

磁共振波谱及成像技术在纳米尺度物质生物效应研究中的应用*

雷皓[†] 魏黎 刘买利

(中国科学院武汉物理与数学研究所 波谱与原子分子物理国家重点实验室 武汉 430071)

摘要 纳米尺度物质的生物效应研究是近年来在纳米科技发展过程中派生出来的一个崭新的、发展很快的且多学科高度交叉的领域, 需要把纳米科学、物理学、化学以及生物医学等多学科的研究手段结合起来, 进行综合研究. 核磁共振波谱与成像, 作为一种原位、无损、动态、实时、多信息的检测手段, 在此领域的研究中将发挥不可或缺的重要作用. 文章分 3 个方面简要介绍核磁共振波谱与成像技术在纳米尺度物质生物效应研究中的应用 (1) 纳米尺度物质在生物组织及个体内的检测与分析 (2) 纳米尺度物质与生物大分子相互作用的核磁共振波谱研究 (3) 纳米尺度物质生物效应的核磁共振代谢组学研究.

关键词 纳米颗粒, 生物效应, 核磁共振成像, 核磁共振波谱, 代谢组学

Application of magnetic resonance imaging and spectroscopy in studying the biological effects of manufactured nanoparticles

LEI Hao[†] WEI Li LIU Mai-Li

(State Key Laboratory of Magnetic Resonance and Atomic and Molecular Physics,
Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract With the rapid development of nanoscience and nanotechnology in recent years, growing research interest and efforts have been directed to study the biological effects of manufactured nanoparticles and substances alike. Despite the fact that significant progress has been made, this is still largely an uncharted field. Any advances in this field would certainly require thorough multi-disciplinary collaboration, in which the expertise and tools in nanoscience/nanotechnology, physics, chemistry and biomedicine have to be combined. Due to their wide range of applications in physics, chemistry and biomedicine, magnetic resonance (MR) imaging and spectroscopy are among the most important and powerful research tools currently in use, mainly because these techniques can be used in situ and noninvasively to acquire dynamic and real-time information in various samples ranging from protein solution to the human brain. In this paper, the application of MR imaging and spectroscopy in studying the biological effects of manufactured nanoparticles is discussed. It is expected that these techniques will play important roles in 1) detecting the presence of nanoparticles in biological tissues and in vivo, 2) studying the interactions between the nanoparticles and biomolecules and 3) investigating the metabolic aspect of the biological effects of nanoparticles.

Keywords nanoparticle, biological effects, magnetic resonance imaging, nuclear magnetic resonance spectroscopy, metabonomics

随着近年来纳米科学与技术的迅速发展, 与生物医学有关的纳米材料的研发以及纳米尺度物质在生物体内的行为及其对生物体的影响(生物效应)等问题已成为了各国科学家关心的热门课题^[1, 2].

* 国家自然科学基金(批准号:10234070、30370419、30400136)资助项目

2005-06-15 收到初稿, 2005-06-21 修回

[†] 通讯联系人. Email: leihao@wipm.ac.cn

生物纳米科学是一个高度交叉的学科领域,需要把纳米科学、物理学、化学以及生物医学等多学科的研究手段结合起来,对其进行综合研究。

核磁共振(NMR)作为一种谱学方法,是物理学提供给化学、生物、医学和材料科学等领域的一种非常有效的研究手段。它能用于观测小到分子的结构和性质,大到活体动物乃至人的解剖结构与功能。也正是因为具有广泛的应用范围和前景,核磁共振技术在近五十年来得到了飞速的发展。在20世纪六七十年代,傅里叶变换概念与技术的引入,二维与多维NMR波谱方法的建立以及磁共振成像技术的诞生,使得NMR的研究与应用领域从传统的物理学、分析化学迅速扩展到了生物医学。同时,在这一时期发展起来的固体高分辨NMR波谱技术也为材料科学的发展打开了一条新的途径。1991年诺贝尔化学奖单独授予了瑞士科学家Ernst,表彰他将傅里叶变换引入NMR波谱与成像,并实现和发展了多维NMR波谱技术。2002年诺贝尔化学奖的一半授予了瑞士科学家Wüthrich,表彰他在利用多维NMR波谱技术测定溶液中蛋白质结构研究中的开创性贡献。2003年诺贝尔生理学或医学奖授予美国科学家Lauterbur和英国科学家Mansfield,表彰他们在建立与发展磁共振成像技术中的贡献。

核磁共振作为一种研究手段和工具之所以具有如此大的影响力,主要是因为它具有两个特点:首先,核磁共振是一种无损(noninvasive)的研究手段,其检测过程不会对被检测的样品或对象产生损害;其次,核磁共振技术具有多功能性和可变通性(versatility and flexibility),即对于同一研究对象,不同的核磁共振技术可用来获得不同层次、不同类别的信息。例如,运用不同的方法,核磁共振成像可分别用于观测脑的解剖结构、脑的新陈代谢过程、脑功能以及脑中分子水平上的生物物理与生物化学过程。

世界范围内,核磁共振波谱及与成像技术已被广泛应用于物理学与生物医学的交叉研究。各种新的磁共振技术在生物医学及材料科学的各个研究领域,如在药物与蛋白相互作用、代谢组学、磁共振成像造影剂的研发以及新型材料的微观结构表征等,都发挥着重要的作用。核磁共振技术在纳米尺度物质生物效应研究中的应用主要表现在以下三个方面:

1 纳米尺度物质在生物组织及个体内的检测与分析

国内外越来越多的研究结果表明,纳米尺度物质可通过多途径(如呼吸道、消化道和皮肤等)进入生物体,并表现出与常规尺寸物质不同的特有的生物学性质。长达20多年的与颗粒物有关的流行病学调查结果表明,城市居民的发病率和死亡率与所其生活环境中空气里的微、纳颗粒的浓度与尺寸有密切关系^[3,4]。超细(ultrafine,特指直径小于100 nm)颗粒物浓度的增加所导致的城市居民发病率与死亡率的增高远远大于相同组分的微米颗粒^[4]。此外,初步研究成果还表明,通过呼吸道进入体内的纳米颗粒能够转移到循环系统,甚至可通过血脑屏障进入大脑,并对大脑的结构和功能产生一定的影响^[5-7]。如何进行原位、动态、高灵敏度地检测进入活的生物活体中的纳米尺度物质,则是研究其纳米生物效应所要求的。现在常用的方法一般采用放射性同位素(¹⁴C, ¹³¹I和⁹⁹Tc等)标记^[6,8,9]。例如,北京大学Wang等人用化学标记技术对纳米碳管进行放射性标记,并利用射线探测技术首次实现了生物环境中纳米碳管的半定量检测^[9]。虽然这种方法的检测灵敏度很高,但缺点有:一般不能进行活体、原位检测,标记可能因新陈代谢过程而脱落,空间分辨率和组织分辨率低,难以区分血液和组织中的标记物等。

核磁共振成像技术(MRI)自1973年问世以来,由于具有可对活体进行无损、实时、动态检测,空间分辨率高、组织对比度好、功能强等特性而备受生物医学工作者的青睐,到今天已发展成为临床诊断和基础研究中必不可少的重要工具之一。随着近年来纳米科技与材料科学的飞速发展,一些具有纳米结构的新型磁共振成像造影剂(contrast agent)开始出现,为磁共振成像技术的发展增添了新的活力。这些造影剂的主要功能是,通过改变生物体内局部组织中水质子的弛豫速率来提高正常与病变部位的成像对比度或衬度(临床上称为增强),显示体内器官的功能状态。从另一个角度,具有纳米结构的磁共振造影剂的出现,也为利用磁共振成像技术检测纳米尺度物质在生物组织及个体中的分布与代谢提供了可能。常见的具有纳米结构的磁共振成像造影剂大致可分为两类:含顺磁性金属离子(如过渡元素和镧系金属离子)的纳米结构,如金属内包富勒烯等;基于超顺磁性金属氧化物微粒的造影剂,其中应用最广、最具代表性的就是氧化铁纳米颗粒。

金属富勒烯是将金属原子包在富勒烯里而生成的一种新型分子,其球体外壳完全由碳原子组成。用

作磁共振成像造影剂的金属富勒烯一般是内包顺磁性的金属原子,如钆(Gd)等。由于富勒烯半径很小,加上是球体形分子,所以富勒烯内的顺磁性中心与组织中水分子间的平均距离(D)要小于常规造影剂。而造影剂的弛豫率与 D 的6次方成反比,所以金属富勒烯造影剂的弛豫率大都远远高于常规造影剂,有很好的显像效果^[10]。以顺磁性金属富勒烯为探针,磁共振成像可用来检测富勒烯类的纳米结构在生物体内的分布与代谢过程。例如,Mikawa等人用磁共振成像观测了多羟基金属富勒烯 $Gd@C_{82}(OH)_n$ ($n \approx 40$)在小鼠体内的分布,发现经静脉注射后,金属富勒烯主要分布于网状内皮组织丰富的器官,如肺、肝、脾等^[10]。Bolskar等人用磁共振成像观测了多羧基金属富勒烯 $Gd@C_{60}[C(COOH)_2]_{10}$ 在大鼠体内的分布,发现羧基修饰金属富勒烯经静脉注射后主要造成肾脏增强,而不在肝脏聚积,注射1小时后就开始通过膀胱排出体外,从而表现出与多羟基金属富勒烯截然不同的生物分布状态^[11]。Bolskar等人通过比较前人的结果得出结论:富勒烯在生物体内的分布的主要取决于其表面修饰基团的性质,其他性质如富勒烯的大小、电子结构、是否内包金属原子、内包金属原子的种类,甚至表面修饰基团的个数等对于其生物分布状态的影响不大^[11]。

氧化铁颗粒是常用的磁共振成像造影剂,粒径一般在几纳米到几千纳米不等。氧化铁颗粒造影剂一般具有以下基本结构:内部以顺磁性的 Fe_2O_3 , Fe_3O_4 或它们的复合物为核心,外部采用高分子材料或有机物分子(如葡聚糖、聚乙二醇等)包裹,以提高其在生物环境中的稳定性与生物兼容性。与其他类型的成像造影剂相比,氧化铁颗粒造影剂具有一些独特的性质(1)超顺磁性:氧化铁颗粒的弛豫率比一般的钆螯合物造影剂的弛豫率高很多^[12],因此磁共振成像对氧化铁颗粒具有很高的检测灵敏度。据文献报道,理论上磁共振成像可在生物体中检测出铁的最低含量为每细胞23.3 fmol,与正电子发射断层扫描(PET)大致相当^[13]。Shapiro等人测试了离体与活体条件下磁共振成像对不同粒径的氧化铁颗粒的检测灵敏度^[14]。结果表明,提高成像分辨率可以提高单颗纳米颗粒的检出率,离体条件下可检测出单细胞中的单颗氧化铁颗粒(one particle-one cell),在活体实验中,粒径为 $1.63 \mu m$ 的单颗氧化铁颗粒被引入到单细胞状态(single-cell-stage)的鼠胚胎中,发育11.5天后,胚胎的磁共振图像上仍可观测到单颗氧化铁颗粒^[14]。(2)良好的生物相容性:金

属离子螯合物造影剂在生物环境中可能发生降解,使金属离子游离出来,而游离的镧系金属离子(如 Gd^{3+})一般都具有很强的生物毒性^[15],而氧化铁颗粒则不同,它的主要成分是生物可降解的铁,由于生物降解所形成游离态的铁可通过正常的生化途径被细胞再循环和再利用,因此不具有长期生物毒性^[16,17]。(3)强可塑性;可对颗粒进行各种后修饰,通过化学键将其与靶向性的官能团或者配体直接连接。另外,氧化铁颗粒的磁学性质和它的后修饰潜力可通过不同的合成方法实现人为调控^[18]。在生物医学的应用中,氧化铁纳米颗粒一般作为探针用于磁共振细胞影像,即用磁共振成像的方法在生物活体中无损地检测和研究细胞水平的生物过程,包括细胞的增生、分化、迁移和聚集等^[19]。表面修饰的氧化铁纳米颗粒还可用作探针用于分子影像^[20,21],在生理和病理条件下,在生物活体中无损地检测和研究细胞内的分子过程(如基因表达等)。

氧化铁颗粒在生物体内的分布及其药代动力学过程取决于颗粒的尺寸大小、表面包裹物和后修饰材料的性质。据文献报道,粒径的大小和表面修饰材料的不同可直接影响到吞噬细胞对氧化铁颗粒的吞噬效率^[22],而粒径大小不同的纳米颗粒穿越细胞膜的机制也不尽相同^[23]。综合考虑氧化铁颗粒的生物安全性、强可塑性以及磁共振成像对它的高检测灵敏度,不同粒径和表面修饰的氧化铁颗粒应可成为利用磁共振成像方法研究纳米颗粒在生物组织及个体中分布与代谢的理想探针。图1给出了几个利用磁共振成像方法研究氧化铁纳米颗粒(粒径为10 nm左右)在大、小鼠不同组织中的分布的例子。

2 纳米尺度物质与生物大分子相互作用的核磁共振波谱研究

纵观国际上的相关研究,不难发现此领域的研究热点正逐步从纳米尺度物质的整体生物效应转移到纳米颗粒与细胞、细胞器以及蛋白质、核酸、糖等功能性生物大分子的相互作用等方面。许多生物大分子,如蛋白质,其本身尺寸大小就在纳米量级。此外,蛋白质的许多功能都是通过蛋白与配体分子间的相互作用来实现的,这些相互作用通常也是在纳米尺度上进行的,并具有高空间选择性和立体选择性。也正是因为如此,具有高反应活性的纳米颗粒是否会与生物大分子结合而影响后者的结构和功能;

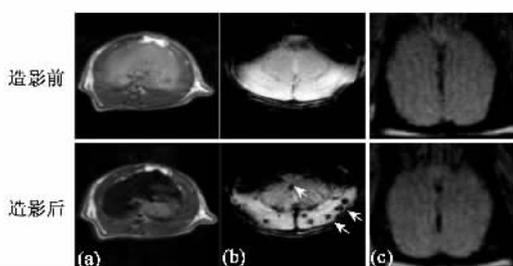


图1 静脉注射氧化铁纳米颗粒前后正常大鼠肝脏(a)与弓形虫感染小鼠脑组织(b)的磁共振像,鼻腔滴入氧化铁纳米颗粒溶液前、24小时后,大鼠嗅球的磁共振像(c)。由静脉进入体内的氧化铁纳米颗粒主要被单核吞噬细胞吸收,包括各组织器官中的巨噬细胞(如肝脏中的Kuffer细胞等)和血液中的单核细胞。在(a)中,大量的氧化铁纳米颗粒被肝脏组织吸收,沉积于肝脏的纳米颗粒大约占总注射量70%—80%;在(b)中,弓形虫颅内感染引起炎症反应和血脑屏障(BBB)的破坏,氧化铁纳米颗粒通过破损的BBB在感染区聚积(白色箭头所指),但氧化铁纳米颗粒不能通过完整的BBB和多突触神经传导通路进入大脑;在鼻腔中滴入氧化铁纳米颗粒后,并未发现其沿嗅觉传导通路到达嗅球并在嗅球中沉积(c)

纳米颗粒在生物环境中可能发生的自组装行为是否会影响和干扰蛋白质与配体分子间的相互识别和相互作用,是否能利用纳米颗粒与生物大分子之间的特异性相互作用来设计治疗重大疾病(如艾滋病)的药物等问题就显得非常突出了。这方面的研究目前还刚刚起步,有报道的结果不是很多。例如,有报道富勒烯可抑制艾滋病毒(HIV-1)上的蛋白酶,并可能被发展成为治疗艾滋病的药物^[24,25]。多羟基富勒烯(富勒醇)可以抑制谷氨酸AMPA受体,对治疗脑缺血损伤等神经疾病有一定的作用^[26]。

研究生物大分子结构与功能的方法目前主要有两种:X射线晶体衍射和高分辨核磁共振波谱。对于X射线晶体衍射技术而言,核磁共振波谱不仅仅是有力的补充,而且有着前者不能比拟的特点和优势:(1)适用于测定溶液状态下的生物大分子的三维结构,在得不到单晶样品时,核磁共振波谱是唯一可选择的方法;(2)可研究蛋白质与配体分子(如纳米颗粒)间的强、弱以及极弱相互作用;(3)可以用于研究蛋白质分子的动力学特性及其与功能的关系。

生物大分子的功能在很大程度上取决于分子结构在时域和空间上的变化。绝大多数生物过程从根本上讲依赖于通过蛋白质和核酸构象变化所传递的信息来实现。纳米尺度物质的存在有可能诱导生物大分子的构象变化,影响包括蛋白质的折叠组装以

及与配体的结合、分子识别以及酶催化反应等过程。核磁共振谱峰的线宽、纵向和横向弛豫速度、原子核之间的Overhauser效应(NOE)和偶极-偶极耦合常数等参数包含有丰富的从皮秒到秒范围内的分子动力学信息,而且这些信息可用于表征和研究蛋白质(包括结构域)的折叠、构象转化、振动、扩散、与配体的结合、侧链的转动、酶催化反应等^[27,28]。虽然核磁共振波谱在研究药物与蛋白的相互作用中起到了非常重要的作用。但是,利用核磁共振波谱学的方法研究纳米尺度物质与生物大分子相互作用的工作还非常少^[29],几乎未见报道。尽管如此,核磁共振波谱学的方法勿庸置疑是研究纳米尺度物质对生物大分子结构、功能及其动力学过程的影响的最重要也是最有潜力的方法之一。

3 纳米尺度物质生物效应的核磁共振代谢组学研究

纳米尺度物质生物效应研究的另一个层次就是其对细胞、组织以至于生物个体的新陈代谢和功能的影响。而这恰恰正是核磁共振代谢组学研究的范畴。人们对代谢物和代谢水平的认识已经有几十年的历史。近年来,随着分析技术的不断、迅速发展,大量样品和大量代谢物的快速定量测定成为可能,代谢组学的概念也随即应运而生。作为一个病理诊断、基因功能分析和系统生物学研究的强有力的技术平台,Nicholson等人定义代谢组学(metabonomics/metabolomics)为:利用动态和多参数定量分析方法,研究在病理生理刺激或遗传变异条件下生物系代谢水平的响应和变化^[30]。代谢组学研究中最为常用的分析方法是核磁共振波谱与质谱。

作为一种无损、多参数的动态分析技术,核磁共振波谱在代谢组学的研究中起着不可替代的作用^[31]。首先,核磁共振波谱可研究各种类型的样品,包括细胞、细胞/组织的提取液、完整生物组织、体液(血清、脑脊液和尿液等);其次,用核磁共振波谱分析体液等复杂生物混合时不需要太多的样品前处理,因此,能够在不改变样品的生理状态的条件对样品的组成进行全面的分析;例如高分辨魔角旋转核磁共振波谱技术(HR-MAS)正在被越来越广泛地用于研究无需前处理的完整生物组织中的代谢过程^[32];再其次,核磁共振波谱同时具有定性分析和定量分析的功能。大多数代谢物都有特征的核磁共

振谱峰,所以很容易得到引起谱特征变化的标志性代谢物,亦即生物标识分子,以及这些标识分子的周期性动态变化;其次,流动探头、自动进样技术和自动核磁共振谱处理技术的出现和不断完善,使得测定速度、灵敏度和准确性不断提高;最后,核磁共振谱可以用数据文件的形式辅出,便于用模式识别等进行统计分析,并以图示的方式显示代谢水平对刺激的动态响应或变化过程。最近,Brindle 等人的研究表明,人血清的核磁共振代谢组学分析可用于冠心病诊断^[33]。Wang 等人用核磁共振代谢组学方法研究了血吸虫感染小鼠的尿液并发现这些小鼠体内的糖酵解过程受到了干扰,证明此方法不但有助于理解寄生虫感染的生物学效应,还可用于该疾病的监控^[34]。随着核磁共振代谢组学方法的不断完善以及应用范围的不断扩展,它无疑也会成为在细胞、组织以及整体水平上研究纳米尺度物质生物效应的重要方法之一。

总之,纳米生物效应研究是纳米科学及技术研究中一个崭新的、发展很快的且多学科高度交叉的领域,需要把各学科的多项研究手段结合起来进行综合研究。而核磁共振波谱和成像技术,作为一种原位、无损、动态、实时、多信息的检测手段,无疑在此领域的研究中将发挥不可或缺的重要作用。

致谢 感谢中国科学院高能物理研究所赵宇亮研究员提供有关资料。

参 考 文 献

[1] Service R F. *Science* ,2004 ,304 :1732
 [2] Service R F. *Science* ,2003 ,300 :243
 [3] Gauderman W J , Avol E , Gilliland F *et al.* *N. Engl. J. Med.* ,2004 ,351 :1057
 [4] Samet J M , Dominici F , Currier F C *et al.* *N. Engl. J. Med.* ,2000 ,343 :1742
 [5] Oberdorster E. *Environ. Health Perspect.* ,2004 ,112 :1058
 [6] Oberdorster G , Sharp Z , Atudorei V *et al.* *Inhal. Toxicol.* ,2004 ,16 :437
 [7] Oberdorster G , Sharp Z , Atudorei V *et al.* *J. Toxicol. Environ. Health A* ,2002 ,65 :1531
 [8] Li Q N , Xiu Y , Zhang X D *et al.* *Nucl. Med. Biol.* ,2002 ,29 :707
 [9] Wang H F , Wang J , Deng X Y *et al.* *J. Nanosci. Nano*

technol. ,2004 ,4 :1019
 [10] Mikawa M , Kato H , Okumura M *et al.* *Bioconjug. Chem.* ,2001 ,12 :510
 [11] Bolskar R D , Benedetto A F , Husebo L O *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* ,2003 ,125 :5471
 [12] Renshaw P F , Owen C S , McLaughlin A C *et al.* *Magn. Reson. Med.* ,1986 ,3 :217
 [13] Heyn C , Bowen C V , Rutt B K *et al.* *Magn. Reson. Med.* ,2005 ,53 :312
 [14] Shapiro E M , Skrtic S , Sharer K *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ,2004 ,101 :10901
 [15] Feng J , Li X , Pei F *et al.* *Magn. Reson. Imaging* ,2002 ,20 :407
 [16] Majumdar S , Zoghbi S S , Gore J C. *Invest. Radiol.* ,1990 ,25 :771
 [17] Weissleder R. *Radiology* ,1994 ,193 :593
 [18] Bonnemain B. *J. Drug Target* ,1998 ,6 :167
 [19] Bulte J W , Kraitchman D L. *Curr. Pharm. Biotechnol.* ,2004 ,5 :567
 [20] Delikatny E J , Poptani H. *Radiol. Clin. North Am.* ,2005 ,43 :205
 [21] Bulte J W , Kraitchman D L. *NMR Biomed.* ,2004 ,17 :484
 [22] Raynal I , Prigent P , Peyramaure S *et al.* *Invest. Radiol.* ,2004 ,39 :56
 [23] Rejman J , Oberle V , Zuhorn I S *et al.* *Biochem. J.* ,2004 ,377 :159
 [24] Friedman S H , Decamp D L , Sijbesma R P *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* ,1993 ,115 :6506
 [25] Sijbesma R , Srdanov G , Wudl F *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* ,1993 ,115 :6510
 [26] Jin H , Chen W Q , Tang X W *et al.* *J. Neurosci. Res.* ,2000 ,62 :600
 [27] Atkinson R A , Kieffer B. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* ,2004 ,44 :141
 [28] Palmer A G. *Chem. Rev.* ,2004 ,104 :3623
 [29] Rozhkov S P , Goryunov A S , Sukhanova G A *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* ,2003 ,303 :562
 [30] Nicholson J K , Lindon J C , Holmes E. *Xenobiotica* ,1999 ,29 :1181
 [31] Griffin J L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* ,2003 ,7 :648
 [32] Martinez-Bisbal M C , Marti-Bonmati L , Piquer J *et al.* *NMR Biomed.* ,2004 ,17 :191
 [33] Brindle J T , Antti H , Holmes E *et al.* *Nature Med.* ,2002 ,8 :1439
 [34] Wang Y L , Holmes E , Nicholson J K *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ,2004 ,101 :12676