

· 论 著 ·

不同表面修饰的 Fe_3O_4 纳米颗粒在体 肿瘤成像研究

乔瑞瑞^{1*}, 刘侃^{2*}, 贾兵³, 曾剑峰¹, 欧阳汉², 王凡³, 高明远¹

(1. 中国科学院 化学研究所, 北京 100190; 2. 中国医学科学院北京协和医学院 肿瘤医院, 北京 100021;
3. 北京大学 医学同位素研究中心, 北京 100191)

[摘要] 目的: 比较两种不同表面修饰的 Fe_3O_4 纳米颗粒作为肿瘤探针进行在体磁共振成像(MRI)的区别。方法: 采用两种不同表面修饰的 Fe_3O_4 作为磁共振造影剂, 并利用其表面羧基与具有靶向识别肿瘤表面整合素受体(Integrin $\alpha_v\beta_3$)的 c(RGDyK) 多肽进行耦联, 制备出具有肿瘤靶向性的磁共振分子探针。以荷人脑胶质瘤(U-87 MG)裸鼠为动物模型, 进行体内 MRI 研究。结果与结论: 两种纳米颗粒均能够产生明显的 T_2 造影效果, 表面为聚乙二醇及油胺共同修饰的纳米颗粒的最佳成像时间为注射药物后 8 h, 而只有聚乙二醇修饰的纳米颗粒的最佳成像时间为注射药物后 4 h, 导致两种纳米颗粒在成像时达到最佳成像效果的时间不同的原因在于其表面电荷的不同。

[关键词] Fe_3O_4 纳米颗粒; 分子成像; 磁共振成像; 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸肽

[中图分类号] R730.49; R319 [文献标识码] A [文章编号] 1671-6264(2011)01-0063-04
doi:10.3969/j.issn.1671-6264.2011.01.013

In vivo MR imaging of tumor by using Fe_3O_4 nanoparticles bearing with different surface ligand as contrast agent

QIAO Rui-rui^{1*}, LIU Kan^{2*}, JIA Bing³, ZENG Jian-feng¹, OUYANG Han²,
WANG Fan³, GAO Ming-yuan¹

(1. Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; 2. Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China; 3. Medical Isotopes Research Center, Peking University, Beijing 100191, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the contrast effect for MR imaging of tumor by using two types of Fe_3O_4 nanoparticles bearing with different surface ligands as tumor-targeting contrast agent. **Methods:** The tumor-targeting peptide c(RGDyK) was conjugated with Fe_3O_4 nanoparticles bearing with carboxylic groups by the conjugation reaction mediated by EDC and sulfo-NHS. Then, the conjugates were applied to *in vivo* detecting tumors in BALB/c nude mice bearing U-87 MG human glioma cancer xenografts. **Results and Conclusion:** The two different types of Fe_3O_4 nanoparticles both can obtain obvious contrast effect, however, the best contrast images had to be acquired at different time. For particles bearing with PEG and oleyamine, the best contrast images can be acquired at 8 h after injection, while for particles bearing with PEG, it was 4 h after injection, which may be affected by the

[收稿日期] 2010-10-27 [修回日期] 2010-11-05

[基金项目] 科技部国家重大科学研究计划资助项目(2011CB935800); 国家自然科学基金资助项目(21003135)

[作者简介] 乔瑞瑞(1983-), 女, 山西洪洞人, 助理研究员, 药学硕士; 刘侃(1979-), 男, 陕西宝鸡人, 主治医师, 医学博士。* 为并列第一作者。

[通信作者] 高明远 E-mail: gaomy@iccas.ac.cn

different surface charge of the Fe_3O_4 nanoparticles.

[Key words] Fe_3O_4 nanoparticles; molecular imaging; magnetic resonance imaging; Arg-Gly-Asp (RGD)

基于磁性氧化铁纳米颗粒的MRI造影剂在20世纪90年代开始被用于临床诊断肝脏肿瘤^[1],目前的市售产品有Feridex[®](SPIO,肝部损伤造影)、Gastromark[®](SPIO,肠胃造影)及Combidx[®](USPIO, Ultra-small superparamagnetic iron oxides,淋巴造影)等^[2]。这些临床应用结果显示了磁性铁氧化物纳米微粒在MRI诊断中的优异磁学成像性能和体内安全性,使得相关的磁性铁氧化物纳米微粒造影剂增强MRI技术成为当今国内外研究的热点。近年来,随着纳米颗粒制备技术的不断发展,尤其是高温热解法在制备高质量纳米晶体方面的重大突破,使得表面修饰结构及功能更为复杂的新一代超顺磁性氧化铁纳米颗粒MRI造影剂开始出现^[3-6]。通过利用尺寸更小的造影剂颗粒与特定的配体或受体的耦联,成功地实现了肿瘤靶向分子成像的应用^[7-10]。然而,体内靶向成像应用对于纳米颗粒的物理化学性质提出了更高的要求,纳米颗粒的尺寸及表面修饰等性质均会影响到其在体成像效果,笔者研究了尺寸相近而表面电性不同的两种 Fe_3O_4 纳米颗粒为载体与肿瘤靶向肽精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)耦联后,在人胶质瘤(U-87 MG)磁共振靶向MRI中的应用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂:1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺[ethyl-3-(dimethylaminopropyl carbodiimide), EDC]购自Sigma公司,N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt)购自Fluka公司,c(RGDyK)由北京大学医学部提供,磁性纳米颗粒由北京万德高科技发展有限公司提供。仪器:透射显微镜(TEM, JEM-100CXII),激光动态光散射仪(Nano ZS, Malvern),临床3.0 T磁共振成像仪(GE公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 Fe_3O_4 纳米颗粒 本研究采用了两种具有不同表面性质的生物相容性磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒($3.5 \text{ mg Fe} \cdot \text{ml}^{-1}$),分别命名为 Fe_3O_4 (I)、 Fe_3O_4 (II)。其主要区别在于 Fe_3O_4 (I)的表面电位接近电中性,而 Fe_3O_4 (II)在中性水溶液中呈负电性。此外,上述两种磁性纳米颗粒表面均带有羧基残基,供下一步生物耦联反应使用。

1.2.2 Fe_3O_4 纳米颗粒与c(RGDyK)的耦联 取286 μl

(1 mg Fe)的 Fe_3O_4 纳米颗粒溶液,加入1 μl EDC和2.87 mg的sulfo-NHS,活化10 min,加入20 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ c(RGDyK)溶液16.7 μl ,加入100 μl 10 $\times$ PBS及596 μl 超纯水溶液,使得耦联物溶液中Fe浓度为1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。室温下反应4 h,然后采用超纯水反复透析16 h。采用同样的耦联方法,分别得到两种不同表面修饰的 Fe_3O_4 与c(RGDyK)的耦联物。

1.2.3 脑胶质瘤动物模型的构建 U-87 MG人神经胶质瘤细胞(HTB-14TM,购自美国ATCC),用含质量分数10%胎牛血清的DMEM(低糖)培养基在37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为0.05的 CO_2 培养箱中常规培养传代。取4~5周龄BALB/c裸鼠,右侧后肢腋下接种U-87 MG细胞, 2×10^6 个 $\cdot$ 只 $^{-1}$,饲养于无特殊病原体级动物房。待肿瘤平均直径达到0.4~0.6 cm时用于实验。

1.2.4 体内MRI 首先,采用麻醉剂将体重约为20 g的胶质瘤荷瘤裸鼠麻醉,然后将其固定在支架上,置于磁场强度为3 T的临床用磁共振仪(GE公司)中对裸鼠的肿瘤部位进行扫描,采用的线圈为1英寸实验动物用鸟笼线圈(GE公司),获得 T_2 像的扫描参数如下:FOV = 8 cm $\times$ 8 cm; matrix size = 160 $\times$ 128; slice thickness = 1 mm; TE = 120 ms; TR = 2 500 ms; NA = 4。扫描结束后,通过尾静脉向编号为1的荷瘤裸鼠体内注射0.2 ml(剂量为10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) Fe_3O_4 (I)与c(RGDyK)的耦联物,向编号为2的荷瘤裸鼠体内注射相同剂量 Fe_3O_4 (II)与c(RGDyK)的耦联物;此外,分别向编号为3和4的荷瘤裸鼠体内注射相同剂量的 Fe_3O_4 (I)及 Fe_3O_4 (II)溶液作为对照组。采用上述的磁共振设备及序列在特定时间点进行图像扫描。

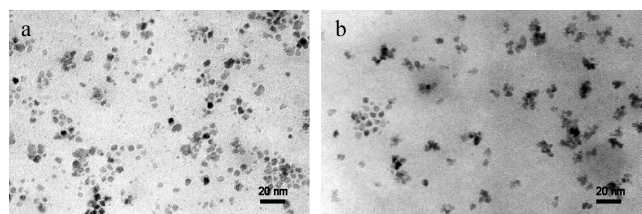
2 结 果

2.1 Fe_3O_4 纳米颗粒尺寸形貌表征

采用电子TEM对 Fe_3O_4 纳米颗粒的尺寸形貌进行表征,纳米粒子的形貌近似为球形(图1),粒径统计结果表明,磁性纳米晶体的粒径分别为(6.2 ± 1.0) nm和(5.4 ± 1.1) nm。

2.2 Fe_3O_4 纳米颗粒与c(RGDyK)的耦联物表征

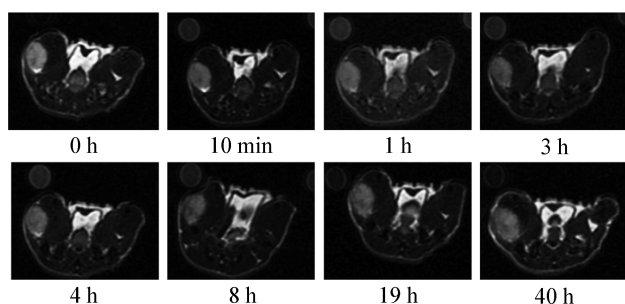
采用激光动态光散射仪(Nano ZS, Malvern)对 Fe_3O_4 纳米颗粒与c(RGDyK)的耦联物进行表征,结果显示,耦联前 Fe_3O_4 (I)本身的水合尺寸为36.3 nm,耦联后为46.1 nm;耦联前 Fe_3O_4 (I)Zeta电位为-0.92,耦联后为-2.84。耦联前 Fe_3O_4 (II)本身的

a. $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{I})$ 纳米颗粒; b. $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{II})$ 纳米颗粒图1 $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{I})$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{II})$ 纳米颗粒的 TEM 照片Fig 1 TEM image of $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{I})$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{II})$ nanoparticles

水合尺寸为 20.5 nm, 耦联后为 28.6 nm; 耦联前 $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{II})$ Zeta 电位为 -11.50 , 耦联后为 -7.28 。耦联前后纳米颗粒水合尺寸的变化表明纳米颗粒已经与 c(RGDyK) 成功耦联。 $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{I})$ 与 $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{II})$ 的 Zeta 电位有明显区别, 耦联前 $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{I})$ 的表面电位几乎呈中性, $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{II})$ 的表面电位则呈明显负电性。

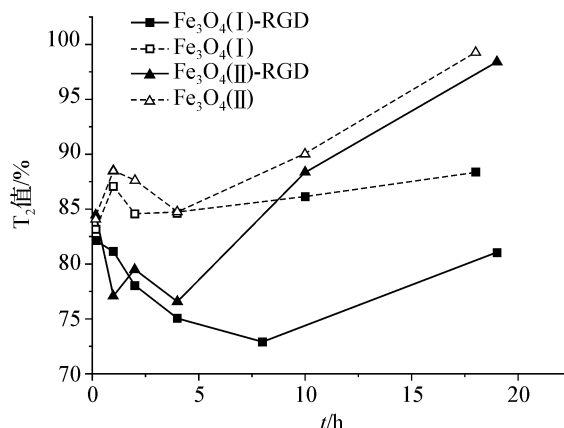
2.3 以 Fe_3O_4 纳米颗粒与 c(RGDyK) 的耦联物为造影剂的体内 MRI 效果

2.3.1 MRI 将以上分子探针通过尾静脉注射入相应的荷瘤裸鼠体内并进行 MRI, 注射 $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{I})$ 与 c(RGDyK) 的耦联物后的 MRI 结果见图 2。注射造影剂后, 随着纳米探针在体内循环时间的延长, 肿瘤部位逐渐变暗, 呈现出明显的 T_2 造影效果。

图2 $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{I})$ 与 c(RGDyK) 的耦联物为造影剂的体内 MRIFig 2 T_2 -weighted MR images of tumor-bearing nude mice acquired before and at different time points after intravenous injections of $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{I})$ -c(RGDyK)

2.3.2 T_2 value (T_2 值) 趋势图 图 3 为实验组 [$\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{I})$ -c(RGDyK), $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{II})$ -c(RGDyK)] 与对照组 [$\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{I})$, $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{II})$] 随时间延长 T_2 值变化的曲线图。与注射造影剂前肿瘤部位的 T_2 值相比, 随着时间的延长, 实验组 [$\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{I})$ -c(RGDyK), $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{II})$ -c(RGDyK)] T_2 值均逐渐下降, 其中 $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{I})$ -c(RGDyK) 至 8 h 下降至最低点 (下降 27%), $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{II})$ -c(RGDyK) 至 4 h 下降至最低点 (下降 23%), 均呈现出明显的多肽靶向识别效果, 此后随着药物代谢,

T_2 值呈逐渐上升趋势; 而对照组注射纳米颗粒后, 随着血液逐渐分布至肿瘤部位, 肿瘤部位 T_2 值立即下降至最低, 随时间延长 T_2 值呈缓慢上升趋势。

图3 注射不同纳米探针后肿瘤区域的 T_2 值变化曲线图Fig 3 Variations of T_2 values of tumors after the injections of different nano probes

3 讨 论

采用两种不同表面修饰的 Fe_3O_4 作为磁共振造影剂, 并利用其表面羧基与具有靶向识别肿瘤表面受体的 c(RGDyK) 多肽进行耦联, 制备出具有肿瘤靶向性的磁共振分子探针。对 Fe_3O_4 纳米颗粒的表征结果表明, 两种不同表面修饰的纳米颗粒具有相近的尺寸, 但是其表面电性有所区别。体内 MRI 实验结果表明, 两种不同表面修饰的纳米颗粒在肿瘤成像时有所区别, 通过比较这两种纳米颗粒的物理化学性质, 我们认为造成其成像下降最大值时间点有所区别的原因主要在于其表面电位的不同。其中, 表面接近中性的 $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{I})$ 纳米颗粒因具有较长的血液循环时间而使最终达到最佳 T_2 成像效果的时间较长 (8 h), 而表面为负电的 $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{II})$ 纳米颗粒的血液循环时间较短, 最终达到最佳 T_2 成像效果的时间较短 (4 h)。并且, $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{I})$ 纳米颗粒组的 T_2 值在 19 h 时比探针注射前仍有下降, 而 $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{II})$ 纳米颗粒组的 T_2 值则已经基本恢复至正常水平, 进一步说明这两种纳米颗粒由于表面电性不同引起血液循环时间不同而导致了最终肿瘤成像效果的差别。

随着分子成像研究的逐渐深入, 以纳米颗粒为载体分子探针将能够更进一步提高医学成像的灵敏度及准确性, 而纳米颗粒的表面修饰对其在体发挥效应及体内生物代谢的影响作用值得引起关注。

[参考文献]

[1] STARK D D, WEISSLEDER R, ELIZONDO G, et al. Super-

- paramagnetic iron-oxide clinical application as a contrast agent for MR imaging of the liver[J]. Radiology, 1988, 168(2): 297-301.
- [2] QIAO R R, YANG C H, GAO M Y. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications[J]. J Mater Chem, 2009, 19(35): 6274-6293.
- [3] SUN S H, ZENG H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles [J]. J Am Chem Soc, 2002, 124(28): 8204-8205.
- [4] SUN S H, ZENG H, ROBINSON D B, et al. Monodisperse MFe_2O_4 ($\text{M} = \text{Fe}, \text{Co}, \text{Mn}$) nanoparticles [J]. J Am Chem Soc, 2004, 126(1): 273-279.
- [5] LI Z, SUN Q, GAO M Y. Preparation of water-soluble magnetite nanocrystals from hydrated ferric salts in 2-pyrrolidone: Mechanism leading to Fe_3O_4 Angew[J]. Chem Int Ed, 2005, 44(1): 123-126.
- [6] LI Z, WEI L, GAO M Y, et al. One-pot reaction to synthesize biocompatible magnetite nanoparticles [J]. Adv Mater, 2005, 17(8): 1001-1005.
- [7] HUH Y M, JUN Y W, SONG H T, et al. *In vivo* magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals [J]. J Am Chem Soc, 2005, 127(35): 12387-12391.
- [8] HU F Q, WEI L, ZHOU Z, et al. Preparation of biocompatible magnetite nanocrystals for in vivo magnetic resonance detection of cancer[J]. Adv Mater, 2006, 18(19): 2553-2556.
- [9] LEE J H, HUH Y M, JUN Y, et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging [J]. Nat Med, 2007, 13(1): 95-99.
- [10] LIU S J, JIA B, QIAO R R, et al. A novel type of dual-modality molecular probe for MR and nuclear imaging of tumor: Preparation, characterization and *in vivo* application[J]. Mol Pharm, 2009, 6(4): 1074-1082.
- (本文编辑:何彦梅)

· 论 著 ·

羧甲基壳聚糖载药纳米微球的制备及其对
喉肿瘤细胞的杀伤及靶向作用的探测

姚述光, 张文豪, 杨培慧, 蔡继业

(暨南大学 化学系, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 研究羧甲基壳聚糖(CMCS)载药纳米微球的制备及其对肿瘤细胞的杀伤和靶向作用。方法: 将壳聚糖分子上的羟基改性成羧基, 用于化学偶联阿霉素(ADR), 并进一步在载药纳米微球上修饰转铁蛋白(Tf), 制备主动靶向载药纳米微球; 采用MTT(四甲基氮唑蓝)法评价载药纳米微球对喉肿瘤细胞的杀伤率; 应用原子力显微镜(AFM)对载药纳米微球作用后喉肿瘤细胞表面超微结构的变化进行形态学观察。结果: 载药纳米微球对喉肿瘤细胞的杀伤率比同剂量的ADR提高了31%, 表面进一步修饰Tf后其杀伤率比同剂量ADR提高了41%。ADR与载药纳米微球对喉肿瘤细胞的细胞膜表面超微结构的影响存在较大的差异。结论: 载药纳米微球在肿瘤细胞表面受吸附或受体介导的内吞作用, 致使微球在细胞表面的释药机制不同于单独药物的扩散模型, 从而明显提高对肿瘤细胞的杀伤率, 这对探讨药物的作用机制和靶向药物的研发具有重要的指导意义。

[关键词] 壳聚糖; 纳米微球; 喉肿瘤细胞; 原子力显微镜; 四甲基氮唑蓝

[中图分类号] R979.1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-6264(2011)01-0066-06

doi:10.3969/j.issn.1671-6264.2011.01.014

[收稿日期] 2010-10-28 [修回日期] 2010-12-02

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(21071064, 30828028); 科技部973项目基金资助项目(2010CB833603)

[作者简介] 姚述光(1987-), 男, 贵州天柱人, 在读硕士研究生。E-mail: yaoshuguang2005@163.com

[通信作者] 杨培慧 E-mail: typh@jnu.edu.cn