

文章编号: 1004-4353(2020)04-0326-07

## 负载磁性氧化铁纳米粒子的 脂质体的制备及评价

金哲浩<sup>1</sup>, 崔云秋<sup>2</sup>, 孙景鑫<sup>2</sup>, 金光玉<sup>1</sup>, 全姬善<sup>2\*</sup>

(1. 延边大学附属医院 影像一科, 吉林 延吉 133002; 2. 延边大学 药学院, 吉林 延吉 133002)

**摘要:** 为了增强磁性氧化铁纳米粒子(magnetic iron oxide nanoparticles, MION)的成像效果, 采用薄膜分散法制备了负载 MION 的脂质体(MION loaded liposome, MION-LP), 并对其磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)灵敏度进行了探究. 制备的 MION-LP 的粒径为  $(68.82 \pm 0.16)$  nm, Zeta 电位为  $(-7.81 \pm 0.82)$  mV; 当铁离子的质量浓度为  $8 \mu\text{g}/\text{mL}$  时, 细胞的存活率可达到 80%; 对 MION-LP 进行普鲁士蓝染色实验显示, 在 HepG2 和 SMMC-7721 内有较多的蓝染颗粒; 体外的 MRI 信号随 MION-LP 中铁离质量浓度的增加而逐渐降低; 在荷瘤裸鼠尾静脉注射 MION-LP 后其肿瘤区域的 T2 信号强度明显下降 ( $n=3$ ,  $*P<0.05$ ). 综上所述, 制备的可视化载体 MION-LP 可增加 MRI 成像的灵敏度, 因此该研究结果可为 MRI 可视化载体的研究提供理论和实验依据.

**关键词:** 脂质体; 磁性氧化铁纳米粒子; 磁共振成像; 荷瘤裸鼠; 可视化载体

中图分类号: R944

文献标识码: A

## Preparation and evaluation of magnetic iron oxide nanoparticles loaded liposome

JIN Zhehao<sup>1</sup>, CUI Yunqiu<sup>2</sup>, SUN Jingxin<sup>2</sup>, JIN Guangyu<sup>1</sup>, QUAN Jishan<sup>2\*</sup>

(1. Department of Imaging, Yanbian University Hospital, Yanji 133002, China;

2. College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China)

**Abstract:** In order to enhance the imaging effect of magnetic iron oxide nanoparticles (MION), MION loaded liposomes (MION-LP) was gained by thin film dispersion method, and the effect of enhancing the sensitivity of magnetic resonance imaging (MRI) was explored. The particle size of MION-LP is  $(68.82 \pm 0.16)$  nm, the Zeta potential is  $(-7.81 \pm 0.82)$  mV. The MTT experiment shows that when the iron concentration is increased to  $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , the cell survival rate reached more than 80%. In the Prussian blue staining experiment, there were blue stained particles in HepG2 and SMMC-7721 cells. In *vitro* MRI experiments, as the concentration of MION-LP increased, the MRI signal gradually decreased. The intensity of T2 signal in the tumor area of tumor-bearing nude mice was significantly decreased after MION-LP was injected into the tail vein ( $n=3$ ,  $*P<0.05$ ). In summary, the prepared MION-LP could increase the sensitivity of MRI imaging, thus the research results could provide theoretical and experimental basis to the research of MRI visualization carriers.

**Keywords:** liposome; magnetic iron oxide nanoparticles; magnetic resonance imaging; tumor-bearing nude mice; visualization carrier

收稿日期: 2020-09-07

\* 通信作者: 全姬善(1975—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为药物传递系统.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81560578); 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20191158KJ)

## 0 引言

造影剂可增强 MRI 成像效果,提高临床诊断的准确性。目前,临床应用较为广泛的造影剂为金属 Gd 螯合物,但其存在敏感度低、半衰期短、无靶向性等问题<sup>[1]</sup>。研究显示,MION 作为 T2 负性造影剂,在 MRI 领域具有良好的应用前景。MION 由磁铁矿或磁赤铁矿组成,具有超顺磁性<sup>[2]</sup>、靶向性<sup>[3]</sup>等特性。为了避免 MION 发生氧化和自身聚集,并能使其在所需区域积累,通常采用脂质体(liposome)对 MION 进行递送。研究<sup>[4]</sup>显示,脂质体具有生物相容性好、毒性低和无免疫原性的特点,且在合成脂质体的材料中加入聚乙二醇可阻止吞噬细胞对脂质体的识别和摄取,进而可延长 MION 在体内的作用时间。另外,脂质体在递送 MION 的同时还可递送化疗药物等,因此可通过利用 MRI 实现对药物的实时跟踪。为了提高 MION 的递送效率和增强成像效果,使纳米载体达到可视化载体的要求,本文制备了一种磁性纳米材料载体,并对其进行了表征,同时对其安全性和有效性进行了评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

福尔马林、乌拉坦、多聚甲醛、抗坏血酸、六水三氯化铁和四水氯化铁均为分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;盐酸羟胺、氯仿、甲醇、邻二氮菲、钼酸铵、无水醋酸钠、浓硫酸、高氯酸、乙酸、二甲苯、无水乙醇、硝酸铁(Ⅲ)九水合物、氨水、硝酸和二甲基亚砷均为分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司;胆固醇,美国 Avanti 公司;蛋黄卵磷脂、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-PEG2000),日本精化株式会社;四甲基偶氮唑蓝,碧云天生物技术研究;DMEM 培养基、胰酶消化液,美国 HyClon 公司;RPMI-1640 培养基,美国 Gibico 公司;胎牛血清,以色列 BI 公司;Sephadex G-50,美国 Sigma-Aldrich 公司;透析袋,美国光谱公司;苏木素(hematoxylin)、伊红(eosin)联合染色液(HE 染色液),上海源叶生物科技有限公司;普鲁士蓝试剂盒、中性树胶、磷酸缓冲溶液(phosphate buffer saline,PBS),索

莱宝科技有限公司;石蜡,国药集团化学试剂有限公司。

BALB/c 雌性裸鼠(5 周龄),在无特定病原体(specific pathogen free,SPF)的条件下饲养。SPC-A1 细胞(人肺腺癌细胞)、HepG2 细胞和 SMMC-7721 细胞(人肝癌细胞)购自上海吉凯基因科技有限公司。在培养箱(37℃,二氧化碳的体积分数为 5%)内培养上述细胞,培养基中均加入体积分数为 10%的胎牛血清和体积分数为 1%的青霉素和链霉素。SPC-A1 细胞和 SMMC-7721 细胞的培养基为 RPMI, HepG2 细胞的培养基为 DMEM。

### 1.2 实验仪器

酶标仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;BL-90 Plus 型 Zeta 电位用粒度分析仪,美国 Brookhaven 仪器公司;超声波细胞粉碎仪,宁波新芝生物科技有限公司;X 射线衍射仪,荷兰 PANalytical 公司;Virtis 台式冷冻干燥机,美国 SP Scientific 公司;临床 3.0 T 核磁共振扫描仪,德国西门子股份公司;U-1900 型光束分光光度计,日本 HITACHI 有限公司;DW-86L80 型超低温保存箱,浙江捷盛低温设备有限公司;荧光电子显微镜,日本 Olympus 有限公司;RCZ-6B3 型旋转蒸发仪,上海黄海药检有限公司;DZF-6050 型真空干燥箱,广州市深华生物技术有限公司;Vortex2 圆周振荡器,德国 IKA 公司。

### 1.3 MION-LP 的制备

参考文献[5]的方法合成 MION。将 1.9608 g 六水三氯化铁、0.718 g 四水氯化铁溶于超纯水中,然后将其加入到由氮气保护的三口烧瓶中,并在搅拌下迅速注入 4.8 mL 氨水,反应 30 min;将永久磁铁置于烧瓶下,静置,待上述体系分层后去除上清液;用超纯水多次清洗磁铁吸附物至清洗液 pH=7;分离清洗液后在所得到的沉淀物中加入 0.1 mol·L<sup>-1</sup>的硝酸溶液(酸化),然后在氮气保护和高速磁力搅拌下加入硝酸铁(Ⅲ)九水合物溶液;加热回流 1 h(溶液颜色由棕黑色变成黄褐色)后去除上清液,并用超纯水将磁铁吸附物转移至截留相对分子质量为 6 000~8 000 的透析袋中;以 0.01 mol·L<sup>-1</sup>的硝酸溶液作为透析液对所得沉淀物透析 2 d 即得 MION。

参考文献[6]的方法制备 MION-LP. 将 1.4 mg 胆固醇、20.0 mg 卵磷脂和 3.6 mg DSPE-PEG2000 溶于氯仿-甲醇(体积比为 2:3)中,然后利用旋转蒸发仪蒸发溶剂得磷脂膜;将装有磷脂膜的旋蒸瓶置于真空干燥箱内(40℃)干燥 12 h,然后加入 MION 水溶液,并于 40℃水浴条件下水化脱膜 30 min;冰浴下利用超声波细胞粉碎仪的探针对水化液进行超声 15 min,过滤(0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜)后即得 MION-LP,并保存(4℃)备用.

#### 1.4 MION-LP 中含磷量的测定

将 Sephadex G-50 凝胶(作为柱填料)用超纯水充分溶胀后填充到 2.5 mL 注射器(去塞加滤板)中,然后用超水平衡 30 min. 吸取 1 mL MION-LP 的水溶液置于已处理的凝胶柱中,用超水洗脱后将洗脱液收集至试管(刻度为 0.5 mL)中并加入消化剂(消化剂的配置方法为:将 140 mL 的浓硫酸加入到盛有 250 mL 蒸馏水的 500 mL 容量瓶中,混合,冷却后加入 70% 质量分数的高氯酸 32.5 mL,再用蒸馏水定容);加热,消化至溶液澄清后将其放置至冷却;加入显色剂(其中 a 液为含 2.5 g 钼酸铵、8.2 g 无水醋酸钠的 1000 mL 混合溶液, b 液为 10% 抗坏血酸溶液, a、b 液为体积比为 9:1 的混合液(现配现用)),在 70℃水浴中加热 10 min. 测定含磷溶液的吸光度(700 nm 处),计算含磷量并绘制磷含量-洗脱液体积数的曲线. 在分离后的 MION-LP 溶液中加入 2% 的乳糖(冻干保护剂),混匀后将其放入冰箱(-80℃)内冷冻 12 h,然后将其放入真空冷冻干燥机中干燥 72 h 即得 MION-LP 冻干粉.

#### 1.5 MION-LP 的包封率测定

分别吸取同体积分离后的 MION-LP 溶液和 MION 溶液,加入质量分数为 10% 的盐酸羟胺溶液,摇匀后加入质量分数为 0.15% 的邻二氮菲和 1 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸溶液,并用蒸馏水定容. 在 510 nm 波长下测定橘红色配合物的吸光度<sup>[7]</sup>,由此得到 MION-LP 溶液中铁离子的质量浓度,然后用 MION-LP 溶液中的铁离子的质量浓度与 MION 溶液中铁离子的质量浓度的比值即可计算得到 MION-LP 溶液中 MION 的包封率<sup>[8]</sup>.

#### 1.6 MION-LP 的体外评价

1) MION-LP 的细胞毒性测定. 将生长至对数期的细胞以  $2 \times 10^4$  个/孔(HepG2 细胞)和  $1 \times 10^4$  个/孔(SPC-A1 细胞和 SMMC-7721 细胞)的细胞密度接种在 96 孔板中. 在 37℃的培养箱内培养 18~22 h 后,分别加入不同铁离子浓度的 MION 和 MION-LP 溶液. 在空白对照组中加入无血清的培养基,并在 37℃下培养 24 h. 将 MTT 溶液加入到板孔中,然后将孔板用铝箔纸包裹后放入培养箱内孵育 4 h;吸去上清液后加入二甲基亚砷溶液;使用酶标仪在 490 nm 下测定溶液吸光度(OD),并利用  $OD_{\text{实验}}$  与  $OD_{\text{空白}}$  的比值计算细胞的存活率.

2) 细胞摄取 MION-LP 的测定. 采用普鲁士蓝试剂盒对细胞内摄取的 MION-LP 进行染色,结果显示 MION 为蓝色. 将细胞以  $6 \times 10^5$  个/孔(HepG2 细胞)和  $4 \times 10^5$  个/孔(SMMC-7721 细胞)的细胞密度接种于 6 孔板中,在培养箱内 37℃培养 18~22 h 后分别加入铁离子质量浓度为 8  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 MION-LP. 在空白对照组中加入无血清的培养基,并在培养箱内 37℃培养 6 h 后去除板孔中的游离药物及死细胞. 每孔加入 4% 多聚甲醛(用于固定细胞),静置 30 min 后除去多聚甲醛,再加入普鲁士蓝染色试剂盒中 A1 液和 A2 液的等体积混合液,染色 30 min. 使用 PBS 清洗细胞 3 次,然后在每孔中加入普鲁士蓝染色试剂盒中的 B 液,染色 10 min. 使用 PBS 清洗细胞 3 次,然后将 6 孔板置于荧光电子显微镜下观察并拍摄.

3) 体外 MRI 成像能力的检测. 配制铁离子质量浓度为 1、2、3、4、5、6、7、8  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 MION 溶液和 MION-LP 溶液. 将溶液置于离心管内,加入 300  $\mu\text{L}$  的热琼脂糖溶液,然后利用涡旋振荡器充分混匀溶液后冷却;取上清液进行 MRI 体外检测(自旋时间 3700 ms,回波时间 117 ms,成像野 12 cm×12 cm,层厚 2 mm).

#### 1.7 MION-LP 的体内评价

将 SPC-A1 细胞接种于 6 只 BALB/c 裸鼠右侧腋窝皮下. 接种后的裸鼠在 SPF 条件下饲养,并定期观察裸鼠的生存条件、生长状况和测量裸鼠肿瘤大小(使用游标卡尺). 肿瘤增长至约 200 mm<sup>3</sup>(肿瘤体积 =  $1/2 \times$  肿瘤的长  $\times$  肿瘤的宽  $\times$

肿瘤的高)时即表明荷瘤裸鼠模型建立成功.肿瘤增长至  $600\text{ mm}^3$  时,将荷瘤裸鼠平均分为两组(空白对照组和 MION-LP 实验组).于荷瘤裸鼠腹腔注射  $1\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 20% 乌拉坦.麻醉荷瘤裸鼠后,摆置俯卧位,并使用医用胶带将其四肢和尾部固定在纸板上.荷瘤裸鼠呼吸匀速后,将纸板置于膝关节线圈内,并依次扫描裸鼠的肿瘤横向位置.扫描结束后,对实验组荷瘤裸鼠的尾静脉注射 MION-LP (剂量为  $30\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),然后分别间隔 0.5、1、1.5、2、2.5、3 h 再次将裸鼠置于膝关节线圈内,并依次扫描(行常规 T2WI 扫描)裸鼠的肿瘤横向位置.将扫描数据收集到西门子工作站对肿瘤区域给药前后的组织信号强度进行测量.测量时以  $0.02\text{ sq.cm}$  大小为感兴趣区域(ROI),取 3 次测量的平均值,并采用独立样本  $t$  检验进行分析. T2WI 扫描的具体参数为: TSE 序列, TE 117 ms, TR3100, 反转角  $89^\circ$ , 层厚 2 mm, 矩阵  $256 \times 1256$ , 体素  $0.3\text{ mm} \times 0.3\text{ mm} \times 0.9\text{ mm}$ .

### 1.8 荷瘤裸鼠的组织病理染色

1) HE 染色荷瘤裸鼠组织.对荷瘤裸鼠进行 MRI 扫描后,剥离其肿瘤、肝脏和脾脏组织,并将各组织放入福尔马林溶液中对其进行固定、脱水、包埋、切片.将切片放置到恒温箱( $60^\circ\text{C}$ )过夜后再在室温下放置 20 min,然后用二甲苯溶液浸泡(10 min),乙醇溶液(体积分数分别为 100%、95%、85%)梯度浸泡(每次浸泡 3 min 并用自来水冲洗 10 min),苏木素染色(自来水冲洗 10 min),伊红染色(2 min),乙醇溶液(体积分数分别为 5%、95%、100%)梯度脱水,二甲苯溶液浸泡(3 min),中性树胶封片.在荧光显微镜下观察封片并拍摄图片.

2) 普鲁士蓝染色荷瘤裸鼠组织.荷瘤裸鼠组织经切片和脱蜡后,滴加普鲁士蓝试剂盒中 A1 和 A2 的混合液,避光 50 min 后用流水冲洗去余色 5 min;滴加普鲁士蓝 B 液染色 30 s,流水冲洗 5 s 去余色,然后依次将切片放入乙醇和二甲苯中脱水,中性树胶封片.在荧光显微镜下观察封片并拍摄图片.

## 2 结果与分析

采用共沉淀法合成 MION,除去其中的小分

子(采用截留相对分子质量为  $6000 \sim 8000$  的透析袋透析)后得到纯化的 MION.图 1 为 MION 的 X 射线衍射图.由图 1 可以看出, MION 的衍射峰出现在  $30.3(220)$ 、 $35.6(311)$ 、 $43(400)$ 、 $53.8(422)$ 、 $57.4(511)$ 、 $62.7(440)$  处,这些峰与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (反式尖晶石结构)的标准卡(JCPDS 01-085-1436)<sup>[6]</sup>中的特征衍射峰一致.

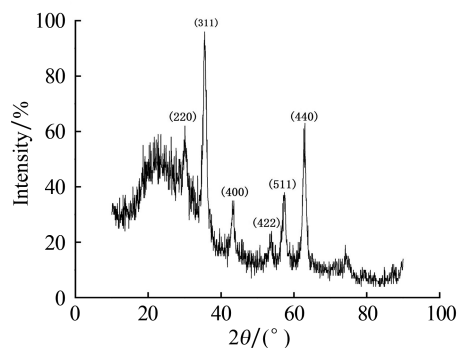


图1 MION 的 X 射线衍射图

由 MION 的粒径图(图 2(A)) 和 Zeta 电位图(图 2(B)) 可知, MION 的粒径为  $(43.79 \pm 1.08)\text{ nm}$ , Zeta 电位为  $(20.36 \pm 2.93)\text{ mV}$ . 由 MION-LP 粒径图(图 2(C)) 和 Zeta 电位图(图 2(D)) 可知, MION-LP 的粒径为  $(68.82 \pm 0.16)\text{ nm}$ , Zeta 电位为  $(-7.81 \pm 0.82)\text{ mV}$ . MION-LP 的粒径大于 MION 的粒径表明, LP 的加入增加了 MION 的粒径.另外, MION-LP 呈负电表明 LP 对 MION 进行了包覆.由 MION 和 MION-LP 的透射电子显微镜图(图 2(E) 和图 2(F)) 可知, MION-LP 呈球形,内部隐约可见 MION 的颗粒,这再次证明 LP 对 MION 进行了包覆.

采用葡聚糖凝胶柱层析法分离未被包覆的 MION,得到含有 MION-LP 的洗脱液.根据比色法测定洗脱液中无机磷的质量.图 3 为 MION-LP 的磷脂洗脱曲线.由图 3 可以看出,第 3 次洗脱之后得到的洗脱液中磷含量低于  $0.5\text{ }\mu\text{g}$ ,表明包封的脂质体在第 3 次洗脱后其大部分已经流出.因此,本文取前 3 次得到的 MION-LP 洗脱液作为活性测试样品.

以测定 MION 和 MION-LP 的铁离子的质量浓度( $x$ )与吸光度( $y$ )做线性回归,结果表明在  $0 \sim 2.5\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内,铁离子的质量浓度与吸光度呈线性关系,其回归方程为:  $y = 0.1945x -$



0.004 6,  $R^2=0.999\ 8$ . 在 510 nm 处测定 MION-LP 和 MION 溶液的吸光度,由此得到 MION-LP 和 MION 的铁离子的质量浓度分别为  $(64.57 \pm 0.15) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $71.24 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,经进一步计算得 MION 的包封率为  $(90.64 \pm 0.21)\%$ .

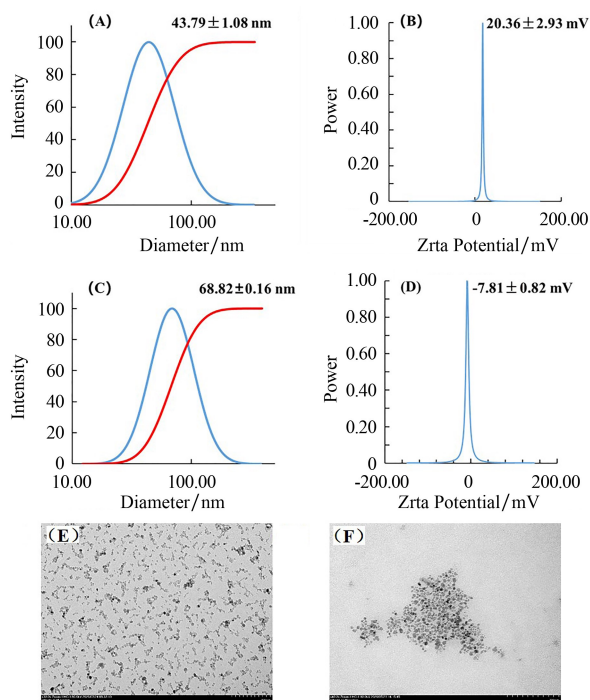


图 2 MION 和 MION-LP 的粒径、Zeta 电位和透射电子显微镜图

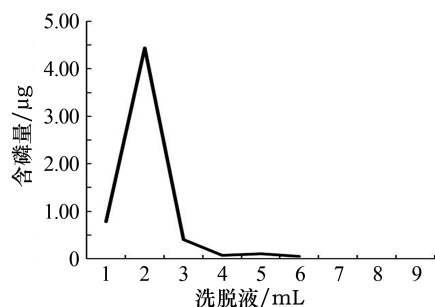


图 3 MION-LP 的磷脂洗脱曲线

采用 MTT 法测定了 MION 和 MION-LP 在 HepG2、SPC-A1 和 SMMC-7721 3 种细胞中的毒性,结果如图 4 所示.由图 4(A)可知,加入含有不同质量浓度铁离子的 MION 的无血清培养基对细胞进行培养时,3 种细胞的存活率均在 80% 以上,这表明 MION 溶液对 3 种细胞的存活率未造成较大影响.由图 4(B)可知,加入含有不同质量浓度铁离子的 MION-LP 的无血清培养基对细胞进行培养时,当铁浓度大于  $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,细胞

存活率低于 80%,这表明 MION-LP 具有一定的细胞毒性.为避免 MION-LP 对细胞的毒性作用,选择铁离子的质量浓度为  $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 MION-LP 对细胞进行了进一步的体外实验,并用普鲁士蓝染色实验对细胞摄取 MION-LP 的情况进行了观察.图 5 为 MION-LP 与 HepG2、SMMC-7721 孵育 6 h 后的染色图.由图 5 可以看出,两种细胞内均有较多的蓝染颗粒,这表明细胞摄取了较多的 MION-LP,即 MION-LP 可增强 MRI 的成像效果.

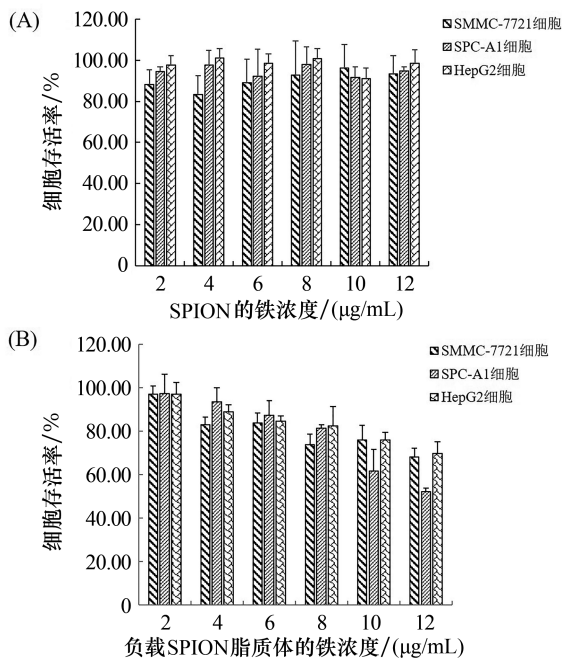


图 4 MION(A) 和 MION-LP(B) 的细胞毒性测定结果

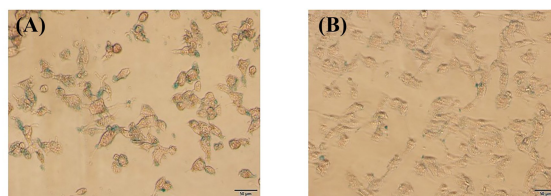


图 5 HepG2 细胞(A)和 SMMC-7721 细胞(B)的普鲁士蓝染色图(显微镜放大倍数  $10 \times 20$ )

由图 6 可知,随着 MION 和 MION-LP 中铁离子质量浓度的增加,MRI 的信号逐渐降低.为了验证 MION-LP 在体内的成像效果,对荷瘤裸鼠的尾静脉注射了 MION-LP,并对荷瘤裸鼠肿瘤部位进行了 T2WI 序列平扫,结果如图 7(A)所示.由图 7(A)可以看出,随着对裸鼠肿瘤部位扫描时间的增加,其图像逐渐成灰色.为对比肿瘤区

域给药前后的组织信号强度,以 0.02 sq. cm 大小为 ROI,对所得数据进行了独立样本  $t$  检验,结果如图 7(B)所示.由图 7(B)可以看出,给药后 3 h 内的 ROI 信号强度与给药前的 ROI 信号强度相比,给药后的 ROI 信号强度在统计学上呈显著性差异( $*P<0.05$ ).由此表明,对荷瘤裸鼠的尾静脉注射 MION-LP 后,MION-LP 在肿瘤部位出现聚集,进而说明 MION-LP 对肿瘤部位具有一定的靶向性.

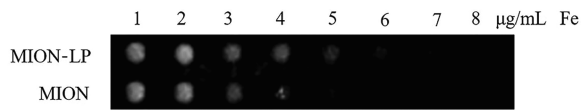


图 6 MION-LP 与 MION 的体外 MRI 图

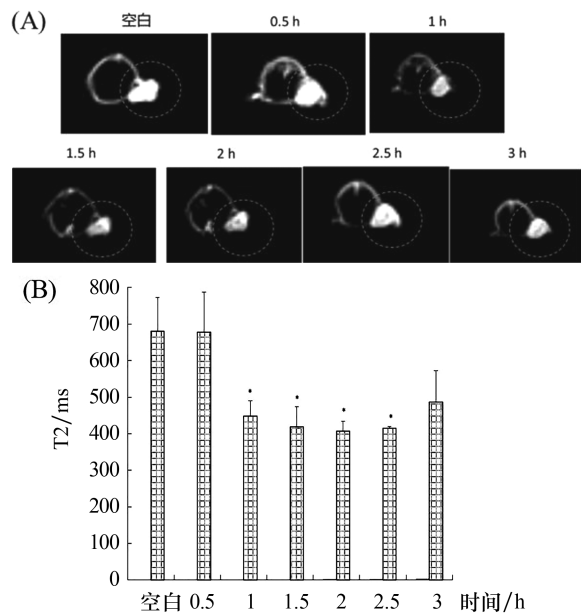


图 7 荷瘤裸鼠肿瘤部位的 MRI 检测图像(A)及其对应的 MRI 信号值的变化(B)

图 8 为肿瘤组织的染色图,其中图 8(A)为空白对照组的 HE 染色,图 8(B)为 MION-LP 实验组的 HE 染色,图 8(C)为 MION-LP 实验组的普鲁士蓝染色.由空白对照组图 8(A)和 MION-LP 实验组图 8(B)中的 HE 染色可以看到,细胞排列杂乱,细胞核变大且形状不规则,核质比例失调,这表明成功建立了荷瘤裸鼠模型.由图 8(C)可以看出,在经过普鲁士蓝染色的肿瘤切片内未观察到蓝染颗粒,说明 MION 经脂质体运输至肿瘤部位后,其又经过血液循环被送至其他组织中,即表明 MION 不会在肿瘤部位累积.

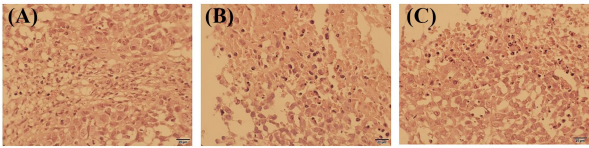


图 8 肿瘤组织的染色图(显微镜放大倍数 10×40)

肝脏组织的 HE 染色和普鲁士蓝染色如图 9 所示.由图 9(A)可以看出,肝脏组织结构正常,且切片内有肝脏特有的肝血窦结构,由此可确定切片为肝脏组织.肝脏组织的普鲁士蓝染色如图 9(B)所示.由图 9(B)可以看出,肝脏切片内有明显的蓝染颗粒,说明荷瘤裸鼠尾静脉注射的 MION-LP 已到达肝脏内.脾脏组织的 HE 染色如图 9(C)所示.由图 9(C)可以看出,脾脏组织结构正常,且切片内紫红色的部分为红髓,分散于红髓间的蓝色小点为白髓结构,由此可确定切片为脾脏组织.研究<sup>[10-12]</sup>表明,MION-LP 被递送到肿瘤部位后,其经过血液循环到达肝脏和脾脏内后能够被肝脾库普弗细胞(Kupffer cell)吸收、清除.脾脏组织的普鲁士蓝染色如图 9(D)所示.由图 9(D)可以看出,脾脏切片内有明显的蓝染颗粒,说明在荷瘤裸鼠尾静脉注射的 MION-LP 已到达脾脏内并被代谢.

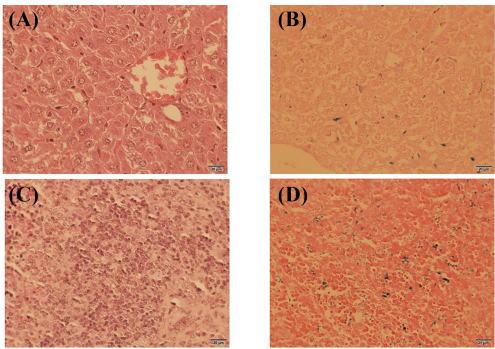


图 9 肝脏和脾脏组织的染色图(显微镜放大倍数 10×40)

3 结论

本文利用薄膜分散法成功制得了 MION-LP,且方法简单.通过体外和体内对 MION-LP 进行综合评价表明,MION-LP 可以在不影响组织正常状态下获得良好的 MRI 成像效果.本文研究结果可为 MION 的应用提供理论参考.今后我们将在 MION-LP 中加入抗肿瘤药物以对其治疗肿瘤的效果进行研究.

## 参考文献:

- [1] 黄鹏. 纳米材料的可控合成、功能化及其在肿瘤诊疗中应用研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2012.
- [2] JNANRANJAN P, BHABANI S S, SUMIT M, et al. Engineered polymeric iron oxide nanoparticles as potential drug carrier for targeted delivery of docetaxel to breast cancer cells[J]. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2019, 485: 165-173.
- [3] MAEDA H, TSUKIGAWA K, FANG J. A retrospective 30 years after discovery of the enhanced permeability and retention effect of solid tumors; next-generation chemotherapeutics and photodynamic therapy: problems, solutions, and prospects[J]. *Microcirculation*, 2016, 23(3): 173-182.
- [4] ZHAO T T, LIU Y P, GAO Z, et al. Self-assembly and cytotoxicity study of PEG-modified ursolic acid liposomes[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2015, 53: 196-203.
- [5] VAN EEIJK G A, VROEGE G, PHILIPSE A. Convenient preparation methods for magnetic colloids[J]. *Journal of Magnetism & Magnetic Materials*, 1999, 201(1-3): 31-33.
- [6] 杨萍. 人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 长循环脂质体的制备及评价[D]. 延吉: 延边大学, 2017.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 8.
- [8] 李海量. 聚合物修饰的叶酸靶向磁性纳米传递系统的制备及其对鼻咽癌的抑制和成像作用[D]. 广州: 南方医科大学, 2017.
- [9] MOK H J, ZHANG M Q. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-based delivery systems for biotherapeutics[J]. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2013, 10(1): 73-87.
- [10] ZHOU H, FAN Z Y, DENG J J, et al. Hyaluronidase embedded in nanocarrier PEG shell for enhanced tumor penetration and highly efficient antitumor efficacy[J]. *Nano Letters*, 2016, 16(5): 3268-3277.
- [11] ZHENG W W, ZHOU K R, CHEN Z W, et al. Characterization of focal hepatic lesions with SPIO-enhanced MRI[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2002, 8(1): 82-86.
- [12] REYNOLDS P R, LARKMAN D J, HASKARD D O, et al. Detection of vascular expression of E-selectin in vivo with MR imaging[J]. *Radiology*, 2006, 241(2): 469-476.

—————  
(上接第 307 页)

## 参考文献:

- [1] LEVENBERG K. A method for the solution of certain nonlinear problems in least squares[J]. *Quart Appl Math*, 1944, 2: 164-168.
- [2] MARQUARDT D W. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters[J]. *J Soc Ind Appl Math*, 1963, 11: 431-441.
- [3] YAMASHITA N, FUKUSHIMA M. On the rate of convergence of the Levenberg-Marquardt method[J]. *Computing*, 2001, 15: 239-249.
- [4] FAN J Y, YUAN Y X. On the quadratic convergence of the Levenberg-Marquardt method[J]. *Computing*, 2005, 74: 23-39.
- [5] AMINI K, ROSTAMI F, GIUSEPPE G. An efficient Levenberg-Marquardt method with a new LM parameter for systems of nonlinear equations[J]. *J Comput Appl Math*, 2018, 67(5): 637-650.
- [6] CHEN L, MA Y F. Shamanskii-Like Levenberg-Marquardt method with a new line search for systems of nonlinear equations[J]. *J Syst Sci Complex*, 2020, 33: 1694-1707.
- [7] LIANG M, ZHENG B, ZHENG Y T, et al. A two-step accelerated Levenberg-Marquardt method for solving multilinear systems in tensor-train format[J]. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 2021, 382: 113069.
- [8] FAN J Y, HUANG J C, PAN J Y. An adaptive multi-step Levenberg-Marquardt method[J]. *Journal of Scientific Computing*, 2019, 78: 531-548.
- [9] 杨柳, 陈艳萍. 求解非线性方程组的一种新的全局收敛的 Levenberg-Marquardt 算法[J]. *计算数学*, 2008, 30(4): 388-396.
- [10] STEWART G W, SUN J G. *Matrix Perturbation Theory*[M]. San Diego (CA): Academic Press, 1990.
- [11] MORE J J, GARROW B S, HILLSTROM K E. Testing unconstrained optimization software[J]. *ACM Trans Math Softw*, 1981, 7: 17-41.
- [12] SCHNABEL R B, FRANK P D. Tensor methods for nonlinear equations[J]. *SIAM J Numer Anal*, 1984, 21: 815-843.