

¹³¹I标记贝伐单抗偶联紫杉醇超顺磁性氧化铁纳米粒的制作及生物分布实验

季发权¹ 吉安平¹ 张杰¹ 柏凌¹ 焦庆嵩¹ 戚宁² 张东生² 杜明华¹

1(南京中医药大学附属医院 核医学科 南京 210029)

2(东南大学 临床医学院 南京 210009)

摘要 为了研究¹³¹I标记贝伐单抗偶联紫杉醇超顺磁性氧化铁纳米粒(¹³¹I-Bevacizumab-Paclitaxel-Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles, ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs)的制备和生物学分布。将30只成瘤裸鼠分为单靶向组及双靶向组,再按时间点2 h、6 h、12 h、24 h及48 h分为5个亚组,每亚组各3只,尾静脉注射¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs后,进行生物学分布及单光子发射计算机断层成像术(Single-Photon Emission Computed Tomography, SPECT)显像。¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs的粒径约220 nm,分散性尚可;¹³¹I标记率为81.4%;放射性化学纯度(Radiochemical Purity, RCP)>99%;在PB缓冲液中稳定性良好;在体外PTX(Paclitaxel)缓释性能良好;与A549细胞有较好的亲和力。体内生物学分布结果:随着时间的延长,肿瘤组织的放射性计数相对增高,12 h达高峰;T/NT(Target to Nontarget)比值逐渐升高,48 h达7.80±0.50。6 h、12 h、24 h、48 h时,双靶向组的肿瘤组织放射性计数及T/NT比值均高于单靶向组,差异均具有统计学意义($P<0.05$),且差异性随着时间延长越来越显著。SPECT显像结果:2 h肿瘤部位即有放射性聚集,且随着时间的延长,放射性聚集增加并持续稳定,T/NT比值持续上升。初步研究结果显示,¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs具有用于肺癌诊疗的潜质,值得进一步研究。

关键词 超顺磁性氧化铁纳米粒, 紫杉醇, 核素¹³¹I, 贝伐抗体, 荷瘤裸鼠, 肺癌

中图分类号 TL927.3

DOI: 10.11889/j.0253-3219.2023.hjs.46.030301

Preparation and biodistribution study of ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs

Ji Faquan¹ Ji Anping¹ ZHANG Jie¹ BO Ling¹ JIAO Qingsong¹ QI Ning²

ZHANG Dongsheng² DU Minghua¹

1(Department of Nuclear Medicine, The Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

2(College of Clinical Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China)

Abstract [Background] ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs is a type of nanoparticle used in cancer therapy. It is composed of four components: a radioactive isotope of iodine (¹³¹I), a chemotherapy drug called paclitaxel (PTX), a type of nanoparticle called superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs), and a molecule called bevacizumab (BEV) which is an antibody that targets and blocks the growth of blood vessels that supply tumors. [Purpose] This study aims to investigate the preparation and biological distribution of ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs. [Methods] First of all, ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs were prepared, synthesized and identified. The transmission electron microscope (TEM) were employed to observe the particle characteristics. Then, 30 tumor-burdened nude mice were divided into the single

国家自然科学基金(No.81171452)、江苏省自然科学基金(No.BK20131455)资助

第一作者: 季发权, 男, 1982年出生, 2018年于南京大学医学院获硕士学位, 研究领域为肿瘤治疗

通信作者: 杜明华, E-mail: njdmh@aliyun.com

收稿日期: 2022-10-19, 修回日期: 2023-01-23

Supported by National Natural Science Foundation of China (No.81171452), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No.BK20131455)

First author: Ji Faquan, male, born in 1982, graduated from Medicine School of Nanjing University with a master's degree in 2018, focusing on oncology therapy

Corresponding author: DU Minghua, E-mail: njdmh@aliyun.com

Received date: 2022-10-19, revised date: 2023-01-23

targeting group and the dual targeting group for evaluation of ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs distribution in these nude mice, each group was divided into five sub-groups based on time points of 2 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h, 3 in each sub-group. Finally, ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs were injected into the caudal vein of these mice, and experiments of biological distribution *in vivo* and SPECT imaging were carried out, and results were analyzed using GraphPad Prism 8.3 software. [Results] The nanospheres in prepared ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs are obtained in good mono dispersion with a diameter of approximately 220 nm by TEM observation. ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs obtained in a high radiolabeling yield is about 81.4% with the radiochemical purity of over 99% and good stability shown in the 0.2 mol·L⁻¹ PB buffer. And it could attain sustained PTX release *in vitro*. Comparing with the cellular uptake of ¹³¹I, a higher uptake and sustained PTX release *in vitro* are shown for ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs. Biodistribution experimental results show: After the injection of ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs, with the extension of time, the radiation count of the tumor is relatively higher, at 12 h reaching the peak. And the T/NT ratio increased gradually, and it reaches 7.8±0.50 at 48 h. The counts and the ratios at 6 h, 12 h, 24 h and 48 h are notably higher in the dual targeting group than the single targeting group ($P<0.05$), and over time the differences are more significant. SPECT examination results show: At 2 h after the injection of ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs, the tumor site has a radioactive build-up. With the extension of time, the accumulation of radioactivity increased and remained stable, and the T/NT ratio rises steadily. [Conclusions] These results demonstrated the potential of ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs in the diagnosis and treatment of lung cancer, and it was worthy of further study.

Key words Superparamagnetic iron oxide nanoparticles, Paclitaxel, ¹³¹I, Bevacizumab, Tumor bearing nude mice, Lung cancer

肺癌(Lung Cancer)是导致人类死亡的主要原因之一。目前,提高抗癌药物的有效性已成为肺癌研究的一项重大挑战^[1]。紫杉醇(Paclitaxel,PTX)是临床常用的细胞毒类的抗癌药物,由于缺乏靶向性,导致生物利用度低、毒副作用大,限制了其临床应用^[2]。因此,探索具有更好药代动力学和药效学特性的新型抗癌药物成为肺癌研究的热点^[3]。

近年来,肿瘤综合治疗成为提高肺癌疗效的研究热点之一^[4]。超顺磁性氧化铁纳米颗粒(Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles, SPIONs)载药系统是一类具有独特的磁靶向功能的纳米载药系统^[5]。一方面,其将化疗药物包裹起来,大大降低化疗药物的毒副作用;另一方面,其具备的缓释功能增加化疗药物在肿瘤部位的持续时间,提高对肿瘤的抑制作用^[6]。为了进一步增强 SPIONs 载药系统的生物靶向效果,可以用单抗来修饰 SPIONs 载药系统,这样制备出的纳米载药系统就具有双重靶向作用^[7]。贝伐单抗(Bevacizumab, BEV)是较常用的单抗之一,其是一种血管生成抑制剂,可以与血管内皮生长因子特异性结合而阻断其生物活性,来抑制肿瘤的扩散^[8];其偶联纳米颗粒,可以增强纳米颗粒的靶向效果,提高疗效^[9]。放射性核素 ¹³¹I 制备工艺简便、体内代谢适宜,同时具备 β 衰变和 γ 衰变,β 衰变可以用于体内照射治疗、γ 衰变可以进行体外显像,是临床常用的理想放射性治疗核素^[10];常用来构建综合治疗系统,增强疗效,同时监

测药物分布^[11]。

受此启发,本实验制备了具有双重靶向的肺癌综合治疗纳米粒——¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs,研究它的特征、体外药物释放、细胞摄取以及其在荷瘤裸鼠体内的分布与代谢,为给肺癌综合治疗的发展提供理论和实验依据。

1 实验仪器及材料

1.1 实验仪器

透射电镜:日本,TEM2100HR;紫外光度计:上海,精密仪器仪表有限公司;旋转蒸发仪:上海,亚荣生化仪器有限公司;磁力搅拌器:郑州,长城仪器厂,DF-101S;离心机:北京,白洋医疗器械有限公司,BY-320C;单光子发射计算机断层成像(Single-Photon Emission Computed Tomography, SPECT):荷兰,飞利浦公司,型号 Skylight;CO₂培养箱:美国,REVCO;放射性活度仪:美国,CAPINIEC CRC-15R;γ 计数器:美国,PerkinElmer 公司,1470Wizard;电子天平:德国,Sartorius 公司,CP224S。

1.2 实验试剂

乙酰丙酮铁、聚乙二醇:上海,艾韦特医疗科技有限公司;油胺、油酸、去离子水、乙醇、丙酮:北京,三瓶科技公司;紫杉醇:江苏,红豆杉生物科技有限公司;氯仿、贝伐单抗:上海,罗氏有限公司;硼酸盐缓冲液;乙磺酸缓冲液。

1.3 实验动物

BALB/c-nu 裸鼠购至东部战区总医院动物中心, 4 周龄, 体重约 20 g, 雄性, 无特殊病原菌级 (Specific Pathogen Free, SPF), 饲养于层流柜中。所有动物实验操作均按照南京中医药大学附属医院 (江苏省中医院) 动物伦理委员会规范与准则执行。

2 实验方法

2.1 ^{131}I -BEV-PTX-SPIONs 的制备

^{131}I -BEV-PTX-SPIONs 的合成过程如图 1 所示。

1) 合成超顺磁性氧化铁纳米粒。将乙酰丙酮铁加热分解制成超顺磁性氧化铁纳米粒, 并在其表层包裹聚乙二醇。

2) 包封紫杉醇: 先将聚乙二醇修饰的超顺磁性氧化铁纳米粒分散在氯仿中, 加入紫杉醇粉末, 孵育 30 min 后, 旋转蒸发, 待有机溶剂完全蒸发, 将在紫

杉醇超顺磁氧化铁纳米粒由油相转入水相, 冷却至室温, 利用超声探头将其分散。最后使用滤膜过滤后高速离心, 提纯。

3) 偶联贝伐单抗^[12]: 将已制备完成的载紫杉醇超顺磁性氧化铁纳米粒通过超滤离心替换到乙磺酸缓冲溶液中, 依次加入可溶于水的碳二亚胺和氮羟基琥珀酰亚胺, 充分溶解后震荡活化。活化结束后, 超滤离心、提纯、转至硼酸缓冲液中, 与贝伐单抗常温孵育、偶联。最后再超速离心、过滤提纯。

4) 标记 ^{131}I : 通过 Iodogen 法用 ^{131}I 对纳米粒进行标记, 使用 PD10 柱凝胶进行分离纯化, 计算标记率。终产品行薄层色谱法 (Thin-Layer Chromatography, TLC) 方法质控, 检测放射化学纯度。TLC 检测方法: 硅胶浸渍玻璃纤维条为支持物; 85% 甲醇溶液为展开剂; 将样品点在距离层析线 1 cm 处, 并将纤维条置入盛有展开剂的试管中, 待展开剂前锋到达 7 cm 处, 取出纤维条, 干燥后用 Bio scan 扫描仪扫描 8 cm。

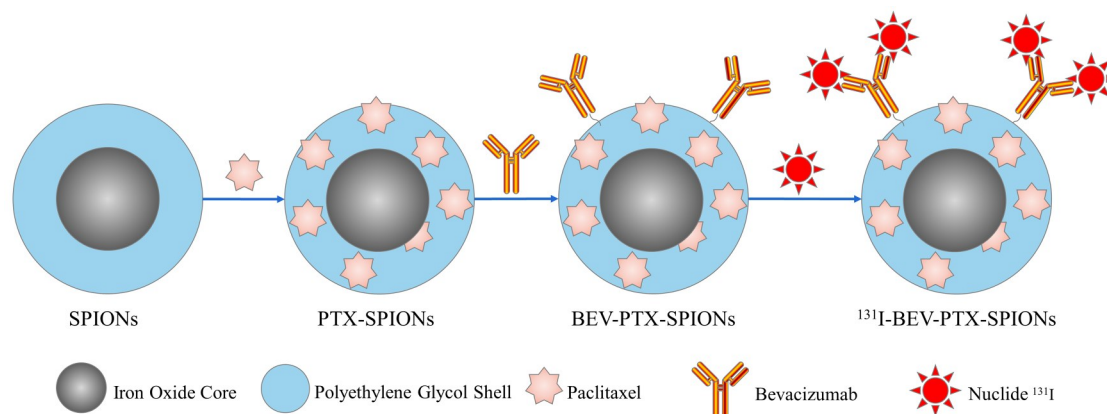


图 1 ^{131}I -BEV-PTX-SPIONs 合成过程
Fig.1 Synthesis procedure of ^{131}I -BEV-PTX-SPIONs

2.2 体外药物释放

为了确定药物释放曲线, 将 0.2 mL ^{131}I -BEV-PTX-SPIONs 悬浮在 20 mL 生理盐水中, 在硬玻璃管中保持 37 °C 不断摇动。在不同的孵育时间, 离心, 从玻璃管中取 0.5 mL 上清液, 并加入相同体积的新鲜生理盐水。所以样品均在 227 nm 处紫外线吸收度测定 PTX 含量。

2.3 细胞摄取

配制 5×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的 A549 细胞悬液, 将细胞悬液铺在 24 孔板 (每孔 500 μL) 上温育。用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。将 500 μL 含有 37 kBq ^{131}I 和 ^{131}I -BEV-PTX-SPIONs 的新鲜无血清培养基分别加入板孔中。在 37 °C 孵育多次, 在每个预定的时间, 通过抽吸除去培养基, 并用冰冷的 PBS 缓冲液冲洗细胞

两次。随后, 用 0.1 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 裂解细胞。收集细胞裂解物和随后的 PBS 洗脱液, 并用 γ 计数器测量放射性并校正衰减。摄取率被归一化为每 10^5 个细胞与总添加放射性剂量的百分比。

2.4 实验动物分组和处理方法

将 30 只成瘤裸鼠模型分为单靶向组及双靶向组, 每组又按时间点分为 2 h、6 h、12 h、24 h 及 48 h 亚组, 每亚组各 3 只。给予 2% 的戊巴比妥钠 (约 60 μL) 腹腔麻醉后, 每只荷瘤裸鼠均经尾静脉注射 ^{131}I -BEV-PTX-SPIONs 0.2 mL (含 7.4 MBq), 双靶向组于药物注射后立即在肿瘤局部皮肤外贴敷 0.6 T 小磁体, 用胶带固定, 并持续至实验结束^[13]。分别在 2 h、6 h、12 h、24 h 及 48 h 眼静脉采血后处死, 解剖荷瘤裸鼠的肿瘤、对侧腋下肌肉、脑、甲状

腺、肺、心、肝、脾、胃、肠、肾、股骨、性腺等不同脏器或组织。各组织用生理盐水冲洗后用滤纸吸干，称重后置于试管底部进行 γ 计数，均测量两次，取平均值记录。各时间点组织样本 γ 计数检测的同时测6支标准管以用于后续计算。标准管配置方法为取3.7 MBq的¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs至100 mL容量瓶中，加生理盐水定容至刻度，摇匀，用200 μ L移液器准确量取200 μ L溶液至放免管中，平行制备6份。计算每克组织中的放射性占注射进裸鼠体内总放射性的比值(%ID·g⁻¹)，并计算肿瘤组织与对侧腋下肌肉组织的%ID·g⁻¹比值，即T/NT比值(Target to Nontarget Ratios)。

SPECT显像实验：随机取3只成瘤裸鼠，尾静脉注射¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs 0.2 mL(含7.4 MBq)，注射后立即在肿瘤局部加0.6 T小磁体，方法同双靶向组，并持续至实验结束，分别在2 h、6 h、12 h、24 h及48 h行SPECT显像。采集条件：静态采集，探头配置高能通用准直器，能峰为364 keV，窗宽为20%，矩阵256×256，zoom 2.19，采集计数为300 k。勾画肿瘤部位与对侧腋下肌肉部位感兴趣区，分析肿瘤组织与对侧腋下肌肉组织的放射性计数比值，即

T/NT比值。

所有裸鼠每天均采用灌胃1%碘化钾0.2 mL封闭甲状腺并持续至实验结束。

2.5 统计学方法

所有数据均应用GraphPad Prism 8.3软件进行分析，计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果及讨论

3.1 ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs特征

通过透射电镜观察BEV-PTX-SPIONs和¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs的特征(图2)。BEV-PTX-SPIONs分散性良好，粒径大小均匀，约170 nm。采用Iodogen法来进行¹³¹I的标记的，首先将放射性碘扩散至不溶于水的固相氧化剂薄层中、活化，再将活化的放射性碘标记于BEV-PTX-SPIONs上^[14]。标记物¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs粒径大小基本均匀，约220 nm，部分呈融合，分散性尚可。可见，¹³¹I的标记虽然使纳米粒的粒径从170 nm增加到220 nm，但未对纳米粒的分散性产生太大影响。

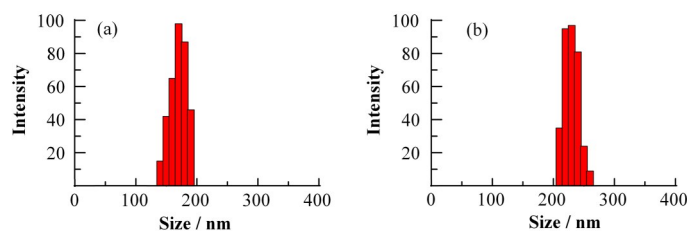


图2 纳米颗粒尺寸TEM图 (a) BEV-PTX-SPIONs(粒径约170 nm), (b) ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs(粒径约220 nm)
Fig.2 TEM pattern of nanoparticle size (a) BEV-PTX-SPIONs (170 nm), (b) ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs (220 nm)

标记物为澄清溶液，pH: 7.4; ¹³¹I的标记率: 81.4%。TLC检测结果为游离¹³¹I展开至0.7~0.8, ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs滞留在0.1~0.2, 以此来分析样品的放射性化学纯度。放射化学纯度(Radiochemical Purity, RCP)大于99%。标记物在PB缓冲液中1 h、2 h及4 h的RCP分别为97.19%、97.12%、95.20%，TLC分析显示，标记物有较好的体外稳定性。符合体内放射性核素进一步研究的要求^[15-16]。

3.2 PTX释放

¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs中紫杉醇在体外30 d内的释药时间曲线如图3所示，在第一天PTX释放率为(18.17±0.22)%，这部分释放的PTX可能是仅粘附在纳米粒表面或未被纳米粒严密包裹^[17]。经过1 d的突释后，释药速率降低，半衰期约为10 d。30 d时

PTX累积释放率达到(70.90±1.77)%。结果表明：¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs可以实现持续的PTX释放。

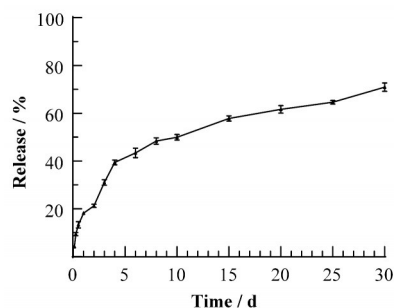


图3 ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs的PTX在生理盐水中缓释曲线
Fig.3 PTX release curve of ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs in saline

3.3 细胞摄取

为了评估BEV单克隆抗体免疫靶向能力，用A549细胞进行了细胞摄取研究。如图4所示，在

37 °C下孵育 30 min, ^{131}I 的细胞摄取率约为(1.27±0.26)%ID,而后长达 180 min 没有显著变化。 ^{131}I -BEV-PTX-SPIONs 的细胞摄取率在 30 min 内达到(2.54±0.41)%ID,在 60 min 内达到(3.06±0.26)%ID。与 ^{131}I 相比, ^{131}I -BEV-PTX-SPIONs 显示出更好的细胞亲和力,可能跟 BEV 与 A549 细胞的特异性结合有关^[18]。

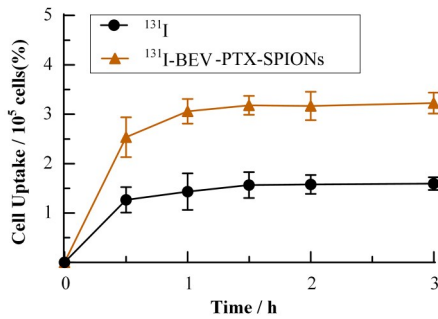


图4 ^{131}I 和 ^{131}I -BEV-PTX-SPIONs在A549细胞中的摄取
Fig.4 Uptake of ^{131}I and ^{131}I -BEV-PTX-SPIONs in A549 cell

3.4 ^{131}I -BEV-PTX-SPIONs 在荷瘤裸鼠体内的生物学分布结果

生物学分布结果见表1。在注射 ^{131}I -BEV-PTX-SPIONs后,所有裸鼠以肝放射性计数最高,肾脾次

之,肿瘤的放射性亦相对较高。随着时间的延长,正常组织的放射性计数均逐步下降。而肿瘤部位的放射性计数先增高,12 h达到高峰4.95±0.59,后缓慢下降,下降速度低于其余组织,于48 h显示其放射性已高于其余组织;T/NT比值一直增高,48 h达7.80±0.50。说明 ^{131}I -BEV-PTX-SPIONs在BEV单抗靶向作用下有较好的肿瘤聚集效应,同时与肿瘤组织抗原抗体结合后使其在肿瘤组织内清除缓慢,而致滞留时间延长,验证了BEV单克隆抗体的靶向作用^[19];而正常组织没有BEV单抗的靶点呈下降表现,尤其是从24 h至48 h呈断崖式下跌。

2 h时,虽然双靶向组的肿瘤放射性计数及T/NT比值高于单靶向组,但差异无统计学意义($P>0.05$);6 h、12 h、24 h、48 h时,双靶向组的肿瘤放射性计数及T/NT比值均高于单靶向组($P<0.05$),且差异性随着时间延长越来越明显。说明磁靶向进一步增强了 ^{131}I -BEV-PTX-SPIONs在肿瘤内的聚集,验证了磁靶向的作用^[20]。尽管2 h时的差异无统计学意义,可能是磁靶向的作用效能需要一定的时间累积。肝脾肾有较高的放射性,是由于肝脾为网状内皮系统的吞噬作用所致、肾为药物排泄通路所致局部聚集^[21-22]。

表1 ^{131}I -BEV-PTX-SPIONs在荷A549肺癌裸鼠中的生物分布($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 1 Distribution of ^{131}I -BEV-PTX-SPIONs in nude mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

器官 Organ	注射后不同时间各器官的放射性摄取率 Radioactive uptake rate of various organs at different time after injection / %ID·g ⁻¹									
	单靶向组 Single targeting group					双靶向组 Dual targeting group				
	2 h	6 h	12 h	24 h	48 h	2 h	6h	12 h	24 h	48 h
血 Blood	3.90±0.28	3.35±0.53	2.97±0.29	1.97±0.17	0.40±0.06	3.89±0.19	3.17±0.16	2.84±0.10	1.94±0.06	0.39±0.04
肿瘤 Tumour	1.51±0.22	1.75±0.27	3.72±0.23	2.82±0.17	1.97±0.14	1.88±0.22	2.32±0.23 ^a	4.95±0.59 ^a	3.71±0.36 ^a	2.63±0.19 ^b
肌肉 Muscle	1.27±0.07	1.03±0.04	0.94±0.05	0.63±0.01	0.37±0.01	1.14±0.11	1.01±0.06	0.95±0.04	0.64±0.04	0.34±0.01
脑 Brain	1.67±0.03	1.41±0.09	1.21±0.14	0.65±0.04	0.39±0.01	1.54±0.05	1.33±0.11	1.21±0.15	0.60±0.03	0.34±0.07
甲状腺 Thyroid	1.66±0.20	1.61±0.07	1.20±0.10	0.47±0.04	0.32±0.03	1.61±0.13	1.54±0.04	1.10±0.12	0.49±0.04	0.23±0.04
肺 Lung	3.36±0.21	3.24±0.14	2.19±0.13	0.90±0.07	0.23±0.07	3.38±0.18	3.22±0.23	2.19±0.03	0.86±0.05	0.18±0.06
心脏 Myocardium	2.74±0.11	2.25±0.28	1.13±0.10	0.68±0.05	0.22±0.04	2.75±0.17	2.20±0.31	1.21±0.05	0.65±0.04	0.23±0.02
肝 Liver	10.64±1.39	8.41±2.16	6.07±1.85	4.20±0.31	1.64±0.13	10.47±1.72	8.26±2.09	5.87±1.40	3.84±0.17	1.68±0.17
脾 Spleen	5.39±1.46	4.88±0.57	3.93±0.70	2.61±0.08	0.98±0.07	5.19±1.54	4.71±0.98	3.94±0.36	2.54±0.13	0.86±0.05
胃 Stomach	3.14±0.58	2.41±0.88	2.00±0.16	0.63±0.21	0.20±0.05	2.84±0.52	2.34±0.72	1.96±0.06	0.60±0.18	0.24±0.05
肠 Intestines	2.65±0.23	2.05±0.21	1.99±0.33	1.48±0.50	0.61±0.10	2.45±0.20	1.95±0.29	1.91±0.42	1.34±0.41	0.52±0.01
肾 Kidney	5.09±2.37	3.98±2.28	3.55±1.64	1.20±0.70	0.61±0.06	4.88±2.06	4.25±2.76	3.44±1.41	1.23±0.72	0.67±0.05
股骨 Femur	2.04±0.33	1.46±0.18	1.32±0.04	0.86±0.08	0.41±0.02	2.04±0.15	1.58±0.09	1.21±0.03	0.90±0.19	0.50±0.19
性腺 Gonad	1.61±0.02	1.52±0.10	1.10±0.13	0.44±0.08	0.23±0.04	1.51±0.32	1.11±0.19	1.07±0.06	0.41±0.04	0.21±0.04
TN比 Ratios of target to nontarget	1.19±0.12	1.70±0.27	3.95±0.32	4.48±0.24	5.32±0.33	1.66±0.35	2.30±0.26 ^a	5.19±0.47 ^a	5.76±0.26 ^b	7.80±0.50 ^b

注: 较单靶向组 a) $P<0.05$, b) $P<0.01$

Notes: Compared with single target group: a) $P<0.05$, b) $P<0.01$

3.5 SPECT显像结果

SPECT显像结果见图5及表2。起初显像剂大部位位于胸腹部,主要分布于血供丰富器官如肺、心、肝、脾、胃、肠、肾等,尾静脉注射处显像剂少许残留而显影,与血池显像、肝脾网状内皮系统的吞噬及泌尿系统的排泄有关^[23];而后胸腹部显像剂随时间逐渐减淡,说明显像剂在胸腹部没有作用靶点而慢慢排出^[24]。

肿瘤部位2 h仅见少许显像剂影,6 h基本可以辨别出肿瘤轮廓,12 h即清晰可见,显像剂达高峰,放射性计数为 980.67 ± 19.55 ,后缓慢下降,T/NT比值

一直增高,48 h T/NT比值高达 7.72 ± 0.20 。结果表明:在BEV单克隆抗体免疫靶向及磁靶向的双重靶向作用下,显像剂快速聚集到肿瘤部分,并与作用靶点特异结合,延缓显像剂的排出,提高T/NT比值;验证了¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs的BEV单克隆抗体免疫靶向及磁靶向的双重靶向作用^[25-26]。

SPECT显像T/NT比值较体内生物学分布双靶向组略低,可能跟前后重叠组织的放射性计数相对拉高了肌肉的放射性计数占比有关^[27],但无统计学显著性差异($P>0.05$),说明SPECT显像表现与体内生物学分布实验相一致。

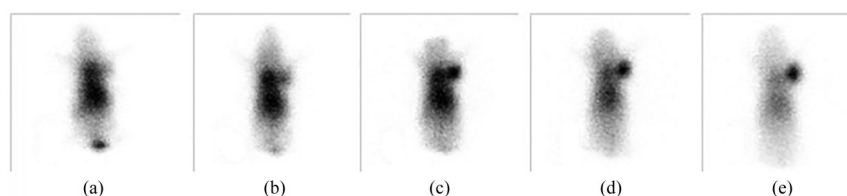


图5 荷瘤裸鼠SPECT图 (a) 2 h,(b) 6 h,(c) 12 h,(d) 24 h,(e) 48 h
Fig.5 SPECT image of nude mice (a) 2 h, (b) 6 h, (c) 12 h, (d) 24 h, (e) 48 h

表2 ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs在荷A549肺癌裸鼠中SPECT放射性计数值($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 2 Radioactive counts of ¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs in nude mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

部位 Locality	2 h	6 h	12 h	24 h	48 h
肿瘤 Tumour	381.67 ± 30.62	482.67 ± 29.37	980.67 ± 19.55	789.00 ± 11.00	506.67 ± 7.57
肌肉 Muscle	274.33 ± 27.79	226.67 ± 23.12	195.67 ± 12.01	139.00 ± 8.54	65.67 ± 2.08
TN比 Ratios of target to nontarget	1.41 ± 0.24	2.15 ± 0.33	5.03 ± 0.41	5.69 ± 0.27	7.72 ± 0.20

4 结语

本文对¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs的制备、质控分析、体外稳定性、体外药物释放、细胞摄取、生物学分布及SPECT显像进行了初步研究。¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs的标记率高,RCP超过99%,在PB缓冲液中温育1 h、2 h及4 h,RCP均大于95%,表明具有较好的体外稳定性,在体外缓释性能良好;与A549细胞较好的亲和力。动物体内¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs主要经肝肾代谢,在肺癌组织中有较高摄取。初步研究结果指出,¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs具有较好的体内性质,具有用于肺癌诊疗的潜质,后期将针对抑瘤效果开展进一步研究。不足之处在于肝脾有较高的纳米粒聚集,可能需要对给药路径进行改进(如瘤内注射等);同时SPECT图像虽然能够很好地显示肿瘤组织及裸鼠的基本结构,但图像整体不够精细,后期可以改用micro SPECT来提高图像质量。

致谢 感谢江苏省生物材料与器件重点实验室及江苏省原子医学研究所的支持,感谢工作人员在¹³¹I-BEV-PTX-SPIONs合成和质控过程中的协助。

作者贡献声明 季发权:实验方案设计、纳米粒制备、体内分布实验、稿件撰写;吉安平:纳米粒质控和分析;张杰:纳米粒药物释放和分析;柏凌:纳米粒细胞摄取和分析;焦庆嵩:纳米粒制备,参与论文修改;戚宁:纳米粒体内分布实验、体外显像;张东生、杜明华:实验整体方案指导和论文修改。

参考文献

- Šutić M, Vukić A, Baranašić J, *et al.* Diagnostic, predictive, and prognostic biomarkers in non-small cell lung cancer (NSCLC) management[J]. *Journal of Personalized Medicine*, 2021, **11**(11): 1102. DOI: [10.3390/jpm11111102](https://doi.org/10.3390/jpm11111102).
- Puiu R A, Balaure P C, Constantinescu E, *et al.* Anti-cancer nanopowders and MAPLE-fabricated thin films based on SPIONs surface modified with paclitaxel loaded β -cyclodextrin[J]. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(9): 1356. DOI: [10.3390/pharmaceutics13091356](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091356).
- Gui G, Fan Z Q, Ning Y H, *et al.* Optimization, characterization and *in vivo* evaluation of paclitaxel-loaded folate-conjugated superparamagnetic iron oxide

- nanoparticles[J]. International Journal of Nanomedicine, 2021, **16**: 2283 - 2295. DOI: [10.2147/IJN.S287434](https://doi.org/10.2147/IJN.S287434).
- 4 Khodadadi E, Mahjoub S, Arabi M S, *et al.* Fabrication and evaluation of aptamer-conjugated paclitaxel-loaded magnetic nanoparticles for targeted therapy on breast cancer cells[J]. Molecular Biology Reports, 2021, **48**(3): 2105 - 2116. DOI: [10.1007/s11033-021-06199-y](https://doi.org/10.1007/s11033-021-06199-y).
- 5 Szczęch M, Orsi D, Łopuszyńska N, *et al.* Magnetically responsive polycaprolactone nanocarriers for application in the biomedical field: magnetic hyperthermia, magnetic resonance imaging, and magnetic drug delivery[J]. RSC Advances, 2020, **10**(71): 43607 - 43618. DOI: [10.1039/d0ra07507h](https://doi.org/10.1039/d0ra07507h).
- 6 Ngema L M, Adeyemi S A, Marimuthu T, *et al.* Synthesis of novel conjugated linoleic acid (CLA) -coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for the delivery of paclitaxel with enhanced *in vitro* anti-proliferative activity on A549 lung cancer cells[J]. Pharmaceutics, 2022, **14**(4): 829. DOI: [10.3390/pharmaceutics14040829](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040829).
- 7 Kagawa T, Matsumi Y, Aono H, *et al.* Immunohyperthermia effected by antibody-conjugated nanoparticles selectively targets and eradicates individual cancer cells[J]. Cell Cycle (Georgetown, Tex), 2021, **20**(13): 1221 - 1230. DOI: [10.1080/15384101.2021.1915604](https://doi.org/10.1080/15384101.2021.1915604).
- 8 Wang D, Zhou J, Fang W M, *et al.* A multifunctional nanotheranostic agent potentiates erlotinib to EGFR wild-type non-small cell lung cancer[J]. Bioactive Materials, 2021, **13**: 312 - 323. DOI: [10.1016/j.bioactmat.2021.10.046](https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.10.046).
- 9 Zhao Z T, Wang J, Fang L, *et al.* Dual-responsive nanoparticles loading bevacizumab and gefitinib for molecular targeted therapy against non-small cell lung cancer[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2023, **44**(1): 244 - 254. DOI: [10.1038/s41401-022-00930-6](https://doi.org/10.1038/s41401-022-00930-6).
- 10 Soyluoglu S, Durmus-Altun G. Animal models for the evaluation of theranostic radiopharmaceuticals[J]. Current Radiopharmaceuticals, 2021, **14**(1): 15 - 22. DOI: [10.2174/1874471013666200425223428](https://doi.org/10.2174/1874471013666200425223428).
- 11 İnce İ, Müftüler Z B, Medine E İ, *et al.* Thymoquinone glucuronide conjugated magnetic nanoparticle for bimodal imaging and treatment of cancer as a novel theranostic platform[J]. Current Radiopharmaceuticals, 2021, **14**(1): 23 - 36. DOI: [10.2174/2211556009666200413085800](https://doi.org/10.2174/2211556009666200413085800).
- 12 焦庆嵩, 李占峰, 季发全, 等. 贝伐珠单抗靶向载紫杉醇超顺磁性氧化铁纳米粒制备的初步研究[J]. 现代医学, 2017, **45**(11): 1544 - 1547. DOI: [10.3969/j.issn.1671-7562.2017.11.002](https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-7562.2017.11.002).
- JIAO Qingsong, LI Zhanfeng, JI Faquan, *et al.* Preliminary study on the preparation of bevacizumab targeted paclitaxel loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles[J]. Modern Medical Journal, 2017, **45**(11): 1544 - 1547. DOI: [10.3969/j.issn.1671-7562.2017.11.002](https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-7562.2017.11.002).
- 13 Kiamohammadi L, Asadi L, Shirvalilou S, *et al.* Physical and biological properties of 5-fluorouracil polymer-coated magnetite nanographene oxide as a new thermosensitizer for alternative magnetic hyperthermia and a magnetic resonance imaging contrast agent: *in vitro* and *in vivo* study[J]. ACS Omega, 2021, **6**(31): 20192 - 20204. DOI: [10.1021/acsomega.1c01763](https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01763).
- 14 Inci I D, Tekin V, Kilcar A Y, *et al.* Radioiodination of pimnidazole as a novel theranostic hypoxia probe[J]. Current Radiopharmaceuticals, 2021, **14**(1): 46 - 50. DOI: [10.2174/1874471013666200331114908](https://doi.org/10.2174/1874471013666200331114908).
- 15 Yang C Y, Yun Q Y, Sun H K, *et al.* Non-invasive imaging of Toll-like receptor 5 expression using ¹³¹I-labeled MAb in the mice bearing H22 tumors[J]. Oncology Letters, 2014, **7**(6): 1919 - 1924. DOI: [10.3892/ol.2014.2025](https://doi.org/10.3892/ol.2014.2025).
- 16 Kothari P, De B P, He B, *et al.* Radioiodinated capsids facilitate *in vivo* non-invasive tracking of adeno-associated gene transfer vectors[J]. Scientific Reports, 2017, **7**: 39594. DOI: [10.1038/srep39594](https://doi.org/10.1038/srep39594).
- 17 Lugert S, Unterweger H, Mühlberger M, *et al.* Cellular effects of paclitaxel-loaded iron oxide nanoparticles on breast cancer using different 2D and 3D cell culture models[J]. International Journal of Nanomedicine, 2018, **14**: 161 - 180. DOI: [10.2147/IJN.S187886](https://doi.org/10.2147/IJN.S187886).
- 18 Di Filippo L D, Lobato Duarte J, Hofstätter Azambuja J, *et al.* Glioblastoma multiforme targeted delivery of docetaxel using bevacizumab-modified nanostructured lipid carriers impair *in vitro* cell growth and *in vivo* tumor progression[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2022, **618**: 121682. DOI: [10.1016/j.ijpharm.2022.121682](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121682).
- 19 Pang J T, Xing H X, Sun Y G, *et al.* Non-small cell lung cancer combination therapy: hyaluronic acid modified, epidermal growth factor receptor targeted, pH sensitive lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of erlotinib plus bevacizumab[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, **125**: 109861. DOI: [10.1016/j.biopha.2020.109861](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109861).

- 20 Lee C R, Kim G G, Park S B, *et al.* Synthesis of hyaluronic acid-conjugated Fe₃O₄@CeO₂ composite nanoparticles for a target-oriented multifunctional drug delivery system[J]. *Micromachines*, 2021, **12**(9): 1018. DOI: [10.3390/mi12091018](https://doi.org/10.3390/mi12091018).
- 21 Lv J, Pan Y, Li X, *et al.* Study on the distribution and elimination of the new hormone irisin *in vivo*: new discoveries regarding irisin[J]. *Hormone and Metabolic Research*, 2015, **47**(8): 591 - 595. DOI: [10.1055/s-0035-1547261](https://doi.org/10.1055/s-0035-1547261).
- 22 Wu F Y, Chen Y H, Li D C, *et al.* Synthesis and evaluation of radioiodine-labeled pH (low) insertion peptide variant 7-like peptide as a noninvasive tumor microenvironment imaging agent in a mouse MDA-MB-231 triple-negative breast cancer model[J]. *Molecular Imaging and Biology*, 2022, **24**(4): 570 - 579. DOI: [10.1007/s11307-021-01702-0](https://doi.org/10.1007/s11307-021-01702-0).
- 23 Li J D, Chen Y X, Peng C Y, *et al.* Micro-SPECT imaging of acute ischemic stroke with radioiodinated riboflavin in rat MCAO models via riboflavin transporter targeting[J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2022, **13**(13): 1966 - 1973. DOI: [10.1021/acscchemneuro.2c00177](https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.2c00177).
- 24 Jin Q M, Zhao J Z, Gao M, *et al.* Evaluation of necrosis avidity and potential for rapid imaging of necrotic myocardium of radioiodinated hypocrellins[J]. *Molecular Imaging and Biology*, 2018, **20**(4): 551 - 561. DOI: [10.1007/s11307-017-1157-8](https://doi.org/10.1007/s11307-017-1157-8).
- 25 Tang L G, Sun X L, Liu N, *et al.* Radiolabeled angiogenesis-targeting croconaine nanoparticles for trimodality imaging guided photothermal therapy of glioma[J]. *ACS Applied Nano Materials*, 2018, **1**(4): 1741 - 1749. DOI: [10.1021/acsnanm.8b00195](https://doi.org/10.1021/acsnanm.8b00195).
- 26 Abdollah M R A, Carter T J, Jones C, *et al.* Fucoidan prolongs the circulation time of dextran-coated iron oxide nanoparticles[J]. *ACS Nano*, 2018, **12**(2): 1156 - 1169. DOI: [10.1021/acsnano.7b06734](https://doi.org/10.1021/acsnano.7b06734).
- 27 Ma H, Li F Z, Shen G H, *et al.* Synthesis and preliminary evaluation of ¹³¹I-labeled FAPI tracers for cancer theranostics[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2021, **18**(11): 4179 - 4187. DOI: [10.1021/acs.molpharmaceut.1c00566](https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00566).