

· 论著 ·

一种新型ICG递送纳米颗粒的制备及其在肿瘤成像中的应用*

范秀松¹ 刘 朋² 言伟强^{1,*}

1.北京大学深圳医院医学影像科 (广东 深圳 518035)

2.北京大学深圳医院骨科生物材料国家地方联合研究中心 (广东 深圳 518036)

【摘要】 ICG由于其独特的性质而被用于肿瘤的荧光成像和光学治疗,然而单独ICG的体内半衰期短,生物利用度低,从而限制了其广泛应用。基于此,本文构建了一种聚合物递送体系用于ICG的有效递送和肿瘤荧光成像。首先合成了一种阳离子双嵌段聚合物(PPEGMA-b-P(DMAEMA-co-TIBMA)),通过静电相互作用与ICG复合形成纳米颗粒。利用动态光散射表征了ICG纳米颗粒的粒径为55 nm,同时MTT实验证明其具有良好的生物相容性,通过共聚焦显微镜观察发现ICG纳米颗粒可以快速进入U87细胞并分布在细胞质中。体内分布实验表明ICG纳米颗粒可以有效的将ICG递送到肿瘤部位,实现肿瘤的荧光成像。综上所述,利用阳离子两嵌段聚合物通过静电作用负载ICG用于递送ICG到肿瘤部位是一种有效可行的方案。

【关键词】 吲哚菁绿; 纳米颗粒; 静电复合; 肿瘤成像

【中图分类号】 R73

【文献标识码】 A

【基金项目】 深圳市科技计划项目(JCYJ20210324105806016; JCYJ20220531093604009)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2023.01.048

Preparation of a Novel ICG Delivery Nanoparticle and Its Application in Tumor Imaging*

FAN Xiu-song¹, LIU Peng², YAN Wei-qiang^{1,*}

1.Department of Radiology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China.

2.National & Local Joint Engineering Research Center of Orthopaedic Biomaterials, Department of Bone & Joint Surgery, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China.

Abstract: Although indocyanine green (ICG) is a promising agent for tumor imaging and phototherapy due to its unique properties, their extensively application is limited because of short half-life in vivo and low bioavailability. To solve these problems, a novel polymeric ICG delivery system was fabricated for effective ICG delivery and tumor imaging. Firstly, a cationic block polymer(PPEGMA-b-P(DMAEMA-co-TIBMA))was synthesized, and the ICG nanoparticle was prepared by electrostatic interaction of PPEGMA-b-P(DMAEMA-co-TIBMA) and ICG. This ICG nanoparticle have a diameter of 55 nm and present good biocompatibility. In addition, the ICG nanoparticle can enter U87 cells effectively observed by confocal microscope. In vivo experiment demonstrated that this ICG nanoparticle can deliver ICG to tumor sites effectively. Overall, it is a promising strategy to deliver ICG to tumor sites by cationic block polymer through electrostatic interaction.

Keywords: Indocyanine Green; Nanoparticle; Electrostatic Complex; Tumor Imaging

1 前言

吲哚菁绿(ICG)是一种生物相容性良好的近红外荧光染料,可应用于肿瘤成像诊断和光热治疗等多个领域^[1-2]。虽然ICG已被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于临床近红外成像,然而其在体内的半衰期仅有150到180秒,很容易被分解代谢,从而导致其在肿瘤部位蓄积时间短,限制了其广泛的应用。

近年来随着纳米科技的飞速发展,纳米药物递送体系受到了广泛的关注。纳米材料可以延长血液循环时间和通过增强渗透和保留(EPR)效应提高其在肿瘤部位的蓄积,实现对肿瘤的被动靶向^[3-5]。一系列的纳米颗粒(聚合物、四氧化三铁^[6]、介孔硅颗粒^[7]、石墨烯^[8]等)已被开发用于药物的有效递送、提高肿瘤部位的蓄积,其中聚合物纳米颗粒由于其制备简单、易修饰、生物相容性好等优势而被广泛用于药物的递送^[9]。因此,通过构建ICG递送纳米颗粒可克服其半衰期短、肿瘤部位蓄积少的缺点,促进ICG的广泛应用。

通过静电作用构建药物递送纳米颗粒是一种绿色安全的方法,制备过程完全在水相中进行,无需有机溶剂的参与,具有广阔的应用前景^[10-11]。由于ICG分子带有两个磺酸基分子,因此其成负电性。基于此,我们通过制备了一种带阳离子的两嵌段聚合物利用静电相互作用构建了一种聚合物递送ICG纳米颗粒,用于实现ICG的有效递送和肿瘤荧光成像。考察了ICG纳米颗粒的尺寸、生物相容性以及其在肿瘤部位的蓄积和成像效果。

2 资料和方法

2.1 基本资料 聚甲基丙烯酸聚乙二醇单甲醚(PPEGMA, Mn=500), 4-氰基-4-[[[(十二烷基)硫酮甲基]硫基]戊酸(CDTPA), 偶氮二异丁腈(AIBN), 甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMAEMA)和二氧六环购买自于Sigma-Aldrich。2-(2', 3', 5'-三碘苯甲酰基)甲基丙烯酸乙酯(TIBMA)按照文献的方法合成^[12]。

2.2 PPEGMA-b-P(DMAEMA-co-TIBMA)的合成 将PEGMA(2.41 g)溶解在二氧六环(5mL)中,然后将AIBN(7.9mg)和CDTPA(97.2mg)加到该溶液中。将该混合物鼓氩气30分钟除氧,并在70℃下搅拌聚合24小时。将反应液倒入过量的冰乙醚中,通过离心收集沉淀物并真空干燥获得PPEGMA大分子转移剂。

将PPEGMA-CDTPA(0.5g)、DMAEMA(0.55g)、TIBMA(0.92g)和AIBN(3.28mg)溶解在二氧六环(4mL)中。将该混合液鼓氩气30分钟除氧,并在70℃下搅拌聚合24小时。将反应液倒入大量过量的乙醚中,通过离心收集沉淀物并真空干燥获得PPEGMA-b-P(DMAEMA-co-TIBMA)。

2.3 ICG负载 纳米颗粒的制备及表征 将5mg PPEGMA-b-P(DMAEMA-co-TIBMA)溶于水中,然后在搅拌状态下将1mg吲哚菁绿(ICG水溶液)滴入,室温搅拌1h,放入3500透析袋中透析1天,收集放在4度冰箱储藏待用。纳米颗粒的粒径及粒径分布用动态光散射来测定。

2.4 ICG纳米颗粒的生物相容性测试 通过MTT法测定ICG纳米颗粒对U87(人神经胶质瘤细胞)的细胞毒性。将U87细胞以5×10³个细胞/孔接种于96孔板中,使用100μL含10% FBS的

【第一作者】范秀松,男,主管技师,主要研究方向:CT、MRI影像技术。E-mail: bdyfanxiusong@163.com

【通讯作者】言伟强,男,主任医师,教授,主要研究方向:影像诊断及分子影像。E-mail: syanzwq@126.com

DMEM培养基, 37°C培养过夜。将每孔中的培养基更换为相同体积的含有不同浓度的 ICG 纳米颗粒 DMEM 培养基, 并且孵育 24 小时。之后, 将每孔中的培养基更换为 100 μ L 含有浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT 的 DMEM 培养基, 并将细胞在 37°C 下再培养 4 小时。4 小时后, 将含 MTT 的培养基替换为 100 μ L DMSO, 在酶标仪上记录每个孔在 595 nm 处的吸光度。数据表示为 ($\bar{x} \pm s$)。($n=3$)。

2.5 ICG 纳米颗粒与 U87 细胞的相互作用 将 U87 细胞接种在 4 孔 Lab-Tek 分室盖玻片中(每孔 5×10^5 个细胞), 使用 0.5 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基孵育过夜。然后去除培养基, 加入含有 ICG 或 ICG 纳米颗粒的培养基在 37°C 培养 4 h, 去除培养基, 用 PBS 洗涤细胞三次并用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 15 分钟。采用 DAPI 进行细胞核染色, 并使用共聚焦显微镜观察。

2.6 ICG 纳米颗粒在荷瘤裸鼠中的分布 通过将 U87 细胞(1×10^6 个细胞)注射到裸鼠的右侧, 获得荷瘤小鼠。待肿瘤体积增长到大约 60 mm³ 后, 将小鼠随机分为 2 组, 每组 6 只。ICG 或 ICG 纳米颗粒通过尾静脉注射到小鼠体内。在不同时间点通过小动物荧光活体成像观察其在荷瘤小鼠体内的分布。

3 讨论

3.1 PPEGMA-b-P(DMAEMA-co-TIBMA)的合成 PPEGMA-b-P(DMAEMA-co-TIBMA)通过可逆加成-断裂链转移(RAFT)聚合的方法制备, 其合成路线图如图1所示。首先以CDTPA为链转移剂将PEGMA通过RAFT聚合制备了大分子链转移剂PPEGMA, 然后以PPEGMA为大分子链转移剂将DMAEMA和TIBMA共聚得到两嵌段聚合物PPEGMA-b-P(DMAEMA-co-TIBMA)。

通过凝胶渗透色谱(GPC)和¹H-NMR 证明了PPEGMA-b-P(DMAEMA-co-TIBMA)的成功合成。在图2中可以明显的可以看到各氢的化学位移峰。通过积分计算得PPEGMA-b-P(DMAEMA-

co-TIBMA)中PPEGMA、DMAEMA和TIBMA的聚合度分别为10、41和16。利用¹H-NMR 和GPC计算所得PPEGMA 和PPEGMA-b-P(DMAEMA-co-TIBMA)的分子量如表1所示。

3.2 ICG 纳米颗粒的制备及表征 PPEGMA-b-P(DMAEMA-co-TIBMA)在水溶液中由于DMAEMA而带正电, ICG则因带有磺酸基而带负电, 因此, 在水溶液中通过将 PPEGMA-b-P(DMAEMA-co-TIBMA) 和 ICG 混合, 则可以通过静电相互作用获得 ICG 纳米颗粒, 其中PPEGMA位于纳米颗粒的表面, 降低其在血液循环中的蛋白吸附, 延长血液循环时间; 带负电的ICG和带正电的P(DMAEMA-co-TIBMA)段形成纳米颗粒的内核。通过动态光散射测得ICG 纳米颗粒的直径为55 nm。

3.3 ICG 纳米颗粒的体外表征 良好的生物相容性是纳米颗粒用于体内成像的首要条件, 因此, 我们利用MTT 法测定ICG纳米颗粒对 U87 细胞的毒性, 结果表明, ICG 纳米颗粒具有良好的生物相容性, 在测试浓度范围内不会影响U87细胞的存活率。

此外, 本研究还考察了ICG纳米颗粒与U87细胞的相互作用。通过将ICG纳米颗粒和U87细胞共孵育3 h, 然后利用共聚焦显微镜观察了ICG在细胞内的分布, 实验结果表明, ICG 纳米颗粒可以更好的递送ICG到U87细胞里面, 并且其主要分布在细胞质中。

3.4 ICG 纳米颗粒的体内肿瘤成像 本研究通过小动物荧光成像考察了ICG纳米颗粒在荷瘤小鼠体内的分布及在肿瘤部位的蓄积。结果表明, 经过尾静脉注射24 h后, ICG 纳米颗粒可以递送ICG到肿瘤部位, 实现肿瘤的荧光成像, 而单独的ICG则已经快速从体内代谢。

表1 各聚合物的分子量(g/mol)

sample	Mn(¹ H-NMR) ^a	Mn(GPC) ^b	Mw/Mnb
PPEGMA	5000	8010	1.25
PPEGMA-b-P(DMAEMA-co-TIBMA)	21245	14344	1.52

注: aDetermined from ¹H-NMR. bDetermined from GPC (THF).

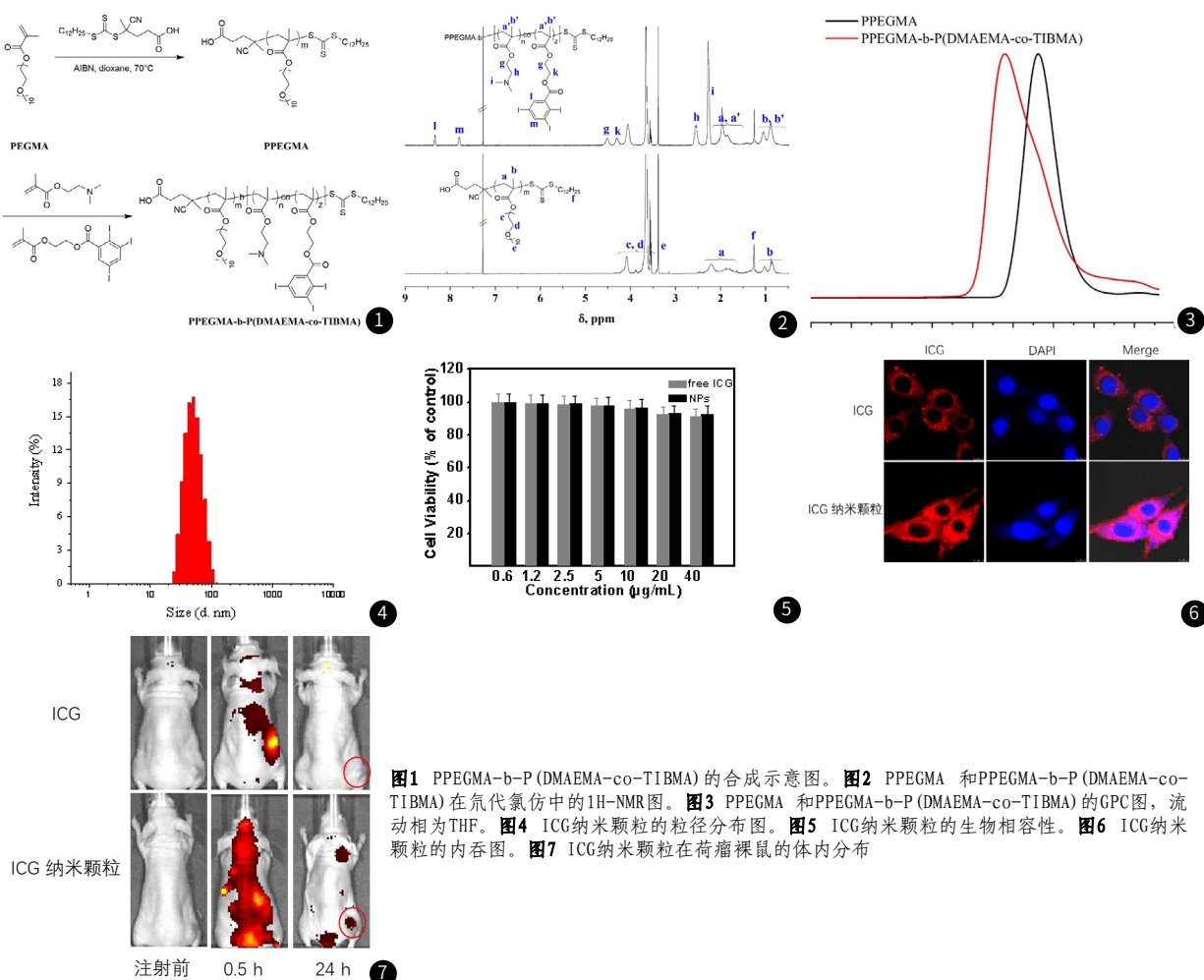


图1 PPEGMA-b-P(DMAEMA-co-TIBMA)的合成示意图。图2 PPEGMA 和PPEGMA-b-P(DMAEMA-co-TIBMA)在氘代氯仿中的¹H-NMR图。图3 PPEGMA 和PPEGMA-b-P(DMAEMA-co-TIBMA)的GPC图, 流动相为THF。图4 ICG纳米颗粒的粒径分布图。图5 ICG纳米颗粒的生物相容性。图6 ICG纳米颗粒的内吞图。图7 ICG纳米颗粒在荷瘤裸鼠的体内分布

4 结 论

本研究利用简单的静电相互作用构建了一种聚合物ICG纳米颗粒,该纳米颗粒的水和粒径为55 nm。该纳米颗粒具有良好的生物相容性,并且可快速进入U87细胞内部,分散在细胞质中。此外,ICG纳米颗粒可以在活体肿瘤部位有效的蓄积实现肿瘤的荧光成像。

参考文献

- [1] Ma R, Alifu N, Du Z, et al. Indocyanine green-based theranostic nanoplatfrom for NIR fluorescence image-guided chemo/photothermal therapy of cervical cancer[J]. International Journal of Nanomedicine, 2021, 16: 4847-4861.
- [2] Pan W, Chen W, Min Y, et al. A review on nano-based drug delivery system for cancer chemioimmunotherapy[J]. ACS Omega, 2021, 6 (51): 35505-35513.
- [3] Tang L, Li J, Zhao Q, et al. Advanced and innovative nano-systems for anticancer targeted drug delivery[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(8): 1151.
- [4] Mu W, Chu Q, Liu Y, et al. A review on nano-based drug delivery system for cancer chemioimmunotherapy[J]. Nano-Micro Letters, 2020, 12(1): 1-24.
- [5] Lim S, Park J, Shim M K, et al. Recent advances and challenges of repurposing nanoparticle-based drug delivery systems to enhance cancer immunotherapy[J]. Theranostics, 2019, 9(25): 7906-7923.

- [6] Gholami A, Mousavi S M, Hashemi S A, et al. Current trends in chemical modifications of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery in cancer chemotherapy[J]. Drug Metabolism Reviews, 2020, 52(1): 205-224.
- [7] Li W, Liu Z, Fontana F, et al. Tailoring porous silicon for biomedical applications: From drug delivery to cancer immunotherapy[J]. Advanced Materials, 2018, 30(24): 1703740.
- [8] Sharma H, Mondal S. Functionalized graphene oxide for chemotherapeutic drug delivery and cancer treatment: A promising material in nanomedicine[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(17): 6280.
- [9] Chen S, Zhu L, Du Z, et al. Polymer encapsulated clinical ICG nanoparticles for enhanced photothermal therapy and NIR fluorescence imaging in cervical cancer[J]. RSC Advances, 2021, 11(34): 20850-20858.
- [10] Chen J, Ding J, Zhang Y, et al. Polyion complex micelles with gradient pH-sensitivity for adjustable intracellular drug delivery[J]. Polymer Chemistry, 2015, 6(3): 397-405.
- [11] Xia D, Wang F, Pan S, et al. Redox/pH-Responsive Biodegradable Thiol-Hyaluronic Acid/Chitosan Charge-Reversal Nanocarriers for Triggered Drug Release[J]. Polymers, 2021, 13(21): 3785.
- [12] Wang K W, Peng H, Thurecht K J, et al. Multifunctional hyperbranched polymers for CT/19 F MRI bimodal molecular imaging[J]. Polymer Chemistry, 2016, 7: 1059-1069.

(收稿日期: 2022-06-16)

(校对编辑: 姚丽娜)

(上接第 109 页)

注意患儿静脉滴注情况,不可擅自调整输液速度,减少因静脉给药导致的ADR;因此在选择给药途径时,在不影响临床治疗时,优先考虑口服用药,其次是肌肉注射,将静脉注射作为小儿用药途径的最末选项^[13]; (4)用药前,明确疾病诊断,详细了解患儿既往用药史、过敏史,使治疗方案更加简化,避免药物滥用性;并严格控制给药剂量,根据个体化差异,选择合理的用药剂量;同时临床医师要熟知小儿的肾脏解剖特点及生理特点,认识药物肾毒性,严格掌握用药指征,避免药物滥用,尽量控制肾毒性药物的使用^[14]; (5)强化对医务人员、患儿家长的健康宣教,提倡抗生素准确、合理用药的宣传教育,强化安全用药的监督管理,使其掌握临床用药监测知识、用药方法,强化医务人员急救知识的专业培训,树立准确用药的责任意识,广泛普及ADR知识,以此提高临床用药的安全性,实现经济、安全用药的目的^[15]; (6)临床用药时,需要有目的联合用药,用最少种类的药物达到治疗目的,在联合用药时,需要尽量排除药物之间相互作用引起的不良反应,若患儿服用多种药物出现不良反应,需要准确分辨是哪种药物引起的不良反应,以此提高临床用药的安全性及有效性^[16]。

综上所述,小儿常用药存在不良反应,以1~3岁小儿为主,抗生素、中药类制剂以及静脉注射是引起不良反应的主要情况,因此临床需要加强用药监测,强化抗生素、中药制剂的安全管理,教育公众能安全合理用药,以此减少小儿ADR的发生,为临床合理、安全用药提供参考。

参考文献

- [1] 钟文, 毛晨梅, 王梅. 某院562例儿童药品不良反应回顾性分析[J]. 儿科药理学杂志, 2018, 24(10): 39-42.
- [2] 吴雨亭, 冷静. 我院522例抗菌药物不良反应报告及相关因素分析[J]. 西北药理学杂志, 2019, 34(4): 560-563.
- [3] 王千一, 夏旭东, 彭亚丽, 等. 儿童药物不良反应1103例分析[J]. 安徽医药, 2020, 24(3): 627-630.

- [4] 李沙沙, 徐济萍, 刘帅, 等. 2013-2016年我院儿童抗感染药物不良反应的评价[J]. 儿科药理学杂志, 2018, 24(1): 46-48.
- [5] 周莉, 时艳平, 侯红丽, 等. 108例儿童药物不良反应分析[J]. 儿科药理学杂志, 2019, 25(4): 55-57.
- [6] 黄贝茹, 黄钢花. 2016-2017年我国儿童药品不良反应分析[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(6): 758-762.
- [7] 李燕, 陈海燕, 刘强. 某儿童医院2014-2016年414例儿童药品不良反应报告分析[J]. 儿科药理学杂志, 2018, 24(8): 43-46.
- [8] 王昆祥, 郭品, 韩慧韵, 等. JCI标准下某儿童医院106例药品不良反应调查分析[J]. 儿科药理学杂志, 2019, 25(9): 49-52.
- [9] 张明, 杨星辰, 金丽, 等. 122例中药制剂所致ADR特点及其影响因素[J]. 中成药, 2021, 43(8): 2268-2271.
- [10] 任红, 汪立梅. 中药注射剂不良反应原因分析与护理策略[J]. 中国实用护理杂志, 2019, 35(33): 2598-2601.
- [11] 柴艳冬, 牛恒立, 许颖, 等. 头孢菌素类抗生素药物不良反应情况分析[J]. 华南预防医学, 2021, 47(7): 910-912, 916.
- [12] 连晓梅. 中药制剂导致的不良反应类型、特点与用药管理对策[J]. 山西医药杂志, 2020, 49(6): 712-713.
- [13] 杨娟艳, 杨芳蓉, 杨爽, 等. 品管圈在提升我院药品不良反应报告监测水平中的应用[J]. 中国药物警戒, 2020, 17(7): 412-417.
- [14] 滕威, 李明爽, 于鲁海, 等. 某三甲医院从被动收集到主动监测药品不良反应监测管理水平干预效果评价[J]. 药物流行病学杂志, 2019, 28(9): 572-577.
- [15] 合理用药国际网络中国中心组临床安全用药组, 中国药理学学会药源性疾病专业委员会, 中国药学会医院药学专业委员会, 等. 与药品说明书有关的用药错误防范指导原则[J]. 药物不良反应杂志, 2019, 21(2): 92-97.
- [16] 李晓峰, 朱有才, 翟占强. 临床药师在规范药物不良反应自我管理中的作用[J]. 中医药管理杂志, 2021, 29(8): 94-95.

(收稿日期: 2022-06-25)

(校对编辑: 姚丽娜)