

行政院原子能委員會  
委託研究計畫研究報告

醣質肝膽磁振造影劑之研究

**Application Research of Glyco MRI Agent**

計畫編號：992001INER082

受委託機關(構)：國立交通大學

計畫主持人：王雲銘

核研所聯絡人員：王美惠

聯絡電話：03-5712121-56976

E-mail address：ymwang@mail.nctu.edu.tw

報告日期：99年12月

## 目 錄

|  |    |
|--|----|
| 目錄.....  | I  |
| 中文摘要.....  | 1  |
| Abstract.....                                      | 2  |
| 壹、計畫緣起與目的.....                                     | 3  |
| 貳、研究方法與過程.....                                     | 5  |
| 一、超順磁氧化鐵參雜錳之奈米粒子 SPIO ( $MnFe_2O_4$ )之合成.....      | 5  |
| 二、Galactosyl –Fluorescence-SPIO 之合成.....           | 6  |
| 三、動態光散射儀(Dynamic Light Scattering, DLS) 測定.....    | 8  |
| 四、縱向弛緩率( $r_1$ )及橫向弛緩率( $r_2$ )之測定.....            | 8  |
| 五、 $MnFe_2O_4$ -Galactose–Fluorescence 穩定度測試.....  | 9  |
| 六、傅立葉轉換紅外線光譜儀(FTIR)鑑定.....                         | 9  |
| 七、穿透式電子顯微鏡 (TEM) 之測定.....                          | 9  |
| 八、細胞株及其培養.....                                     | 9  |
| 參、主要發現與結論.....                                     | 10 |
| 一、 $MnFe_2O_4$ -Galactose–Fluorescence 之物化性探討..... | 10 |
| 二、弛緩率 (relaxivity, $r_2$ ) 的研究.....                | 13 |
| 肆、參考文獻.....  | 14 |

## 中文摘要

磁振造影(magnetic resonance imaging, MRI)是近年來在臨床診斷上相當重要之影像工具。自 1980 年代問世後，在短短的數年間，就掀起了一片熱潮。它在醫學影像診斷上的貢獻，不斷地被肯定，MRI 之所以受到矚目，除了它能呈現高度敏銳的影像，提供臨床醫師豐富的訊息外，其獨特的造影原理，不同於傳統放射線的造影技術，不需侵入人體即可得到人體各種結構組織之任意截面剖面圖，並且獲取其它眾多的物理參數訊息，而身體幾乎任何部位皆可執行 MRI 檢查，所得之影像非常清晰與細膩，尤其是對軟組織的影像，不是任何其他醫學影像系統所能比擬。然而，廿一世紀的醫學將邁入分子醫學、基因醫學的時代。利用 MRI 來顯示分子或細胞層次之生化功能之影像（稱分子影像，molecular imaging）近年來已在實驗動物獲得成功。目前科學家們正努力嘗試將此技術轉移至人體，希望在疾病初期就能偵測到蛋白質、氨基酸或受體等生化方面的異常表現，以作為早期診斷或療效監測之用。根據衛生署統計，國人十大死亡原因中，慢性肝病、肝硬化為第六位，而肝癌更是國內十大癌症死亡原因的第一位，若能早期診斷，應有助於預防肝炎的發生。新近文獻報導聚合型半乳糖酐對肝細胞有特異性之結合。本計畫預計建立可用於診斷肝癌之醣質藥物之動物造影技術平台。

## **Abstract**

Asialoglycoprotein receptors (ASGP-R) ,situated on the hepatocyte membrane, can recognize galactose or N-acetylgalatosamine terminal of desialylated glycoprotein or glycopeptide. Sawamura et al. reported that a decrease in the number of ASGP-R led to an accumulation of asialoglyprotein in the sera of galactosamine-treated rats, and the number of these receptors decreases in patients with chronic liver diseases.

In this study,the hepatoma animal model will be used to evaluate its potential for diagnosis of liver disease with MRI imaging technique.

## 壹、計畫緣起與目的

磁振造影 (Magnetic Resonance Imaging, MRI) 自發明以來，已成為醫學臨床診斷上繼斷層掃描 (CT)、超音波及 X-Ray 照相等影像診斷儀器外，另一相當具代表性的影像醫學技術。MRI 具備不需侵入人體的優勢，而且所需照射能量低，不會產生游離輻射，所以對人體掃描不會造成副作用。MRI 在軟組織的成像上表現優秀，對於膀胱、直腸、子宮、陰道、骨、關節、肌肉等部位的檢查都較斷層掃描優秀，和斷層掃描相比，MRI 在影像擷取的部分除了可以自由選擇，更精確獲得所需的影像，最大優勢是在於它能夠任意觀察立體體的影像，此一優勢更為醫生提供一種診斷病情，尋找病因的方法。磁振造影經過多年的發展，已經開始應用在細胞甚至分子層級，為了在更小的層級下開發應用於細胞與功能性的影像，設計可達到標幟活體細胞的目標化、區域化和量化的新型對比劑是不可或缺的。近年來，一直不斷嘗試發展新的對比劑，其中尤以超順磁性的反相對比劑發展最為突出，此類是以減少橫向弛緩時間 (spin-spin relaxation time, T<sub>2</sub>) 的對比劑，也稱為 T<sub>2</sub> 對比劑，其目的是用以減少組織訊號，使得影像轉為較灰暗或黑色，此即超順磁氧化鐵奈米粒子 (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIO)。氧化鐵粒子並非全部具有超順磁特性，要具備此一特性，氧化鐵粒子的粒徑必須介於特定的範圍。對於磁性奈米粒子而言，會從塊材時的鐵

磁性進入奈米層級的順磁性，而當尺寸繼續縮小至數個或是十幾奈米時，即會產生超順磁特性。本研究利用熱裂解方式，合成了超順磁氧化鐵奈米粒子 (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIO)，並嘗試利用參雜 (doping) 的形式，以求得更高的 T2 弛緩率。新近文獻報導聚合型半乳糖對肝細胞有特異性之結合，因此在本研究中利用半乳糖結合螢光基團並與氧化鐵奈米粒子做結合，期望能達到目標化的顯影效果，並做為雙功能之對比劑。

## 貳、研究方法與過程

### 一、超順磁氧化鐵參雜錳之奈米粒子 SPIO ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ )之合成

將  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  (2 mmol, 0.71g)、 $\text{Mn}(\text{acac})_2$  (1 mmol, 0.25g)、oleic acid (6 mmol, 1.7g)、oleylamine (6 mmol, 1.6g)、1,2-Hexadecandiol (10 mmol, 2.55g) 和 benzyl ether 混合置於高溫爐。緩慢升溫至 200 °C 後持續加熱一小時使其融解並混合均勻，並加熱至 300 °C，到達指定溫度並持續加熱一小時後降溫至室溫。產物加入丙酮後以 12000rpm 離心，並利用丙酮清洗，移除多餘的界面活性劑，離心後之沉澱物即為 SPIO ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ )，可溶於 chloroform、hexane 等溶劑保存。反應藉由調整 benzyl ether 的量改變金屬前驅物的濃度，藉以控制粒子粒徑，並以穿透式電子顯微鏡觀察其粒徑及形狀。

### (一)、compound (2)之製備

在 20g 的 compound(1)中加入 45ml 的 33%之 HBr，在冰浴條件下攪

拌 overnight，反應結束後以減壓濃縮機(40°C)抽乾，然後加入 100ml 的三氯甲烷，利用飽和的 sodium bicarbonate 水溶液萃取，收取三氯甲烷層，並加入 MgSO<sub>4</sub> 除去水份，再加入 150ml 的酒精使之沉澱，接著進行過濾，過濾後以減壓濃縮機濃縮，再利用矽膠管柱層析法用乙酸乙酯：己烷 = 1:1 的比例進行沖提。

#### **(二)、compound(4)之製備**

秤取 compound (3) : compound (2) 莫耳數比 1.5 : 1，將其溶於乙腈溶液中攪拌均勻，緩緩加入催化劑氧化銀，於氮氣環境下反應 4 小時，每小時點片觀察是否仍有起始物 compound (3)，反應結束後再利用矽膠管柱層析法用乙酸乙酯：己烷 = 1:1 的比例進行沖提。

#### **(三)、compound(5)之製備**

compound (4) : methyl-3-mercaptopropanoate 莫耳數比 1:1.2，先將 compound (4) 溶於乙腈中，加入催化劑碳酸鉀再緩緩加入 methyl-3-mercaptopropanoate，攪拌均勻反應 overnight。反應結束，抽氣過濾除去催化劑碳酸鉀，以減壓濃縮抽乾並用矽膠管柱層析法用乙酸乙酯：己烷 = 1:1 的比例進行沖提。

#### **(四)、compound(6)之製備**

先將 compound(5) 溶於甲醇中，以玻璃滴管緩緩加入 5 當量 1M 的 NaOH，避光攪拌均勻反應 overnight，以減壓濃縮除去配製 NaOH 溶液時所使用的水，並用矽膠管柱層析法用乙酸乙酯：己烷 = 3:2 的比例進行沖提，之後再以 HPLC 純化。

#### **(五)、compound(7)之製備**

先將 MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 10mg 溶於 2ml 之甲苯中，再將 compound(6) 溶於 2ml

之甲醇溶液中，兩者混合在氮氣環境下超音波震 8 小時，震盪過程須避光。8 小時後以強力磁鐵吸引氧化鐵奈米粒子後除去上清液，接著以 3ml 的酒精清洗氧化鐵奈米粒子後，再次以強力磁鐵吸引氧化鐵奈米粒子的方式除去上清液，重複三次後用 3ml 的丙酮清洗氧化鐵奈米粒子，方法同以酒精清洗，以移除未結合上 SPIO 之 Galactose-Fluorescence。將丙酮移除後，強力磁鐵吸附物可溶於極性溶液中。

### 三、動態光散射儀(Dynamic Light Scattering, DLS) 測定

DLS 的原理是利用使用單一波長的雷射光照射在分散在液相中的懸浮粒子表面，量測在幾個反射角的反射光強度，或者固定在某一個角度量測反射光強度的衰變情形，再配合理論分析模式，便可以得到粒子的平均大小及分布。將  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ -Galactose-Fluorescence 溶液樣品，配製成 1~10 mM 的水溶液 (1 ml) 裝在 DLS 專用石英管內，量測粒子的水合直徑。

### 四、縱向弛緩率( $r_1$ )及橫向弛緩率( $r_2$ )之測定

將  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ -Galactose-Fluorescence 水溶液樣品分別配製成五個不同濃度，再利用 20 MHz relaxometer 測量樣品在  $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$  的縱向弛緩時間 ( $T_1$ ) 及橫向弛緩時間 ( $T_2$ )。

### 五、 $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ -Galactose-Fluorescence 穩定度測試

使用粒徑分析儀測量  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ -Galactose-Fluorescence 之水合粒徑，每隔一星期取新樣品測量一次。將  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ -Galactose-Fluorescence 溶於不同 pH 值之水溶液中，觀察其有無沉澱情形，並使用粒徑分

析儀測量其水合粒徑。

#### 六、傅立葉轉換紅外線光譜儀(FTIR)鑑定

將溶於水之  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ -Galactose-Fluorescence 凍乾使其成粉末狀，取 2mg 之樣品粉末與乾燥的 KBr 粉末一同研磨再壓成片，藉紅外線光譜測定其組成並確認其成分之分子構造。

#### 七、穿透式電子顯微鏡 (TEM) 之測定

配製 0.2~0.5% (W/W) 氧化鐵奈米粒子溶液，並利用毛細管將樣品點染於鍍碳銅網上，待其自然乾燥後以穿透式電子顯微鏡觀察。選取範圍內 200~300 個鐵核計算其大小，並且求出其平均粒徑。

#### 八、細胞株及其培養

細胞株，在其細胞膜表面表現不同量的 ASGP-R。細胞株為不表現 ASGP-R 的細胞，作為對照組細胞。所有細胞皆培養於 37°C 培養箱及曝有 5% 二氧化碳。

## 參、主要發現與結論

### 一、 $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ -Galactose-Fluorescence 之物化性探討

本研究利用熱裂解的方式在高溫下合成出了超順磁氧化鐵參雜錳的 SPIO ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ )。本研究藉由調整起始物的濃度達到對粒徑的控制，由結果可以得知，當反應條件濃度越高，所生成的奈米粒子粒徑會越大。另從 TEM 影像可知，所有的粒子邊界都相都明顯可辨，並呈現單分散 (monodisperse)，沒有聚集的情況；所有粒子的粒徑都相近，粒徑分佈範圍窄；大部分的粒子外觀皆為圓形或是多邊形，鮮少不規則角形的粒子。

而為在 SPIO 表面修飾具目標化性質的半乳糖以及做為觀測螢光影像之基團 coumarin，在甲苯溶液中利用超音波震盪將  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  和 Galactose-Fluorescence 進行表面配位子交換，使原本因 oleic acid 包覆而呈現疏水性奈米粒子，在表面配位子的交換後，進而可分散到極性環境中，且以水溶液的形式儲存於  $4^\circ\text{C}$  環境，並以 DLS 測量其粒徑大小，其水合直徑大小為  $46.89 \pm 5.3\text{nm}$ 。

為探討  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ -Galactose-Fluorescence 在各種生理條件下是否能維持良好分散性，以氫氧化鈉、鹽酸配置 pH 值由 5 至 11 的水溶液，並加入等量的  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ -Galactose-Fluorescence 溶液，使每個比色管之氧化鐵奈米粒子濃度皆為 1mM，結果  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ -Galactose-Fluorescence 在 pH 值從 5~11 不同 pH 水溶液中無明顯沉澱。

由 DLS 儀器觀察 MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Galactose-Fluorescence 在不同酸鹼值下的粒徑變化，可觀察到 MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Galactose-Fluorescence 在 pH 值 6~11 之間，粒徑變化不大，表示 MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Galactose-Fluorescence 在 pH 值 6~10 時，結構穩定，為安定存在。但在 pH 小於 6 以後，粒徑變大，較不穩定，因此本研究所合成之 MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Galactose-Fluorescence 儲存時不宜儲存於酸性溶液下。然而在 pH6~10 之間 MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Galactose-Fluorescence 性質較穩定，且保有良好的分散性質，故爾後之實驗當中皆採用 pH7.4 之 MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Galactose-Fluorescence 做為探討對象。

## 二、弛緩率 (relaxivity, $r_2$ ) 的研究

將 MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Galactose-Fluorescence pH7.4 以及市售用藥 Resovist 之水溶液樣品分別配製成五個不同濃度，再利用 20 MHz relaxometer 測量樣品在  $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$  的橫向弛緩時間 ( $T_2$ ) 並倒數與濃度做圖，求得 MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Galactose-Fluorescence 橫向遲緩率。所得 MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Galactose-Fluorescenc 遲緩率值為  $244.78 \pm 3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，而 Resovist 之橫向遲緩率為  $164.08 \pm 3.2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，因此 MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Galactose-Fluorescence 除了具有半乳糖可進行目標化之外，其影像對比度及靈敏度都高於市售用藥 Resovist。

#### 肆、參考文獻

1. K. M. K. Selima, Y. S. Haa, S. J. Kima, Y. Changb, T. J. Kimc, G. H. Lee, I. K. Kanga, *Biomaterials*, 2007,28, 710–716
2. C. H. Lai, C. Y. Lin, H. T. Wu, H.S. Chan, Y. J. Chuang , C. T. Chen , C. C. Lin, *Adv. Funct. Mater.*, 2010, XX, 1–11
3. G. Vittadin, E. Felder, P. Tirone and V. B. Lorusso, *Invest. Radiol.*, 1988, 23, 246.
4. P. Pavone, G. Patrizio and C. Buoni, *Radiology*, 1990, 176, 61.
5. S. Aime, E. Gianolio, D. Corpillo, C. Cavallotti, G. Palmisano, M. Sisti, R. Pagliarin, *Helv. Chim. Acta.*, 2003, 86, 615.
6. Lee, J. H.; Huh, Y. M.; Jun, Y. W.; Seo, J. W.; Jang, J. T.; Song, H. T.; Kim, S.; Cho, E. J.; Yoon, H. G.; Suh, J. S.; Cheon, J., *Nat. Med.*, 2007, 13, 95-99.
7. Anderson EA, Isaacman S, Peabody DS, Wang EY, Canary JW, Kirshenbaum K. *Nano Lett*, 2006;6:1160–4.
8. T. Komatsu, K. Kikuchi, H. Takakusa, K. Hanaoka, T. Ueno, M. Kamiya, Y. Urano, T. Nagano, *J.A.C. S.* 2006, 128, 15946-15947
9. X. Wu, C. C. Ling, D. R. Bundle, *Org. Lett.*, Vol. 6, No. 24, 2004
10. Weissleder, R.; Elizondo, G.; Wittenberg, J.; Rabito, C. A.; Bengel, H. H.; Josephson, L. *Radiology* 1990, 175, 485-493.