

文章编号: 1000-5404(2013)19-2033-04

论著

携 Fe₃O₄ 靶向血栓聚乳酸-羟基乙酸微球的制备及体外 MR 成像研究

周君¹, 张瑜¹, 郭大静¹, 熬梦², 郑元义², 王志刚² (400010 重庆, 重庆医科大学: 附属第二医院放射科¹, 超声影像学研究所²)

【摘要】 目的 制备携 Fe₃O₄ 靶向血栓的聚乳酸-羟基乙酸 (poly lactic-co-glycolic acid, PLGA) 微球, 探讨其理化性质并在 MR 监测下观测其对体外血栓的靶向能力。方法 以 PLGA 为载体, 通过双乳化溶剂挥发法及碳二亚胺法制备携带 MR 造影剂 Fe₃O₄ 及表面修饰血栓亲和性短肽精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸 (Arg-Gly-Asp-Ser, RGDS) 的 PLGA 微球 (RGDS-Fe₃O₄-PLGA 微球), 对其理化性质进行表征, 通过体外靶向血栓实验探究其对血栓的靶向能力, 并评价其 MR 显影效果。结果 成功制备了 RGDS-Fe₃O₄-PLGA 微球, 激光粒径仪测得微球的粒径为 (1 105 ± 83) nm, 其形态规则, 大小均匀, 呈球形, 分散性好, 火焰原子吸收光谱法测得 Fe₃O₄ 携带率为 43.6%, 流式细胞仪检测 RGDS 的连接率为 23.57%。在 MR 监测下, 体外血栓寻靶实验证实该微球可有效靶向血栓并明显降低血栓周边 T₂ 信号。结论 本实验制得的 RGDS-Fe₃O₄-PLGA 微球对体外血栓有良好的亲和性, MR 对比增强效果好。

【关键词】 氧化铁; PLGA; 血栓; 微球; RGDS

【中图分类号】 R445.2; R944.9; R981

【文献标志码】 A

Preparation and *in vitro* MR imaging of Fe₃O₄-loaded PLGA microparticles targeting thrombus

Zhou Jun¹, Zhang Yu¹, Guo Dajing¹, Ao Meng², Zheng Yuanyi², Wang Zhigang² (¹Department of Radiology, Second Affiliated Hospital, ²Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

【Abstract】 **Objective** To prepare Fe₃O₄-loaded thrombus-targeting poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) microparticles, and to investigate its related characteristics and targeting ability to thrombus *in vitro* by MRI. **Methods** PLGA was employed as the core of microparticles of drug carriers. Fe₃O₄-loaded PLGA microparticles were first prepared through double emulsion solvent evaporation technique and the ligands Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) were further covalently bound to the surface of microparticles *via* carbodiimide-mediated amide bond formation. The physical and chemical properties of RGDS-Fe₃O₄-PLGA microparticles were measured, and their feasibility and efficacy of targeting thrombus were estimated by *in vitro* experiment. MR images of the microparticles were observed with a 3.0 T clinical MR scanner. **Results** The RGDS-Fe₃O₄-PLGA microparticles were spherical in shape with a mean diameter of 1 105 ± 83 nm, and had neither aggregation nor adhesion tendencies. The carrier rate of Fe₃O₄ was 43.6% through atomic absorption spectrometer, and the conjugate rate of RGDS was detected as 23.57% by flow cytometry. Pathological section confirmed that the microparticles specifically accumulated in the edge of thrombus. MR scanning demonstrated the microparticles effectively targeted thrombus and significantly decreased T₂ signal on the edge of the thrombus. **Conclusion** Our prepared RGDS-Fe₃O₄-PLGA microparticles have good affinity to thrombus and exhibit contrast-enhanced effect in *in vitro* MI images.

【Key words】 iron oxide; poly lactic-co-glycolic acid; thrombus; microparticle; Arg-Gly-Asp-Ser

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81171332). Corresponding author: Guo Dajing, E-mail: guodaj@163.com

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81171332)

【通信作者】 郭大静, E-mail: guodaj@163.com

【优先出版】 <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130619.1517.002.html> (2013-06-19)

血栓性疾病严重危害人类健康,对血栓的早期诊断及治疗可有效降低其致残率及病死率。分子影像学的发展使得血栓的早期、特异性诊断成为可能,其中,MR分子成像通过选用不同的分子探针,在体内直接探测靶点在生理及病理状态下的信息,为疾病的诊断及治疗提供早期、可靠、活体的影像学资料。在血栓形成过程中,血小板糖蛋白(GP) II b/III a受体在激活的血小板上高密度表达,Lys-Gly-Asp(KGD)与Arg-Gly-Asp(RGD)这两种氨基酸序列与纤维蛋白原、vWF识别结合GP II b/III a受体的位点相似,能高度特异地与激活血小板上的GP II b/III a受体结合,且可通过竞争性抑制作用阻断血小板聚集的最后共同通路,在一定程度上抑制血栓的形成^[1]。这也成为本研究选用精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸(Arg-Gly-Asp-Ser, RGDS)靶向血栓的重要考虑因素。聚乳酸-羟基乙酸(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)以其良好的生物相容性及可降解性已成为目前研究应用最多的载体材料之一。本研究选用端羧基-聚乳酸-羟基乙酸(PLGA-COOH)作为载体携带Fe₃O₄并在表面修饰血栓特异性短肽RGDS,制备RGDS-Fe₃O₄-PLGA微球,旨在从分子水平实现MR对血栓的精确定位、定性诊断。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

PLGA-COOH(配比75:25,相对分子质量20 000,济南岱罡生物材料有限公司);有机物可溶性氧化铁纳米粒子(油酸表面修饰,美国大洋纳米科技公司);异硫氰酸(FITC)荧光标记的RGDS(杭州中肽生物制剂公司);1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC, Sigma);N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, Sigma);2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES, Sigma);聚乙烯醇(PVA, Sigma);二氯甲烷、异丙醇等均为分析纯。

超声震荡仪(VCX130,美国Sonic);高速均质乳化机(C10,上海恒川机械设备有限公司);高速冷冻离心机(Centrifuge 5804R,德国Eppendorf);激光粒径仪(Zeta SIZER 3000HS,英国Malvern);激光扫描共聚焦显微镜(TCS SP2,德国徕卡仪器有限公司);流式细胞仪(FACSVantage SE,美国BD公司);透射电镜(H-7500,日本Hitachi公司);原子吸收光谱仪(Z-5000,日本Hitachi公司);超导型磁共振仪(3.0T, Philips)等。

1.2 Fe₃O₄-PLGA微球的制备

采用双乳化溶剂挥发法,并在文献[2]基础上做了部分改进。取100 mg PLGA-COOH及100 μL氧化铁纳米粒子充分溶解于2 mL二氯甲烷中作为油相,再取0.4 mL双蒸水作为内水相加入其中,超声震荡60 s成棕色初乳液,将此乳化液逐滴加入10 mL 3% PVA溶液中,高速均质乳化机均质3 min,转速10 000 r/min,即得复乳溶液。加入20 mL 2%异丙醇溶液,室温搅拌2 h,使有机溶剂充分挥发。经双蒸水多次洗涤、离心后弃上清液,收集Fe₃O₄-PLGA微球冷冻干燥以备用。

1.3 RGDS-Fe₃O₄-PLGA微球的制备

采用碳二亚胺法^[3],将制得的Fe₃O₄-PLGA微球复溶于

10 mL MES缓冲液中(0.1 mol/L, pH=5),先后向其中加入过量的EDC及NHS(物质的量比为1.5:1),置于摇床上4℃下活化2 h后用双蒸水洗涤、离心3次,将活化微球复溶于10 mL MES缓冲液中(0.1 mol/L, pH=8),向其中加入适量FITC荧光标记的RGDS,4℃下反应1 h后,用双蒸水洗涤、离心3次以去除未反应的RGDS。收集微球冷冻干燥以备用。

1.4 RGDS-Fe₃O₄-PLGA微球理化性能的检测

采用普通光学显微镜观测微球形态、大小、分散度等。激光粒径仪测量微球的平均粒径。透射电镜观测微球形态及其内Fe₃O₄分布情况。原子吸收光谱仪^[4]检测Fe₃O₄携带率。激光扫描共聚焦显微镜及流式细胞仪检测FITC标记的RGDS的连接。

1.5 体外MR扫描

将制得的RGDS-Fe₃O₄-PLGA微球复溶于20 mL双蒸水中,分别取0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mL微球浓度为5 mg/mL的样品溶液加入8支Eppendorf管中,每管均用8%明胶溶液定容至4 mL,充分混匀,避免微球发生沉降,以双蒸水为背景,置于3.0T MR扫描仪上行T₂WI扫描,采用头颅专用单通道正交线圈,FFE序列,扫描参数:TR=87 ms,TE=9 ms,翻转角度(FP)=45°,体素=0.6 mm×0.6 mm×3 mm,矩阵=147×147,激励次数=4次,沿各管内径勾画感兴趣区域(ROI),分别测量各管样品溶液信号强度(SI)3次,取平均值,制得各样本信号强度曲线。

取健康志愿者新鲜肘静脉血10 mL,加入适量促凝剂,37℃水浴2 h,直至血栓形成。取适量RGDS-Fe₃O₄-PLGA微球复溶于PBS缓冲液中,将血栓浸泡于其中,摇床上37℃水浴环境中反应1 h后,用流速为20 cm/s的PBS缓冲液反复冲洗血栓,对照组采用未连接RGDS的Fe₃O₄-PLGA微球与血栓同等条件下作用。分别切取部分冲洗后的血栓组织固定于8%明胶溶液中,置于3.0T MR扫描仪行T₂WI扫描,采用小鼠实验线圈,FFE序列,TR=34 s,TE=9.21 s,翻转角度(FP)=45°,体素=0.5 mm×0.5 mm×3 mm,矩阵=100×100,激励次数=16次,观测靶向微球及非靶向微球分别作用的血栓信号有何差别。

1.6 体外血栓靶向实验

切取部分上述RGDS-Fe₃O₄-PLGA微球及Fe₃O₄-PLGA微球作用并冲洗后的血栓置于支承器上,在其周围滴上包埋剂,放入-25℃低温恒冷箱中做血栓组织冰冻切片,层厚8 μm,封片后显微镜下观察微球对血栓的靶向情况。

2 结果

2.1 RGDS-Fe₃O₄-PLGA微球理化性能

采用双乳化法以及碳二亚胺法制备的RGDS-Fe₃O₄-PLGA微球显微镜下显示其粒径较均一,表面光滑,呈球形,分散性好,无团聚倾向,悬浮稳定性较好,未见明显沉降。激光粒径仪测得微球的粒径为(1 105±83) nm,粒径分布范围窄,此粒径大于血管内皮间隙孔径。透射电镜显示微球表面光滑,氧化铁颗粒均匀分布于微球壳上,形成一圈较规则黑色圆环,而微球内部未见分布(图1),激光扫描共聚焦显微镜观测到RGDS-Fe₃O₄-PLGA微球周围有规则的环状绿色荧光,而微球内水相中几乎未见荧光出现,对照组Fe₃O₄-PLGA微球在激光扫描共聚焦显微镜下未见绿色荧光(图2),证实了FITC-RGDS与PLGA上-COOH的有效连接。流式细胞术中以Fe₃O₄-PLGA微球为对

照随机计数10 000个RGDS-Fe₃O₄-PLGA微球,测得靶向微球上FITC标记的RGDS的连接率为23.57%,火焰原子吸收光谱法测得Fe₃O₄-PLGA微球的Fe₃O₄携带率为51.4%,而RGDS-Fe₃O₄-PLGA微球的Fe₃O₄携带率为43.6%。

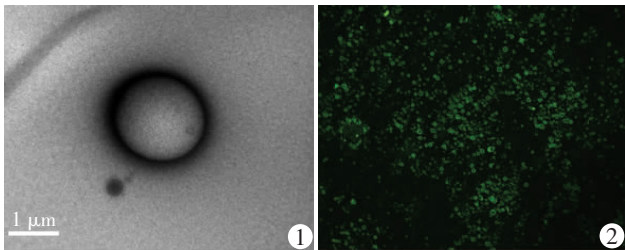


图1 透射电镜观察RGDS-Fe₃O₄-PLGA微球形态

图2 激光扫描共聚焦显微镜观察RGDS-Fe₃O₄-PLGA微球形态(×800)

2.2 体外靶向血栓及MR扫描结果

MR扫描示各Eppendorf管中信号与双蒸水背景信号相比均有不同程度降低,且随样品中靶向微球浓度的增加,T₂信号的降低越发显著,证实该微球可有效降低T₂信号(图3)。RGDS-Fe₃O₄-PLGA微球作用的血栓在FFE序列呈高信号,其周围环以一圈低信号带,Fe₃O₄-PLGA微球作用的血栓周围未见确切低信号带(图4),即说明RGDS-Fe₃O₄-PLGA靶向微球通过受配作用有效地实现了与血栓的连接,并具备降低血栓周边信号的能力,能够在MR监测下表达对血栓的特异性检出性能;未连接RGDS的微球在接近体内血流速度的冲洗下不能稳固连接在血栓表面,从而无靶向对比增强效应。在体外靶向血栓实验血栓组织冰冻切片中观测到在血栓周边有大量RGDS-Fe₃O₄-PLGA微球聚集,未连接RGDS的Fe₃O₄-PLGA微球未见血栓周边出现聚集(图5)。

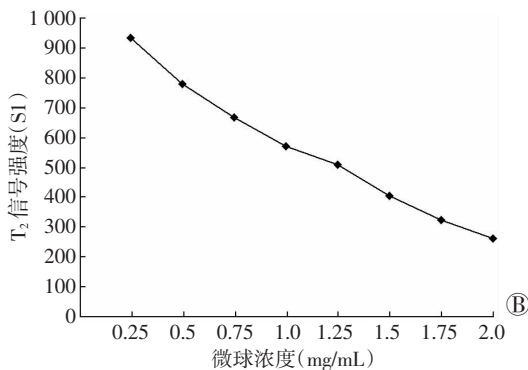
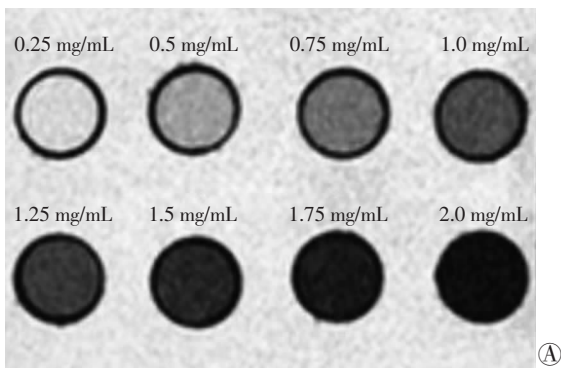


图3 RGDS-Fe₃O₄-PLGA微球MR扫描(A)及信号强度变化(B)

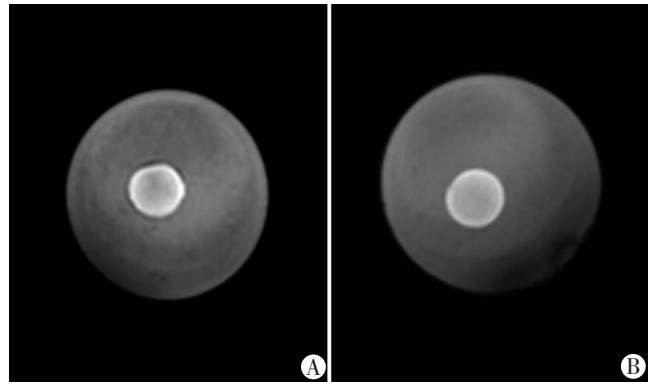


图4 不同微球作用血栓后体外MR成像T₂WI扫描表现
A: RGDS-Fe₃O₄-PLGA微球; B: Fe₃O₄-PLGA微球

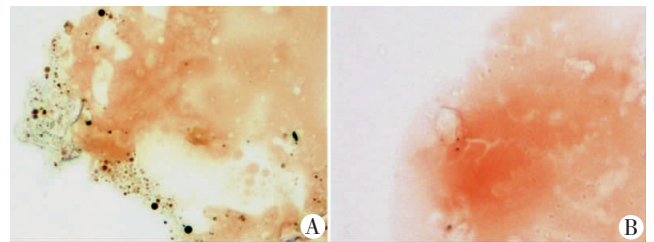


图5 体外靶向血栓组织病理变化(LM×400)
A: 靶向组(RGDS-Fe₃O₄-PLGA微球); B: 非靶向组(Fe₃O₄-PLGA微球)

3 讨论

原位血栓及血栓栓塞是许多心脑血管疾病产生的原因,对血栓形成进行显像,对指导治疗、改善预后具有广泛的应用价值。随着分子影像学的迅猛发展,现已有多种针对血栓的分子探针^[5-7]。MR分子影像技术具有高的空间分辨率、无辐射危害和多序列成像等优点,是继放射性核素成像后最有希望进入临床应用的分子影像手段,通过不同的理化方法可将MR造影剂、靶向制剂、药物等通过特殊载体有机结合,得到多功能MR分子探针,可从分子水平上对各种疾病实现早期、无创、在体及特异性诊断及治疗。

在MR造影剂的选择上,本课题组在前期实验中选用顺磁性MR对比剂钆喷酸葡胺(Gd-DTPA)溶液作为内水相载入PLGA微球中,透射电镜证实微球内部有大量钆离子充填,Gd-DTPA包封率为39.53%,在1.5T MR成像仪上能有效增加纵向弛豫率^[2]。然而,鉴于血栓在不同时期中其内铁原子的状态不同,血栓亦随时间变化显示复杂的信号,仅通过T₁信号的改变来监测活体血栓对部分血栓的判断存在困难,这也成为选用不同造影剂实现对血栓各期监测显得尤为重要的原因。超顺磁性MR对比剂Fe₃O₄可产生较强的T₂负性对比效应,较阳性对比剂Gd-DTPA而言,其半衰期长、弛豫率高、毒副作用小,现已广泛用于MR分子影像中。因此,本研究探讨包裹MR阴性对比剂Fe₃O₄

构建靶向血栓 PLGA 微球,通过靶向血栓并降低其 T_2 信号,以期实现对不同时期血栓的检测。阳性 MR 对比剂 Gd-DTPA 溶液具有良好的亲水性,Doiron 等^[8]证实 PLGA 微球中的 Gd-DTPA 溶液会出现较明显的突释现象。因此,在制备工艺上,本研究选用脂溶性的 Fe_3O_4 ,可有效避免 PLGA 作为载体材料时出现的突释问题,使用油酸表面修饰的氧化铁纳米粒子与 PLGA-COOH 共同作为油相成球,让 Fe_3O_4 分布于微球壳上而非内水相中,如此,在内水相及外水相环境中,脂溶性的 Fe_3O_4 不会出现突释现象,实验亦证实本文制备的靶向 PLGA 微球在连接 RGDS 前后 Fe_3O_4 携带率分别 51.4% 和 43.6%,在前后近 4 h 的-COOH 活化过程以及 RGDS 连接过程中, Fe_3O_4 并未出现明显突释。这为后续靶向体外及体内血栓的 MR 对比增强效果提供了有力保障。在体外 MR 扫描中,各管中样本溶液按浓度梯度稀释至 50 ~ 400 倍,各组样本溶液均可有效降低 T_2 信号。

血栓靶点有纤维蛋白、活化血小板膜上的 GP II b/III a 受体、抗纤维蛋白溶酶、活化凝血因子 X III (FX III a)^[9-11] 等。在血栓靶点的选择上,本研究利用受体与配体的专一性结合作用,实现靶向微球对血栓的超选。含有 RGD、KGD 序列的多肽类物质可作为配体特异性地与血小板 GP II b/III a 受体结合。在 RGDS 短肽和 PLGA 微球结合方式的选择上,杨钰楠等^[12-13]证实共价键合的化学修饰方法较表面吸附法更能实现 RGDS 的稳定、高效连接,并通过体外实验证实了共价键合 RGDS 的脂膜超声造影剂对血栓良好的靶向性。鉴于此,本研究在选材上引进了含-COOH 的 PLGA,通过碳二亚胺法使微球表面的-COOH 与 RGDS 短肽上的-NH₂ 键合,而后的激光扫描共聚焦显微镜检测结果说明 FITC 标记的 RGDS 与 PLGA 微球表面的-COOH 成功连接。体外寻靶实验亦证实了该微球对体外血栓的亲水性,血栓组织冰冻切片观测到在血栓周边有大量靶向微球聚集,MR 扫描显示的血栓周边的低信号同样佐证了这一结论。这与 Miserus 等^[10]的研究结果相符。然而本研究制备的微球 RGDS 连接率并不高,仅为 23.57%,究其原因,可能与碳二亚胺法活化微球的时间不够长有关。国内外诸多学者采用碳二亚胺法连接 RGDS 得到的连接率大不相同,但呈现出随活化时间延长连接率增高的趋势。除此之外,本研究选用油酸修饰的 Fe_3O_4 与 PLGA-COOH 共同作为油相成球,两种材料都分布在微球壳上,是否会减少 PLGA-COOH 相对含量,从而减少连接 RGDS 所需的-COOH 数量也有待探究。所以改变 Fe_3O_4 和 PLGA 的投入比例是否会提高 RGDS 连接率是下一步需要验证的问题。

总之,本研究制备的 RGDS- Fe_3O_4 -PLGA 微球形态

规则,粒径较均一, Fe_3O_4 携带率高,可实现对血栓的靶向,并能有效引起 MR 对比增强效应,为 MR 分子影像学在血栓各期诊断中的应用开辟了新视野,且制备微球采用的是双乳化溶剂挥发法,这赋予了其载药潜能,若在内水相中加入水溶性溶栓药物构建多功能 MR 分子探针,还可实现对血栓的治疗作用,实现 MR 监测下的靶向溶栓。这必将为血栓的各期诊断及治疗开辟安全、可靠的新思路。

参考文献:

- [1] Sivaraman B, Latour R A. Delineating the roles of the GP II b/III a and GP-I b-IX-V platelet receptors in mediating platelet adhesion to adsorbed fibrinogen and albumin [J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (23): 5365 - 5370.
- [2] 张瑜,郭大静,周君,等. 靶向血栓 MR 分子探针的构建及初步鉴定 [J]. *临床放射学杂志*, 2012, 31(8): 1178 - 1182.
- [3] Vaidya B, Agrawal G P, Vyas S P. Platelets directed liposomes for the delivery of streptokinase: Development and characterization [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 44(5): 589 - 594.
- [4] Ling Y, Wei K, Zou F, et al. Temozolomide loaded PLGA-based superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and treatment of malignant glioma [J]. *Int J Pharm*, 2012, 430(1/2): 266 - 275.
- [5] Wu Y, Unger E C, McCreery T P, et al. Binding and lysing of blood clots using MRX-408 [J]. *Invest Radiol*, 1998, 33(12): 880 - 885.
- [6] Jaffer F A, Tung C H, Gerszten R E, et al. *In vivo* imaging of thrombin activity in experimental thrombi with thrombin-sensitive near-infrared molecular probe [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(11): 1929 - 1935.
- [7] Ciesienki K L, Yang Y, Ay I, et al. Fibrin-targeted PET probes for the detection of thrombi [J]. *Mol Pharm*, 2013, 10(3): 1100 - 1110.
- [8] Doiron A L, Chu K, Ali A, et al. Preparation and initial characterization of biodegradable particles containing gadolinium-DTPA contrast agent for enhanced MRI [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(45): 17232 - 17237.
- [9] Hara T, Bhayana B, Thompson B, et al. Molecular imaging of fibrin deposition in deep vein thrombosis using fibrin-targeted near-infrared fluorescence [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2012, 5(6): 607 - 615.
- [10] Miserus R J, Herias M V, Prinzen L, et al. Molecular MRI of early thrombus formation using a bimodal alpha2-antiplasmin-based contrast agent [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2009, 2(8): 987 - 996.
- [11] Kim D E, Schellingerhout D, Jaffer F A, et al. Near-infrared fluorescent imaging of cerebral thrombi and blood-brain barrier disruption in a mouse model of cerebral venous sinus thrombosis [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(2): 226 - 233.
- [12] 杨钰楠,高云华,谭开彬,等. 携 RGDS 超声造影剂的制备及体外靶向血栓研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(6): 562 - 564.
- [13] 杨钰楠,高云华,谭开彬,等. 携 RGDS 的脂膜氟烷超声造影剂增强血栓显影的实验研究 [J]. *临床超声医学杂志*, 2007, 9(7): 388 - 390.

(收稿:2013-03-16;修回:2013-04-21)

(编辑 汪勤俭)