波

谱

学 杂

志

第 30 卷第 2 期 2013 年 6 月

Chinese Journal of Magnetic Resonance

Vol. 30 No. 2 Jun. 2013

文章编号: 1000-4556(2013)02-279-14

超极化¹²⁹Xe磁共振分子影像学

张 继^{1,2},罗 晴¹,郭茜桅¹,陈世桢¹,周 欣^{1*}

[1. 波谱与原子分子物理国家重点实验室,武汉磁共振中心(中国科学院 武汉物理与数学研究所),

湖北 武汉 430071;

2. 中国科学院大学,北京 100049]

摘 要:磁共振分子影像学发展的主要瓶颈之一在于灵敏度的限制,基于激光光泵和自旋交换技术能获得增强4~5个量级的超极化¹²⁹ Xe 磁共振信号,因此超极化¹²⁹ Xe 磁共振分子影像 学相对于传统 MRI 在灵敏度上表现出巨大的优势.围绕提高灵敏度这一核心 MRI 问题及其 在科学研究中的应用,该文介绍了目前基于超极化¹²⁹ Xe 的生物分子探针的基本结构和原理, 阐述了与之相关的分子影像学方法和技术,同时评述了当前的最新研究进展和发展方向.

关键词:磁共振成像(MRI);分子影像学;灵敏度;超极化¹²⁹Xe;分子探针 **中图分类号:**O482.53 **文献标识码:**A

引言

20世纪70年代发展起来的磁共振成像(Magnetic Resonance Imaging, MRI)技术, 由于其无创伤、无辐射、高分辨率和高对比度等优势,目前已成为活体状态下显示人体 结构的最好影像学技术之一,已被广泛地应用于疾病临床诊断和基础研究中.随着磁共 振技术的不断进步和革新, MRI 不仅能用于解剖结构成像,同时也扩展至生物组织和机 体的功能磁共振成像(Functional Magnetic Resonance Imaging, fMRI),例如对脑功能 的研究^[1,2].20世纪末至21世纪初,分子影像学的概念被引入到 MRI,Weissleder R 等 人将分子影像学定义为对活体内进行的细胞和分子水平生物过程的可视化测量^[3].分子 影像学的观测对象是细胞和分子层面的生化变化,相对于功能成像和组织结构成像,分

作者简介:张继(1988-),男,湖北人,硕士研究生,主要研究方向为超灵敏磁共振分子探针与分子影像学.E-mail: zhangji198805@gmail.com. * 通讯联系人:周欣,电话:027-87198802, E-mail: xinzhou@wipm.ac.cn.

收稿日期: 2012-09-07; 收修改稿日期: 2012-11-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81227902,11004228); 国家科学技术部创新方法资助项目(2010IM-030600);中国科学院知识创新工程重要方向资助项目(KJCX2-EW-N06);中国科学院"百人计划"资助项 目([2010]88).

子影像学对于生理变化要敏感得多,因此更加适合用于疾病的早期诊断,这对于重大疾病的治疗具有巨大的潜在价值.另外,基于分子影像学,目前出现了"诊断治疗",即"个性化治疗"这一新的治疗理念,即通过运用分子影像学手段监控治疗后患者的生化反应,迅速评价治疗效果进而调整或改进治疗手段,因此能够针对个体特性实施个性化治疗.分子影像学作为一门新兴的交叉学科,其最大的技术困难之一在于灵敏度的限制,由于其探测对象的浓度往往在微量或痕量水平,需要灵敏度极高的探测技术.相对于其它影像学方法,MRI的固有弱点就是灵敏度较低,因此发展高灵敏度的 MRI 探测手段对于发展 MRI 分子影像学具有重大的意义,本文介绍以超极化(Hyperpolarized)¹²⁹ Xe 为探针的 MRI 分子影像学.

磁共振灵敏度低的核心原因在低的热极化度. 核磁矩不为 0 的核在外加磁场的作用 下,核自旋能级会产生塞曼分裂,上下能级布居数之差除以上下能级布居数之和即为极 化度,在 NMR 实验的一般磁场强度范围内,热平衡条件下的原子核极化度通常为 10⁻⁵ ~10⁻⁶,即十万至百万个粒子中只有一个粒子对磁共振信号有贡献. 通过激光光泵和自 旋交换(spin-exchange optical pumping, SEOP)技术可以使热极化¹²⁹Xe 的极化度提高 4 ~5 个数量级^[4,5],即被称之为超极化¹²⁹Xe. 除了 SEOP 技术之外,提高极化度的方法还 有仲氢诱导核极化(para-hydrogen induced polarization, PHIP)^[6,7]、动态核极化(dynamic nuclear polarization, DNP)^[8,9]等.

超极化¹²⁹ Xe MRI 分子影像学包含 3 个部分:超极化技术、生物分子探针技术和磁 共振方法.本文将着重介绍生物分子探针技术和磁共振方法两方面的研究进展,对于想 更深刻了解超极化的读者,可参考上述关于超极化的相关文献^[4-9].

1 Xe 单原子分子作为分子探针

Xe 单原子分子作为分子探针很早就引起研究者的兴趣, Xe 作为分子探针具有以下 优势:(1)通过超极化手段可得到超极化 Xe, 能将 Xe 的极化度提高 10 000 倍以上,大 大提高 MRI 的灵敏度;(2)Xe 的外层电子云对周围环境变化十分敏感,能够敏锐的反映 所处环境的变化, Xe 的化学位移范围高达 & 7 500;(3)Xe 在生物组织和人体内无背景 信号,可获得高对比度的图像,适合充当分子探针.

Xe 在自然界中有 8 种稳定的和超过 40 种不稳定的同位素,在稳定的同位素中有两种核自旋不为 0 的同位素¹²⁹ Xe(天然丰度 26.44%, *I*=1/2)和¹³¹ Xe(天然丰度 21.18%, *I*=3/2)可用于核磁共振研究^[10]. Xe 作为惰性元素,不易发生化学反应,但由于 Xe 核外电子较多,外层电子云受原子核约束较小,因此核外电子云易极化,对周围电子环境非常敏感.除此以外,Xe 的自旋晶格弛豫时间(*T*₁)对 Xe 周围环境的变化较为敏感. Xe 这些物理、化学性质使得 Xe 成为一个较好的 NMR 探针,用于表征多种物质的结构,如催化领域的分子筛,以及生物领域的蛋白质等^[11,12].

早在 20 世纪 60 年代, Schoenborn B P 等人通过 X-射线单晶衍射证明了 Xe 可以被 蛋白质的空腔吸收^[13-16]. Tilton R F 等人通过研究发现蛋白质吸收 Xe 后对蛋白质的结 构影响甚微,通过模拟实验发现 Xe 与蛋白质主要是通过范德华力进行相互作用^[17]. 1982 年, Tilton R T Jr. 和 Kuntz I D Jr. 首次用¹²⁹ Xe NMR 研究抹香鲸肌红蛋白和血红 蛋白与 Xe 相互作用的过程,研究了温度(223 K~283 K)变化对 Xe 的化学位移和线宽 的影响,以及常温常压下蛋白质浓度对 Xe 化学位移的影响.研究证明: Xe 在水中和 Xe 与蛋白质结合后有不同的化学位移^[18].Locci E 等人通过¹²⁹ Xe NMR 研究了 Xe 与马肌 红蛋白、蛋清溶菌酶、马细胞色素 c 三种蛋白质的相互作用^[19].利用 Xe 对蛋白质的空 腔和表面进行探测,他们的研究结果表明 Xe 的化学位移对蛋白质结构十分敏感, Xe 作 为分子探针能探测蛋白质周围环境的细微变化.不过,由于 Xe 化学位移对周围环境的 敏感度太高,温度、压强等实验条件对 Xe 的化学位移也能产生较大影响,难以直接确定 引起 Xe 化学位移变化的原因,这是 Xe 直接作为分子探针的一个难以克服的缺陷.Xe 与蛋白质之间的相互作用是通过范德华力实现的,与蛋白质相结合的 Xe 和溶液中的自 由 Xe 进行快交换,¹²⁹ Xe NMR 不能区分二者之间的 NMR 信号,不能直接得到结合 Xe 的化学位移;同时,缺乏特异性制约了 Xe 单原子分子作为分子探针在蛋白质结构探测 中的应用,所以 Xe 单原子分子作为分子探针直接探测生物体系的相关报道相对较少.

2 基于 Xe 的生物分子探针

2.1 基于 Xe 的生物分子探针的设计

通过激光光泵的超极化技术,¹²⁹ Xe NMR 获得了超高灵敏度,但是¹²⁹ Xe 本身不具备 分子探针所必需的特异性(specificity).为了克服这个弱点,2001 年 Spence M M 所在研 究组提出了一种新的设计思路,发展了基于 Xe 的生物分子探针,如图 1 所示^[20],称之 为"二级"探针系统^[21],其中,Xe 原子为一级探针,功能化的"笼"状超分子穴番为二级探 针.功能化的穴番由穴番 A、一段链状分子残基(tether)和赋予探针特异性结合能力的 配体(ligand)组成.当¹²⁹ Xe 进入到超分子"笼"-穴番后,其化学位移相对于自由状态会 有大幅度改变,因此可以通过¹²⁹ Xe 化学位移的变化检测到功能化穴番的存在,即功能化 穴番赋予了¹²⁹ Xe 对目标分子的特异性探测能,例如,对癌细胞的特异性检测,如图 2 所 示.更为有利的是,由于¹²⁹ Xe 对环境的高度敏感性,通过其化学位移变化,可以判断功 能化探针是否已经和目标分子结合.



图 1 基于 Xe 的生物分子探针的结构示意图:"笼"状分子-穴番、配体及联接两者的链状残基^[20] Flg. 1 The structure of biosensor. The cage is shown as quadrangle; the ligand is shown as circular and the tether is shown as pentagonum^[20]





这种"二级"生物分子探针将分子探针的靶向性和超极化¹²⁹ Xe 的超高灵敏度成功结 合到一起,开发出了对特定目标分子进行高灵敏度探测的磁共振方法,极大地扩展了 ¹²⁹ Xe在磁共振分子影像学中的应用空间.

2.2 Xe 与穴番的相互作用

在基于 Xe 的生物分子探针的设计中,"笼"的作用至关重要,一个合适的"笼"状分 子要满足这几点要求:(1)对 Xe 具有良好的亲和性;(2)"笼"内外 Xe 的交换速率要达到 一定的要求:既不能超出 Xe 化学位移的变化范围大小所决定的频率尺度(即满足"慢交 换"条件),同时也要足够快以及时补充"笼"内的 Xe. 在选择合适"笼"状分子的过程中, 研究者们发现穴番较好的符合这些要求,对穴番与 Xe 的相互作用进行广泛的研究.

Bartik K 等人利用¹²⁹ Xe NMR 和¹ H NMR 研究了 Xe 与穴番 A 相互作用的动力学性 质^[22],包括亲和力常数 K(Binding Constant)、化合物动力学性质和结构信息等.在温度 278 K 时以(CDCl₂)₂ 为溶剂,用¹²⁹ Xe NMR 研究了不同浓度 Xe 在含穴番 A 的(CDCl₂)₂ 溶液中的化学位移,如图 3 所示^[22],¹²⁹ Xe 在纯溶剂中于 δ 229.5 处有一尖锐的单峰,加 入一定量的 Xe($n_{Xe}/n_{ ack{C}^{\oplus}} = 0.46$)溶解在 0.1 mol/L 的穴番 A 的(CDCl₂)₂ 溶液中, δ 229.5 处的峰消失,同时在 δ 62.3 处出现一个新信号;当增加 Xe 的浓度至 $n_{Xe}/n_{ ack{C}^{\oplus}} =$ 2.12时,在δ229.5和δ62.3处各出现一个峰.δ62.3的信号证实了穴番与 Xe 发生了包 络作用,而能够同时观测到自由 Xe 和"笼"内¹²⁹ Xe 的 NMR 信号证明二者之间的交换是 慢交换.通过研究¹²⁹ Xe 信号的半高宽和¹²⁹ Xe 的浓度之间的关系,确定了"笼"内外¹²⁹ Xe 交换的方式:"笼"内¹²⁹ Xe 在"笼"外自由¹²⁹ Xe 的作用下离开穴番空腔,与此同时自由 Xe 进入到穴番空腔中,溶液中没有自由 Xe 时,"笼"内 Xe 不会自动离开穴番空腔.通过不 同温度下 Xe 化学位移研究发现,"笼"内 Xe 的化学位移值随着温度的升高呈线性增大; 自由 Xe 的化学位移与之相反,随着温度的升高呈线性减小.作者指出引起自由 Xe 和 "笼"内 Xe 之间巨大化学位移差的主要原因是 Xe 与穴番分子之间的相互作用,而不是穴 番中苯环对 Xe 外层电子云的屏蔽. Xe 和 CHCl₃ 在穴番 A 中的竞争实验表明,穴番 A 对 Xe 的亲和性是穴番 A 对 CHCl₃ 的 4~5倍,在研究过的几种中性分子中, Xe 是对穴 番 A 亲和性最高的分子.



图 3 278 K 时,不同浓度 Xe 溶解在 0.1 mol/L 穴番 A 的(CDCl₂)₂ 溶液中的¹²⁹ Xe NMR 谱图^[22]. (a) ¹²⁹ Xe 在(CDCl₂)₂ 中¹²⁹ Xe NMR 谱图; (b) $n_{Xe}/n_{\widehat{C}^{\oplus}} = 0.46$ 时¹²⁹ Xe 在 0.1 mol/L 穴番 A 的(CDCl₂)₂ 溶液中¹²⁹ Xe NMR 谱图; (c) $n_{Xe}/n_{\widehat{C}^{\oplus}} = 2.12$ 时¹²⁹ Xe 在 0.1 mol/L 穴番 A 的(CDCl₂)₂ 溶液中¹²⁹ Xe NMR 谱图

Fig. 3 ¹²⁹ Xe NMR spectra of xenon with different concentration dissolved in 0.1 mol/L solution of cryptophane-A (CDCl₂)₂ at 278 K^[22]. (a) ¹²⁹ Xe NMR spectrum of xenon dissolved in pure (CDCl₂)₂ at 278 K 0.1 mol/L solution of cryptophane-A in (CDCl₂)₂ at 278 K; (b) ¹²⁹ Xe NMR spectrum of xenon dissolved in an approximately 0.1 mol/L solution of cryptophane-A in (CDCl₂)₂ at 278 K ($n_{Xe}/n_{CA} = 0.46$); (c) ¹²⁹ Xe NMR spectrum of xenon dissolved in an approximately 0.1 mol/L solution of cryptophane-A in (CDCl₂)₂ at 278 K ($n_{Xe}/n_{CA} = 0.46$); (c) ¹²⁹ Xe NMR spectrum of xenon dissolved in an approximately 0.1 mol/L solution of cryptophane-A in (CDCl₂)₂ at 278 K ($n_{Xe}/n_{CA} = 0.46$); (c) ¹²⁹ Xe NMR spectrum of xenon dissolved in an approximately 0.1 mol/L solution of cryptophane-A in (CDCl₂)₂ at 278 K ($n_{Xe}/n_{CA} = 0.46$); (c)

Bifone A 等人在 1996 年研究了人血液中超极化¹²⁹ Xe NMR 性质^[23],通过注射法将 超极化¹²⁹ Xe 注射到样品中.研究者先将¹²⁹ Xe 溶入到 0.9%(质量浓度)的生理盐水中,将 溶有超极化¹²⁹ Xe 的生理盐水注入到人的血液样品中,通过单次采样得到¹²⁹ Xe NMR 谱 图,在δ216 处和δ192 处各出现了一个单峰,δ216 处的峰对应于¹²⁹ Xe 在血液里红细胞 中的信号,δ192 处的峰对应于¹²⁹ Xe 在盐水/血浆混合溶液中的信号.巨大的化学位移差 主要是由于¹²⁹ Xe 与血红蛋白的相互作用引起的.同时研究者还将超极化¹²⁹ Xe 溶解到含 20% 脂质的溶液中,再将制备的溶液注射到人的血液样品中,得到了¹²⁹ Xe 在脂质溶液中 的信号(δ194 处)和在红细胞中的信号(δ216 处),并分别得到其 MRI 图像.

Hill P A 等人对人血浆中 Xe 与穴番的热力学和动力学进行了研究^[24],发现在人血浆环境中,穴番对 Xe 的亲和性[K=2.19±0.22×10⁴ (mol/L)⁻¹]与水环境中穴番对 Xe 的亲和性[K=3.01±0.26×10⁴ (mol/L)⁻¹]在同一量级上,证明在人血浆环境中穴番对 Xe 具有良好亲和性.

Meldrum T 等人用¹²⁹ Xe NMR 研究了穴番 A 与 Xe 在脂质囊泡中的相互作用^[25], 研究人员采用尺寸大小、成分组成与细胞膜相似的脂质囊泡进行研究.如图 4 所示^[25], 在水溶液中(0%脂质,实线段),"笼"内 Xe 的信号出现在 & 62 处,水溶液中的自由 Xe 的信号出现在 & 189 处,在水溶液中加入 1%脂质后在 & 73 处出现了第 3 个信号,该信 号是脂质环境下"笼"内 Xe 的信号.脂质环境"笼"内 Xe 的信号与水溶液环境"笼"内 Xe 信号的强度比为 1:2,远远大于脂质与水的体积比 1:100,由此可知,穴番 A 在脂质中 的溶解度是水中的 50 倍.当脂质含量为 0 时,只有水溶液环境"笼"内 Xe 信号,当脂质 的含量增加到 2%和 5%时,同时出现脂质环境"笼"内 Xe 的信号与水溶液中"笼"内 Xe 信号,但当增加脂质的含量至 10%时,水溶液环境中"笼"内 Xe 信号消失,这是由于 Xe 和穴番亲脂,在脂质中溶解度大.此外,随着脂质含量的增加,溶液中自由 Xe 的信号也 往低场移动,同时线宽变宽,在蛋白质溶液中也有类似的现象^[26],这种现象是由于 Xe 与溶液中溶质分子之间较弱的相互作用所导致的.



图 4 Xe 在含 0%(实线)、1%(段虚线)、10%(点虚线)脂质溶液中的¹²⁹Xe NMR 谱图^[25] Fig. 4 Xenon NMR spectra of the diacid cage in samples of 0% (solid line), 1% (pecked line), and 10% (dotted line) lipid content^[25]

为研究不同环境中 Xe 的交换, 研究人员进行了 Hyper-CEST 实验^[27], 此方法的原 理将在本文后面给出详细介绍, 实验证明脂质环境中 Xe 在"笼"内外的交换速率大于水 环境, 这与从线宽中的得到的信息一致. Xe 和穴番在脂质中溶解度比水中更高, 交换速 率更快, 这些因素使得在脂质环境中 Xe 生物分子探针探测的灵敏度得到提高. 通过该 实验, 证明了在脂质环境中, Xe 对化学环境的敏感性, 通过探测 Xe 的化学位移和线宽, 化学交换速率等性质对周围环境变化的响应, 可以设计出探测生物或化学目标的探针分 子.

2.3 穴番衍生物

穴番 A 对 Xe 具有良好的亲和性,最早作为¹²⁹ Xe 生物的探针的"笼"状分子,之后,研究者在此基础上陆续合成几种穴番衍生物作为"笼"状分子,其改进主要集中在对 Xe 亲和性的提高和水溶性的改善.

Darzac M 等人合成出了一种单羟基修饰的穴番^[28],由于羟基易于修饰,该化合物成为合成新穴番衍生物的中间体,通过该中间体合成出被称为 cryptophanols 的穴番二 聚体,首次合成出了多聚超分子主体分子.

Huber G 等人用-OCH₂COOH 基团取代-OCH₃,合成出了具有良好水溶性的一系列穴番衍生物^[29],该系列衍生物中不同穴番的包络 Xe 的化学位移不同,同时对 Xe 具有良好的亲和性.

Fogarty H A 等人合成出了体积最小的穴番: 穴番-111^[30],将对 Xe 的亲和性提高 到 10 000 (mol/L)⁻¹. 穴番-111 内外 Xe 的交换速率较慢,导致 Xe 的信号峰是一个尖锐 的单峰,有利于谱图识别.

在 Fogarty H A 等人的工作基础上, Fairchild R M 等人合成出了具有良好水溶性的 穴番-111 的衍生物^[31],用6个[(η5-C₅Me₅)Ru^{II}]⁺(即[Cp * Ru]⁺)基团对穴番-111 进行 修饰,大大提高其水溶性,提高对 Xe 的亲和性,达到 2.9×10⁴ (mol/L)⁻¹,同时产生了 独特的包络 Xe 的化学位移(δ 308),有利于谱图的解析.

2006年,Lowery TI等人讨论了基于 Xe 的生物分子探针的优化问题^[32],包括链状 残基的灵活性和长度对¹²⁹ Xe NMR 信号的影响.链状残基的灵活性决定了"笼"和探测目标(此处为蛋白质)运动的耦合程度,灵活性差的链状残基会增加"笼"与蛋白质之间联接 的刚性,"笼"的运动会受到蛋白质的运动的限制,相关时间增长,线宽增加.如果链状 残基灵活性良好,蛋白对"笼"的运动限制减小,运动速率加快,相关时间减小,线宽减 小,提高分辨率.基于 Xe 的生物分子探针与探测目标结合,其相关时间也受"笼"和蛋白 质之间链的长度的影响,短链使"笼"靠近蛋白质的表面而限制了笼子的运动,线宽增 加.长链使线宽变窄,提高分辨率.

3 基于 Xe 的生物分子探针应用于细胞研究

Seward G K 等人进行了基于 Xe 的生物分子探针的细胞实验^[33],对细胞吸收、毒性等性质进行了研究.研究者合成了 3 个肽链修饰(两个细胞穿透肽链-HIV-1 TAT 残基和 D-精氨酸,一个细胞表面受体 RGD 肽链序列)的基于 Xe 的生物分子探针(生物分子探针 I、II、III),并进行了对 AsPC-1(人胰腺癌细胞)、CAPAN-2(人胰腺癌细胞-2)和HFL-1(人肺成纤维细胞-1)三种细胞进行细胞毒性实验.发现 III 在最高实验浓度(100

 μ mol/L)对细胞繁殖抑制为 25%~30%. I、II 的毒性相对高一些,对于 I,HFL-1 的 IC_{50} (抑制一半时抑制剂的浓度)为 60 μ mol/L,AsPC-1 的 IC_{50} 为 75 μ mol/L,CAPAN-2 的 IC_{50} >100 μ mol/L;对于 II,HFL-1 的 IC_{50} 为 75 μ mol/L,AsPC-1 的 IC_{50} 为 100 μ mol/L,CAPAN-2 的 IC_{50} >100 μ mol/L, I、II、III 对细胞的毒性说明 I、II、III 穿透细胞膜进入细胞内部.

为了验证细胞对探针分子的吸收, Seward G K 等人用 Cy3 标记探针 I、II、III,通过 荧光光谱来验证细胞对探针分子的吸收, 10 μmol/L 的 Cy3 标记的探针 I、II、III 与 CA-PAN-2 细胞共同培养,结果显示第 1 h 内细胞内的探针含量急剧增加, 4 h 后达到峰值. 通过共聚焦激光扫描显微镜来确认细胞对探针 I、II、III 的吸收,实验结果显示,对于探 针 I、II,在 310 K 下 AsPC-1、CAPAN-2 和 HFL-1 三种细胞都有吸收. 探针 III 采用 4 种细胞作对比实验——3 种癌细胞 NCI-H1975(人非小细胞肺腺癌细胞)、AsPC-1 和 CAPAN-2 和 1 种正常细胞-红细胞. 结果显示,探针分子成功进入 3 种癌细胞而未能进 入正常细胞,这说明 III 能对癌细胞进行特异性识别. 当用比 RGD 具有更高亲和性的环 状 RGDfV(RGDfV 对 $\alpha_v\beta_3$ 的亲和性是直链 RGD 的 10 倍^[34])和 anti- α 抗体来抑止 RGD 与 $\alpha_v\beta_3$ 的特异性结合,结果显示细胞没有吸收 III,说明癌细胞对探针 III 的吸收是由于 RGD 与 $\alpha_v\beta_3$ 的特异性结合. 这项工作为对癌细胞的特异性的检测和成像提供了支持, 不过在该项工作中存在探针溶解性差的问题,其¹²⁹Xe NMR 检测的灵敏度也较低.

最近该研究小组对该项工作进行了改进^[35],用环状 c[RGDyK] 替代 RGD 作为配体, c[RGDyK]对 α,β。的亲和性比 RGD 强,并通过在穴番上增加水溶性的基团来克服上述探针水溶性差的缺陷. NMR 实验显示,当探针与蛋白质特异性结合后会产生δ4的化学位移差,推进了基于 Xe 的生物分子探针在细胞中的 NMR 研究和成像研究.

Boutin C 等人进行了类似的工作^[36],他们以转铁蛋白为配体通过链状分子联接在 穴番上,转铁蛋白能够与细胞表面的受体结合并通过内吞作用进入到细胞内部,通过荧 光显微镜和¹²⁹ Xe NMR 来研究基于 Xe 的生物分子探针在 K562 细胞悬浮液中的运动, 荧光显微镜的结果显示探针可以被 K562 细胞表面的转铁蛋白的受体识别,并通过细胞 的吞噬作用进入到细胞内部,¹²⁹ Xe NMR 显示探针进入细胞前后, Xe 的化学位移发生变 化,证明探针能与细胞进行特异性结合,为基于 Xe 的生物分子探针对细胞内的物质进 行特异性探测提供了支持.

4 灵敏度的进一步提高

4.1 相关 NMR/MRI 技术的发展

常规 NMR 可以通过信号累加来提高信噪比(信噪比与累加次数的平方根成正比), 但超极化¹²⁹ Xe NMR 却难以采用这种方法.超极化与热极化不同,超极化的高极化度是 通过激光光泵等手段得到,在 NMR 激发并采样后,极化度将降低并且无法通过弛豫机 制恢复到超极化状态.这也是为什么进行超极化¹²⁹ Xe NMR 实验时空扫次数要为 0.

在超极化¹²⁹ Xe NMR 和 MRI 中,需要通过改进脉冲序列来最大限度利用超极化¹²⁹ Xe的极化度^[37],由于自由 Xe 和"笼"内 Xe 的慢交换性质,可以通过选择性脉冲对自由 Xe 和"笼"内 Xe 进行选择性激发,独立的操纵两个体系中 Xe 的信号.

信号交换平均(Exchange-Signal Averaging)^[38],通过选择性脉冲对"笼"内 Xe 信号

进行选择性激发并采样. 在混合(*τ*_{mix})时间内,溶液中自由的超极化 Xe 与"笼"内 Xe 进行交换,在时间*τ*_{mix}中高极化度的自由 Xe 替换掉"笼"内的极化度较低的 Xe,之后进行采样,如此重复,将采集的信号累加,提高信噪比. 重复采样的次数取决于溶液中自由 Xe 的 *T*₁、探针浓度和溶解 Xe 的浓度. 这种方法的缺陷是重复采样的次数受限于溶液中自由 Ae 的 *T*₁ 的长度,对信噪比的提高有限.

化学交换饱和转移(Chemical Exchange Saturation Transfer, CEST), 一种利用化 学交换实现弱小信号放大的磁共振方法.即在同一系统中,当化学位移不同的质子之间 存在化学交换时,射频脉冲操纵其中浓度较低的质子 A(一般为游离大分子)的自旋,其 自旋的变化将通过化学交换累加到另外一种质子 B上(一般为水质子),通过观察另一种 质子(一般为水质子)的核磁信号的变化,可间接的探测到浓度较低的质子 A. CEST 方 法有效的前提条件是"慢交换",即化学交换速率小于交换双方的化学位移之差.溶液中 自由 Xe 与"笼"内的化学交换满足慢交换条件,因此 CEST 方法也可以应用于¹²⁹ Xe NMR 信号的放大. 2006 年 Schröder L 等人结合 CEST 和超极化¹²⁹ Xe 技术^[27],提出了 Hyper-CEST 方法,将 CEST 方法的灵敏度提高了 10 000 倍.

2003年 Pines A 研究组提出了分离探测的方法^[39],与传统 NMR/MRI 激发线圈和 探测线圈用同一线圈不同:分离探测用两个线圈——一个激发线圈对核磁信号进行编 码,然后用另一个线圈后进行解码和探测.该方法克服了同一线圈只能对线圈的激发效 率和探测效率中的一个方面进行优化的缺点,可以同时对二者进行分别优化,因而可以 大幅度提高探测灵敏度.¹²⁹ Xe 是分离探测的理想观测核,分离探测方法可以运用在基于 Xe 的生物分子探针方法中,提高该方法的灵敏度.2009 年 Zhou X 等人在该方法的基础 上提出通过相变(溶解态到气态)增强磁共振的 Hyper-SAGE 方法(Hyperpolarized xenon signal amplification by gas extraction)^[40],即通过在溶解态下进行信号编码,然后通 过萃取获得气态 Xe 后进行采样,由于气态 Xe 的浓度是同等压力下溶解态 Xe 浓度的 10 倍,Hyper-SAGE 方法大幅度提高了 NMR/MRI 的探测灵敏度.同时,以该方法为基 础,还可以通过压缩气体 Xe 或降低样品温度的方式获得液态 Xe 来增加探测线圈中 Xe 的浓度,以进一步提高探测的灵敏度.

4.2 改进生物分子探针的设计

基于¹²⁹ Xe 的生物分子探针的磁共振灵敏度不仅可以通过发展有针对性的 NMR/ MRI 技术来提高,还可以通过改进探针的结构,增加探针上"笼"的数量的方式来提高信 号源的浓度. Mynar J L 等人设计出了一种多聚体-笼超分子^[41],这种超分子通过酸碱作 用和疏水作用把多个穴番联在一个多聚体上,Mynar J L 等人成功将穴番联接在树状大 分子 PANAM 上. 他们将两个穴番联接在 G5 PANAM,在对 G5 PANAM 修饰并联上 一个有生物素修饰的链之后得到多聚体-笼超分子探针,对抗生素蛋白进行检测,灵敏度 提高了 8 倍,同时这种方法消除了穴番的非对映异构体对信号的减弱,减小了探针的合 成难度.

Meldrum T 等人也做了类似的工作^[42],将多个基于 Xe 的生物分子探针联接到 MS₂ 病毒衣壳上, MS₂ 病毒衣壳联结核苷酸适配子后可以和特定的细胞受体进行特异性结 合,并被细胞吸收,具有生物兼容性.因为 MS₂ 病毒衣壳可以追踪探测目标,所以当多 个探针联接到一个 MS₂ 病毒衣壳上后,可以提高检测物质的最低检测限. MS₂ 由 180 个 单体组成, Meldrum 等人在单个 MS₂ 病毒衣壳上平均联上了 125 个分子探针, 再将之与 Hyper-CEST 方法结合, 将最低探测限从 10 nmol/L^[43]提高到了 0.7 pmol/L, 是目前文 献报道的最高 MRI 分子影像灵敏度.

5 基于 Xe 的生物分子探针在磁共振分子影像学中的应用

Xe 作为分子探针在蛋白质结构探测中的应用已在前文中详述,本节将着重讲述基于 Xe 的生物分子探针的应用.

最早 Pines A 研究组提出基于 Xe 的生物分子探针方法以抗生物素蛋白和亲和素为 研究体系,抗生物素蛋白和亲和素之间的亲和力常数为 10¹⁵ (mol/L)^{-1[44]}. 亲和素作为 配体,抗生物素蛋白作为靶目标. 当以亲和素为配体的基于 Xe 的生物分子探针与抗生 物素蛋白生物素结合后会产生 δ 2.1 的化学位移差,可通过¹²⁹ Xe MRI 化学位移成像得 到生物样品中生物素蛋白的空间分布.

MMPs(基质金属蛋白酶)几乎能降解细胞外基质(ECM)中的各种蛋白成分,破坏肿 瘤细胞侵袭的组织学屏障,在肿瘤侵袭转移中起关键性作用,而 MMP-7 在癌症发生的 过程中过度表达,因此对 MMP-7 的高灵敏检测有利于癌症的诊断和研究. Dmochowski I J 研究组合成了对 MMP-7 响应的基于 Xe 的生物分子探针^[45]. 该探针以 7 个氨基酸残 基作为配体, MMP-7 与配体作用后, MMP-7 通过催化作用将配体的 3 个残基切掉,



图 5 以寡聚核苷酸作为配体的基于 Xe 的生物分 子探针对核酸探测的¹²⁹ Xe NMR 谱图.(a) 只有生 物分子探针;(b)生物分子探针溶液中加入互补链; (c)生物分子探针中只加入非互补链^[48]

Fig. 5 High-field region of the ¹²⁹Xe NMR spectra of using nucleotide-sensitive Xe biosensor to detect specific nucleotide^[48]. (a) Xe biosensor alone ; (b) Xe biosensor + complementary strand. ; (c) Xe biosensor + non-complementary strand "笼"内 Xe 的化学位移发生变化,通过观察 化学位移的变化,来探测 MMP-7 的催化作 用.由于实验中采用的外消旋的穴番,在未 加入 MMP-7 时,¹²⁹ Xe NMR 有两个强度相 等的峰,化学位移相差δ0.6,加入 MMP-7 发生酶催化反应后,NMR 出现4个峰,其 中增加的两个峰对应于酶催化反应后探针 中"笼"内 Xe 的峰,反应前的分子探针和反 应后分子探针 Xe 的化学位移产生了δ0.5 的差别.

作为后续工作,该研究小组研究了用 基于 Xe 的生物分子探针检测碳酸酐酶(human carbonic anhydrase)^[46]和碳酸酐酶 II (human carbonic anhydrase II)^[47]表现出了 良好的特异性.

Roy V 等人^[48]合成出了以寡聚核苷酸 作为配体、对 DNA 具有响应的基于 Xe 的 生物分子探针.如图 5 所示^[48],在 310 K 下,在互补链存在时,"笼"内 Xe 的化学位 移往高场偏移 δ 2,加入非互补链时,信号 没有改变,说明该探针只对配体的互补链 响应,具有较高特异性.该方法在实验上实现了核苷酸序列的特异性探测,扩大了基于 Xe 的生物分子探针的探测领域.与生物素-亲和素系统不同,DNA 链之间的作用较弱 $[K \approx 10^6 (\text{mol/L})^{-1}]$,主要相互作用为氢键作用,这项工作证明了基于 Xe 的生物分子 探针方法不仅适用于亲和力常数大的系统,也能利用该方法探测与配体亲和力常数小的 物质.

Schröder L 等人在 Hyper-CEST 基础上提出对温度的成像^[49],温度影响 CEST 方 法中"笼"内外 Xe 的交换速度, 交换速率影响 Hyper-CEST 的效果, 如图 6 所示, 温度越 高交换速率越快,因此 Hyper-CEST 效果越好. 使用该方法可以对温度进行成像,其温 度分辨率可达到 0.6 K^[43].



299 K

图 6 利用¹²⁹ Xe 对温度进行成像^[49] Fig. 6 Application for ¹²⁹Xe temperature-sensitive molecular imaging^[49]

展望 6

磁共振分子影像技术可以在无损伤条件下对细胞和分子水平上的生物过程进行描述 和测量,通过对体内特异性分子的分布、浓度以及运动的探测,可用于对疾病发生机制 的研究,并在未来可能用于早期诊断和个性化治疗监测.目前,超极化¹²⁹ Xe 的磁共振分 子影像学技术,同时满足了分子影像学在灵敏度、特异性等关键性指标的要求,并目尚 处于技术发展的早期,还有巨大的技术潜力可供挖掘. 从长远来看,¹²⁹ Xe 的 MRI 分子 影像学技术有可能达到对癌症、神经系统疾病、血管疾病等疾病临床上的早期检测的技 术要求,服务于公共医疗卫生.

超极化¹²⁹Xe分子影像学目前处于起步阶段,并且面临一些问题:目前穴番最适合作 为¹²⁹Xe 生物分子探针的"笼"状分子, 但穴番也存在难合成、生物兼容性差等缺点, 寻找 和设计更为合适的"笼"状分子仍是当前相关研究的重点之一;同时,由于超极化¹²⁹Xe的 极化度在无磁场环境中退极化较快,并且生物体内顺磁性物质也会加快退极化的速度, 所以, 超极化¹²⁹ Xe 极化度的保持和在生物体内的运输是目前面临的另一个巨大挑战.发 展解决以上问题的关键技术,是超极化¹²⁹Xe分子影像学未来的主要研究方向.

参考文献:

[1] Wang Qian-feng(王前锋), Li Jian-qi(李建奇), Wu Dong-mei(吴东梅), et al. High-resolution diffusion-weighted imaging on small animals on a clinical 3 T MRI scanner(小动物高分辨扩散加权成像在临床 MRI 上的实现) [J]. Chinese J Magn Reson(波谱学杂志), 2012, 29(3): 372-378.

29	D 波 谱 学 杂 志 第 30 卷	
[2]	Zhang Xiao-dong(张晓东). The preliminary fMRI investigation of 10 Hz modulation laser acupuncture induc cerebral cortical activation in human(以功能性核磁共振造影初探 10 Hz 调制激光针灸刺激所引发人类大脑皮 的话化现象)[1] Chinese I Magn Reson(波谱学杂志), 2010, 27(3), 369-378	ced E质
[3]	Weisslede R Mahmood II Molecular imaging [1] Radiology 2001 21(2), 316-333	
L3] F47	The X Hyperpolarized Noble Gases as Contrast Agents In size NMR Imaging Methods and Protocols $[N]$	/T]
	USA. Humana Press 2011	1].
[5]	Zeng X, Wu Z, Call T, <i>et al.</i> Experimental determination of the rate constants for spin exchange between op cally pumped K, Rb, and Cs atoms and ¹²⁹ Xe nuclei in alkali metal-noble-gas van der Waals molecules[J]. Pl Rev A, 1985, 31(1): 260-278.	pti- hys
[6]	Bowers C R, Weitekamp D P. Transformation of symmetrization order to nuclear-spin magnetization by cher	mi-
	cal-reaction and nuclear-magnetic-resonance[J]. Phys Rev Lett, 1986, 57(21): 2 645-2 648.	
[7]	Golman K, Axelsson O, Jóhannesson H, <i>et al</i> . Parahydrogen-induced polarization in imaging: subsecond C- angiography[J]. Magn Reson Med, 2001, 46(1): 1-5.	-13
[8]	Song C, Hu K N, Joo C G, <i>et al</i> . TOTAPOL: A biradical polarizing agent for dynamic nuclear polarization of periment in aqueous media[J]. J Am Chem Soc, 2006, 128(35): 11 385-11 390.	ex-
[9]	Jan H, Larsen A, Fridlund B, <i>et al.</i> Increase in signal-to-noise ratio of >10,000 times in liquid-state NMR[J Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(18): 10 158-10 163.	J].
[10]	Jameson C J. Multinuclear NMR[M]. New York: Plenum Press, 1987.	
[11]	Dybowski C, Bansal N, Duncan T M. NMR spectroscopy of xenon in confined spaces: clathrates, intercalate and zeolites [1]. Annu Rev Phys Chem, 1991, 42(1), 33-464.	es,
[12]	Raftery D, Chmelka B F. Xenon NMR Spectroscopy, in NMR Basic Principles and Progress[M]. Berli	.in :
[13]	Springer-veriag, 1994. Schoenborn B P, Watson H C, Kendrew J C. Binding of xenon to sperm whale myoglobin[J]. Nature, 196 207(4992), 28-30.	65,
[14]	Schoenborn B P, Nobbs C L. The binding of xenon to sperm whale deoxymyoglobin[J]. Mol Pharmacol, 196 2(5): 495-498.	66,
[15]	Schoenborn B P. Structure of alkaline metmyoglobin-xenon complex[J]. J Mol Biol, 1969, 45(2); 297-30	03.
[16]	Schoenborn B P. Binding of xenon to horse hemoglobin[J]. Nature, 1965, 208(5012); 760-762.	
[17]	Tilton R F, Singh U C Jr., Weiner S J, <i>et al</i> . Computational studies of the interaction of myoglobin and xer	non
[18]	Tilton R T Jr., Kuntz I D Jr Nuclear magnetic resonance studies of xenon-129 with myoglobin and hemog	çlo-
[19]	Locci E, Dehouck Y, Casu M, <i>et al.</i> Probing proteins in solution by ¹²⁹ Xe NMR spectroscopy[J]. J Magn F	Re-
[20]	Spence M M, Rubin S M, Dimitrov I E, <i>et al</i> . Functionalized xenon as a biosensor[J]. Proc Natl Acad	Sci
□ 21]	USA, 2001, $98(19)$: 10 004-10 007.	
L21]	Sun Xian-ping(孙献平), Han Ye-qing(韩叶淯), Luo Qing(罗喑), <i>et al</i> . Hyperpolarized 25 Xe magnetic re- nance imaging and its applications in biomedicine(超极化 ¹²⁹ Xe 磁共振波谱和成像及在生物医学中的应用)[]	so- J].
F027	Physics(物理), 2011, 40(6): 381—390.	
L22∫	Bartik K, Luhmer M, Dutasta J P, <i>et al.</i> Xe-129 and H-1 NMR study of the reversible trapping of xenon	by
[23]	Bifone A, Song Y Q, Seydoux R, <i>et al.</i> NMR of Laser-polarized Xenon in human blood[J]. Proc Natl Acad USA, 1996, 93(23): 12 932-12 936.	Sci

^[24] Hill P A, Qian W, Roderic G E, et al. Thermodynamics of xenon binding to cryptophane in water and human plasma[J]. J Am Chem Soc, 2007, 129(30): 9 262-9 263.

[25] Meldrum T, Schröder L, David E, et al. Xenon-based molecular sensors in lipid suspensions[J]. J Magn Re-

son, 2010, 205(2): 242-246.

- [26] Rubin S, Spence M M, Dimitrov I, et al. Detection of a conformational change in maltose binding protein by ¹²⁹Xe NMR spectroscopy[J]. J Am Chem Soc, 2001, 123(35): 8 616-8 617.
- [27] Schröder L, Lowery T, Hilty C, et al. Molecular imaging using a targeted magnetic resonance hyperpolarized biosensor[J]. Science, 2006, 314(5798); 446-449.
- [28] Darzac M, Brotin T, Bouchu D, et al. Cryptophanols, new versatile compounds for the synthesis of functionalized cryptophanes and polycryptophanes[J]. Chem Commun, 2002, 7(1): 48-49.
- [29] Huber G, Brotin T, Dubois L, et al. Water soluble cryptophanes showing unprecedented affinity for xenon: Candidates as NMR-based biosensors[J]. J Am Chem Soc, 2006, 128(18): 6 239-6 246.
- [30] Fogarty H A, Berthault P, Brotin T, *et al*. A cryptophane core optimized for xenon encapsulation[J]. J Am Chem Soc, 2007, 129(34): 10 332-10 333.
- [31] Fairchild R M, Joseph A I, Holman K T, et al. A water-soluble Xe@cryptophane-111 complex exhibits very high thermodynamic stability and a peculiar Xe-129 NMR chemical shift[J]. J Am Chem Soc, 2010, 132(44): 15 505-15 507.
- [32] Lowery T J, Garcia S, Ruiz E J, et al. Optimization of xenon biosensors for detection of protein interactions
 [J]. Chem Bio Chem, 2006, 7(1): 65-73.
- [33] Seward G K, Qian W, Dmochowski I J. Peptide-mediated cellular uptake of cryptophane[J]. Bioconjugate Chem, 2008, 19(11): 2 129-2 135.
- [34] Ye Y P, Bloch S, Xu B G, *et al.* Design, synthesis, and evaluation of near infrared fluorescent multimeric RGD peptides for targeting tumors[J]. J Med Chem, 2006, 49(7): 2 268-2 275.
- [35] Seward G K, Bai Y B, Najat S, et al. Cell-compatible, integrin-targeted cryptophane-¹²⁹ Xe NMR biosensors
 [J]. Chem Sci, 2011, 2(6): 1 103-1 110.
- [36] Boutin C, Stopin A, Lenda F, et al. Cell uptake of a biosensor detected by hyperpolarized ¹²⁹Xe NMR the transferrin case[J]. Bioorgan Med Chem, 2011, 19(13): 4 135-4 143.
- [37] (a) Patyal B R, Gao J H, Williams R F, et al. Longitudinal relaxation and diffusion measurements using magnetic resonance signals from laser-hyperpolarized Xe-129 nuclei[J]. 1997, 126(1): 58-65; (b) Ruppert K, Brookeman J R, Hagspiel K D, et al. Probing lung physiology with xenon polarization transfer contrast (XTC) [J]. Magn Reson Med, 2000, 44(3): 349-357.
- [38] Spence M M, Ruiz E J, Rubin S M, et al. Development of functionalized xenon biosensor[J]. J Am Chem Soc, 2004, 126(46): 15 287-15 294.
- [39] Moulè A J, Spence M M, Han S I, et al. Amplification of xenon NMR and MRI by remote detection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(16): 9 122-9 127.
- [40] Zhou X, Graziani D, Pines A. Hyperpolarized xenon NMR and MRI signal amplification by gas extraction[J].
 Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(40): 16 903-16 906.
- [41] Mynar J L, Lowery T J, Wemmer D E, et al. Xenon biosensor amplification via dendrimer-cage supramolecular constructs[J]. J Am Chem Soc, 2006, 128(19): 6 334-6 335.
- [42] Meldrum T, Seim K L, Bajaj V S, et al. A xenon-based molecular sensor assembled on an MS2 viral capsid scaffold[J]. J Am Chem Soc, 2010, 132(17): 5 936-5 937.
- [43] Schröder L, Meldrum T, Smith M, et al. Temperature response of ¹²⁹Xe depolarization transfer and its application for ultrasensitive NMR detection[J]. Phys Rev Lett, 2008, 100(25): 257 603(1-4).
- [44] Berthault P, Huber G, Desvaux H. Biosensing using laser-polarized xenon NMR/MRI[J]. Prog Nuc Magn Reson Spectr, 2009, 55(1): 35-60.
- [45] Qian W, Seward G K, Hill P A, et al. Designing ¹²⁹Xe NMR biosensors for matrix metalloproteinase detection
 [J]. J Am Chem Soc, 2006, 128(40): 13 274-13 283.
- [46] Chambers J M, Hill P A, Aaron J A, et al. Cryptophane Xenon-129 nuclear magnetic resonance biosensors targeting human carbonic anhydrase[J]. J Am Chem Soc, 2009, 131(2): 563-569.

- [47] Aaron J A, Chambers J M, Jude K M, *et al.* Structure of ¹²⁹Xe-cryptophane biosensor complexed with human carbonic anhydrase II[J]. J Am Chem Soc, 2008, 130(22): 6 942-6 943.
- [48] Roy V, Brotin T, Dutasta J P, *et al.* A cryptophane biosensor for detection of specific nucleotide targets through xenon-NMR[J]. Chem Phys Chem, 2007, 8(14): 2 082-2 085.
- [49] Schröder L, Chavez L, Meldrum T, et al. Temperature-controlled molecular depolarization gates in nuclear magnetic resonance[J]. Angew Chem Int Ed, 2008, 47(23): 4 316-4 320.

Magnetic Resonance Molecular Imaging with Hyperpolarized ¹²⁹Xe

ZHANG Ji^{1,2}, LUO Qing¹, GUO Qian-ni¹, CHEN Shi-zhen¹, ZHOU Xin^{1*}

[1. State Key Laboratory of Magnetic Resonance and Atomic and Molecular Physics,

Wuhan Center for Magnetic Resonance (Wuhan Institute of Physics and Mathematics,

Chinese Academy of Sciences), Wuhan 430071, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China]

Abstract: The applications of magnetic resonance molecular imaging are often hindered by low sensitivity. Magnetic resonance signal of hyperpolarized ¹²⁹Xe can be enhanced 4 \sim 5 orders of magnitude by spin-exchange optical pumping. Ultrasensitive ¹²⁹Xe magnetic resonance molecular imaging shows a huge advantage in sensitivity comparing with the conventional MRI. In this paper, the improvement of the sensitivity of MRI and its applications to scientific research are introduced; the basic structures and principle of Xebased biosensors are interpreted; the updated methodology and technology of molecular imaging are reviewed, and the advance of magnetic resonance molecular imaging with hyperpolarized ¹²⁹Xe is commented.

Key words: MRI, molecular imaging, hyperpolarized ¹²⁹Xe, sensitivity, molecular sensors

^{*} Corresponding author: Zhou Xin, Tel: 027-87198802, E-mail: xinzhou@wipm. ac. cn.