分基于 Gd 内嵌金属富勒烯的分子影像探针并不能得到准确的分子结构 使其作为临床药物使用受到限制 而一些得到准确分子结构的衍生物造影效率明显下降。因此 制备高效、多模且具有准确分子结构的影像探针是下一阶段研究工作的热点和难点。目前 研究工作仍处于体外实验阶段 动物体内实验阶段性进展虽然显示出良好的效果 但是其长期的生物毒性还有待进一步评价。

Reference

- 1 Weissleder R. Radiology , 1999 , 212(3): 609-614
- 2 Louie A. Chem. Rev. , 2010 , 110(5): 3146-3195
- 3 Kim J , Piao Y , Hyeon T. Chem. Soc. Rev. , 2009 , 38(2): 372 390
- 4 Kim C H , Favazza C , Wang L H V. Chem. Rev. , 2010 , 110(5): 2756-2782
- 5 Cheng L , Yang K , Li Y G , Chen J H , Wang C , Shao M W , Lee S T , Liu Z. Angew. Chem. Int. Ed. , 2011 , 50(32): 7385 7390
- 6 Liu Y L , Ai K L , Liu J H , Yuan Q H , He Y Y , Lu L H. Angew. Chem. Int. Ed. , 2012 , 51(6): 1437 1442
- 7 Mansfield P. Angew. Chem. Int. Ed. , 2004 , 43(41): 5456 5464
- 8 XIAO Yan, WU Yi-Jie, ZHANG Wen-Jun, LI Xiao-Jing, PEI Feng-Kui. Chinese J. Anal. Chem., 2011, 39(5): 757-764
 肖研, 吴亦洁,章文军,李晓晶,裴奉奎. 分析化学, 2011, 39(5): 757-764
- 9 Lauffer R B. Chem. Rev. , 1987, 87(5): 901-927
- 10 Caravan P, Ellison J J, McMurry, T J, Lauffer R B. Chem. Rev., 1999, 99(9): 2293-2352
- 11 Hammersting R, Huppertz A, Breuer J, Balzer T, Blakeborough A, Carter R, Fuste L C, Heinz-Peer G, Judmater W, Laniado M, Manfredi R M, Mathieu D G, Muller D, Mortele K, Reimer P, Reiser M F, Robinson P J, Shamsi K, Strotzer M, Taupitz M, Tombach B, Valeri G, Van Beers B E, Vogl T J. Eur. Radiol., 2008, 18(3): 457 – 467
- 12 Pintaske J, Martirosian P, Graf H, Erb G, Lodemann K P, Claussen C D, Schick F. Invest. Radiol., 2006, 41(3): 213-221
- 13 Kuo P H, Kanal E, Abu-Alfa A K, Cowper S E. Radiology, 2007, 242(3): 647-649
- 14 Jia Q J, Zeng J F, Qiao R R, Jing L H, Peng L, Gu F L, Gao M Y. J. Am. Chem. Soc., 2011, 133 (48): 19512 19523
- 15 Wu A G, Ou P, Zeng L Y. Nano, 2010, 5(5): 245 270
- 16 Hao R, Xing R J, Xu Z C, Hou Y L, Gao S, Sun S H. Adv. Mater. , 2010, 22(25): 2729-2742
- 17 Liu Y L, Ai K L, Yuan Q H, Lu L H. Biomaterials, 2011, 32(4): 1185-1192
- 18 Gao J H, Gu H W, Xu B. Acc. Chem. Res. , 2009, 42(8): 1097 1107
- 19 Martina M S, Fortin J P, Menager C, Clement O, Barratt G, Grabielle-Madelmont C, Gazeau F, Cabuil V, Lesieur S. J. Am. Chem. Soc., 2005, 127(30): 10676 - 10685
- 20 Torchilin V P. Pharma. Rev., 2007, 24(1): 1-16
- 21 Tagmatarchis N, Shinohara H. Mini Rev. Med. Chem. , 2001, 1(10): 339-348
- 22 Sitharaman B, Wilson L J. J. Biomed. Nanotechnol. , 2007, 3(4): 342-352
- 23 Bolskar R. Nanomedicine, 2008, 3(2): 201-213
- 24 Chaur M N, Melin F, Ortiz A L, Echegoyen L. Angew. Chem. Int. Ed., 2009, 48(41): 7514-7538

- 25 Heath J R, O'Brien S C, Zhang Q, Liu Y, Curl R F, Tittel F K, Smalley R E. J. Am. Chem. Soc., 1985. 107(25): 7779 - 7780
- Wang C R, Tan K, Tomiyama T, Yoshida T, Kobayashi Y, Nishibori, E, Takata M, Shinohara H. Nature, 2000, 08 26 (6811): 426 - 427
- 27 Wang C R, Kai T, Tomiyama T, Yoshida T, Kobayashi Y, Nishibori E, Takata M, Sakata M, Shinohara H. Angew. Chem. Int. Ed., 2001, 40(2): 397-399
- Yang S F, Popov A A, Dunsch L. Angew. Chem. Int. Ed., 2007, 46(8): 1256-1259 28
- Yang H, Lu C X, Liu Z Y, Jin H X, Che Y L, Olmstead M M, Balch A L. J. Am. Chem. Soc. , 2009, 130(51): 17296 29 -17300
- 30 Nikawa H, Yamada T, Cao B P, Mizorogi N, Stanina Z, Tsuchiya T, Akasaka T, Yoza K, Nagase S. J. Am. Chem. Soc., 2009, 131(31): 10950 - 10954
- 31 Wang T S, Chen N, Xiang J F, Li B, Wu J Y, Xu W, Jiang L, Tan K, Shu C Y, Lu X, Wang C R. J. Am. Chem. Soc., 2009, 131(46): 16646-16647
- 32 Kratschmer W, Lamb L D, Fostiropoulos K, Huffman D R. Nature, 1990, 347(6291): 354-358
- 33 Shinohara H. Rep. Prog. Phys., 2000, 63(6): 843-885
- 34 Tsuchiya T, Wakahara T, Lian Y F, Maeda Y, Akasaka T, Kato T, Mizorogi N, Nagase S. J. Phys. Chem. B, 2006, 110(45): 22517 - 22520
- SUN Bao-Yun , ZHAO Shi-Xiong , DONG Jin-Quan , ZHAO Yu-Liang , YUAN Hui. China Patent , CN200910266130.9. ,2009 35 孙宝云,赵世雄,董金泉,赵宇亮,袁慧. 中国专利,CN200910266130.9.,2009
- Bolskar R D, Benedetto A F, Husebo L O, Price R E, Jackson E F, Wallace S, Wilson L J, Alford J M. J. Am. Chem. 36 Soc. , 2003 , 125(18) : 5471 - 5478
- Lu J, Sabirianov R F, Mei W N, Duan C G, Zeng X C. J. Phys. Chem. B, 2006, 110(47): 23637-23640 37
- Qian M C , Khanna S N. J. Appl. Phys. , 2007 , 101(9): 1-3 38
- Stevenson S, Rice G, Glass T, Harich K, Cromer F, Fordan M R, Craft J, Hadju E, Bible R, Olmstead M M, Maitra K, 39 Fishier A J , Balch A L , Dorn H C. Nature , 1999 , 401(6748): 55 - 57
- 40 Zhang E Y, Shu C Y, Feng L, Wang C R. J. Phys. Chem. B, 2007, 111(51): 14223-14226
- Zhang S R, Sun D Y, Li X Y, Pei F K, Liu S Y. Fullerene Science and Technology, 1997, 5(7): 1635-1643 41
- 42 Wilson L J. The Electrochemical Society Interface • Winter, 1999, 8(6): 24-28
- 43 Mikawa M, Kato H, Okumura M, Okumura M, Kanazawa Y, Miwa N, Shinohara H. Bioconjugate Chem. , 2001, 12(4): 510 - 514
- 44 LIU Kai-Min ZHANG Jun, XING Geng-Mei, ZHAO Yu-Liang. Chinese J. Appl. Chem., 2007, 24(1): 90-94 刘凯敏 张钧, 邢更妹, 赵字亮. 应用化学, 2007, 24(1): 90-94
- Zhang J, Liu K M, Xing G M, Ren T X, Wang S K. J. Radioanal. Nucleic Chem. , 2007, 272(3): 605-609 45
- 46 LU Xing , XU Jian-Xun , SHI Zu-Jin , SUN Bao-Yun , GU Zhen-Nan , LIU Hong-Dong , HAN Hong-Bin. Chem. J. Chinese Universities , 2004 , 25(4): 697 - 700

卢兴,徐建勋,施祖进,孙宝云,顾振南,刘洪东,韩鸿宾.高等学校化学学报,2004,25(4):697-700

- 47 Kato H , Kanazawa , Y , Okumura , M , Taninaka A , Yokawa T , Shinohara H. J. Am. Chem. Soc. , 2003 , 125(14): 4391-4397
- Terreno E , Castelli D D , Viale A , Aime S. Chem. Rev. , 2010 , 110(5): 3019-3042 48
- Sayes C M , Fortner J D , Guo W , Lyon D , Boyd A M , Ausman K D , Tao Y Z , Sitharaman B , Wilson L J , Hughes J B , 49 West J L , Colvin V L. Nano Lett. , 2004 , 4(10) : 1881 - 1887
- 50 Chen C Y , Xing G M , Wang J X , Zhao Y L , Li B , Tang J , Jia G , Wang T C , Sun J , Xing L , Yuan H , Gao Y X , Meng H , Chen Z , Zhao F , Chai Z F , Fang X H. Nano Lett. , 2005 , 5(10): 2050 - 2057
- 51 Yang D , Zhao Y L , Guo H , Li Y N , Tewary P , Xing G M , Hou W , Oppenheim J J , Zhang N. ACS Nano , 2010 , 4(2): 1178 - 1186
- 52 Liang X J , Meng H , Wang Z , He H Y , Meng J , Lu J , Wang P C , Zhao Y L , Gao X Y , Sun B Y , Chen C Y , Xing G M , Shen D W, Gottesman M M, Wu Y, Yin J J, Jia L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 2010, 107(16): 7449-7454
- Meng H, Xing G M, Sun B Y, Zhao F, Lel H, Li W, Song Y, Chen Z, Yuan H, Wang X X, Long J, Chen C Y, Liang 53

X J , Zhang N , Chai Z F , Zhao Y L. ACS Nano , 2010 , 4(5): 2773 – 2783

- 54 Sitharaman B , Bolskar R D , Rusakova I , Wilson L J. Nano Lett. , 2004 , 4(12): 2373 2378
- 55 Laus S, Sitharaman B, Toth V, Bolskar R D, Helm L, Asokan S, Wong M S, Wilson L J, Merbach A E. J. Am. Chem. Soc. , 2005, 127(26): 9368 – 9369
- 56 Laus S, Sitharaman B, Toth E, Bolskar R D, Helm L, Wilson L J, Merbach A E. J. Phys. Chem. C, 2007, 111(15): 5633 5639
- 57 Shu C Y , Gan L H , Wang C R , Pei X L , Han H B. Carbon , 2006 , 44(3): 496 500
- 58 Shu C Y , Zhang E Y , Xiang J F , Zhu C F , Wang C R , Pei X L , Han H B. J. Phys. Chem. B , 2006 , 110(31): 15597 - 15601
- 59 Shu C Y , Ma X Y , Zhang J F ,Gibson H W , Dorn H C , Corwin F D , Fatouros P P , Dennis T J S. Bioconjugate Chem. , 2008 , 19(3): 651 - 655
- 60 Shu C Y , Wang C R , Zhang J F , Corwin F D , Sim J H , Zhang E Y , Dorn H C , Gibson H W , Fatorous P P , Wang C R , Fang X H. Chem. Mater. , 2008 , 20(6): 2106 – 2109
- 61 Fatouros P P, Corwin F D, Chen Z J, Broaddus W C, Tatum J L, Kettenmann B, Ge Z, Gibson H W, Russ J L, Leonard A P, Duchamp J C, Dorn H C. *Radiology*, **2006**, 240(3): 756 764
- 62 Zhang J F , Fatouros P P , Shu C Y , Reid J , Owens L S , Cai T , Gibson H W. , Long G L , Corwin F D Chen Z J , Dorn H C. *Bioconjugate Chem.* , **2010** , 21(4): 610-615
- 63 Shu C Y, Corwin F D, Zhang J F, Chen Z J, Reid J E, Sun M H, Xu W, Sim J H, Wang C R, Fatouros P P, Esker A R, Gibson H W, Dorn H C. *Bioconjugate Chem.*, 2009, 20(6): 1186–1193
- 64 Filmore H L , Shultz M D , Henderson S C , Cooper P , Broaddus W C , Chen Z J , Shu C Y , Zhang J F , Ge J C , Dorn H C , Corwin F , Hirsch J I , Wilson J , Fatouros P P. Nanomedicine , 2011 , 6(3): 449 – 458
- 65 Shultz M D , Wilson J D , Shu C Y , Ge J C , Zhang J Y , Gibson H W , Fillmore H L , Hirsch J I , Dorn H C , Fatouros P P. J. Am. Chem. Soc. , 2010 , 132(14): 4980 – 4981
- 66 Shultz M D , Wilson J D , Fuller C E , Zhang J Y , Dorn H C , Fatouros P P. Radiology , 2011 , 261(1): 136-143.
- 67 Anderson S A , Lee , K K , Frank J A. Invest. Radiol. , 2006 , 41(3): 332 338
- 68 Sitharaman B , Tran L A , Pham Q P , Bolskar R D , Muthupillai R , Flamm S D , Mikos A G , Wilson L J. Contrast Media & Molecular Imaging , 2007 , 2(3): 139 – 146
- 69 Cagle D W , Kennel S J , Mirzadeh S , Alford J M , Wilson L J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 1999 , 96(9): 5182 5187
- 70 Zheng J P , Liu Q L , Zhen M M , Jiang F , Shu C Y , Jin C , Yang Y J , Alhadlaq H A , Wang C R. Nanoscale , 2012 , 4 (12): 3669 – 3672

Recent Progress of Molecular Imaging Probes Based on Gadofullerenes

ZHENG Jun-Peng , ZHEN Ming-Ming , WANG Chun-Ru , SHU Chun-Ying*

(Key Laboratory of Molecular Nanostructure and Nanotechnology Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract Paramagnetic gadofullerenes and their derivatives exhibit much higher relaxivity than commercial MagnevistTM(Gd-DTPA) , therefore have become competitive candidates for magnetic (MR) imaging probes. More prominently , the stable fullerene cages are believed to hinder both chemical attack on the inner clusters and the escape of the toxic lanthanide ions , which should effectively suppress the toxicity of naked Gd^{3+} ions. Some functionalized gadofullerides also available for further conjugation to fabricate multifunctional probes. This review presents the latest finding of magnetic resonance imaging (MRI) probes based on various gadofullerenes , including $Gd @ C_{60}$, $Gd@ C_{82}$ and $Gd_3N @ C_{80}$. The derivative strategy dependent relaxivity properties and biodistributions as well as their potential application as nanoplatform for multifunctional probe are reviewed and discussed.

Keywords Molecular imaging; Endohedral metallofullerene; Magnetic resonance imaging; Review

(Received 11 April 2012; accepted 6 June 2012)