

[文章编号] 1007-7669(2009)04-0268-05

生物素化全氟碳纳米颗粒荷载药物体外释放和磁共振影像观察

周兆熊^a, 张柏根^a, 张皓^a, 孙黎^b, 王晓珉^b, 张纪蔚^a

(上海交通大学医学院附属仁济医院 a. 血管外科; b. 药剂科, 上海 200001)

[关键词] 氟碳化合物; 纳米粒子; 血管内膜; 磁共振成像; 缓释

[摘要] 目的 制备生物素化全氟碳载药纳米颗粒, 分析纳米载药的释放特点及其对磁共振信号强度的影响。方法 以全氟碳为纳米核心, 通过高压均质方法, 分别包被抗内膜增生药物地塞米松磷酸钠或醋酸地塞米松, 以及磁共振造影剂钆喷酸葡胺。采用扫描电镜和激光粒度分析仪检测纳米颗粒形态和粒径, 高效液相色谱仪测定纳米颗粒载药包封率和体外溶出情况, 同时观察磁共振影像及波谱信号强度变化。结果 地塞米松磷酸钠和醋酸地塞米松全氟碳纳米粒径分别为 (224 ± 6) 和 (236 ± 9) nm。荷载亲水性地塞米松磷酸钠药物的包封率为 $(66.4 \pm 1.0)\%$, 并有一定突释现象, 首日溶出比率为 77.2%; 荷载疏水性醋酸地塞米松药物的包封率为 $(95.3 \pm 1.3)\%$, 首日溶出比率为 23.6%。全氟碳纳米颗粒荷载 2 种药物体外溶出时间都超过 1 wk。全氟碳纳米颗粒携带顺磁性造影剂钆喷酸葡胺, 可增加后者的信号强度约 16%。结论 全氟碳纳米颗粒荷载药物具有较好的缓释性, 并能增加磁共振造影剂的信号强度, 提高磁共振检测敏感性。

[中图分类号] R318 [文献标志码] A

Sustained release of drug loaded within biotinylated perfluorocarbon nanoparticles and use in magnetic resonance imaging

ZHOU Zhao-xiong^a, ZHANG Bai-gen^a, ZHANG Hao^a, SUN Li^b, WANG Xiao-min^b, ZHANG Ji-wei^a
(a. Department of Vascular Surgery; b. Department of Pharmacy, Renji Hospital, Affiliated to Jiaotong University School of Medicine, SHANGHAI 200001, China)

[KEY WORDS] fluorocarbons; nanoparticles; tunica intima; magnetic resonance imaging; sustained release

[ABSTRACT] AIM To investigate the *in vitro* release profile of loading drugs encapsulated within the perfluorocarbon (PFC) nanoparticles (NPs) and its ability of enhancing magnetic resonance imaging (MRI). METHODS Dexamethasone sodium phosphate (DxP) or dexamethasone acetate (DxA), and gadopentetate dimeglumine (Gd-DTPA) loaded within biotinylated PFC NPs were constructed by high pressure homogeneous processing method. The morphology and size of NPs were examined by scanning electron microscope (SEM) and laser particle size analyzer. Drug loading and *in vitro* releasing were assessed by high performance liquid chromatography (HPLC). MRI was used to observe the imaging and signal intensity of contrast within the NPs. RESULTS The particle size of DxP-NP and DxA-NP were (224 ± 6) and (236 ± 9) nm, respectively. The encapsulation efficiency (EE) of DxP-NP were $(66.4 \pm 1.0)\%$, with an obviously bursting phenomenon, the initial releasing rate were 77.2%, while the EE of DxA-NP were $(95.3 \pm 1.3)\%$, the initial releasing were

[收稿日期] 2008-11-23 [接受日期] 2009-01-19

[基金项目] 上海市科学技术委员会科研计划项目 (编号: 0552nm024)

[通讯作者] 张纪蔚 (1953—), 男, 教授, 主任医师, 主要从事动脉重建再狭窄机理研究。E-mail: zhangjiwei001@sina.com

23.6%。Both of the two NPs could release persisted over one week. The NPs loading Gd-DTPA could enhance the signal intensity of Gd-DTPA about 16% detected by MRI. CONCLUSION PFC NPs loaded with hydrophilic drug have relatively high encapsulation efficiency and sustained release pattern. Contrast loaded within NPs could enhance the signal intensity detected by MRI.

纳米载体具有药物靶向和控释特点已成为新型药物输送系统研究的热点^[1]。纳米颗粒载药方式, 采用特殊材料作为纳米核心, 外层脂质中的磷脂为表面活性剂, 以保证纳米系统在循环中保持形态和功能的稳定性^[2]。同时, 脂质层可作为载药基质携带分子探针、治疗药物、影像检查造影剂等发挥作用。全氟碳(perfluorocarbon, PFC)结构与碳氢化合物相似, 但所有氢原子被氟原子替代, 是一种超顺磁性材料。它无色无味, 不导电也不助燃, 具有一定的挥发性, 化学性质稳定, 体内代谢不会降解, 没有毒性^[3]。其很好的化学惰性、较高的生物相容性和稳定性使之被用于人造血液^[4]、呼吸窘迫时液态肺灌洗治疗^[5]和磁共振分子影像造影剂^[6]。

本研究拟采用全氟碳作为纳米颗粒核心, 构建生物素化全氟碳纳米载药系统, 同时荷载治疗药物(地塞米松磷酸钠或醋酸地塞米松)和造影剂[钆喷酸葡胺(Gd-DTPA)], 探讨这种纳米载药系统的表观特征, 荷载治疗药物的离体缓释能力, 以及作为磁共振造影剂的影像检测能力。

材料和方法

材料和仪器 全氟碳购自美国 Gateway Specialty Chemicals 公司。生物素化磷脂酰乙醇胺购自上海华美生物试剂公司。胆固醇、卵磷脂、红花油购自美国 Sigma 公司。地塞米松磷酸钠和醋酸地塞米松购自上海通用药业, 地塞米松磷酸钠和醋酸地塞米松标准品购自中国药品生物制品检定所。Gd-DTPA 购自德国 Schering 公司。三氯甲烷为分析纯, 甲醇、三乙胺为色谱纯, 均购自国药集团化学试剂公司。

NanoGenizer 型号高压均质机(苏州微流纳米生物技术有限公司), VC-130BP 超声细胞破碎仪(美国 Sonic 公司产品), Rotavapor R200 旋转蒸发器(德国 Bochi 公司产品), Nicomp380 Z3000 粒度分析仪(州微流纳米生物技术有限公司), Avanti 3D 低温高速离心机(美国 Beckman 公司产品), 240/740 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司产品), 色谱柱

diamonsil C18 (5 μm , 150 mm \times 4.6 mm), THC-D 台式恒温振荡器(太仓市实验仪器厂)。

高压均质方法制备全氟碳载药纳米颗粒 精密称取醋酸地塞米松药粉 100 mg 或量取 0.5% 地塞米松磷酸钠溶液 4 mL, 分别加入胆固醇 0.6 g、卵磷脂 1.2 g、生物素化磷脂酰乙醇胺 20 mg、Gd-DTPA 5 mL 和三氯甲烷 30 mL, 通风橱内充分振荡溶解。溶液在旋转蒸发仪内 35 $^{\circ}\text{C}$ 真空水浴制成均匀药膜, 再分别加入全氟碳 20 mL 和红花油 1 mL。细胞破碎仪内超声振荡制成微乳, 加去离子水定容至 100 mL。置入高压均质机内, 低压(0.7 kPa)循环 3 次, 高压(1.5 kPa)循环 5 次, 制成全氟碳载药纳米颗粒乳液^[7,8]。

粒径分析和 zeta 电位测定 取纳米颗粒乳液 100 μL , 稀释 20 倍, 超声分散 5 min, 制得分散液。激光粒度仪进行纳米粒径和 zeta 电位测试。条件为: HeNe 激光波长 633 nm, 电位梯度 10 V \cdot cm⁻¹, 散射角 9 $^{\circ}$, 测定温度 20 $^{\circ}\text{C}$ 。

扫描电镜观察全氟碳载药纳米药物颗粒形态 载玻片超声清洗后, 分别在异丙醇、甲醇和丙酮中浸洗 10 min, 3 次。将纳米样品滴在玻片上, 令其自由扩散, 室温干燥 2 h, 然后将载药全氟碳纳米样品置于负压(0.1 \times 10⁻⁶ kPa)中 5 min, 充氩气后喷金 4 次, 每次间隔 30 s。扫描倍数 2 000 至 28 000 倍。

线性实验 精密称取地塞米松磷酸钠和醋酸地塞米松标准品 10 mg, 分别置入 50 mL 容量瓶内。前者用去离子水稀释, 后者用甲醇稀释, 定容至 50 mL。精密移取标准品溶液, 分别用流动相稀释, 地塞米松磷酸钠浓度分别为 12.5、6.25、3.125 和 1.56 mg \cdot L⁻¹; 醋酸地塞米松浓度分别为 56、28、14、7、3.5 和 1.75 mg \cdot L⁻¹。两者各取 20 μL 溶液注入液相色谱仪, 记录峰面积, 以峰面积 A 对药物浓度 ρ (mg \cdot L⁻¹) 进行线性回归分析。

HPLC 检测色谱条件参照文献 [9]: 色谱柱 diamonsil C18, 地塞米松磷酸钠和醋酸地塞米松检测波长均为 240 nm。地塞米松磷酸钠流动相: 甲醇-三乙胺-0.02 mol \cdot L⁻¹ 磷酸二氢钾 (70 : 2 : 28, $V : V : V$, pH 3.0)。醋酸地塞米松流动相: 甲醇-

去离子水 (74 : 26, V : V)。流动相速度均为 1 mL·min⁻¹, 检测温度 37 ℃。

全氟碳纳米荷载治疗药物包封率 (EE) 测定 取纳米样品 100 μL, 加入甲醇 900 μL, 充分振荡溶解, HPLC 检测得出纳米药物总量 (E₁)。取纳米样品 1 mL 置入微量离心管, 64 000 × g 离心 1 h, 取上清液, HPLC 检测得游离药物总量 (E₂)。纳米药物包封率 EE = (E₁ - E₂) / E₁。HPLC 检测同上。

全氟碳载药纳米颗粒药物溶出实验 半透膜 Membrera-cell (分子截留量 14 000), 置于 2% (W/V) 碳酸氢钠和 1 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0) 溶液中煮沸 10 min, 再用蒸馏水漂洗 10 min 后置入 1 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0) 煮沸 10 min, 冷却至 4 ℃浸没存放。精密量取载有地塞米松磷酸钠或醋酸地塞米松的纳米颗粒乳液 5 mL 置入半透膜中, 两端锁扣夹紧。半透膜放入浓度为 0.5 g·L⁻¹ 人体清蛋白生理盐水 200 mL 中, 恒温摇床设定为 20 ℃, 每分钟振荡 60 次。在设定时间内提取溶液标本, 并补充等量溶液, 溶液标本 -20 ℃冻存。实验重复 3 次。HPLC 检测同上。

磁共振影像及和波谱信号强度检测 取 10 个直径为 10 cm 的聚丙烯培养皿, 分别加入 2% 琼脂糖溶液 20 mL。10 个培养皿 2 个一组分成 5 组, 分别加入 Gd-DTPA 5 μL、全氟碳 20 μL、Gd-DTPA 5 μL + 全氟碳 20 μL、生素化全氟碳纳米颗粒乳液 100 μL [20% (V/V) 全氟碳, 5% (V/V) Gd-DTPA] 和无任何药物 (空白对照)。10 个培养皿同时采用 Philips 3.0T 磁共振检测, 参数为: TR 500 ms, TE 10 ms。影像观察同时记录波谱信号强度。

统计学方法 采用 SPSS 10.0 统计软件, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对数据进行正态分布检验, 两变量差异采用单因素方差分析。以 0.05 为检验水准, $P < 0.05$ 认为差异显著。

结 果

地塞米松磷酸钠和醋酸地塞米松全氟碳载药纳米颗粒表征分析结果 地塞米松磷酸钠全氟碳载药纳米颗粒成球状, 大小较为均匀; 醋酸地塞米松全氟碳载药纳米颗粒表面光整, 没有药物结晶。见图 1。

地塞米松磷酸钠和醋酸地塞米松全氟碳载药

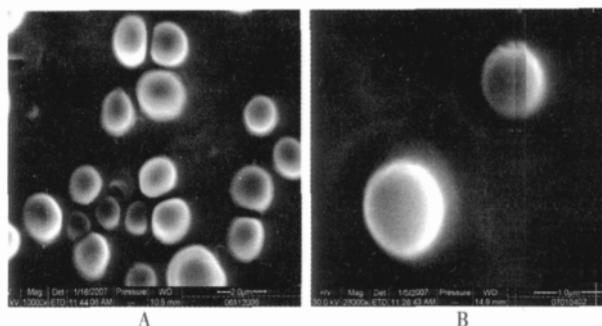


图 1 电镜扫描显示全氟碳载药纳米颗粒的表征 A: 地塞米松磷酸钠全氟碳纳米颗粒 (× 10 000); B: 醋酸地塞米松全氟碳纳米颗粒 (× 280 000)

纳米颗粒的纳米粒径均成单峰样正态分布, 平均粒径分别为 (224 ± s 6) 和 (236 ± 9) nm。见图 2。地塞米松磷酸钠与醋酸地塞米松全氟碳纳米颗粒径相似, 差异不显著 ($P > 0.05$)。但醋酸地塞米松全氟碳纳米颗粒的 zeta 电位高 1 倍, 有较高的系统稳定性, 结果见表 1。

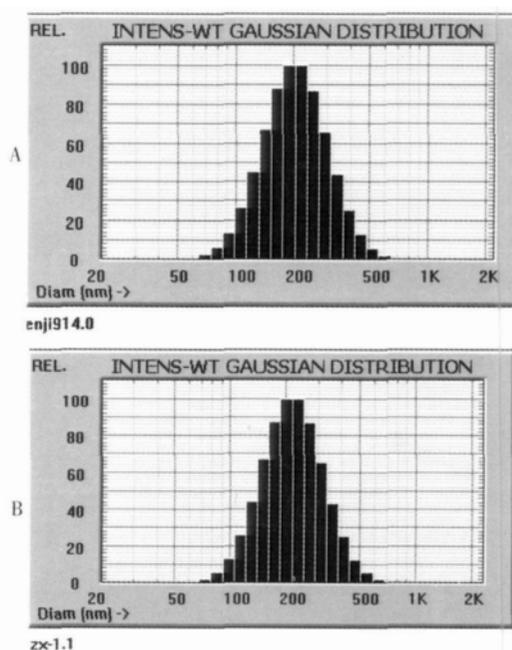


图 2 激光粒度仪分析全氟碳载药纳米颗粒粒径分布图 A: 地塞米松磷酸钠全氟碳纳米颗粒; B 醋酸地塞米松全氟碳纳米颗粒

表 1 地塞米松磷酸钠和醋酸地塞米松全氟碳纳米颗粒表征分析结果

纳米颗粒	粒径/nm	zeta 电位绝对值/mV
地塞米松磷酸钠	224 ± 6	18.0 ± 1.7
醋酸地塞米松	236 ± 9 ^a	43.0 ± 2.3 ^b

经单因素方差分析, 两两比较: 与地塞米松磷酸钠纳米颗粒比较, $^a P > 0.05$, $^b P < 0.01$

全氟碳纳米荷载治疗药物包封率检测结果 地塞米松磷酸钠标准品在 1.56 ~ 12.5 mg·L⁻¹ 范围内, 浓度与峰面积成线性关系 ($r^2 = 0.999 4$), 回归方

程为: $\rho = 4.264 \times 10^{-5} A - 0.0306$; 醋酸地塞米松标准品在 $1.75 \sim 56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 浓度与峰面积成线性关系 ($r^2 = 0.9991$), 回归方程为: $\rho = 2.2416 \times 10^{-5} A - 0.005789$ 。HPLC 检测全氟碳纳米颗粒治疗药物的峰面积, 对照标准品测定所得回归方程, 并根据包封率测定公式, 得到荷载治疗药物包封率。地塞米松磷酸钠纳米颗粒的包封率为 $(66.4 \pm 1.0)\%$, 醋酸地塞米松纳米颗粒的包封率为 $(95.3 \pm 1.3)\%$ 。

全氟碳纳米颗粒荷载治疗药物体外溶出实验结果 地塞米松磷酸钠全氟碳纳米早期突释现象明显, 首日药物释放比率为 77.2% 。由于地塞米松磷酸钠在释放环境中有一定降解, 因此累积释放比率有一定下降, 但 1 wk 后仍有约 10% 药物未完全释放。醋酸地塞米松全氟碳纳米颗粒早期突释程度较轻, 约为 23.6% , 以后逐日释放比率接近线性关系, 有较好的缓释特性。见图 3。

磁共振影像及和波谱信号强度检测结果 磁共振影像观察结果见图 4 A。单纯全氟碳 (第 5、6 条带) 没有影像增强作用, 影像效果与空白对照组 (第 1、2 条带) 相似。单纯 Gd-DTPA 组 (第 3、4 条带) 与 Gd-DTPA + 全氟碳组 (第 9、10 条带)

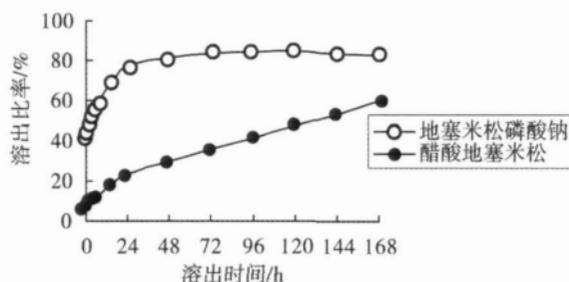


图 3 地塞米松磷酸钠和醋酸地塞米松全氟碳纳米颗粒体外溶出情况

影像效果接近。全氟碳载药纳米颗粒 (第 7、8 条带), 成像信号均匀, 有明显影像增强效果。

磁共振记录各造影剂波谱信号相对强度 (均值) 见图 4B, 依次为: 空白对照组 630, Gd-DTPA 1 375, 全氟碳 590, 全氟碳载药纳米颗粒 1 600, Gd-DTPA + 全氟碳 1 385。全氟碳载药纳米颗粒信号强度是对照组的 2.5 倍, 比单纯 Gd-DTPA 信号强度增加 16% 。

讨 论

本研究中的全氟碳纳米颗粒采用高压均质制

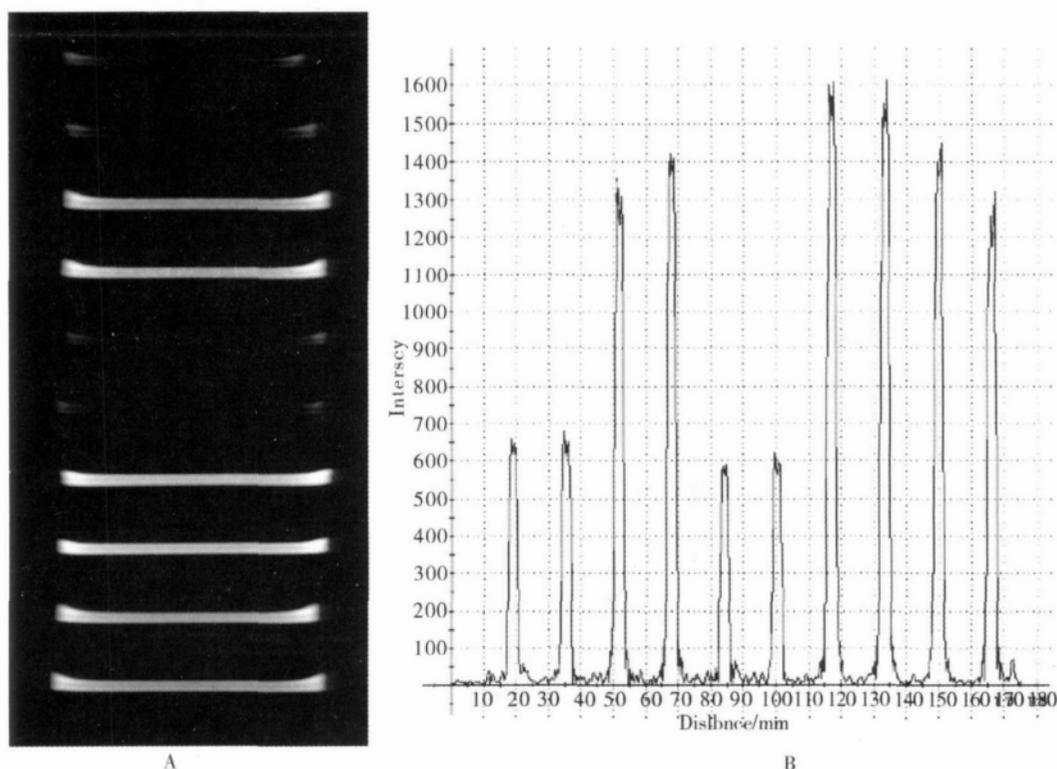


图 4 磁共振影像及波谱信号强度检测结果 A 为磁共振观察各造影剂图像, 从上至下第 1、2 条带为空白对照, 第 3、4 条带是钆喷酸葡胺, 第 5、6 条带是全氟碳, 第 7、8 条带是全氟碳载药纳米颗粒, 第 9、10 条带是钆喷酸葡胺+全氟碳; B 为磁共振造影剂信号强度波谱图, 排列次序从左至右与左图影像观察上下次序相同, 横坐标为间隔距离 (mm)

备方法, 在高压 (1.4 kPa) 下将微粉化药物和表面活性剂溶液通过孔隙挤出, 局部产生气穴和爆裂, 以使药物微粉进一步崩碎。经多次循环, 可得到粒径在 100 ~ 1 000 nm 之间的纳米颗粒。本研究制备的全氟碳纳米颗粒, 无论是荷载地塞米松磷酸钠或醋酸地塞米松, 平均粒径都小于 250 nm, 两者无显著差异 ($P > 0.05$)。SONG 等^[10]和 FLACKE 等^[11]研究发现, 纳米载体药物输送系统, 如果粒径小于 300 nm, 则更容易透过血管内膜, 对于抑制血管平滑肌细胞的靶向治疗有很大帮助。

本研究发现, 全氟碳纳米颗粒体系中, 水溶性地塞米松磷酸钠药物包封率比脂溶性醋酸地塞米松低, 两者差异显著 ($P < 0.05$)。全氟碳纳米颗粒表面的脂质层可促进醋酸地塞米松溶解, 药物即使离开纳米表面还能重新被吸附。相反, 地塞米松磷酸钠在脂质中溶解度低, 一旦离开纳米表面, 溶液中的表面活性剂就会占据, 因此纳米颗粒乳液中有较多的游离药物。药物包封率和化学性质决定了纳米荷载药物的溶出特性。水溶性药物如地塞米松磷酸钠, 在纳米颗粒中保留能力较低, 1 d 约有 70% 药物溶出。醋酸地塞米松全氟碳纳米颗粒早期突释程度较轻, 以后逐日溶出比率接近线性关系。以上实验表明, 全氟碳纳米颗粒荷载水溶性药物有较明显突释现象, 有利于需要首剂加强的药物治疗, 而荷载脂溶性药物, 可以保持较长的药物溶出时间, 有利于提高药物的生物利用效率。

磁共振分子影像造影剂应具有非常高的信噪比, 能分辨极低浓度 (如纳摩尔或皮摩尔) 的生物标记^[12]。本实验选用全氟碳作为纳米载体, 因为全氟碳是一种超顺磁性材料, 可增加顺磁性造影剂, 如钆剂的信号强度。研究结果发现, 液态全氟碳波谱信号强度与空白对照组基本相同, 说明全氟碳本身没有顺磁作用, 但制备成纳米颗粒携带钆剂等顺磁物质后, 可明显增加后者的信号强度 (约 16%)。液态全氟碳与钆剂简单混合, 并不能明显改善磁共振信号强度, 钆剂必须与超顺磁性物质紧密结合, 才能提高磁共振检测灵敏度。

本研究的最终目标是制备一种具有靶向治疗和分子影像功能的纳米药物载体。因此, 在这个纳米载体系统中, 荷载的药物包括有抗内膜增生

药物地塞米松磷酸钠或醋酸地塞米松, 以及磁共振造影剂 Gd-DTPA 和能借助生物素-亲和素系统与生物素化抗体连接的磷脂酰乙醇胺。本实验通过高压均质法制备的生物素化全氟碳载药纳米颗粒, 表观特征符合设计要求, 全氟碳纳米荷载药物具有较好的缓释性, 并可以增加磁共振造影剂的信号强度, 提高磁共振检测敏感性, 这些结果为进一步的体内研究提供了依据。

[参考文献]

- [1] 毛世瑞, 毕殿洲. 固脂纳米粒药物释放系统的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(6): 455-460.
- [2] RIESS JG. Understanding the fundamentals of perfluorocarbons and perfluorocarbon emulsions relevant to *in vivo* oxygen delivery [J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2005, 33(1): 47-63.
- [3] MULDER WJ, STRIJKERS GJ, GRIFFIOEN AW, *et al.* A liposomal system for contrast-enhanced magnetic resonance imaging of molecular targets[J]. *Bioconjug Chem*, 2004, 15(4): 799-806.
- [4] HAMILTON MC, PEEK GJ, DUX AE. Partial liquid ventilation [J]. *Pediatr Radiol*, 2005, 35(11): 1152-1156.
- [5] LANZA GM, WINTER P, CARUTHERS S, *et al.* Novel paramagnetic contrast agents for molecular imaging and targeted drug delivery[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2004, 5(6): 495-507.
- [6] LANZA GM, WALLACE KD, SCOTT MJ, *et al.* A novel site-targeted ultrasonic contrast agent with broad biomedical application[J]. *Circulation*, 1996, 94(12): 3334-3340.
- [7] LANZA GM, YU X, WINTER PM. Targeted antiproliferative drug delivery to vascular smooth muscle cells with a magnetic resonance imaging nanoparticle contrast agent [J]. *Circulation*, 2002, 106(22): 2842-2847.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典; 二部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 185, 842.
- [9] GUZMAN LA, LABHASETWAR V, SONG C. *et al.* Local intraluminal infusion of biodegradable polymeric nanoparticles. A novel approach for prolonged drug delivery after balloon angioplasty[J]. *Circulation*, 1996, 94(6): 1441-1448.
- [10] SONG C, LABHASETWAR V, MURPHY H. *et al.* Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery[J]. *J Controlled Release*, 1997, 43(2): 197-212.
- [11] FLACKE S, FISCHER S, SCOTT MJ, *et al.* A novel MRI contrast agent for molecular imaging of fibrin: implications for detecting vulnerable plaques[J]. *Circulation*, 2001, 104(11): 1280-1285.