

## 肺靶向性多室脂质体磁共振对比剂的制备及其特性分析

张 薇<sup>1</sup>, 耿 芳<sup>2</sup>, 姜庆军<sup>1</sup>, 刘士远<sup>1\*</sup>, 肖湘生<sup>1</sup>, 余宇宏<sup>2</sup>, 魏晓慧<sup>2</sup>

(1. 第二军医大学长征医院影像科, 上海 200003; 2. 上海交通大学药学院大分子给药实验室, 上海 200030)

**[摘要]** **目的:** 制备具有肺靶向性的多室脂质体 DepoFoam(Depo) 磁共振对比剂, 对其理化性质及生物特性进行初步观察。

**方法:** 以 Depo 为载体包封常规磁共振对比剂钆喷酸葡胺(Gd-DTPA, Gd), 制备多室脂质体磁共振对比剂 Depo-Gd; 观察其形态, 分析其粒径, 计算其包封率。10 只小鼠随机平均分为 Depo-Gd 尾静脉注射组和 Depo-Gd 肠系膜静脉注射组 2 组, 每组各 5 只, 分别经鼠尾静脉或肠系膜静脉注射附有红色荧光的 Depo-Gd, 观察小鼠一般状况, 初步分析其生物毒性; 20 min 后将所有小鼠的肝脏、肺脏和肾脏取出, 制成切片, 观察各脏器内有无红色荧光染色。**结果:** 成功制备 Depo-Gd 粒子, 电镜下可见其形态圆整, 流动性好, 性质稳定, 粒径均匀(平均 18  $\mu\text{m}$ ), 包封率为 50%, Gd 的浓度为 0.0417 mmol/ml。注药后各组小鼠始终很活跃, 未见明显的呼吸和神智异常; 荧光显微镜下观察, Depo-Gd 尾静脉注射组小鼠肺内见大量的红色物质显像, 而肝肾内未见显影; Depo-Gd 肠系膜静脉注射组小鼠肝脏显影良好而肺内未见染色。**结论:** Depo 包载 Gd 制备的 Depo-Gd 理化性质稳定, 具有较高的包封率, 无明显生物毒性及过敏反应, 经周围静脉注射时, 具有很好的肺靶向性, 值得进一步研究以应用于临床。

**[关键词]** 多室脂质体; 钆喷酸葡胺; 肺; 磁共振成像

**[中图分类号]** R 981.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0087-04

## Preparation and characterization of pulmonary targeting DepoFoam loaded MR contrast media: gadopentetate dimeglumine

ZHANG Wei<sup>1</sup>, GENG Fang<sup>2</sup>, JIANG Qing-jun<sup>1</sup>, LIU Shi-yuan<sup>1\*</sup>, XIAO Xiang-sheng<sup>1</sup>, YU Yu-hong<sup>2</sup>, WEI Xiao-hui<sup>2</sup>

(1. Department of Radiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Macromolecular Administration Laboratory, Pharmacy Institute, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To prepare a pulmonary targeting DepoFoam loaded MR contrast media: gadopentetate dimeglumine (Gd-DTPA), and to observe its physico-chemical and biologic characteristics. **Methods:** The routine magnetic resonance contrast media Gd-DTPA was encapsulated with multivesicular liposome (DepoFoam, Depo) labelled with red fluorescence to obtain a new particle Depo-Gd. The morphology, diameter, and the encapsulation rate of the new particle were examined. The targeting efficiency of the particle was assessed by animal test with mice. Ten mice were evenly divided into 2 groups; one group received caudal vein-injection of Depo-Gd and the other group received vena mesenterica-injection of Depo-Gd. Twenty minutes after the injection the slices of the mouse liver, lung, and kidney were obtained from both group and the fluorescence labeling were observed. **Results:** Under microscope, the produced Depo-Gd particles were round in shape and stable in status, with good mobility and well-distributed diameter (18  $\mu\text{m}$  in average). The encapsulation rate of the particles was 50% and the concentration of Gd was 0.0417 mmol/ml. The animal fluorescence test showed that mice in the 2 groups were all active and with normal respiratory and conscious status after the injection. In the Depo-Gd caudal vein-injection group, large amount of red dyeing was found in the lung while little red dyeing was found in the liver and kidney; in vena mesenterica-injection group, satisfactory dyeing was found in the liver but not in the lung. **Conclusion:** The produced Depo-Gd particles have a stable physico-chemical property and with satisfactory encapsulation rate. There is no obvious biological toxicity and allergic reaction. Besides, the particles have a good pulmonary targeting ability when injected into peripheral veins, making them promising in future clinical application.

**[KEY WORDS]** DepoFoam; Gd-DTPA; lung; magnetic resonance imaging

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(1): 87-90]

目前磁共振肺部灌注成像检查一般采用对比剂首过剂量法<sup>[1,2]</sup>, 但常规对比剂钆喷酸葡胺(Gd-DTPA, Gd)在人体内的代谢非常快, 注射后肺实质的强化只能持续 4~7 s<sup>[3]</sup>, 限制了其对肺脏疾病的诊断。如果能将其与大分子蛋白或其他大分子物质结合,

**[基金项目]** 上海市科委科研项目(03JC14009). Supported by Research Program of Shanghai Science and Technology Committee (03JC14009).

**[作者简介]** 张 薇, 硕士生. 现在上海交通大学附属仁济医院放射科, 上海 200001. E-mail: laventer@163.com

\* Corresponding author. E-mail: cjr.liushiyuan@vip.163.com

使之能更长时间存留于血管及血池,保持血中较高的浓度,将有利于临床上肺脏 MRI 成像。本研究以含有多个纳米脂质体为结构单元的多室脂质体 DepoFoam(Depo)作为载体,利用其载药量高,体积大、扩散慢的特点,包载 Gd,制备含 Gd 的大分子物质 Depo-Gd,并对其理化性质和生物特性进行初步分析和评价,探讨将其应用于临床肺脏 MRI 成像的可行性。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂 钆喷酸葡胺注射液 Gd(相对分子质量 938.02,北京北陆药业股份有限公司),赖氨酸、胆固醇、三油酸甘油酯(广州化学试剂厂),DG-PC(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine),DGPG(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)])。

1.2 仪器和设备 ICP 电感耦合等离子发射光谱仪(美国 P. E 公司),高速分散器 BioHomogenizer M133/2280(瑞士 Biospec Products 公司),旋转蒸发仪 LABOROTA 4000(德国 Heidolph 公司),CIS100 粒度粒径分析仪(荷兰 Ankersmid 仪器有限公司),高速离心机 Centrifuge 5804R(德国 Eppendorf 公司),荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

### 1.3 Depo-Gd 的制备及理化性质分析

1.3.1 Depo-Gd 的制备 内水相为 1 ml 469 mg/ml Gd 注射液,油相为含有胆固醇 20.5 mg、DGPC 28.5 mg、DGPG 5 mg、三油酸甘油酯 6 mg 的 1 ml 氯仿溶液。第一和第二外水相均为含有 4% 葡萄糖、20 mmol 赖氨酸的 4 ml 水溶液。在 40℃ 水浴中将内水相缓慢加入油相,10 000 r/min( $r=12.5$  cm)高速搅拌 8 min 成初乳,快速倒入第一外水相中,5 000 r/min( $r=12.5$  cm)高速搅拌 10 s 成复乳,再迅速转移到装有第二外水相的 150 ml 的圆底烧瓶中混匀,在 35℃ 水浴中通氮气吹除氯仿即得 Depo-Gd 混悬液。制备两批样品合并混合。600×g 离心 10 min 收集下层,用生理盐水等体积洗涤离心再收集下层约 7.5 ml。高速离心除去游离的未被包封的 Gd。将 1 ml 469 mg/ml Gd 的注射液用生理盐水稀释得 10 mg/ml Gd 的注射液样品。

1.3.2 Depo-Gd 的电镜观察和粒径分析 取 Depo-Gd 用生理盐水分散,用 CIS100 粒度粒径分析仪作粒径测定并制图,得出其平均粒径。

1.3.3 Depo-Gd 包封率的测定 取 Depo-Gd 混悬

液加破膜液涡旋破膜,用 ICP 电感耦合等离子发射光谱仪测定钆,结果记为  $W_1$ ,将分离后的脂质体加破膜液测定结果记为  $W_2$ ,则包封率计算公式: $Q\% = W_2/W_1 \times 100\%$ 。

### 1.4 Depo-Gd 的生物毒性和靶向性的评价

1.4.1 动物来源及分组 取 10 只昆明种小鼠,体重(20±2) g,雌雄不限(上海交通大学实验动物中心),随机分成 Depo-Gd 肠系膜静脉注射组和 Depo-Gd 尾静脉注射组 2 组,每组 5 只。Depo-Gd 肠系膜静脉注射组小鼠以 3% 的戊巴比妥钠溶液 2 ml 腹腔注射麻醉,固定,剖开腹腔,取出肠系膜,沿肠系膜静脉注入稀释过的含有红色荧光的 Depo-Gd 溶液 0.5 ml(0.24 ml/kg);Depo-Gd 尾静脉注射组小鼠直接经鼠尾静脉注射含有红色荧光的 Depo-Gd 溶液,用量同上。

1.4.2 Depo-Gd 的生物毒性及靶向性的观察 观察小鼠一般状况,初步分析其生物毒性。20 min 后将小鼠的肝脏、肺脏、肾脏取出,制成切片,放在荧光显微镜下观察其染色情况,以确定对比剂在脏器中是否有滞留。染色结果判断标准:肉眼人为将红色度定为 4 级,以“+”表示其色度强弱,由两名高年资主治医师双盲读片。

## 2 结果

2.1 Depo-Gd 的制备情况及物理特性 成功制备 Depo-Gd 溶液,肉眼见其浓缩溶液呈乳白色,电镜下见粒子形态圆整,流动性好,不粘连,大小均匀,性质稳定(图 1A);荧光显微镜观察可见红色染色均匀(图 1B)。粒径分析仪测定发现约 60% 的粒子直径分布于 13~25  $\mu\text{m}$  之间,成单峰分布,平均粒径约 18  $\mu\text{m}$  左右(图 2)。Depo-Gd 包封率约为 50%,含 Gd 的浓度为 0.0417 mmol/ml。

2.2 动物荧光实验结果 尾静脉注射 Depo-Gd 溶液后小鼠始终很活跃,未见到明显的呼吸和神智异常。注射 Depo-Gd 溶液 20 min 后解剖全部 10 只小鼠,在红色荧光显微镜下观察各脏器染色情况:红色荧光 Depo-Gd 肠系膜静脉注射组小鼠肺脏(-),肝脏(卅,图 3A),肾脏(+);红色荧光 Depo-Gd 尾静脉注射组肺脏(卅,图 3B),肝脏(-),肾脏(+). Depo-Gd 溶液由周围静脉注射后停留到肺组织,由门脉系统注射后停留到肝脏,一定粒径(13~25  $\mu\text{m}$ )的 Depo-Gd 可以停留在毛细血管网内,有很好的靶向性。

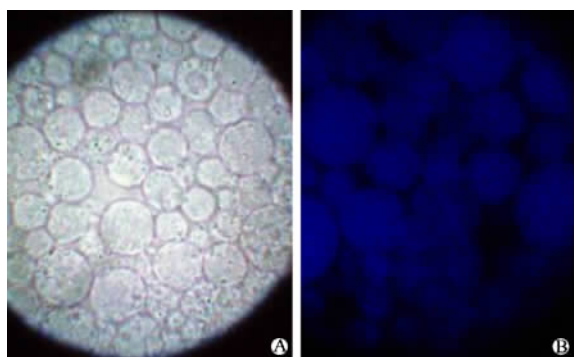


图 1 电镜下 Depo-Gd 粒子(A)及荧光显微镜下附有红色荧光的 Depo-Gd 粒子(B)

Fig 1 DepoGd particles under electron microscope(A) and fluorescent microscope with red dyeing lipid(B) ( $\times 400$ )

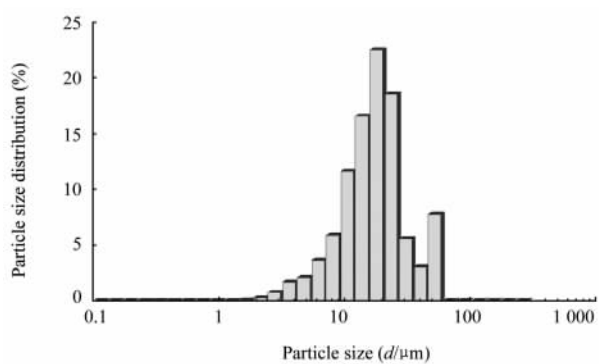


图 2 Depo-Gd 粒径分布图

Fig 2 Distribution of Depo-Gd particle diameters

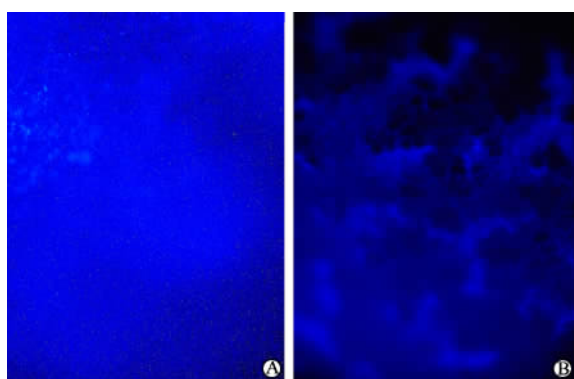


图 3 Depo-Gd 肠系膜静脉注射组肝脏组织(A)和 Depo-Gd 尾静脉注射组肺脏组织(B)荧光显微镜下所见

Fig 3 Liver slice in Depo-Gd injection via mesentery vein group(A) and lung slices in Depo-Gd injection via tail vein group(B) under fluorescence microscope ( $\times 40$ )

### 3 讨论

但肺组织因质子密度低,空气-肺组织界面具有磁敏感性效应以及呼吸运动等因素的影响,常规

MRI 成像较为困难<sup>[4]</sup>,而且,目前 MR 肺灌注成像所用的常规对比剂是 Gd,其经静脉注射后迅速分布于细胞外液,约 1 min 后血和组织中浓度已达到高峰,24 h 内约 90% 以原形从尿中排出。而肺循环的时间只有 3.0~3.4 s,无法用 Gd 等常规细胞外对比剂来很好评价肺组织灌注情况。因此,目前许多临床、科技工作者尝试将 Gd-DTPA 与大分子物质结合,使其经静脉注射后能停留于肺动脉处,提高肺动脉处对比剂的局部浓度,以利于成像。

脂质体是一种药物载体,由脂质双层包裹内部水性小腔组成,其脂质一般为磷脂,可使包封的药物在血液循环中免遭破坏或清除;同时易于被组织吸收,毒副作用小。包裹药物为简单的物理过程,不会改变药物的分子结构,而且药物被包裹后可降低毒性,减小药物用量,提高药物效果。国外已有不少将脂质体作为肺靶向药物载体的研究<sup>[5]</sup>。Suga 等<sup>[6]</sup>提出用普通脂质体作为 Gd 的载体进行肺实质灌注成像可取得良好的效果。但普通脂质体的包封率只有 30%,效果低于 Depo 脂质体。Depo 脂质体又称大多室脂质体,由非同心的多个脂质层组成,可用极少量的脂质包裹更多的水溶性药物,其包封率大大高于普通脂质体的最高包封率 30%,可以载带更多的药物,并可在 15 d 内维持平稳血药浓度,目前广泛应用于蛋白、多肽等生物药物的输送,并获得了良好的效果<sup>[7]</sup>。

本研究制备对比剂 Depo-Gd 粒径较大,分布较窄,平均粒径为 18  $\mu\text{m}$ ,粒子粒径均匀,流动性好,且性质稳定,包封率高。制备过程中的关键是控制靶向肺组织粒子粒径的大小,使其经静脉注射后,易被机械截留于肺部,提高肺部药物浓度。文献<sup>[8]</sup>报道粒径在 7~12  $\mu\text{m}$  的粒子有明显的肺靶向效果;Pande 等<sup>[9]</sup>发现粒径 4~6  $\mu\text{m}$  的粒子有 62% 可滞留于肺部;Suga 等<sup>[6]</sup>认为粒径在 5.1~25.0  $\mu\text{m}$  的粒子具有良好的肺靶向性。本实验制备的 13~25  $\mu\text{m}$  直径的 Depo-Gd 粒子占 60% 左右,荧光实验中 5 只经鼠尾静脉注射 Depo-Gd 的小鼠 20 min 后观察,肺组织内可见大量红色荧光染色,而肝肾切片未见明显显影,说明 Depo-Gd 经周围静脉注射后具有良好的肺靶向性,大部分停留在了肺内,利于肺脏 MRI 显影。而且实验中各组小鼠一般情况良好,未出现死亡、肺栓塞以及中毒表现。

本研究初步证实 Depo-Gd 经外周静脉注射后具有一定的肺靶向性,且无明显的生物毒性,值得进一步的研究以应用于临床作为肺脏 MRI 显影剂。

## [参考文献]

- [1] Sodani G, Sergiacomi G, Orlando A, et al. Perfusion MRI of the lung: preliminary results in twenty healthy volunteers[J]. Radiol Med (Torino), 2002, 103(1-2): 45-54.
- [2] Matsuoka S, Uchiyama K, Shima H, et al. Effect of the rate of gadolinium injection on magnetic resonance pulmonary perfusion imaging[J]. J Magn Reson Imaging, 2002, 15: 108-113.
- [3] Hatabu H, Gaa J, Kim D, et al. Pulmonary perfusion: qualitative assessment with dynamic contrast-enhanced MRI using ultra-short TE and inversion recovery turbo FLASH[J]. Magn Reson Med, 1996, 36: 503-508.
- [4] Abolmaali N D, Hietschold V, Appold S, et al. Gadomer-17-enhanced 3D navigator-echo MR angiography of the pulmonary arteries in pigs [J]. Eur Radiol, 2002, 12: 692-697.
- [5] Suarez S, Gonzalez-Rothi R J, Schreier H, et al. Effect of dose and release rate on pulmonary targeting of liposomal triamcinolone acetonide phosphate [J]. Pharm Res, 1998, 15: 461-465.
- [6] Suga K, Mikawa M, Ogasawara N, et al. Potential of Gd-DTPA-mannan liposome particles as a pulmonary perfusion MRI contrast agent: an initial animal study[J]. Invest Radiol, 2001, 36: 136-145.
- [7] Ye Q, Asherman J, Stevenson M, et al. DepoFoam technology: a vehicle for controlled delivery of protein and peptide drugs[J]. J Control Release, 2000, 64(1-3): 155-166.
- [8] Kanke M, Simmons G H, Weiss D L, et al. Clearance of <sup>141</sup>C3-labeled microspheres from blood and distribution in specific organs following intravenous and intraarterial administration in beagle dogs[J]. J Pharm Sci, 1980, 69: 755-762.
- [9] Pande S, Vyas S P, Dixit V K. Localized rifampicin albumin microspheres[J]. J Microencapsul, 1991, 8: 87-93.
- [收稿日期] 2006-05-28 [修回日期] 2006-12-13  
[本文编辑] 贾泽军

## 2006年中国医药科技十大新闻

一、在2006年全国科技大会上,中国科学院院士、著名肝脏外科专家吴孟超教授荣膺国家最高科技奖,成为自2000年该奖项设立以来中国医药卫生界获此殊荣的第一人。

二、我国进一步加强对艾滋病的防治和科学研究。国务院公布《艾滋病防治条例》、广西疾病预防控制中心完成中国首个艾滋病疫苗I期临床观察、中国疾病预防控制中心具有原始创新性艾滋病疫苗获准启动临床观察、北京协和医院领衔的中国艾滋病病人抗病毒治疗研究优选出适合我国国情的药物治疗方案、国家中医药免费治疗艾滋病项目扩大至14个省市区。

三、国家“十一五”期间加大对医药卫生科技投入。为落实《国家中长期科技发展规划纲要(2006~2020)》,先后启动“国家科技支撑计划”和“863”计划中人口与健康相关重大项目,并积极筹划实施“重大新药创制”、“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”两个重大科技专项。

四、我国建立大规模人胎肝基因表达谱。军事医学科学院贺福初院士等成功建立迄今国际上规模最大的人胎肝基因表达谱,首次在分子水平阐释了人胎肝的“行为”特征,为揭示人胎肝治疗重症肝炎、再生障碍性贫血等疾病的奥秘奠定基础。该成果荣获国家自然科学二等奖。

五、第四军医大学西京医院完成我国首例、全球第二例“换脸术”,即“颜面部复合组织异体移植术”。手术在切口层面、手术流程设计、脸部皮瓣的耐缺血时间等关键技术取得突破,并在免疫抑制治疗方面取得了成果。

六、我国城乡居民十大死因公布。卫生部对全国30个市和78个县(县级市)进行的统计数据表明,我国城市居民死亡原因构成中居前十位者分别为:恶性肿瘤、脑血管病、心脏病、呼吸系统疾病、损伤及中毒、消化系统疾病、内分泌营养和代谢疾病、泌尿生殖系统疾病、精神障碍、神经系统疾病。农村居民前十位死因分别为:呼吸系统疾病、脑血管病、恶性肿瘤、心脏病、损伤及中毒、消化系统疾病、泌尿生殖系统疾病、内分泌营养和代谢疾病、肺结核、精神障碍。

七、科学技术在食品药品安全事件检测和处理中发挥支撑作用。在“福寿螺”、“红心鸭蛋”、“多宝鱼”、“欣弗”、“齐二药”等事件的发现和处理中,科技工作者提供了重要的科学依据,发挥了重要的作用。

八、青藏铁路全线正式运营,我国高原医学研究团队为保障青藏铁路建设者的健康和生命安全作出突出贡献,实现了在严酷自然条件下鼠疫人间“零传播”和高原病“零死亡”。高原医学成果对青藏铁路开通后广大乘客的健康安全出行意义重大。

九、军事医学科学院王玉民等研制出我国首个移动生物安全三级(P3)实验室,获得近10项发明与实用专利,使我国成为继美、法、德之后,极少数能够独立设计和研制该装备的国家。

十、我国新药创制取得新突破。第二军医大学郑秀龙课题组研制出国家一类新型肿瘤放疗增敏药物,此项研究荣获国家技术发明奖二等奖;广州中医药大学李国桥教授“抗药性恶性疟防治药青蒿素复方的研发与应用”获国家科技进步二等奖。