

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01417

• 短篇报道 •

超顺磁性氧化铁纳米颗粒单次和连续给药的小鼠组织分布

An observation on tissue distribution of superparamagnetic iron oxides after single- and repeated-dose injection in mice

尹龙萍¹, 韩瑜², 龙玲¹, 刘睿¹, 袁正³, 刘士远^{3*}

1. 纳米技术及应用国家工程研究中心, 上海 200241
2. 上海交通大学自动化系, 上海 200240
3. 第二军医大学长征医院影像科, 上海 200003

[关键词] 超顺磁性氧化铁纳米颗粒; 原子吸收光谱; 组织分布; 形态学

[中图分类号] R 981.1 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2008)11-1417-02

磁性纳米颗粒除了具有一般纳米颗粒的特性外, 还具有超顺磁性, 在外加磁场作用下可定向操纵, 因此其在生物医学中有着广泛的应用前景, 如药物输送、磁共振成像(MRI)对比剂、靶向药物以及细胞分离和免疫分析等等^[1-3]。超顺磁性氧化铁颗粒(superparamagnetic iron oxides, SPIOs)粒径小(直径不超过 100 nm), 血液半衰期长(一般可达 6 h), 是医学成像对比剂研究理想的纳米材料。其功能核团为 Fe_3O_4 晶体, 急性毒理实验表明, 短期内使用安全剂量的 SPIOs 对生物体无明显损害^[4-5]。但是, 大部分被网状内皮系统吞噬的纳米尺度 Fe_3O_4 晶体在体内的长期代谢过程尚未完全明了, 在体内重要器官和组织内的分布亦不十分清楚^[6-8]。鉴于其在生物医学领域的应用前景, 本研究从组织器官水平研究该纳米材料对机体重要器官的形态和功能影响, 通过单次和连续给药对其在体内的单次和重复积累作定量研究, 为合理开发利用该纳米材料奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 仪器 精密电子天平(上海天平仪器厂, 型号: PL6001-S/00); 原子吸收光谱仪(美国 Varian SpectrAA 240 FS); 光学显微镜(日本 Olympus 公司, 型号: CX21); 电热鼓风干燥箱(上海精密实验设备厂, 型号: DHG-9123A)。

1.2 试剂 纳米材料 SPIOs(南京工业大学纳米应用研究中心, 经电镜检测粒径在 30 nm 左右^[6]), 自制注射用纯水, 生理盐水, 铁标准液: GBW 08616, 浓度 1 g/L(上海测试与计量技术研究院), H-E 染色试剂, 锥虫蓝染色试剂, 石蜡, 甲醛。

1.3 实验动物 昆明种小鼠, 雄性, 体质量 17~21 g, 6~8

周龄, 动物合格证号: SCXK(沪) 2007-0005, 购于上海市斯莱克实验动物有限责任公司。

1.4 SPIOs 单次和连续给药在小鼠体内重要器官中的组织分布及形态学研究 40 只小鼠随机分为阴性对照组(2 组)、单次给药组和多次给药组, 每组 10 只。阴性对照组中的一组单次腹腔注射 20 ml/kg 生理盐水, 另一组连续给生理盐水。单次给药组在预实验基础上, 采用剂量为 100 mg/kg (20 ml/kg) 腹腔注射 1 次; 多次给药组同法给药, 每日 1 次, 持续 10 d。观察给药后小鼠的一般表现, 单次给药组于给药后 18 h、多次给药组于最后一次给药后 18 h 处死, 剥离心、脾、肝、肺、肾、脑等器官, 各取一部分用于测定新鲜样品组织铁含量, 余下部分用 4% 甲醛固定, 石蜡包埋、切片, 制作病理组织标本, 常规 H-E 染色和锥虫蓝染色, 光镜下观察纳米粒的分布和组织的病理学变化。

1.5 新鲜组织铁含量的测定 波长: 248.3 nm; 灯电流: 5 mA; 光谱通带: 0.2 nm; 火焰: 空气-乙炔。各组织置 85℃ 鼓风干燥箱中烘烤至恒重, 转入锥形瓶中准确称重。加入浓硝酸 4 ml, 混匀, 称取 0.2~1.0 g 的试样置于消解罐中, 加入约 2 ml 水, 采用优化的 CEM MARS 微波消解方法消解。用少量水溶解残渣, 转入 25 ml 比色管, 清洗锥形瓶, 洗液转入 25 ml 比色管并定容至 25 ml, 待测浓度。将 1 g/L 铁标准溶液依次稀释成 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 μg/ml 标准系列溶液, 按原子吸收分光光度计操作条件测定(采用程序升温法, 最终至 200℃, 20 Pa, 16 min, 400 W), 绘制组织铁浓度测定标准曲线。方法学考察表明, 本法稳定性、精密性、重现性良好, 回收率 93.9%, 可以满足含量测定的要求。按相同条件测定各样品管, 得出光密度值, 代入标准曲线方程中求算

[收稿日期] 2008-04-24 [接受日期] 2008-07-20

[基金项目] 国家自然科学基金(c03031801); 上海市学科带头人计划(06XD14039)。Supported by National Natural Science Foundation of China(c03031801) and Program of Shanghai Subject Chief Scientists(06XD14039)。

[作者简介] 尹龙萍, 硕士, 工程师, E-mail: dragon_ylp@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-63610109-73680, E-mail: cjr.liushiyan@vip.163.com

相应浓度值,按稀释比例换算后得到干品组织铁含量,转换成新鲜样品组织铁含量。

1.6 统计学处理 数据用SPSS统计软件包处理,计量资料齐性(Homogeneity of Variances)检验后进行方差分析(ANOVA)和比较(Multiple Comparisons)。

2 结果

2.1 一般情况及体质量变化 给药前,各组小鼠状态良好,进食饮水正常,大便成形,黄褐色,毛色润泽;给药后,除阴性对照组外,其余各组小鼠均表现为不活泼,聚堆;反抗性增强,反抗力减弱;进食及饮水稍有减少,体质量略微下降,但不明显;脏器指数变化不明显;无死亡情况发生。

2.2 原子吸收光谱仪检测结果 从图1可见,SPIOs经注射后,迅速分布至各器官、组织中,依次为心、脾、肝、肺、肾、脑等脏器,心脾肝脏富集量最高。连续10d同等剂量重复腹腔注射SPIOs,体内重要脏器组织铁含量与单次给药相比差别不明显,可见连续给药体内代谢较快,无蓄积,毒性较低。本次实验中SPIOs的最大耐受量大于100 mg/kg。

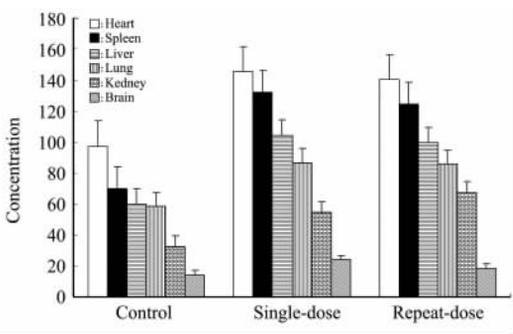


图1 SPIOs 单次和连续给药在小鼠体内重要器官中的组织分布
n=10; x±s

2.3 病理组织学检查 取心、脾、肝、肺、肾、脑进行病理组织学检查,常规H-E染色下各组织均未见明显的形态学改变,锥虫蓝试剂染色状态下观察不到铁粒子的存在。

3 讨论

由于磁性纳米颗粒的广泛应用前景,其对人类健康与生存环境甚至生命过程的各个方面将产生什么样的影响,已经成为人们广泛关注的热点^[9-10]。然而,关于其生物安全性的风险评估工作刚刚起步,尚处于积累原始数据的初级阶段。本研究通过预实验,采用100 mg/kg SPIOs腹腔注射给药较

为稳定,遂通过单次给药与连续给药2种给药方式,观察了SPIOs在小鼠体内的分布情况,结果发现SPIOs在小鼠体内的分布依次为心、脾、肝、肺、肾、脑,对体内重要脏器功能有一定影响,导致小鼠一般反应变差,但各器官的组织病理学均未见明显改变,而且连续给药无蓄积,显示其毒性较低。本次实验中SPIOs的最大耐受量大于100 mg/kg。

SPIOs小鼠体内实验显示其毒副反应风险低,结合前期体外实验,证实其有较好的临床应用前景。其体内作用机制尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Bourrinet P, Bengel H H, Bonnemain B, Dencausse A, Idee J M, Jacobs P M, et al. Preclinical safety and pharmacokinetic profile of Ferumoxtran-10, an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent[J]. Invest Radio, 2006, 41: 313-324.
- [2] Neuberger T, Schopf B, Hofmann H, Hofmann M, von Rechenberga B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system[J]. J Magn Magn Mater, 2005, 293: 483-496.
- [3] Corot C, Petry K G, Trivedi R, Saleh A, Jonkmann C, Le Bas J F, et al. Macrophage imaging in the central nervous system and in carotid atherosclerotic plaque using ultrasmall superparamagnetic iron oxide in magnetic resonance imaging[J]. Invest Radiol, 2004, 39: 619-625.
- [4] 刘 岚,唐 萌,顾 宁,熊丽林,马 鸣,张 宇,等. Nano-Fe₃O₄-Glu的急性和长期毒性研究[J]. 环境与职业医学, 2004, 21: 430-433.
- [5] 庞小峰,张怀武,邓 波,赵 强,刘乐维,漆 婷,等. 纳米尺度物质的生物效应和安全性[J]. 物理, 2006, 35: 287-293.
- [6] 王国斌,肖 勇,陶凯雄,张 力,李剑星,夏泽锋,等. 纳米级三氧化二铁的药动力学和组织分布研究[J]. 中南药学, 2005, 3: 5-7.
- [7] 郑建伟,徐 戎,唐 滔,王剑明,曾繁典,邹声泉. 5-氟尿嘧啶纳米磁性颗粒在荷瘤鼠体内靶向性分布[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2007, 36: 202-205.
- [8] Powers K W, Palazuelos M, Moudgil B M. Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies[J]. Nanotoxicology, 2007, 1: 42-51.
- [9] Sanhai W R, Sakamoto J H, Canady R, Ferrari M. Seven challenges for nanomedicine[J]. Nat Nanotechnol, 2008, 3: 242-244.
- [10] Linkov I, Satterstrom F K, Corey L M. Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions[J]. Nanomedicine, 2008, 4: 167-171.

[本文编辑] 孙 岩