

• 实验研究 •

SPIO-PBCA-PEG 纳米微粒的合成及 MR 成像

林炳权, 许乙凯, 冯婕

【摘要】 目的:探讨制备长循环 SPIO 聚氰基丙烯酸正丁酯纳米微粒(SPIO-PBCA-PEG)的方法,在动物实验中分析其肝脏成像效果,分析其潜在的应用价值。**方法:**采用界面聚合法制备 SPIO-PBCA-PEG;透射电镜下观察 SPIO-PBCA-PEG 的形态,采用 Malvern-3000HS 激光粒度分析仪测定粒径及其分布,采用邻二氮菲法测定上清液中 Fe 离子浓度,计算 SPIO-PBCA-PEG 的包封率,采用红外光谱学仪器检测其结构。选择 SPF 级 Wistar 大鼠 12 只分为 2 组,分别使用 SPIO 和 SPIO-PBCA-PEG,于 MRI 平扫后分别于注药后 10 和 30 min 以及 1、2、4 和 24 h 行增强扫描,计算各时间点肝脏强化率。**结果:**①透射电镜观察 SPIO-PBCA-PEG 呈类圆形,具有明显的核-壳结构;②SPIO-PBCA-PEG 平均粒径 177 nm,粒径分布为 0.20;③SPIO-PBCA-PEG 溶液中铁含量为 2.27 mg/ml, SPIO-PBCA-PEG 中 SPIO 包封率(ER)为 86.9%;④红外光谱学可测出所得药物中同时含有 PBCA 及 PEG 特征峰谱,证明所得药物 SPIO-PBCA-PEG 中 PEG 连接到 PBCA 纳米壳上;SPIO-PBCA-PEG 组峰值强化时间晚于 SPIO 组,但负性峰值强化率高于 SPIO 组,达到峰值后各时间点负性强化率均高于 SPIO 组。**结论:**SPIO-PBCA-PEG 纳米粒具有较强的亲水性及长循环的特性,表面基团易进行修饰,为进一步实验提供思路。

【关键词】 纳米微粒; 磁共振成像; 对比剂; 聚氰基丙烯酸正丁酯

【中图分类号】 R445.2; R739.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2011)11-1140-04

SPIO-PBCA-PEG nanoparticles: synthesis and application in MRI LIN Bing-quan, XU Yi-kai, FENG Jie. Imaging Center, Nanfang Hospital, the Southern Medical University, Guangzhou 510515, P. R. China

【Abstract】 Objective: To study the method for preparing of long-circulating SPIO-PBCA-PEG and application of MRI in rat, and to investigate the potential value of its applications. **Methods:** ①SPIO-PBCA-PEG were prepared by interfacial polymerization; ②The morphology of SPIO-PBCA-PEG was examined by transmission electron microscopy; ③The size and distribution of the SPIO-PBCA-PEG were measured by Malvern-3000HS laser analyzer; ④The Fe ionic concentration of supernatant was measured by phenanthroline, then the encapsulation efficiency of SPIO-PBCA-PEG was calculated; ⑤Determination of the structure of SPIO-PBCA-PEG by infrared spectroscopy apparatus; ⑥The MRI experiment of SPIO-PBCA-PEG: twelve SPF normal Wistar rats were divided into two groups at random, after plain scan, after contrast medium injection, dynamic data of different groups were acquired at 10min, 30min, 1h, 2h, 4h and 24h, using the same imaging parameters as for the precontrast images. Enhancement ratio of liver was calculated in two groups. **Results:** ①The morphology of SPIO-PBCA-PEG was spherical core-shell structure; ②The average size of SPIO-PBCA-PEG was 177nm and the index of size distribution was 0.20; ③The Fe content of SPIO-PBCA-PEG was 2.27mg/ml, the encapsulation efficiency was 86.9%; ④Infrared spectroscopy detected the drug both with the PBCA and PEG characteristic absorption peak spectrum, connection of PEG to PBCA was proved; ⑤Compared with the SPIO group, the SPIO-PBCA-PEG group had later peak enhancement time, higher peak enhancement ratio, and higher enhancement ratio post peak time. **Conclusion:** The nanoparticles of SPIO-PBCA-PEG have character of hydrophilism and long-circulating, the surface of SPIO-PBCA-PEG is easier to modify which provide route for the next experiment.

【Key words】 Nanoparticle; Magnetic resonance imaging; Contrast medium; Polybutylcyanoacrylate

超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)是内皮网状系统特异性对比剂,其颗粒主要被内皮网状系统特异性吞噬,使正常组织的 T_2 弛豫时间缩短,引起相应区域的信号减低,提高了病灶-正常组织的对比噪声比。但 SPIO 在注射入体内后很快被巨噬细胞吞噬,半衰期短且不具有对肿瘤组织的主动

靶向性。纳米微粒可作为靶向对比剂的载体,不仅可携带 MRI 对比剂,还可通过修饰方法将抗体、多肽和叶酸等物质标志到载体表面,能够起到将对比剂通过被动或主动靶向作用到目标部位的目的^[1,2]。纳米微粒以其良好的稳定性、表面易修饰性、制备工艺简单及体内可降解性等优点而成为靶向给药制剂学研究的热点^[3]。本实验以氰基丙烯酸正丁酯(butylcyanoacrylate, BCA)、聚乙二醇(polyethyleneglycol, PEG)及 SPIO 为合成材料,尝试制备 SPIO 聚氰基丙烯酸正丁

作者单位: 510515 广州,南方医科大学南方医院影像中心

作者简介:林炳权(一),男,广东汕头人,博士研究生,主要从事肿瘤 MRI 免疫成像。

通讯作者:许乙凯, E-mail: yikaivip@163.com

酯纳米微粒(superparamagnetic iron oxid-polybutyl-cyanocrylate-polyethylenegrycol, SPIO-PBCA-PEG), 并与 SPIO 对比, 探讨其肝脏靶向强化效果及潜在临床应用价值。

材料与方法

试剂: 脂溶性 SPIO(南方医院影像中心许乙凯教授合成并提供); mPEG5000 分析纯(上海炎怡生物技术有限公司); BCA 单体(广州白云医用胶公司); 二氯甲烷分析纯(上海炎怡生物技术有限公司)。

JB90-D 型机械搅拌器(上海昂尼仪器仪表有限公司); HR-200 电子天平(日本 A&D 有限公司); 0.22 μm 微孔滤膜(德国 Satoris 产); 日立 H-600 透射电镜(日本日立公司); Zetasizer 3000HS(英国 Malvern instruments GB); Vertex 70 型红外光谱仪(德国 Bruker 公司)。

SPIO-PBCA-PEG 的制备方法: 用二氯甲烷稀释 BCA 单体, 比例为 5:1。精密称取一定量的 mPEG, 溶于去离子水中, PH 控制在 5.5~6.5, 在机械搅拌器下(800 rpm)逐滴缓慢滴加入 10 ml 脂溶性 SPIO 与一定量 BCA 单体的混合液, 搅拌至少 5 h 以上, 终止反应, 减压抽滤后用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 将滤液存于 4℃ 冰箱内备用。

用 Malvern-3000HS 激光粒度分析仪测定粒径及其分布, 取上述 SPIO-PBCA-PEG 混合液放置于透析袋内, 用 5% 葡萄糖溶液透析 48 h, 每隔 8 h 换透析液, 除去游离的 SPIO、mPEG, 然后吸取 1 ml 透析过的该相应样品, 用去离子水稀释至量杯中。所选激光光源波长为 633.0 nm, 测试温度为(25.00±0.05)℃。

SPIO-PBCA-PEG 铁含量及包封率的测定: 取配制好的 SPIO-PBCA-PEG 混合液 5 ml, 在 12000 rpm 速度下低温离心 20 min, 分别收集上清液及沉淀, 用邻二氮菲法测定上清液中 Fe 浓度, 按照公式(1)计算包封率(encapsulation rate, ER):

$$ER = \frac{W_a - W_s}{W_a} \times 100\% \quad (1)$$

其中, W_a 为加入的 SPIO 中 Fe 的含量, W_s 为上清液中 Fe 的含量。

取少量上述经透析过的 SPIO-PBCA-PEG, 在透射电镜下观察其大体形态。按 1:4 的比例用蒸馏水稀释纯净 SPIO-PBCA-PEG 液体, 取 1 滴放在镀膜铜网上, 滤纸吸去多余液体, 加入 2% 磷钨酸染色 30 s, 干燥后电镜下观察。

SPIO-PBCA-PEG 结构检测: 将一定量的样品冷冻干燥后, 在红外光谱学仪上检测样品的红外吸收峰谱。

SPIO-PBCA-PEG 大鼠肝脏成像研究: 取正常 SPF 级 Wistar 大鼠 12 只(由南方医科大学附属南方医院动物实验中心提供), 雌雄不限, 体重(176.5±17.6)g, 采用随机数字法将其分为 2 组。SPIO-PBCA-PEG 组: 剂量为 0.05 mmolFe/kg; SPIO 组: 剂量为 0.05 mmolFe/kg。

MRI 扫描方法: 使用 GE Signa Excite HD 3.0T MR 超导型磁共振扫描仪, 软线圈, 常规行冠状面及横轴面, FSE T_1 WI (TR 400 ms, TE 7.5 ms) 和 T_2 WI (TR 2800 ms, TE 122 ms)。平扫后, 2 组分别于注药后 10 和 30 min 及 1、2、4 和 24 h 各时间点行增强扫描, 绘制 SPIO-PBCA-PEG 和 SPIO 肝实质 SNR-时间曲线, 扫描参数同平扫。

图像分析: 测量增强前后两组实验动物各时间点 T_2 WI 上肝脏信号强度, 在背景区域选取较大的 ROI, 测量并计算背景噪声的标准差(standard deviation of the noise, SD)。计算肝脏各时间点的信噪比(SNR)和强化率(enhanced rate, En%)。

结 果

电镜下形态观察: SPIO-PBCA-PEG 呈类圆形, 大小尚均匀, 具有明显的核-壳结构, 可见 SPIO 被纳米粒包裹(图 1)。SPIO-PBCA-PEG 平均粒径 177 nm, 粒径分布为 0.20(图 2)。制得 SPIO-PBCA-PEG 溶液中铁含量为 2.27 mg/ml, SPIO-PBCA-PEG 中 SPIO 包封率(ER)为 86.9%。SPIO-PBCA-PEG 样品中含有 PBCA 脂羧基的吸收峰 1750.8 cm^{-1} 及 PEG 与 PBCA 形成的 C-O-C 吸收峰 1060.7 cm^{-1} , 证明 PEG 与 PBCA 形成纳米壳相连。

静脉注射 SPIO 后 10 min T_2 WI 上肝实质负性强化程度平均为 21.3%; 在注药后 30 min 时达负性强化峰值, 负性强化率为 48.16%; 注射 1 h 后肝实质信号逐渐缓慢恢复。静注 SPIO-PBCA-PEG 后 10 min, T_2 WI 上肝实质负性强化程度平均为 10.7%, 注药后 30 min 及 1、2、4 和 24 h T_2 WI 示肝实质负性强化程度的均值分别为 22.42%、30.69%、56.89%、53.41% 和 40.99%。与 SPIO 组肝实质强化方式不同, SPIO-PBCA-PEG 组负性强化达峰值时间为注药后 2h, 明显晚于 SPIO 组, 但负性峰值强化率为 56.89%, 高于 SPIO 组, 且达到峰值后的各时间点负性强化率均高于 SPIO 组(图 3、4)。

讨 论

1. SPIO-PBCA-PEG 的形成机制及合成方法

聚氨基丙烯酸烷基酯(polyalkylcyanoacrylate, PACA)属于高分子聚合物, 具有良好的降解性、生物

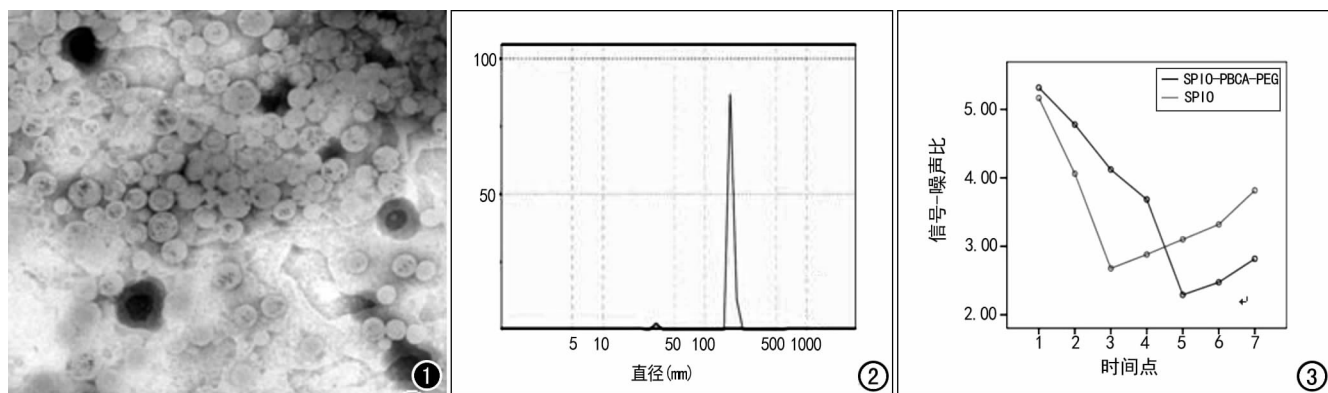


图1 电镜下示 SPIO-PBCA-PEG 呈类圆形,大小尚均匀。图2 激光粒度分析仪显示 SPIO-PBCA-PEG 平均粒径约 177nm,粒径分布为 0.20。图3 两组肝实质 T_2 WI 增强后不同时间点 SNR 对比。横坐标轴代表各时间点(1 为增强前,2 为增强后 10 min,3 为增强后 30 min,4 为增强后 1 h,5 为增强后 2 h,6 为增强后 4 h,7 为增强后 24 h),纵坐标轴代表肝脏 SNR。

相容性和无免疫原形,可通过化学或物理修饰控制性质,运载不同的药物,是一种具有应用前景的纳米材料。其具有在光、热、游离基引发剂及阴离子催化剂等条件存在下可聚合的性质,采用一定的方法通过控制其聚合反应速度可制备成纳米球和纳米囊^[4]。本研究选择了目前研究较为广泛的氰基丙烯酸正丁酯(BCA)作为合成原料,依据聚合反应的原理,选择了界面聚合法合成纳米粒^[5];将单体 BCA 溶于有机溶剂中,搅拌下缓慢逐滴滴加入含非离子表面活性剂的水相中,反应结束后蒸除有机溶剂,即可得含油核的纳米粒。本方法适用于脂溶性药物的包封,所得纳米粒为内含油相的膜壳结构,而且通常情况下载药量比乳液聚合法高。本研究中所需的 SPIO 为特制的脂溶性 SPIO,具有稳定的性质和高度的脂溶性,符合此方法条件。

2. SPIO-PBCA-PEG 纳米粒的制备条件

由于 BCA 单体极易在阴离子的催化下发生聚合反应,制备条件中将 BCA 单体稀释进 CH_2Cl_2 中增加单体的分散度,可减少 BCA 单体的相互碰撞,避免因过快聚合而产生大粒径的纳米粒。将稀释后 BCA 单体加入水相过程中,需要缓慢逐滴滴加入 BCA 单体稀释液,达到纳米粒逐渐聚合产生小粒径纳米颗粒的目的。介质 PH 值亦是影响纳米微粒粒径及均匀度

的重要因素之一,当介质 $PH < 0.5$ 时,聚合反应太慢,不易制成合格的毫微粒;而 $PH > 5$ 时,聚合反应太快而结块,也不能制成合格的毫微粒。但是由于本实验使用的磁性材料 SPIO 在 $PH < 5$ 时容易破坏而发生聚集,因此,本实验在此基础上,通过正交试验,选择了介质的 PH 值为 6.5,并增加 PEG 的浓度来稳定粒子表面,减少其聚合反应速度。纳米微粒的形成是一个简单的物理聚合过程,药物并不参与其反应,而是在纳米颗粒形成中一个被吸附和包裹的过程,因此药物浓

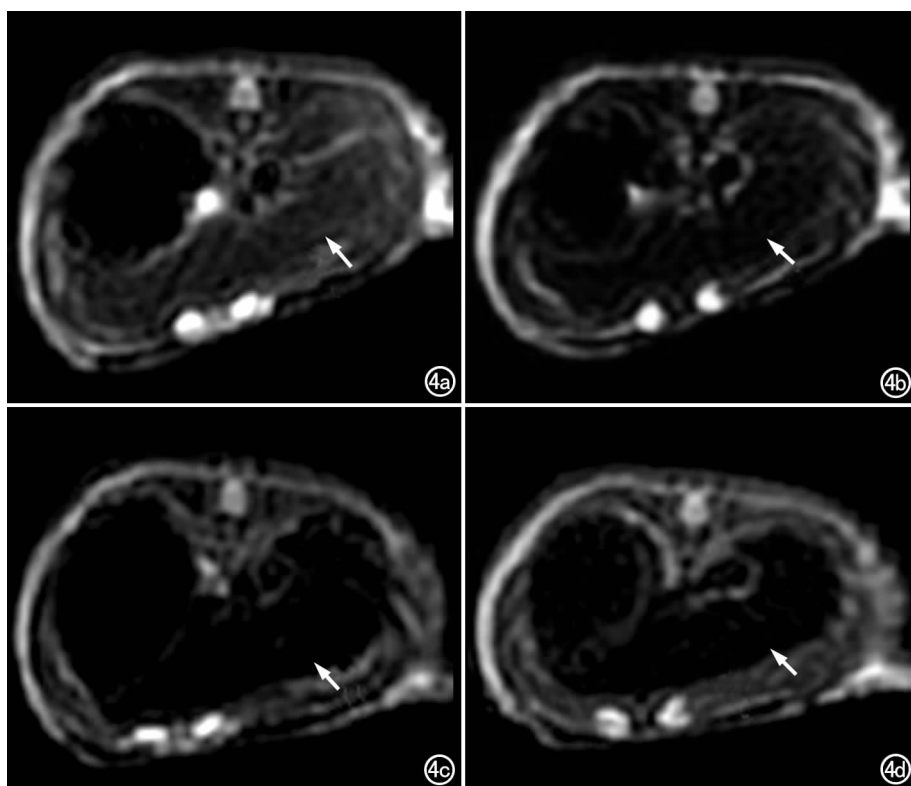


图4 SPIO-PBCA-PEG 注射前后 T_2 WI 肝脏各时间点信号对比。a) 增强前 T_2 WI 示肝脏呈中等信号(箭); b) 增强后 30 min T_2 WI 示肝脏信号下降(箭); c) 增强后 1 h T_2 WI 示肝脏信号强度明显降低(箭); d) 增强后 24 h T_2 WI 示肝脏仍呈低信号(箭)。

度对纳米微粒粒径影响不大。

3. SPIO-PBCA-PEG 纳米颗粒上 PEG 的作用

聚乙二醇(PEG)具有高度的亲水性,其没有免疫原性,能改变药物在水溶液中的生物分配行为和溶解性,在修饰的药物周围产生空间屏障,减少药物的酶解,避免在肾脏的代谢中很快被消除。聚乙二醇是应用最广泛的表面修饰材料,在上述反应中,PEG 不仅起了反应稳定剂的作用,还能连接到 PBCA 上,起到修饰作用。其通过嵌段或接枝的方法,使亲水的 PEG 链段链接在纳米粒的表面,可以改善其亲水性,使粒子具有很好的稳定性而不聚集,延长纳米粒在体内的循环时间,提高药物的生物利用度^[6-8]。

4. SPIO-PBCA-PEG 在影像检查中的应用价值

SPIO 是一种能被网状内皮系统特异性吞噬的对比剂,注入体内后可分布于含吞噬细胞的组织如肝脏、脾脏、淋巴结及骨髓中,分布比较散在,不能全部到达特定部位,且其在血液循环中的半衰期短,达不到相应的铁浓度,临床应用相对局限。SPIO-PBCA-PEG 属于靶向给药系统,粒径大小直接影响药物在体内的靶向分布,其中粒径 $<200\text{ nm}$ 的纳米粒主要分布于肝脏,而 $<50\text{ nm}$ 的纳米粒主要分布在骨髓。SPIO-PBCA-PEG 可将 SPIO 有效地输送至肝脏,减少其在全身内皮网状系统的分布,可减少 SPIO 给药浓度,提高 SPIO 的负性强化效应。且 SPIO 经 PBCA 纳米粒包裹后,纳米囊中含有多个 SPIO,可能使其磁化率高于游离的 SPIO。本研究结果显示,静脉注射 SPIO-PBCA-PEG,同等剂量下的强化率比 SPIO 高,强化效果较 SPIO 明显。

5. SPIO-PBCA-PEG 纳米粒长循环、缓释作用

纳米粒给药系统的一个重要特点就是药物在体内的长循环及缓释性。本实验结果表明,SPIO-PBCA-PEG 纳米粒循环时间明显延长,使 $T_2\text{WI}$ 上肝实质信号逐渐呈负性强化改变,且强化时间较 SPIO 延长。大鼠静脉注射 SPIO-PBCA-PEG 纳米粒后,早期 $T_2\text{WI}$ 肝实质信号变化不明显,在注射后 2 h,肝实质负性强化达到峰值,为 56.89%;4 h 后大鼠肝实质信号逐渐上升,负性强化率为 53.41%;至 24 h 仍有负性强化,负性强化率为 40.99%。而给药后 30 min SPIO 组大鼠肝实质即达负性强化峰值,负性强化率为 48.16%,1 h 后肝实质负性强化逐渐上升,但在同一时间点均低于 SPIO-PBCA-PEG 组的强化程度。SPIO-

PBCA-PEG 虽然经 PEG 亲水修饰后能增加避免巨噬细胞吞噬的概率,但随着体内循环时间的延长,最终仍可能由内皮网状系统逐渐吞噬捕捉,导致了肝脏系统持续性的负性强化。实验表明 SPIO-PBCA-PEG 在血液循环中滞留时间更长,能够持续使肝脏成像。

6. SPIO-PBCA-PEG 潜在应用价值

PBCA 纳米微粒表面的 PEG 上能够进一步被其它基团如抗体、肿瘤表面特异性标志物的配体和叶酸等所修饰,可形成特异性靶向定位特性。PEG 进行转载修饰后可特异性的靶向标志到特定的细胞或组织中,形成特定部位的成像,从而为实现肿瘤或炎症的特异性的靶向成像提供新的思路^[9,10]。

参考文献:

- [1] Wiener EC, Konda S, Shadron A, et al. Targeting dendrimer-chelates to tumors and tumor cells expressing the high affinity folate receptor[J]. Invest Radiol, 1997, 32(12): 748-754.
- [2] Aime S, Botta M, Fedeli F, et al. High relaxivity contrast agents for magnetic resonance imaging based on multisite interactions between a beta-cyclodextrin oligomer and suitably functionalized Gd-III chelates[J]. Chem Eur J, 2001, 7(12): 5261-5269.
- [3] 廖工铁. 靶向给药制剂[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1997.
- [4] 俞耀庭. 生物医用材料[M]. 天津: 天津大学出版社, 2002. 188-191.
- [5] Wohlgemuth M, Machtle W, Mayer C. Improved preparation and physical studies of polybutylcyanoacrylate nanocapsules[J]. J Microencapsul, 2000, 17(4): 437-448.
- [6] Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties[J]. Prog Lipid Res, 2003, 42(6): 463-478.
- [7] Gref R, Luck M, Quellec P, et al. "Stealth" corona, core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2000, 18(3-4): 301-313.
- [8] Bazile D, Prud'homme C, Bassoullet MT, et al. Stealth Me. PEG, PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system[J]. J Pharm Sci, 1995, 84(4): 493-498.
- [9] Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC, et al. Longcirculating and target-specific nanoparticles: theory to practice [J]. Pharmacol Rev, 2001, 53(2): 283-318.
- [10] Otsuka H, Nagasaki Y, Kataoka K, et al. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55(3): 403-419.

(收稿日期: 2011-04-22 修回日期: 2011-06-11)