

靶向相变型载药纳米造影剂的制备及其基本性能和显像特性检测

刘建新 柳阳 彭万宏

摘要 **目的** 制备一种叶酸靶向相变型载羟基喜树碱(HCPT)的纳米粒(FA-HCPT-Fe₃O₄-PFP NDs),检测其基本性能和多模态显像特性。**方法** 采用旋转蒸发-超声法制备FA-HCPT-Fe₃O₄-PFP NDs。于制备后不同时间点使用电子显微镜测定纳米粒粒径以检测其稳定性;将纳米粒乳液加热后置于显微镜下观察其相变特性,高效液相色谱法检测纳米粒内药物(HCPT)的载药量。检测观察纳米粒对富含叶酸受体的SKOV3肿瘤细胞的寻靶能力。对不同浓度纳米粒制备成的凝胶块进行光声成像及MRI;使用低强度聚焦超声(LIFU)辐照纳米粒乳液后行超声成像,分别验证其增强光声、MRI及超声成像的能力。**结果** 制备的FA-HCPT-Fe₃O₄-PFP NDs性质稳定,HCPT载药量为(8.33±0.57)%,包封率为(60.51±2.33)%,加热后可发生液气相变。体外寻靶实验证实该纳米粒对富含叶酸受体的SKOV3肿瘤细胞局部有良好的靶向性。体外多模态显像增强实验结果表明该纳米粒可以明显增强超声、光声及MRI的显影能力。**结论** 本实验所制备的FA-HCPT-Fe₃O₄-PFP NDs具备多模态造影剂的功能,是一种极具潜力的分子探针。

关键词 纳米粒;靶向;相变;载药;造影剂

[中图法分类号]R445.1

[文献标识码]A

Preparation of targeted and phase-shifted nano-scaled contrast agents loaded with drug and detection of the basic performance

LIU Jianxin, LIU Yang, PENG Wanhong

Department of Ultrasound, the Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430014, China

ABSTRACT **Objective** To prepare phase-shifted folate-modified and HCPT-loaded nanodroplets (FA-HCPT-Fe₃O₄-PFP NDs), and to investigate the properties and multimodality imaging in vitro. **Methods** The FA-HCPT-Fe₃O₄-PFP NDs were prepared through the rotary evaporation and sonication process. The size and the stability of FA-HCPT-Fe₃O₄-PFP NDs were detected at different time point after preparation. The phase transition characteristic of the nanodroplets was detected. Drug loading was determined with reverse-phase high-performance liquid chromatographic system. Targeting efficiency of FA-HCPT-Fe₃O₄-PFP NDs was validated with cell experiment. Photoacoustic and magnetic resonance imaging were performed on the gel blocks prepared by different concentrations of nanoparticles. Ultrasonic imaging was performed after irradiation of the nanoparticle emulsion with LIFU. The above experiments were used to verify the ability of nanoparticles to enhance photoacoustic imaging, MRI and ultrasound imaging. **Results** The prepared nanodroplets were stable, the drug loading was (8.33±0.57)%, and encapsulation efficiency was (60.51±2.33)%. Phase-transition was observed of FA-HCPT-Fe₃O₄-PFP NDs with elevated temperature. Targeting experiments in vitro confirmed that the nanoparticles had good targeting ability to SKOV3 tumor cells rich in folate receptors. FA-HCPT-Fe₃O₄-PFP NDs nanoemulsions showed obvious photoacoustic signal, MRI signal and ultrasound signal in vitro. **Conclusion** FA-HCPT-Fe₃O₄-PFP NDs, the successfully fabricated multimodal contrast agent is a molecular probe with great potential.

KEY WORDS Nanodroplets; Targeting; Phase transition; Drug loading; Contrast agent

基金项目:湖北省自然科学基金面上项目(2018CFB601);湖北省卫健委面上项目(WJ2019M030);武汉市卫健委面上重点项目(WX18B11)

作者单位:430014 武汉市,华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院超声诊断科(刘建新、柳阳);湖北省中西医结合医院放射科(彭万宏)

通讯作者:彭万宏, Email: 15956322@qq.com

超声、CT、MRI、光声成像等各种医学影像技术在检查敏感性、分辨率等方面各具优缺点^[1]。目前各种医学影像技术均有其各自的影像造影剂。尽管各种造影剂对疾病的诊疗发挥了一定的作用,但仍然不能突破单一影像技术的局限性。随着现代医学影像技术的不断发展,寻求多模态多功能影像造影剂从而实现多种医学影像技术的优势互补,提高影像诊疗的精准度,已成为现代医学的研究热点^[2]。本实验以叶酸修饰的磷脂和胆固醇的混合物为成膜材料,将超顺磁性氧化铁(Fe_3O_4)纳米颗粒和羟基喜树碱(HCPT)装载于壳层中,液态氟碳全氟戊烷(PFP)包裹于壳层内,制备叶酸靶向相变型载羟基喜树碱的纳米粒(FA-HCPT- Fe_3O_4 -PFP NDs),并检测其各种理化特性及其增强超声、光声、MRI的显影能力,为后续的实验提供基础。

材料与方法

一、实验材料及仪器

1. 主要试剂和细胞:氢化大豆卵磷脂、偶联叶酸的磷脂、二棕榈酰磷脂酰甘油(美国 Avanti 公司),胆固醇[生工生物工程(上海)股份有限公司],HCPT(远大医药黄石飞云制药有限公司),油酸氧化铁纳米颗粒(OA- Fe_3O_4 , 美国 Ocean Nano Tech 公司),PFP(美国 Sigma 公司);SKOV3 肿瘤细胞(重庆医科大学超声影像学研究所)

2. 主要实验仪器:RE-5298 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),VX130 声振仪(美国 Heat System 公司),5840R 低温离心机(湖南凯达科学仪器有限公司),IX53 光学显微镜(上海赛默飞世尔科技有限公司),S-3400N 电子显微镜(日立公司),低强度聚焦超声(LIFU)仪(重庆医科大学超声影像学研究所),MyLab 90 彩色多普勒超声诊断仪(意大利百胜医疗集团),Achieva 3.0T 磁共振仪(荷兰 Philips 公司)。

二、纳米粒的制备

将氢化大豆卵磷脂、偶联叶酸的磷脂、二棕榈酰磷脂酰甘油、胆固醇及 HCPT 以一定的质量比(10:4:3:3:2)称取后加入圆底烧瓶,同时加入 OA- Fe_3O_4 ,用甲醇和三氯甲烷加热溶解。约 20 min 后将上述圆底烧瓶固定于旋转蒸发仪上去除有机溶剂(时间 120 min),然后加入 PBS 洗脱水化,全程冰浴条件下逐滴加入液态氟碳 PFP 200 μl ,并使用声振仪乳化,得到均匀的乳白色混悬液。应用低温离心机在 4℃ 条件下离心洗涤 3 次,所得即为 FA-HCPT- Fe_3O_4 -PFP NDs,置于 4℃ 冰

箱保存备用。使用非偶联叶酸的磷脂替代偶联叶酸的磷脂即制备成非靶向纳米粒,不加入 OA- Fe_3O_4 则制备成不含 Fe_3O_4 的纳米粒。

三、纳米粒基本性能检测

1. 基本性能检测:在光学显微镜及电子显微镜下观察纳米粒的形态。于不同时间点(制备后 6、12、18、24、30、36、42、48 h)分别取样检测 FA-HCPT- Fe_3O_4 -PFP NDs 的粒径。加入三氯甲烷和甲醇进行破球和溶解药物,离心分离取上清液,使用反相高效液相色谱法检测其内 HCPT 含量。

2. 热致相变研究:取制备好的 FA-HCPT- Fe_3O_4 -PFP NDs 乳液稀释 100 倍后滴加于玻片上,并置于加热板内,调节温度分别为 40℃、45℃、50℃ 和 55℃,于光学显微镜下观察纳米粒的热致相变情况并记录。

四、体外寻靶实验及分组

将富含叶酸受体的 SKOV3 肿瘤细胞种植在共聚焦专用培养皿内,与红色荧光染料 DiI 标记的 FA-HCPT- Fe_3O_4 -PFP NDs(靶向组)和不带叶酸的非靶向纳米粒(非靶向组)共孵育 40 min,然后用 PBS 冲洗,加入多聚甲醛固定肿瘤细胞。随后依次加入荧光染料 DiO 和 DAPI,并避光送检。拮抗组采用游离叶酸与培养皿内 SKOV3 细胞共孵育,然后加入荧光标记的 FA-HCPT- Fe_3O_4 -PFP NDs,并依次进行固定、染色。于激光共聚焦显微镜下观察各组染色情况。

五、体外多模态显像增强实验及分组

1. 增强超声成像:取 2 ml FA-HCPT- Fe_3O_4 -PFP NDs 乳液置入凝胶模型,使用 LIFU 仪探头对凝胶模型内乳液进行辐照。设置辐照参数:脉冲模式,辐照强度 3.2 W/cm²,辐照时间 1 min。然后取少许纳米粒乳液于光学显微镜下观察纳米粒粒径变化,了解其相变情况。最后使用彩色多普勒超声诊断仪(探头频率 12 MHz,机械指数 0.06)对凝胶模型内纳米粒乳液进行超声显像,使用灰阶模式和造影模式观察其在辐照前后超声显影情况,并应用重庆医科大学 DFY 软件测量其声强。

2. 增强光声成像:采用凝胶溶液稀释制备的 FA-HCPT- Fe_3O_4 -PFP NDs 乳液,按最终混合液内 Fe_3O_4 浓度将其分为 3 组:0.5 mg/ml 组、1.0 mg/ml 组和 2.0 mg/ml 组,分别制作成凝胶块并标记,以不加纳米粒乳液的凝胶作为对照组,分别行光声成像并记录光声值。光声仪激光激发波长为 680~950 nm,激发深度约 1 cm。

3. 增强 MRI:取脱气水作为对照组 I (I),不含纳米粒的 1% 凝胶作为对照组 II (II)。将 FA-HCPT-

Fe₃O₄-PFP NDs 乳液用1% 凝胶稀释成不同的浓度作为实验组,记为:Ⅲ(5 μg/ml)、Ⅳ(10 μg/ml)、Ⅴ(20 μg/ml)、Ⅵ(40 μg/ml)、Ⅶ(80 μg/ml)、Ⅷ(160 μg/ml)、Ⅸ(320 μg/ml)、Ⅹ(640 μg/ml)、Ⅺ(1280 μg/ml)、Ⅻ(2560 μg/ml)。使用荷兰 Philips 公司磁共振仪,采用 T2 加权系列,设置扫描参数:TR 30.2 ms, TE 9.2 ms, flip 45°, FOV 160 mm, slice thickness 3.0 mm。测量每组磁共振信号强度,测量3次取平均值。

结 果

一、纳米粒基本性能检测

不含 Fe₃O₄ 的纳米粒乳液外观呈乳白色,含 Fe₃O₄ 的纳米粒乳液呈黑褐色(图 1A)。光学显微镜下制备好的 FA-HCPT-Fe₃O₄-PFP NDs 呈球形,大小均一,分布均匀(图 1B);激光共聚焦显微镜下纳米粒呈球形或点状(图 1C)。马尔文仪测得纳米粒平均粒径约(321.20±67.21) nm, 电位约-50 mV。透射电镜显示 Fe₃O₄ 颗粒在纳米粒内呈黑色小颗粒状(图 1D),而不

含 Fe₃O₄ 颗粒的纳米粒内未见黑色小颗粒(图 1E)。高效液相色谱法测得药物包封率和载药量分别为(60.51±2.33)%、(8.33±0.57)%。储存在 4℃ 冰箱内的纳米粒在 48 h 内呈现出良好的稳定性,其粒径大小变化见图 1F。

二、纳米粒热致相变结果

在 40℃ 时,无气泡产生;45℃ 时镜下可见气泡,已发生相变;50℃ 时,可见大量气泡产生;55℃ 时镜下仅可见少许残留大气泡。见图 2。

三、体外寻靶实验结果

在激光共聚焦显微镜下,经荧光染料 DAPI 染色后的细胞核呈蓝色荧光,经 DiO 染色后的细胞膜呈绿色荧光,经 DiI 染色后的纳米粒呈红色荧光。靶向组镜下可见较多红色荧光聚集在细胞膜周围,而在非靶向组和拮抗组的细胞膜周围未见明显红色荧光聚集。见图 3。

四、体外多模态显像增强实验结果

本实验使用不同浓度的纳米粒乳液进行体外光声

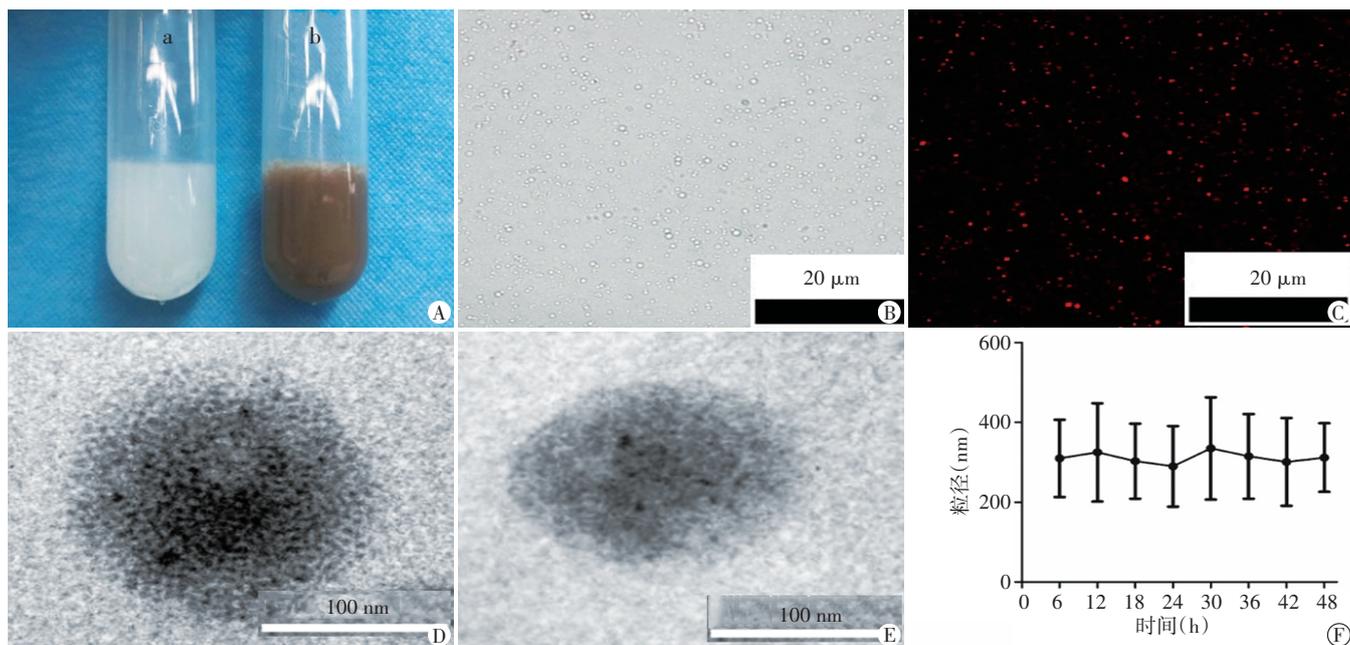


图 1 FA-HCPT-Fe₃O₄-PFP NDs 基本性能检测

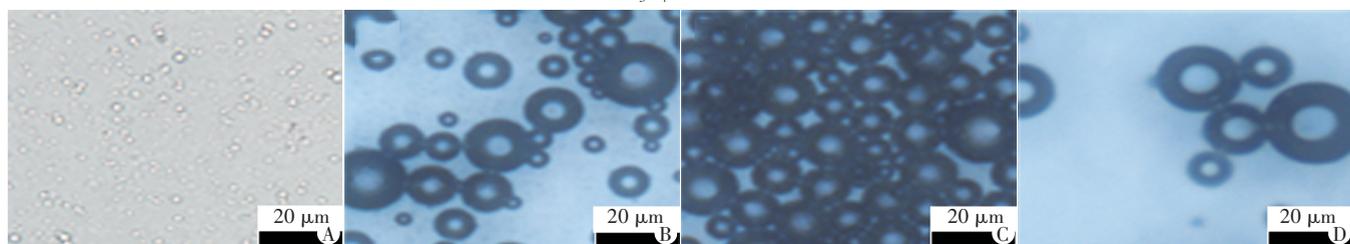
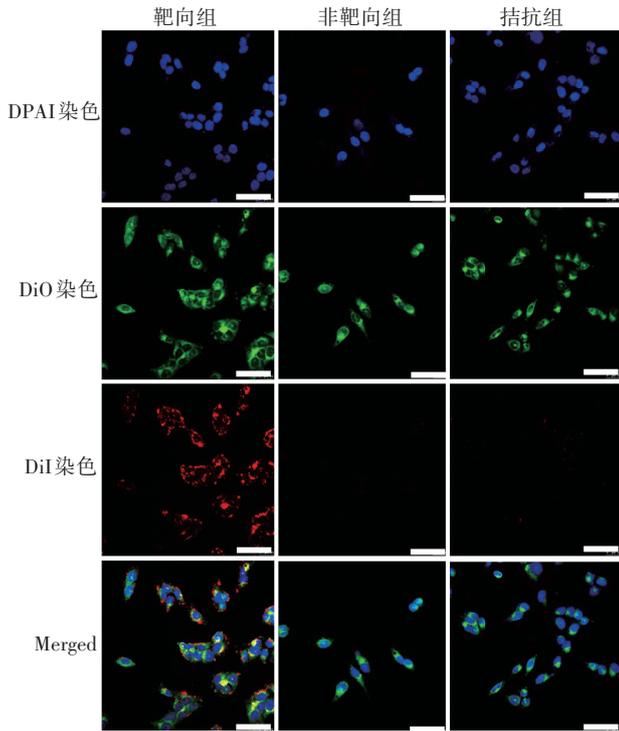


图 2 不同温度下纳米粒的热致相变光学显微镜图

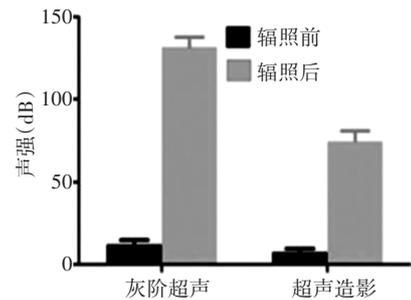
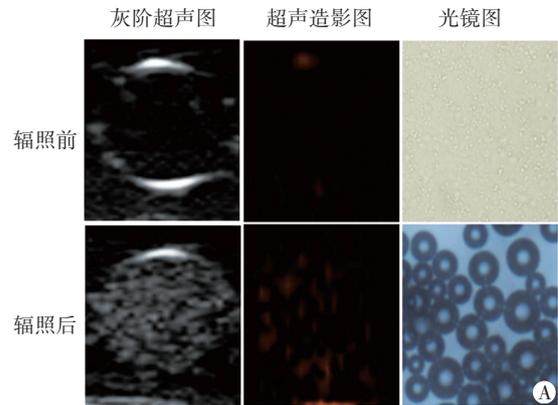
及MRI。①纳米粒乳液经LIFU辐照后,灰阶超声显示其回声增强,辐照前后声强分别为(12.2±2.8)dB、(136.5±5.7)dB,超声造影模式下显示其高增强;辐照前后声强分别为(6.7±2.3)dB、(86.3±5.2)dB;光镜下可见辐照后纳米粒体积增大,见图4。②随着浓度的增加

加,纳米粒体外增强光声成像的效果渐趋明显(图5),对照组、0.5 mg/ml组、1.0 mg/ml组和2.0 mg/ml组所对应的光声值分别为0.21±0.09、0.58±0.06、1.41±0.12、2.13±0.11。③随着浓度的增加,纳米粒体外负性增强MRI的效果越明显,见图6。



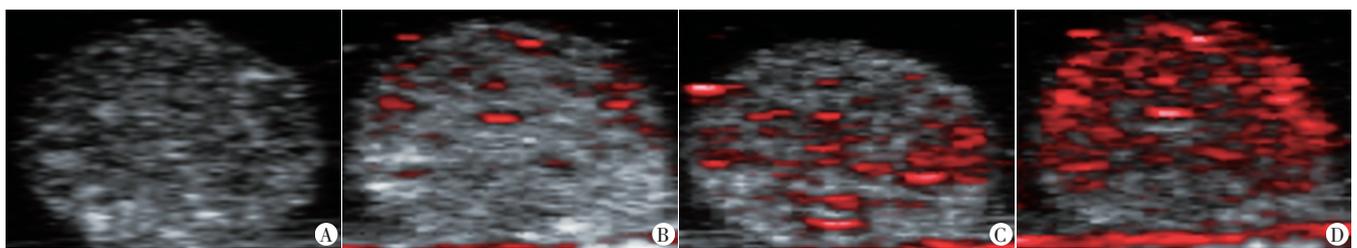
SKOV3细胞与各组纳米粒共孵育后的激光共聚焦显微镜图。蓝色荧光为DAPI染色后的细胞核,绿色荧光为DiO染色后的细胞膜,红色荧光为DiI染色后的纳米粒(标尺:50 μm)

图3 体外寻靶实验的激光共聚焦显微镜图



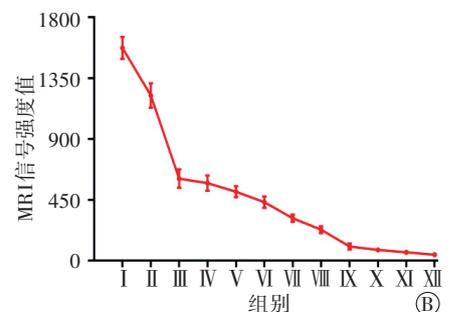
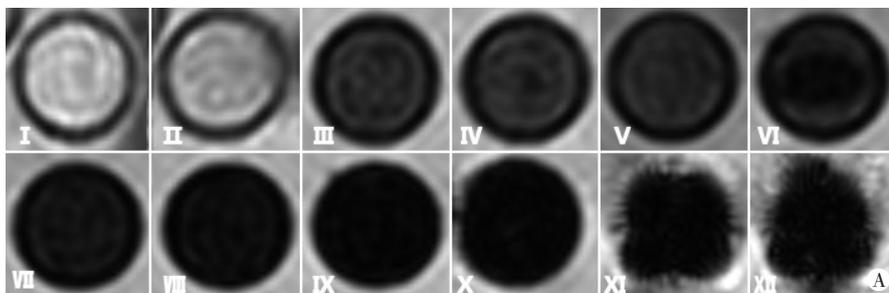
A: 纳米粒在LIFU辐照前后灰阶超声、超声造影及光镜图(×1000); B: 纳米粒在LIFU辐照前后声强值

图4 纳米粒体外增强超声成像图



A: 对照组; B: 0.5 mg/ml组; C: 1.0 mg/ml组; D: 2.0 mg/ml组

图5 不同浓度组纳米粒体外增强光声成像图



A: 不同浓度纳米粒MRI图; B: 不同浓度纳米粒MRI信号强度值

图6 纳米粒体外增强MRI图

讨 论

传统的影像学检查方式均有各自的优缺点^[3],融合多种成像模式的多功能造影剂的出现为现代分子影像学的发展指明了方向^[4],除显像功能外,其还能够在造影剂上装载药物,在影像监控下实现靶向治疗。在这一思路引导下,本实验拟制备集增强超声、光声、MRI及药物控释功能于一体的多模态多功能造影剂,并检测其理化特性,验证其增强多模态显像效能。

Shin等^[5]研究发现,虽然液态氟碳 PFP 沸点仅 29℃,但经磷脂包裹成为纳米级颗粒后,由于纳米粒周围的 Laplace 压力明显增加,PFP 的气化阈值随之升高。本实验结果发现,在 40℃ 时纳米粒基本不发生相变,当温度逐渐升高至 50℃ 时,纳米粒相变最显著,镜下见相变后产生大量气泡,这说明 PFP 纳米粒既能保持一定的稳定性,也能在一定条件下继发相变。同时本实验也发现制备的 FA-HCPT-Fe₃O₄-PFP NDs 在 4℃ 条件下可稳定保存 48 h 而不发生明显相变。反相高效液相色谱法测得的 HCPT 载药量(8.33±0.57)%,包封率(60.51±2.33)%,较高的包封率和载药量为后续的治疗研究提供了保障。

本实验使用的磷脂成分与生物有机体细胞膜的磷脂成分相同,安全性高;液态氟碳具备较好的携氧能力,可被用作血液替代品^[6],同时其还能够溶解于血液中并通过呼气排出体外^[7];Fe₃O₄在体内可被红细胞代谢,再进入正常血浆铁池,参与到机体的代谢过程,具备良好的生物安全性^[8]。叶酸性质稳定,分子量小,且无免疫原性^[9],较多恶性肿瘤如乳腺癌、卵巢癌等组织中叶酸受体均呈高表达,而在正常组织中叶酸受体不表达^[10]。在体外寻靶实验中,靶向组在 SKOV3 肿瘤细胞周围及内部见较多纳米粒聚集,而非靶向组 SKOV3 肿瘤细胞周围及内部无纳米粒聚集,说明叶酸具备的高效靶向性有连接其受体的能力;拮抗组在加入游离叶酸后,阻断了后续加入的靶向纳米粒与肿瘤细胞的特异性结合,也从侧面说明了叶酸与肿瘤细胞结合的高效特异性。

体外多模态显像增强实验结果表明,FA-HCPT-Fe₃O₄-PFP NDs 可以明显增强超声、光声及 MRI 显影能力。液态氟碳 PFP 具备良好的热致相变及声致相变的特性,超声波被认为是最有效的继发相变的方式,本研究中使用 LIFU 仪辐照制备的纳米粒乳液,使得纳米粒发生声致相变,从而明显增强超声成像效果。引

入 Fe₃O₄后,纳米粒具备增强光声成像的作用,且随着纳米粒浓度的增加,光声信号明显增强,光声值亦明显升高。作为一种负性增强对比剂,Fe₃O₄使得纳米粒的 MRI T2 信号强度降低,且浓度越高其信号强度越低,与对照组的高信号呈明显差异。

综上所述,本实验制备的 FA-HCPT-Fe₃O₄-PFP NDs 同时装载了 PFP 和 Fe₃O₄,有望实现多模态显像;引入 HCPT,使其在多模态显像的同时,能够达到药物治疗的目的;在纳米粒表面修饰叶酸受体后,纳米粒能够特异性的靶向结合于高表达叶酸受体的肿瘤细胞周围,进行局部精准显像和靶向治疗,使得 FA-HCPT-Fe₃O₄-PFP NDs 有望成为极具潜力的分子探针。

参考文献

- [1] Kircher MF, Willmann JK. Molecular body imaging: MR imaging, CT, and US. Part I. principles [J]. *Radiology*, 2012, 263(3): 633.
- [2] Wang YX, Idée JM, Corot C. Scientific and industrial challenges of developing nanoparticle-based theranostics and multiple-modality contrast agents for clinical application [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(39): 16146-16150.
- [3] Zhang J, Li C, Zhang X, et al. In vivo tumor-targeted dual-modal fluorescence / CT imaging using a nanoprobe co-loaded with an aggregation-induced emission dye and gold nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2015, 42(12): 103-111.
- [4] Jiang D, Shi Y, Chen X, et al. Fast and robust multimodal image registration using a local derivative pattern [J]. *Medical Physics*, 2017, 44(2): 497.
- [5] Shin U, Kim J, Lee J, et al. Development of (64) Cu-loaded perfluoropentane nanodroplet: a potential tumor theragnostic nanocarrier and dual-modality PET-ultrasound imaging agents [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2020, 46(10): 2775-2784.
- [6] Xie Y, Wang J, Wang J, et al. Tuning the ultrasonic and photoacoustic response of polydopamine-stabilized perfluorocarbon contrast agents [J]. *J Mater Chem B*, 2019, 7(31): 4833-4842.
- [7] Lowe KC. Engineering blood: synthetic substitutes from fluorinated compounds [J]. *Tissue Eng*, 2003, 9(3): 389-399.
- [8] Duguet E, Vasseur S, Mornet S, et al. Magnetic nanoparticles and their applications in medicine [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2006, 1(2): 157-168.
- [9] Farran B, Pavitra E, Kasa P, et al. Folate-targeted immunotherapies: Passive and active strategies for cancer receptor targeting drug delivery strategies and prospects in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2019, 45(6): 45-52.
- [10] Emami J, Ansarypour Z. Receptor targeting drug delivery strategies and prospects in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Res Pharm Sci*, 2019, 14(6): 471-487.

(收稿日期:2020-07-29)