网络出版时间: 2020 – 7 – 15 9:00 网络出版地址: https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200713.1200.001.html
◇基础医学研究◇

新型 pH 敏感型氧化锰纳米探针的制备与表征

邢 新 ,司元纯 陆依凡 ,许 瑞 陈乔尔 ,邹多宏

摘要 目的 合成一种成分为四氧化三锰(Mn₃O₄)的磁共 振纳米造影剂 对其表征并初步探索其造影效能以及安全性 能。方法 以聚丙烯酸作为 pH 响应聚合物与硫酸锰反应 获取纳米颗粒 通过 X 射线光电子能谱分析仪和 X 射线衍 射仪确定所合成氧化锰的分子式,使用透射电子显微镜、粒 度分析仪、电感耦合等离子发射光谱、7.0 T磁共振成像仪器 等对纳米颗粒的形态、磁共振性能、细胞生物相容性以及材 料稳定性进行研究。结果 利用谷胱甘肽、聚丙烯酸与硫酸 锰反应获得氧化锰样品 透射电子显微镜下可以观察到该纳 米颗粒形态为花瓣状,直径约为100 nm,X射线光电子能谱 分析仪及 X 射线衍射仪结果均显示其成分为 Mn₃O₄;该材 料在 pH 为 4.5 时,其 24 h Mn²⁺释放量仍然低于 0.5%,证 明其稳定性良好,安全性佳;磁共振成像结果显示,在 pH 为 酸性的条件下 氧化锰纳米颗粒具有极高的造影性能 ,当 pH 为 4.5 时,其纵向弛豫率达到了 13.0 mmol⁻¹ • s⁻¹,表明其 可以对肿瘤的微环境反应: CCK-8 结果显示,将该氧化锰纳 米颗粒与牙龈成纤维细胞共同培养 24 h 和 48 h 均未产生细 胞毒性,证明该材料具有良好的生物相容性。结论 成功地 合成了一种成分为 Mn₃O₄ 的新型磁共振纳米造影剂,其生 物相容性良好 酸性条件下具有最高的造影效能 ,为其进一 步的临床研究提供依据。

关键词 氧化锰;磁共振成像;纳米造影剂

中图分类号 R 445.2

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2020) 08 - 1151 - 06 doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2020.08.001

与其他的成像方式,如 CT、X 线等相比,磁共振 成像(magnetic resonance imaging ,MRI) 具有非电离、 出色的空间及解剖分辨率等优势^[1]。然而 MRI 却 受到目标灵敏度低的限制。那么开发多种模式的纳 米探针就成为了解决这一问题的一种策略^[2]。目 前 癌症仍然是当今死亡率最高的疾病之一^[3]。

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31870969)

MRI 被广泛地应用于肿瘤的诊治,目前几乎一半的 MRI 需要造影剂的参与^[4] 将纳米探针与 MRI 技术 结合,可以精确地定位肿瘤的部位^[5]; 钆的复合物 一直以来被广泛的应用于此,然而钆离子具有潜在 的毒性。因此,研究者们不断地去开发低毒性、高灵 敏度的基于其他顺磁性金属的纳米探针^[6]。该研 究合成了一种锰基氧化物纳米粒子(manganese oxide nanoparticles,MnO-NPs),它对 pH 响应,具有较 高比表面积和低生物毒性,可以被开发成为新一代 磁共振纳米造影剂。

1 材料与方法

 1.1 试剂与材料 聚丙烯酸(poly acrylic acid, PAA)、谷胱甘肽(glutathione ,GSH)购买自北京索莱 宝科技有限公司;一水硫酸锰(manganese sulfate monohydrate ,MnSO₄ • H₂O)购买自上海阿拉丁公司;细 胞计数试剂盒(cell counting kit-8 ,CCK-8)购买自日 本同仁化学研究所。

1.2 仪器及其使用 使用透射电子显微镜(JEM-2100F,日本 JEOL公司)观察样品的形态;使用粒度 分析仪(NanoBrook 90plus Zeta,美国 Brookhaven公 司)检测样品的粒径大小;孔隙率分仪(Tristar II, 3020M,美国 Micromeritics公司)测量样品的氮吸附 -脱附等温曲线;X射线衍射仪(XRD,TTR-III,日 本 Rigaku公司)分析晶体结构;热重分析仪(TGA, Q5000IR,美国 TA公司)对材料进行热重分析;X射 线光电子能谱分析仪(XPS,ESCALAB 250,美国 Thermo公司)分析材料元素组成;使用电感耦合等 离子发射光谱(ICP-OES,ICAP7200,美国 Thermo公 司)检测锰离子的释放;使用傅里叶变换红外光谱 仪(FTIR,iS10,美国 Nicolet公司)检测有机共价键; 使用酶联免疫检测仪(MQX200,美国 Bio-tek 公司) 检测吸光度。

1.3 材料合成 取 0.5 g NaOH、0.1 g 的 GSH、1.0 g 的 PAA 置于 100 ml 锥形瓶中,向其中加入 10 ml 无水乙醇和 40 ml 的超纯水,在 N₂ 的保护下 60 ℃ 反应 20 min; 随后向其中加入 1 ml 100 mg/ml 的

²⁰²⁰⁻⁰⁴⁻⁰⁹ 接收

作者单位:安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院, 安徽省口腔疾病研究重点实验室,合肥 230032

作者简介: 邢 新 ,男 ,硕士研究生; 邹多宏 ,男 ,教授 ,硕士生导师 ,责任作者 ,E-mail: zdhyy@ ahmu. edu. cn

MnSO₄ ,继续反应 5 h ,反应结束后以 12 000 r/min 的转速离心 5 min ,收集离心产物 ,使用超纯水洗涤 3~5 次后获取氧化锰纳米颗粒样品。

1.4 MnO-NPs的表征 取适量 MnO-NPs 分散于 超纯水中,使用超声波震荡形成悬浮液,将悬液滴于 附有支持膜的铜网上,待液体挥发后将其置于透射 电子显微镜下以观察样品的大小、形态、表面特性 等。采用 XRD、XPS、TGA、FTIR 分别检测该样品。

1.5 弛豫效能检测 取 0.5 g 琼脂糖粉末置于 100 ml 锥形瓶中,磁力搅拌下加热到 100 ℃,澄清透明 后 降温到 80 ℃待用。取等量且适量纳米材料,分 别置于 pH 为 7.4、5.5、4.5 的 PBS 缓冲液中,37 ℃ 下震荡 24 h,分别用相应的 PBS 缓冲液稀释到相等 的合适浓度,分别取 100、50、25、12.5、6.25、0 μ l 溶 液置于 200 μ l 离心管中,分别加入 100、150、175、 187.5、193.75、200 μ l 琼脂糖凝胶。用移液枪吹打 混匀后,置于4 ℃冰箱冷藏凝固,使用 7.0 T 磁共振 扫描仪,检测不同离心管的 T1 弛豫时间。使用 ICP-OES 测定 Mn²⁺浓度。通过纵向驰豫值的倒数/ Mn²⁺浓度的线性拟合,来计算纵向弛豫率。

1.6 Mn²⁺释放研究 取9只50 ml 离心管,分编 号为1~9,每组3只离心管,分成3组,分别加入 39.5 ml pH 为7.4、5.5 和4.5 的 PBS 缓冲液。取 0.5 ml 浓度为10 mg/ml 纳米材料分别分散于离心 管中,置于37 ℃恒温震荡箱中,在5、15、30、60、90、 180、360、720、1 440 min 时各取1 ml 液体分别置于 9个2 ml 离心管中,转速为15 000 r/min,离心5 min 吸取0.5 ml 上清液于5 ml 离心管中,加入1.5 ml 超纯水和1 ml 浓硝酸,震荡摇匀后,静置6h,过 0.45 μm 的滤膜,滤液注入2 ml 离心管中,静置12 h 后,使用 ICP-OES 检测 Mn²⁺的含量。

1.7 氧化锰的生物相容性研究 将人牙龈成纤维 细胞(human gingival fibroblasts,HGF)按照 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,使用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养。接种 24 h 后,使用 PBS 缓 冲液洗涤细胞 2 遍,向其中加入不同浓度的 MnO-NPs,共培养 24、48 h 之后使用 CCK-8 试剂盒检测。

1.8 统计学处理 使用 SPSS 16.0 软件进行数据 分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分 析(ANOVA) 对各组的结果进行分析 P < 0.05 为差 异有统计学意义。

2 结果

2.1 MnO-NPs 结构的表征 透射电子显微镜观察

可见制得的氧化锰呈片形花瓣状 尺度较为均一 合 成的产物具有晶体结构,直径约为5 nm; 粒径分布 比较窄 其直径约为100 nm(图1A) 其表面可见有 一定数量的孔道(图1C、D)。该氧化锰颗粒的比表 面积达到了 231.01 cm³/g(图 2A) 在孔直径为 1.6 和 12 nm 时孔容积最大(图 2B)。粒度分析仪结果 显示 该纳米颗粒具有较窄的粒径 其水合粒径约为 400 nm(图 3A)。X 射线衍射仪结果显示所获取的 纳米颗粒与 Mn₃O₄ 的 PDF 卡片吻合 由此可知所获 取的氧化锰为 Mn₃O₄(图 3B)。傅里叶变换红外光 谱仪结果显示该纳米粒子在波数为 521.6 和 629.2 cm⁻¹处具有明显的吸收峰,这是分属八面体 Mn-O 伸缩振动和四面体 Mn-O 伸缩振动(图 3C)。热重 分析从室温(20 ℃)开始,以20 ℃/min 的速度升 温,直至820 ℃,其结果显示合成的氧化锰重量在 20~150 ℃之间损失了 3.33% 这部分主要是由于 水分子的损失 在 150~400 ℃之间损失了 6.38%, 这部分是由于有机物 GSH 以及 PAA 的损失。 400 ℃ 以后重量趋于平稳,说明此时有机物已被完 全去除(图 3D)。

X 射线光电子能谱分析仪的结果如图 4 所示, 采用 C1s 结合能作为内标准,结果显示该纳米粒子 中含有锰和氧元素。



图 1 氧化锰纳米颗粒在不同倍数下的透射电镜图 A: ×8 000; B: ×40 000; C: ×160 000; D: ×160 000

2.2 不同 pH 下氧化锰纳米颗粒的弛豫率 在场 强为 7.0 T 的磁共振扫描器中,测得在 pH 为 7.4 时,其纵向弛豫率为 2.3 mmol⁻¹ • s⁻¹,当 pH 为 5.5 时,其纵向弛豫率为 6.3 mmol⁻¹ • s⁻¹,而当 pH 为 4.5 时,则达到了 13.0 mmol⁻¹ • s⁻¹。氧化锰纳米 颗粒的纵向弛豫率与 pH 有着明显的关联,即 pH 越 低,其纵向弛豫率越高(图 5A)。

2.3 Mn²⁺ 释放研究 在pH为7.4的PBS溶液



图 3 MnO-NPs 的表征 A: MnO-NPs 的粒径分析; B: MnO-NPs 的 X 射线衍射仪结果; C: MnO-NPs 的傅里叶变换红外光谱仪结果; D: MnO-NPs 的热重分析结果

中 Mn²⁺ 几乎不泄露,此时的氧化锰纳米颗粒是相 对稳定的,当 pH 偏向酸性,在 pH 为 5.5 和 4.5 时, Mn²⁺释放速度加快,但是其 24 h 释放量也不足 0.5%,说明该材料非常稳定(图 5B)。 2.4 氧化锰纳米颗粒的细胞生物相容性研究 为 了验证所合成的氧化锰纳米颗粒是否具有细胞毒性,采用了CCK-8 来对其进行检测。使用不同浓度 的氧化锰纳米颗粒与 HGF 共同培养 24、48 h,与对 照组(氧化锰浓度为 0 μg/ml)进行比较,所得结果 进行单因素方差分析。结果可见,共同培养 24 h 情 况下,与对照组相进行单因素比较,所有组别存活率 差异无统计学意义(F = 0.924, P > 0.05);在共同培 养 48 h 后,与对照组进行单因素比较,当浓度为 16 μ g/ml 时,其存活率差异有统计学意义(P =0.038),但此时细胞存活率高于对照组细胞存活 率,与对照组比较,其他浓度组结果差异无统计学差 异(F = 2.496, P > 0.05);见表1、图6。

3 讨论

分子成像领域最热点的话题就是要求非电离、 非侵入性以及能够实时监测细胞中所发生的分子事 件^[7]。而 MRI 则恰好具备有这些优点,因而它在临 床中拥有着非常广泛的应用^[8]。而 MRI 之所以可 以成功,很大程度上是由于造影剂的使用,造影剂通



图 4 氧化锰颗粒的 XPS 结果





表 1 HGF 与 MnO-NPs 共培养 24 h 和 48 h 细胞存活率		
浓度 (μg/ml)	24 h	48 h
0	$1.000\ 00 \pm 0.055\ 60$	$1.000\ 00\ \pm 0.040\ 81$
1	$0.966\ 48\ \pm\ 0.035\ 63$	$0.980\ 59\pm 0.011\ 68$
2	$1.073\ 17 \pm 0.071\ 52$	0.97450 ± 0.04952
4	$1.006\ 05 \pm 0.111\ 32$	$0.952\ 09 \pm 0.054\ 83$
8	$1.010\ 04 \pm 0.107\ 15$	$1.012\ 10\pm 0.075\ 74$
16	1.04592 ± 0.11940	$1.091\ 17\ \pm 0.032\ 04$
32	$1.036\ 22 \pm 0.085\ 99$	$0.957\ 80\ \pm 0.059\ 19$
64	$1.064\ 76\pm 0.122\ 35$	$0.978\ 59\pm 0.068\ 12$
128	0.95872 ± 0.04441	$0.918\ 01\ \pm 0.049\ 66$
256	$0.929\ 09 \pm 0.027\ 02$	$1.001\ 06\ \pm 0.025\ 74$





过加速组织环境中质子的弛豫率从而增强 MRI 图 像中的信号^[9]。

锰基化合物应用于造影剂已有了非常多的研 究,例如二乙烯三胺五乙酸锰,锰的氧化物,Mn (Ⅱ)/Mn(Ⅲ)的杂化结构等^[6,10-11]。通常情况下 可以将锰基造影剂分为两大类 即锰的氧化物以及 Mn²⁺螯合物,但是由于 Mn²⁺螯合物血液循环时间 短并且容易在脑部堆积从而产生毒性,因此研究者 们更多的将精力放在了锰氧化物上^[12]。本研究所 合成的纳米粒子结合 XPS 和 XRD 的结果可证实为 Mn₃O₄ 其中锰的价态分别为二价和三价。低价态 的锰离子相比较于 Mn4+来说具有更高的造影效能, 尤其是 Mn²⁺。这是由于 Mn²⁺的 3D 轨道上排列有 5 个未成对的电子 这可以产生较大的磁矩,并引起 附近原子核的磁弛豫^[13],因此成分为 Mn₃O₄的 MnO-NPs 理论上就拥有更高的造影效能。PAA 具 有非常良好的生物相容性以及亲水性[14];可以将它 用作为 pH 响应聚合物来修饰纳米颗粒。肿瘤微环 境具有微酸的特点,本研究使用了 pH 响应聚合物 PAA 作为 MnO-NPs 的修饰剂 因此该纳米粒子可能 会具有 pH 敏感性,从而可以对肿瘤微环境响应,为 了验证其是否具有这一性能,在不同的 pH 条件下

测定了它的弛豫效能。当 pH 为 4.5 时,该纳米颗 粒弛豫效能最高,其弛豫率达到了13.0 mmol⁻¹。 s⁻¹,显著地高于 pH 为 5.5 及 7.4 时的弛豫率,并且 酸性条件下可见 Mn²⁺释放速率更快 因此 MnO-NPs 可以对 pH 响应。而另一方面,肿瘤的微环境除了 微酸以外,还有着高浓度的 GSH,有研究表明,高含 量的 GSH 可以破坏 Mn-O 键,并且弱酸的环境可以 促进 Mn²⁺的释放^[15] 从而该纳米造影剂有望在肿 瘤部位具有更高的造影效能。当纳米造影剂注射入 血管内之后其稳定性和生物毒性就成为了一个不可 忽视的问题。与 HGF 共培养后, MnO-NPs 并未对 HGF 产生明显的生物毒性; 同时这一氧化锰纳米颗 粒即便在 pH 达到 4.5 时 其 24 h Mn²⁺释放量也不 足 0.5% 这说明该材料稳定性和安全性较好,具有 应用于人体的潜能。结合以上几点,本研究所合成 的这一新型氧化锰纳米材料,有望作为一种酸敏造 影剂应用于肿瘤的 MRI 检测中。

具有靶向肿瘤药物输送功能的纳米平台可以增 强抗癌药的特异性,并且改善肿瘤部位的药物浓度。 本研究中 尽管未将这一新型氧化锰纳米颗粒与抗 癌药负载 但是通过透射电子显微镜观察可以发现 其表面具有一定的孔道,同时孔隙率分析仪的结果 也印证了孔道的存在,并且其水合粒径约为200 nm 比较适合作为纳米给药平台,将来也可以将其 改良后与抗癌药负载应用于此,从而成为一种具有 诊断及给药作用的全新纳米探针。

在这项研究中,首先提出了一种新型花瓣状氧 化锰纳米颗粒。通过透射电子显微镜直径约为100 nm 随后的 X 射线衍射仪检测确定了所合成的材料 为 Mn_3O_4 ; 弛豫效能检测以及锰离子释放研究表明 了它具有酸敏造影剂应用的潜能; 生物相容性检测 则说明了它几乎无生物毒性,可以安全地应用于人 体。本研究表明该氧化锰纳米粒子结构稳定,生物 相容性佳 对 pH 敏感 酸性条件下拥有着较高的弛 豫效能。因而这一纳米颗粒将可能作为一种新的纳 米造影剂应用于临床 改良后甚至可以成为一个诊 疗一体化的纳米平台从而拥有着更加广泛的应用前 景。

参考文献

- [1] Chen Y , Chen H , Zhang S , et al. Structure-property relationships in manganese oxide-mesoporous silica nanoparticles used for T1weighted MRI and simultaneous anti-cancer drug delivery [J]. Biomaterials 2012 33(7):2388-98.
- [2] Cheon J , Lee J H. Synergistically integrated nanoparticles as mul-

timodal probes for nanobiotechnology [J]. Acc Chem Res 2008 41 (12):1630-40.

- [3] Siegel R L , Miller K D , Fedewa S A , et al. Colorectal cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin 2017 67(3): 177 – 93.
- [4] 司元纯 涨桂龙,王 丹,等.超小氧化钆点缀的介孔二氧化硅 作为磁共振 T1 造影剂的实验研究[J].安徽医科大学学报, 2019 54(5):684-90.
- [5] Zhang G ,Du R ,Qian J ,et al. A tailored nanosheet decorated with a metallized dendrimer for angiography and magnetic resonance imaging-guided combined chemotherapy [J]. Nanoscale 2017 ,10(1): 488-98.
- [6] Patsula V ,Kosinová L ,Lovri M ,et al. Superparamagnetic Fe3O4 Nanoparticles: Synthesis by Thermal Decomposition of Iron(III) Glucuronate and Application in Magnetic Resonance Imaging[J]. ACS Appl Mater Interfaces 2016 8(11):7238-47.
- [7] Weissleder R , Pittet M J. Imaging in the era of molecular oncology
 [J]. Nature 2008 452:580 -9.
- [8] Ni D ,Bu W ,Ehlerding E B ,et al. Engineering of inorganic nanoparticles as magnetic resonance imaging contrast agents [J]. Chem Soc Rev 2017 A6(23): 7438 – 68.
- [9] Bulte J W M , Kraitchman D L. Iron oxide MR contrast agents for

molecular and cellular imaging [J]. NMR Biomed , 2004 ,17:484 - 99.

- [10] Ansar S M ,Fellows B ,Mispireta P ,et al. pH triggered recovery and reuse of thiolated poly(acryl acid) functionalized gold nanoparticles with applications in colloidal catalysis [J]. Langmuir , 2017 33(31) :7642 - 8.
- [11] Zhang M ,Cao Y ,Chong Y ,et al. Graphene oxide based theranostic platform for T1-weighted magnetic resonance imaging and drug delivery [J]. ACS Appl Mater Interfaces 2013 5(24):13325-32.
- [12] Cai X ,Zhu Q ,Zeng Y ,et al. Manganese oxide nanoparticles as MRI contrast agents in tumor multimodal imaging and therapy[J]. Int J Nanomedicine 2019 ,14:8321-44.
- [13] Hsu B Y W ,Kirby G ,Tan A ,et al. Relaxivity and toxicological properties of manganese oxide nanoparticles for MRI applications [J]. RSC Adv 2019 6(51):45462-74.
- [14] Wang Q Bao Y Zhang X et al. Uptake and toxicity studies of poly-acrylic acid functionalized silicon nanoparticles in cultured mammalian cells [J]. Adv Healthc Mater 2012 ,1(2):189-98.
- [15] Yu L ,Chen Y ,Wu M ,et al. "Manganese extraction" strategy enables tumor-sensitive biodegradability and theranostics of nanoparticles [J]. J Am Chem Soc 2016 ,138(31): 9881 – 94.

Preparation and characterization of a novel pH – sensitive manganese oxide nanoprobe

Xing Xin Si Yuanchun Lu Yifan et al

(College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University, Key Lab. of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract *Objective* A magnetic resonance nano-contrast agent containing trimanganese tetroxide was synthesized, its characterization was explored, and its contrast efficiency and safety performance were explored. *Methods*

Polyacrylic acid (PAA) was used as a pH-responsive polymer to react with manganese sulfate to obtain nanoparticles. The molecular formula of the synthesized nanoparticles was determined by X-ray photoelectron spectroscopy and X-ray diffractometer. Transmission electron microscopy, particle size analyzer, inductance Coupled plasma emission spectroscopy and 7.0T magnetic resonance imaging instruments were used to study the morphology, magnetic resonance properties , cell biocompatibility , and material stability of nanoparticles. Results Manganese oxide samples were obtained by the reaction of glutathione, polyacrylic acid and $MnSO_4$. The sample was observed under transmission electron microscopy as petal-shaped nanoparticles with a diameter of about 100 nm. X-ray photoelectron spectroscopy and X-rays diffractometer results showed that its composition was Mn₃O₄; at pH 4.5, the 24 h Mn²⁺ release was still less than 0.5%, which proved its good stability and safety; magnetic resonance imaging results showed that the pH was acidic under the conditions , the manganese oxide nanoparticles had extremely high contrast performance. When the pH was 4.5, the longitudinal relaxation rate reached 13.0 mmol⁻¹ • s⁻¹, indicating that it could respond to the tumor microenvironment; CCK-8 showed that co-cultivation of the manganese oxide nanoparticles with gingival fibroblasts (HGF) for 24 h and 48 h did not produce cytotoxicity, proving that the material had good biocompatibility. Conclusion A new nano-contrast agent with trimanganese tetroxide was successfully synthesized, which has good biocompatibility and the highest contrast efficiency under acidic conditions, providing a basis for its further clinical research.

Key words manganese oxide; magnetic resonance imaging; nano contrast agent