

· 技术与方法 ·

包裹放射性核素¹³¹I 的高分子纳米药物的制备及其放射自显影实验*范永增¹,袁耿彪^{1△},朱晓娥¹,包建东²,Li Chun³(1. 重庆医科大学附属第二医院核医学科 400010; 2. 江苏省原子医学研究所, 江苏无锡 214063;
3. 美国德州安德森癌症中心 77030)

摘要:目的 制备一种包裹放射性核素的纳米药物,并对其理化性质及放射性特征进行研究。方法 采用高分子纳米材料聚乳酸/羟基乙酸(PLGA)作为载体,用放射性核素¹³¹I作为包裹药物,通过双乳化和冷冻干燥技术制备包裹¹³¹I的PLGA纳米药物。并对其外观、形态及放射性特征进行观察分析,采用光镜、电镜及放射自显影术,检测其粒径、电位及其包裹放射性核素的能力。结果 通过本方法成功制备了包裹放射性核素¹³¹I的高分子纳米药物;光镜下观察其形态规则、呈球形,大小均匀,平均粒径为(1.55±0.25)μm,电位为(-30.1±5.3)mv;包封率为(1.0±0.5)%;单个PLGA纳米药物的放射性活度约为1.1×10⁻²Bq,单个纳米药物的比活度为5.2×10⁻³Bq/nm³。体外放射自显影图像显影清晰,与空白对照组对比差异有统计学意义。结论 包裹放射性核素¹³¹I的纳米放射性微球理化性质稳定,具有较高的包封率,放射性自显影效果好,为对放射性核素抵抗或不敏感的肿瘤核素诊断与治疗提供重要方法和思路,为进一步包裹放射性核素的靶向性纳米药物的研究奠定了基础。

关键词:放射性核素 1311; PLGA; 纳米粒子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.12.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)12-1203-03

Fabrication and characterization of radionuclide ¹³¹I-loaded poly (lactic acid-co-glycolic acid) nanoparticles*Fan Yongzeng¹, Yuan Gengbiao^{1△}, Zhu Xiaoe¹, Bao Jiandong², Chun Li³

(1, Department of Nuclear Medicine, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China; Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi, Jiangsu 214063, China;

3. Department of Experimental Diagnostic Imaging, Division of Diagnostic Imaging, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center 1515 Holcombe Blvd, Houston, Texas 77030, USA)

Abstract: Objective To prepare ¹³¹I-loaded nanoparticles, and to study physicochemical and radioactive properties. **Methods** Biodegradable poly (DL-lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles loaded with radionuclide ¹³¹I were prepared by double emulsion solvent-evaporation technique. The appearance, mean diameter, and surface charge were detected. The ¹³¹I loading payload and radioactivity were measured. **Results** Uniform ¹³¹I-PLGA with narrow size distribution and smooth surface were produced. Autoradiography showed radioactivity associated with the PLGA nanoparticles. The encapsulation efficiency was (1.0±0.5)%. The radioactivity of each PLGA nanoparticle was about 1.1×10⁻²Bq, and the specific activity of single nanoparticle was about 5.2×10⁻³Bq/nm³. **Conclusion** ¹³¹I-PLGA nanoparticles have stable physical and chemical properties and reasonable encapsulation efficiency. It may provide an alternative for treatment of cancer resistant to conventional radiotherapy.

Key words: radionuclide ¹³¹I; PLGA; nanoparticle

随着纳米科学与技术的兴起,纳米药物在生物医药领域中的应用日益受到重视。目前关注的热点是在纳米药物的基础上,通过物理、化学及生物合成的方法,制备成载药纳米药物。在疾病诊断、监控、治疗以及生物系统控制等方面,应用纳米技术研制的药物被称之为纳米颗粒,通过一定方法承载具有治疗作用的药物,成为载药纳米颗粒或纳米药物。纳米药物特有的性质,决定了其在药物运输方面具有以下几个优点:(1)缓释药物,提高血药浓度,延长药物作用时间;(2)减少药物降解,提高药物稳定性;(3)保护药物,防止其被体内酶系降解;(4)建立新的给药途径^[1]。聚乳酸/羟基乙酸(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)是近年来发展起来的一种新型纳米药物,是一种具有良好生物相容性,可在体内缓慢降解的高分子材料,其最终降解产物是水和二氧化碳。PLGA具有较高的药物承载能力,适应的药物范围较广,可以是固态、液态,可以是疏

水性、亲水性药物。本实验通过制备一种包裹放射性核素的高分子纳米药物,将放射性核素运输到疾病病灶部位,用以诊断和治疗疾病,且延长病灶内或病灶旁的放射性核素的有效半衰期,同时又降低放射性核素对正常器官、组织细胞不必要的辐射损伤作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 PLGA,聚合比例为50:50;放射性核素¹³¹I(成都高通同位素有限责任公司);核乳胶EM-1(美国GE Healthcare life science),最小分辨率为130 nm,微球150~200 nm;D-19显影液;KodakF-5定影液;声振仪(XL2020);高速分散均质机(上海标本模型厂,FJ300-SH);真空冷冻干燥机,放射性活度计(美国,CRC-15R)。

1.2 包裹放射性核素¹³¹I的高分子纳米药物的制备 采用双乳乳化法,将1g PLGA加入20 mL二氯甲烷中,充分搅拌至其

完全溶解(连续相),然后在其中加入 4 mL ^{131}I (分散相),声振仪声振 30 s,呈乳白色乳化液状态后,将乳化液倒入适量 4% 聚乙烯醇(PVA)溶液中,均质机均质 5 min,然后加入 200 mL 2% 异丙醇溶液,室温下搅拌 2~5 h,使微球表面固化,待二氯甲烷挥发完后,再经双蒸水与正己烷,洗涤、离心,收集 PLGA 纳米颗粒,冷冻干燥 48 h,即得包裹放射性核素 ^{131}I 的 PLGA 纳米放药冻干粉。空白纳米微球的制备:方法同上,中间分散相不加入放射性核素 ^{131}I ,而是加入 4 mL 蒸馏水,制备成空白的高分子纳米颗粒。

1.3 ^{131}I -PLGA 的性质的测定 取适量包裹 ^{131}I 的 PLGA 纳米颗粒冻干粉,双蒸水复溶后,进行形态学观察,测其平均粒径及电位。

1.4 放射性纳米颗粒的放射自显影实验 取适量包裹 ^{131}I 的 PLGA 纳米颗粒冻干粉,双蒸水复溶后,制备成混合均匀的混悬液备用。

1.4.1 制备包裹 ^{131}I 放射性药物的 PLGA 载玻片 先将制备好的 ^{131}I -PLGA 混悬液均匀涂抹在载玻片上,用中性树胶封片(折光率:1.521 6~1.524 0),用此载片浸沾核乳胶,然后将此载片放于垂直位置,使多余乳胶流去,并用吸水纸吸净背面多余的乳胶。

1.4.2 曝光 将上述涂过核乳胶的标本载玻片放入切片盒内,放入装有硅胶的干燥器内,切片盒应开盖过夜后再用粘胶带封闭,在 4 °C 下曝光,时间分别为 1、2、3、4、5、6、7 d。

1.4.3 显影及定影:显影用 D-19 显影液,显影时间 2 min,温度为 20 °C。定影用 Kodak F-5 定影液,时间 2 min,最后用蒸馏水冲洗数次,缓慢干燥以防标本破裂。

1.4.4 最后通过光镜观察载玻片上 PLGA 纳米颗粒中黑色银颗粒的沉着,了解放射性药物在纳米颗粒中的包裹情况。同理将空白 PLGA 纳米颗粒制备成载玻片,并将涂过核乳胶的标本载玻片经曝光、显影及定影,与实验组进行比较。

1.5 测定载药纳米颗粒的包封率与载药纳米颗粒的比活度

1.5.1 用放射性活度计精确测量放射性活度 将制备好的包裹 ^{131}I 的 PLGA 纳米颗粒,用双蒸水洗涤、离心数遍后,用放射性探测器测量最后一次离心液的放射性等于本底,再将所制备的纳米颗粒和离心液收集并用放射性活度计分别测量其放射性活度,计算纳米颗粒 ^{131}I 的包封率。纳米颗粒中 ^{131}I 的活度/加入的 ^{131}I 的总活度=纳米颗粒的包封率或纳米颗粒的包封率=(加入的 ^{131}I 的总活度-离心液的总放射性活度)/加入的 ^{131}I 的总活度。同上分别包裹不同放射性浓度的放射性核素 ^{131}I ,计算其平均包封率。

1.5.2 PLGA 比活度的计算 用细胞计数板和 DFY 定量分析仪计算出制备的 PLGA 载药纳米颗粒总个数,除以 PLGA 纳米颗粒个数和放射性总活度,计算出单个 PLGA 载药纳米颗粒的放射性活度;用粒径仪测算载药纳米颗粒的平均粒径,计算出单个载药纳米颗粒的体积,最后计算单个 PLGA 载药纳米颗粒的比活度。单个纳米颗粒的放射性活度/单个纳米颗粒的体积=单个纳米载药纳米颗粒的比活度。

2 结 果

2.1 光学显微镜下,包裹 ^{131}I 的 PLGA 纳米颗粒的特性 光学显微镜观察,其形态规则、呈球形,表面光滑,大小均匀,复溶后分散度好,纳米颗粒间无明显粘连、聚集现象(插 I 图 1);

激光测径仪检测,粒径范围为 0.95~1.99 μm ,平均粒径为 $(1.55\pm 0.25)\mu\text{m}$,Malvern 表面电位检测,其平均电位为 $(-30.1\pm 5.3)\text{mV}$ 。

2.2 放射自显影实验

2.2.1 载药 PLGA 纳米颗粒显影 包裹 ^{131}I 的 PLGA 纳米药物放射自显影($\times 400$)光镜下,可见 PLGA 纳米药物放射显影在光镜下显影清晰、形态规则呈圆形、大小均匀,微球圆心呈黑色显影,即 ^{131}I 的放射性射线使核乳胶中的银颗粒产生的黑色沉着,经显影及定影处理后的放射自显影,见插 I 图 2。

2.2.2 空白 PLGA 纳米颗粒显影 空白 PLGA 纳米颗粒则只见显影清晰、形态规则,圆形、空心的 PLGA 纳米颗粒,未见黑色银颗粒沉着,见插 I 图 3。

2.3 ^{131}I -PLGA 包封率与比活度 (1)用放射性活度计测量计算,包裹不同放射性浓度的放射性核素 ^{131}I 的纳米载药颗粒放射性核素的包封率分别 1%、1.6%、1.9%。最后计算平均包封率为 1.5%。(2)用细胞计数板和 DFY 定量分析仪计算出制备的 PLGA 纳米颗粒总个数约为 1.7×10^6 (个/g),计算单个 PLGA 纳米颗粒的放射性活度约为 $1.1\times 10^{-2}\text{Bq}$ 。再根据粒径仪测得的粒径,用球体积公式 $V=4/3\Pi R^3$ 计算出单个 PLGA 微球的体积约为 $V=2.145\text{nm}^3$ 。最后计算单个载药纳米颗粒的平均比活度= $1.1\times 10^{-2}\text{Bq}/2.145\text{nm}^3$ 。单个纳米颗粒的比活度为 $5.2\times 10^{-3}\text{Bq}/\text{nm}^3$ 。

3 讨 论

纳米药物成为目前药物和基因运载体研究热点,其主要原因是纳米药物可以穿行于细胞之间,亦可以穿过细胞膜,或者直接穿过生物屏障而直达疾病病灶^[2-4]。纳米药物可通过包裹治疗药物,使其避免被体内酶系降解,减缓治疗药物的体内代谢时间,从而大大提高药物发挥治疗作用的时间^[5-8]。因此选择一种合适的纳米材料,既能直达疾病病灶,又可以保证和提高药物发挥治疗作用的时间具有十分重要的研究意义和临床价值。

本实验采用 PLGA 高分子纳米材料作为载体,利用双乳化法和冷冻干燥技术,制备了包裹放射性核素的高分子 PLGA 纳米药物。其形态规则,呈球形、实心,大小均匀,包封率高,理化性质稳定,复溶后分散度好,无明显的粘连、聚集现象,是一种理想载药纳米药物。并通过放射性核素自显影实验及放射性活度计验证了放射性核素的包裹及包封率情况。放射自显影图像显影清晰,可见载药纳米药物形态规则,大小均匀,球形、圆心呈黑色显影。即通过放射自显影技术,PLGA 包裹的放射性核素所产生的射线作用于感光乳胶的氯化银晶体而产生潜影,再经过显影定影处理,把感光的氯化银还原成黑色的银颗粒。可根据这些银颗粒的部位和数量分析出纳米 PLGA 包裹放射性药物在细胞的分布,以进行定位和定量分析。

放射性核素在疾病的诊断和治疗中的应用是对疾病病灶进行定性、定位诊断及治疗的主要有效方法,放射性核素治疗是利用放射性核素在衰变时能释放 β 或 γ 射线作用于组织细胞并将其能量部分或全部交给组织,产生一系列电离辐射生物效应,通过辐射能的直接和间接作用,使机体生物活性大分子的结构和性质遭受损害,导致细胞繁殖能力丧失、代谢紊乱失调、细胞衰老或死亡。但在目前的具体临床应用中存在的最大问题是放射性核素在对病灶产生电离辐射生物效应,致病变细

胞繁殖能力丧失、代谢紊乱失调、细胞衰老或死亡。同时,对病灶周围及其他部位的正常组织细胞亦产生辐射损伤,严重影响正常组织细胞的功能。通过本研究制备成包裹放射性核素的纳米载药颗粒,可以减小对正常组织细胞不必要的辐射损伤。再结合近年来超声学的无创性药物定位释放技术,可以利用本实验研究的载核素纳米颗粒对病灶进行核素显像,同时又能通过超声技术将病灶部位的 PLGA 纳米颗粒外壳破裂,从而使包裹的放射性核素释放出来,达到对病灶精确、高效的内照射治疗作用。

由于载药纳米药物最终要作用于人,所以要求载药纳米材料无毒、生物相容性好、可生物降解。常见制备载药纳米药物的材料有多聚物、脂质体、金属粒子、微囊、量子球、脂蛋白、白蛋白、纳米胶束等,其制备方法基本包括两大步骤:首先是纳米药物的制备,主要方法有复乳法、溶剂挥发法等^[9]。然后通过理化方法将需携带的药物与纳米药物连接制成载药纳米药物。评价一种载体材料的依据主要有两点:一是其制备成的载药纳米药物应具有合适的尺寸,保证其在形式上应适合生物技术的需要^[10]。二是载体材料应具有较高的药物负载能力,保证其在量上满足生物技术需要。金属粒子是一种很好的载体材料,可以满足对尺寸的较高要求,但因不能被生物降解而大大限制了其应用。脂质体、脂蛋白、清蛋白等天然材料,可降解性好,是很好的基因载体,但其粒径较大。多聚物、量子球、纳米胶束等生物相容性好、并可生物降解,但在制备时会加入有机溶剂(如二氯甲烷),对人体可能有潜在的毒性。因此选择一种合适的纳米材料,具有十分重要的研究意义。

本实验选用的载体材料 PLGA,其具有以下特点:(1)具有很好的生物相容性;(2)具有较高的药物负载能力,允许将药物包裹入纳米颗粒内^[11],且适应的药物范围较广;(3)易于进行表面修饰,带上具有专一识别功能的基因或物质,实现主动靶向给药;(4)并可用超声破坏纳米颗粒而使药物或基因得以定位释放等。PLGA 作为一种纳米药物载体,在药物靶向释放及基因治疗方面,都具有广阔的发展前景^[12-14]。

成功制备出了利用 PLGA 纳米高分子材料包裹放射性核素的载药纳米药物,该载药纳米药物理化性质稳定,有较好的包封率,有望为进一步研究靶向载药纳米药物提供重要方法和思路。

参考文献:

[1] Jain KK. Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice[J]. *Med Princ Pract*, 2008, 17(2): 89-101.

[2] Yamamoto H, Kuno Y, Sugimoto S, et al. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions[J]. *J Control Release*, 2005, 102(2): 373-381.

[3] Zhang N, Chiuasupho C. PLGA Nanoparticle-peptide conjugate effectively targets intercellular cell-adhesion molecule-1[J]. *Bioconjug Chem*, 2008, 19(1): 145-152.

[4] Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice[J]. *Pharmacol Rev*, 2001, 53(2): 283-318.

[5] Na K, Lee KH, Bae YH. pH-sensitivity and pH-dependent interior structural change of self-assembled hydrogel nanoparticles of pullulan acetate/oligo-sulfonamide conjugate[J]. *J Control Release*, 2004, 97(3): 513-525.

[6] Li C, Ke S, Wu QP, et al. Potentiation of ovarian OCA-1 tumor radioresponse by poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2000, 48(4): 1119-1126.

[7] Li C, Newman RA, Wu QP, et al. Biodistribution of paclitaxel and poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugates in mice with ovarian OCA-1 tumor[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2000, 46(5): 416-422.

[8] Li C, Wallace S. Polymer-drug conjugates: recent development in clinical oncology[J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2008, 60(8): 886-898.

[9] Singh S, Ray SS. Polylactide based nanostructured biomaterials and their applications[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2007, 7(8): 2596-2615.

[10] Whitesides GM. The rightsize in nanobiotechnology[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(10): 1161-1165.

[11] Cartiera MS, Ferreira EC, Caputo C, et al. Partial correction of cystic fibrosis defects with PLGA nanoparticles encapsulating curcumin[J]. *Mol Pharm*, 2010, 7(1): 86-93.

[12] Kocbek P, Obermajer N, Cegnar M, et al. Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal anti-body[J]. *J Control Release*, 2007, 120(1/2): 18-26.

[13] Sneh-Edri H, Likhtenshtein D, Stepensky D. Intracellular targeting of PLGA nanoparticles encapsulating antigenic peptide to the endoplasmic reticulum of dendritic cells and its effect on antigen cross-presentation in vitro[J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(4): 1266-1275.

[14] Gupta V, Davis M, Hope-Weeks LJ, et al. PLGA microparticles encapsulating prostaglandin E(1)-hydroxypropyl-β-cyclodextrin(PGE(1)-HPβCD) complex for the treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH) [J]. *Pharm Res*, 2011, 28(7): 1733-1749.