

·论著·

^{125}I 标记聚酰胺-胺及其在小鼠体内的生物分布

刘鉴峰 刘金剑 褚丽萍 王德芝 贺欣 徐宏艳

【摘要】 目的 研究 ^{125}I 标记的树枝状高分子纳米材料聚酰胺-胺(PAMAM)在小鼠体内的生物分布。方法 通过羟基琥珀酰亚胺将酪氨酸连接到4代PAMAM上,再对PAMAM进行 ^{125}I 标记,透析法对标记化合物进行纯化,放射性薄层扫描对标记物进行标记率、放化纯度及稳定性检测。将 ^{125}I -PAMAM 经尾静脉注射入小鼠体内,分别在1、4、8、24、48 h时小鼠进行活体成像,并取主要脏器进行放射性计数。结果 磁共振氢谱法检测结果显示,每个PAMAM分子上约连接了两个酪氨酸分子,标记率约为56%,放化纯度>98%,标记化合物具有良好的稳定性,体外放置72 h放化纯度仍>90%。小动物活体成像结果显示,PAMAM主要聚集在肝脏部位。各组织的放射性计数与显像结果基本一致,主要分布在肝、肾和脾中,而且体内代谢较慢,48 h时在小鼠体内仍有较高分布。结论 未经修饰的PAMAM在肝、肾及脾中大量聚集,体内代谢缓慢,不适合直接作为药物载体使用,需进行化学修饰来加速体内代谢,防止体内蓄积而引起不良反应。

【关键词】 碘放射性同位素;聚酰胺-胺;体内分布

Labeling of polyamidoamine with ^{125}I and its biodistribution in mice LIU Jian-feng, LIU Jin-jian, CHU Li-ping, WANG De-zhi, HE Xin, XU Hong-yan. Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China
Corresponding author: LIU Jian-Feng, Email: lewis78@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the biodistribution of ^{125}I labeled dendrimer nanomaterial—polyamidoamine (PAMAM) in mice. **Methods** Tyrosine was conjugated to four generation PAMAM by N-Hydroxysuccinimide, then ^{125}I was labeled on PAMAM with chloramines-T method, and purified by dialysis. Labeling rate, radiochemical purity and stability of ^{125}I -PAMAM were detected by radioactive thin layer chromatography scanning. The gamma imaging and biodistribution were detected by in vivo imaging system and gamma counter at one, four, eight, twenty-four and forty-eight hours after intravenous injection. **Results** The ^1H nuclear magnetic resonance results showed that about two tyrosines were conjugated to PAMAM. The ^{125}I labeling rate was about 56% and radiochemical purity was more than 98%. The radiochemical purity of labeled compound remained more than 90% at 72 hours in vitro. In vivo imaging results showed that PAMAM was mainly accumulated in liver periphery. The gamma counter results showed that PAMAM mainly accumulated in liver, kidney and spleen, the excretion of PAMAM was slow and there has high dose of PAMAM in mice at 48 hours. **Conclusion** PAMAM with no chemical modification was mainly accumulated in liver, kidney and spleen, and the excretion of PAMAM was slow, so PAMAM is not fit as drug carrier. PAMAM need to chemical modification to accelerate excretion and prevent the emergence of toxicity caused by accumulation in body.

【Key words】 Iodine radioisotopes; Polyamidoamine; Body distribution

聚酰胺-胺(polyamidoamine, PAMAM)型树枝状

高分子纳米材料是以乙二胺为核,与丙烯酸甲酯通过迈克尔加成反应制备的支化大分子,以- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CONHCH}_2\text{CH}_2\text{N-}$ 为重复单元可以得到不同代数的PAMAM^[1-2]。不同代数的PAMAM具有不同的几何尺寸和分子量,与生物体内的生物大分子大小相当,有人称之为“人工蛋白”(artificial protein)^[3]。随着树枝状聚合物代数的升高,其末端官能团数目成

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.02.001

基金项目:国家自然科学基金(81171371、30700178、51203189);天津市自然科学基金(09JCYBJC13400);中国医学科学院放射医学研究所学科发展基金(SF1209)

作者单位:300192 天津,中国医学科学院放射医学研究所,天津市分子核医学重点实验室

通信作者:刘鉴峰(Email: lewis78@163.com)

倍增加,并交替转化。因其大量的末端活性基团和可控的结构,自合成以来即在催化材料、生物医用材料、废水处理等领域得到广泛的应用,近年来,将 PAMAM 应用于药物载体^[4-5]及非病毒基因载体^[6]的报道大量出现。

虽然 PAMAM 作为药物载体具有很多优势,但是,作为一类新的纳米材料,PAMAM 在体内的分布及代谢特性是否满足临床使用要求的研究却很少。本研究通过对 PAMAM 进行 ¹²⁵I 标记来研究其在小鼠体内的分布代谢规律,探讨 PAMAM 作为药物载体的可行性。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

体质量为(20±2)g 的雄性 C57BL/6 纯系小鼠由中国医学科学院血液病研究所提供;4 代 PAMAM 和羟基琥珀酰亚胺购自美国 Sigma 公司;Na¹²⁵I (¹²⁵I,放射性比活度为 1295 GBq/ml,无载体)购自美国 PE 公司;氯胺-T、偏重亚硫酸钠和酪氨酸购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;Kodak In-Vivo Imaging System FX 小动物活体成像仪为 Care-stream Health 公司产品;SN-6100 全自动放射免疫 γ 计数器为上海核所日环光电仪器有限公司产品;AR-2000 薄层扫描仪为美国 Bioscan 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 PAMAM-酪氨酸的合成

称取 25 mg 酪氨酸溶于 8 ml 水和 2 ml 二甲基甲酰胺的混合溶剂中,加入 32 mg 羟基琥珀酰亚胺,调节 pH 至 5 左右,冰水浴中加入 64 mg 二氯乙烷,反应 4 h,之后在溶液中加入 200 mg PAMAM,室温反应 24 h。反应液在纯水中通过截留相对分子质量为 3500 的透析袋透析,反复换水,透析 2 d 后进行冷冻干燥,对产物 PAMAM-酪氨酸行磁共振氢谱法检测。

1.2.2 PAMAM 的 ¹²⁵I 标记、纯化及鉴定

PAMAM 的标记采用氯胺-T 法,在 50 μ l pH 7.2、50 mmol 磷酸盐缓冲液中加入 200 μ g PAMAM-酪氨酸,完全溶解后加入 1.85×10^7 Bq Na¹²⁵I 和 50 μ l 氯胺-T(1 g/L)液,室温震荡反应 5 min,再加入 50 μ l (0.2 g/L)偏重亚硫酸钠溶液终止反应。取 1 μ l 反应液点至硅胶板上,以体积比为 $V_{乙醇}:V_{水}=9:1$ 的溶液为展开剂,采用放射性薄层扫描仪对薄层板进行

扫描,计算标记率。剩余反应液加入截留相对分子质量为 3500 的透析袋中透析纯化,开始用水作为透析液,1 d 后换成磷酸盐缓冲液,直至透析液中检测不到放射性计数为止。取 2 μ l 纯化后的溶液进行薄层层析及薄层扫描,测定标记化合物的放化纯度。

1.2.3 ¹²⁵I-PAMAM 的体外稳定性

取 50 μ l 纯化后的 ¹²⁵I-PAMAM,加入到 200 μ l 人新鲜血清中,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 12、24、48、72 h,取样并采用 1.2.2 节中的方法测定其放化纯度。

1.2.4 小鼠活体成像

选用 4~6 周龄、体质量约 20 g 的雄性 C57BL/6 纯系小鼠,将 ¹²⁵I-PAMAM 按 1.85×10^4 Bq/g 体质量剂量通过尾静脉注射入小鼠体内,注射后 1、4、8、24、48 h 将小鼠麻醉,用小动物活体成像系统进行 γ 成像。

1.2.5 测定 ¹²⁵I-PAMAM 在小鼠体内的分布

取 15 只 C57BL/6 纯系小鼠并随机分为 5 组,每组 3 只,将 ¹²⁵I-PAMAM 按 1.85×10^4 Bq/g 体质量剂量通过尾静脉注射入小鼠体内,注射后 1、4、8、24、48 h 眼球取血后脱颈处死,分别取心、肝、脾、肺、肾、胃、脑、大肠、小肠、甲状腺及睾丸,称重后利用 γ 计数器检测各组织的放射性,计算各组织的放射性摄取率。

2 结果

2.1 PAMAM-酪氨酸的合成

对合成的 PAMAM-酪氨酸进行磁共振氢谱法检测,结果如图 1 所示,在 δ 6.8 ppm 和 δ 7.1 ppm 处出现了明显的峰,此处为酪氨酸的特征峰,表明酪氨酸已成功连接到 PAMAM 上。而 δ 2.24 ppm 处的峰是 PAMAM 中 $-CH_2C(O)-$ 的 H 的峰,共有 248 个,因此,可以通过两个峰的积分比值计算出平均每个 PAMAM 连接了约 2 个酪氨酸分子。

2.2 ¹²⁵I-PAMAM 的标记率、放化纯度及体外稳定性

对 ¹²⁵I-PAMAM 进行薄层层析,在 $V_{乙醇}:V_{水}=9:1$ 的展开剂中,¹²⁵I 的比移值约为 0.7,而 ¹²⁵I-PAMAM 的比移值约为 0.1,可以很好地将两者进行分离。薄层扫描仪检测的标记率为 56%,透析纯化后的放化纯度 > 98%。将标记化合物在模拟体内环境中进行稳定性检测,在人血清 37 $^{\circ}$ C 条件下

孵育, 由图 2 所示可见, 放置 72 h 后放化纯度仍然在 90% 以上, 表明标记化合物在体外具有良好的稳定性, 能满足后续动物实验的要求。

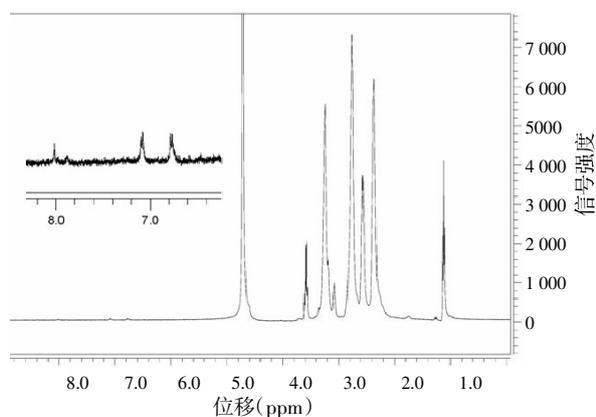


图 1 聚酰胺-胺-酪氨酸的磁共振氢谱谱图 图中, 在 8.68 ppm 和 8.71 ppm 处出现了明显的酪氨酸特征峰, 表明酪氨酸已经成功连接至聚酰胺-胺上。

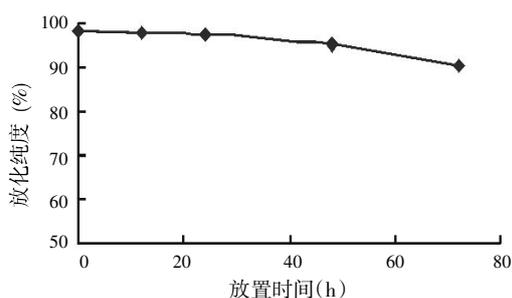


图 2 ¹²⁵I-聚酰胺-胺的体外稳定性 图中, 随着孵育时间的延长, ¹²⁵I-聚酰胺-胺的放化纯度在缓慢降低, 但总体仍较高, 符合实验要求。

2.3 小鼠活体成像

小鼠尾静脉注射 ¹²⁵I-PAMAM 后 5 个时间点的成像结果显示, 尾静脉注射 1 h 后 ¹²⁵I-PAMAM 很快就集中至肝、胃、肾和脾所在的部位, 而其他部位基本无放射性信号。因仪器无法进行三维扫描成像, 肝的位置与胃、脾和肾基本重合, 所以无法判断 ¹²⁵I-PAMAM 具体分布在哪个组织, 因此需要分离各个组织来进一步确定其在每个组织中的具体分布。随着时间的延长, 成像的结果基本一致, 而且放射性信号衰减得很慢, 48 h 时仍能检测到非常强的放射性信号。图 3 给出了注射后 8 h 的成像结果, 其他时间点的成像结果基本类似。

2.4 ¹²⁵I-PAMAM 在小鼠体内的生物分布

¹²⁵I-PAMAM 在小鼠体内的分布结果见图 4, 可以看出 ¹²⁵I-PAMAM 在注射后 1 h 即迅速地被肝、

肾和脾吸收。¹²⁵I-PAMAM 分布最高的组织是肝, 肝中的分布在 4 h 时最高, 随后逐渐降低, 在 48 h 时约代谢至最大摄取率的 1/3; 其次分布较高的为肾, 前 8 h 的分布基本一致, 随后逐渐降低, 48 h 时约代谢至最大摄取率的 1/4; 脾中的分布也较高, 48 h 时约代谢至最大摄取率的 4/5; 血液中的分布始终保持在较低的水平。

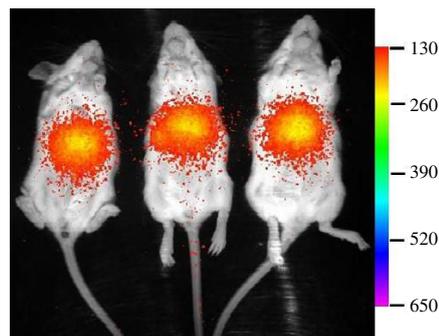


图 3 小鼠尾静脉注射 ¹²⁵I-聚酰胺-胺后 8 h 的活体成像结果 图中, 放射性信号主要集中在肝、胃、脾和肾重叠的部位, 而在其他组织中基本检测不到放射性信号。

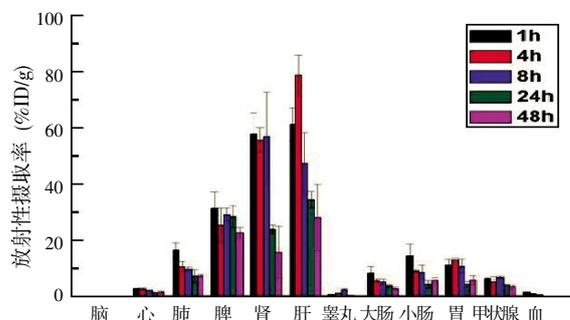


图 4 ¹²⁵I-聚酰胺-胺在小鼠体内的生物分布 图中, 放射性摄取率由高至低依次为肝、肾、脾、肺、小肠、胃、大肠、甲状腺、心、血、脑。

3 讨论

癌症已成为危害人类健康的最严重疾病, 全球每年死亡人数接近 800 万, 目前, 化疗是肿瘤治疗中最主要的手段, 但由于化疗药物的全身分布和对肿瘤细胞无特异选择性的缺点, 使用化疗药物会产生较大的不良反应, 而且易产生耐药性。为解决这一缺点, 研究人员开始研发各种不同的药物靶向载体, 希望能够将药物特定地输送至肿瘤部位, 以达到提高局部药物浓度、提高疗效和降低不良反应的目的^[7-8]。PAMAM 因其独特的结构和可控的合成等

优点而广受关注, 有大量的将其作为药物载体的研究报道^[4-5]。

药物载体除具有适合药物连接, 载药量大等特点外, 还应具有在体内循环时间长、除病变组织外不在其他组织大量蓄积或蓄积后能够较快代谢, 以减少引起体内不良反应的可能性^[9]。本研究结果表明, PAMAM 在体内代谢缓慢, 在肝、肾和脾组织中有较高的蓄积, 而且从组织中清除缓慢, 尤其在脾中, 在检测的 48 h 内只清除了约 20% 的药物, 如此缓慢的清除速度在临床上较难进行连续给药, 因为连续给药会造成更大量的蓄积, PAMAM 长时间蓄积在特定组织中是否会给组织带来不良反应需进一步观察。肿瘤组织的血管发达, 需要比其他正常组织更大量的血液供应来维持其快速生长, 因此血液中含有较高的药物可以更多的被肿瘤组织吸收, 从而达到更好的肿瘤治疗效果, 而血液中 PAMAM 的含量非常低, 所以很难通过 PAMAM 来实现药物被动吸收入肿瘤的目的^[10]。

鉴于 PAMAM 会在体内产生肝、肾和脾蓄积, 而且代谢缓慢, 血液中含有低等分布特点, 说明其并不适合作为长期给药的药物载体, 需要对其进行化学修饰以减少在肝、肾和脾中的蓄积, 提高血液中的含量才更适合作为药物载体来使用。

参 考 文 献

[1] Tomalia DA, Baker H, Dewald JR, et al. A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules. *Polym J*, 1985, 17(1): 117-

132.

- [2] Djeda R, Ruiz J, Astruc D, et al. " Click " synthesis and properties of carborane-appended large dendrimers. *Inorg Chem*, 2010, 49(22): 10702-10709.
- [3] Esfand R, Tomalia DA. Poly(amidoamine)(PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov Today*, 2001, 6(8): 427-436.
- [4] Li Y, He H, Jia XR, et al. A dual-targeting nanocarrier based on poly (amidoamine) dendrimers conjugated with transferrin and tamoxifen for treating brain gliomas. *Biomaterials*, 2012, 33(15): 3899-3908.
- [5] Liu JF, Liu JJ, Chu LP, et al. Novel peptide-dendrimer conjugates as drug carriers for targeting nonsmall cell lung cancer. *Int J Nanomedicine*, 2010, 6: 59-69.
- [6] Zhu K, Guo C, Lai H, et al. Novel hyperbranched polyamidoamine nanoparticle based gene delivery: transfection, cytotoxicity and in vitro evaluation. *Int J Pharm*, 2012, 423(2): 378-383.
- [7] Sawyers C. Targeted cancer therapy. *Nature*, 2004, 432(7015): 294-297.
- [8] Basile L, Pignatello R, Passirani C. Active targeting strategies for anticancer drug nanocarriers. *Curr Drug Deliv*, 2012, 9(3): 255-268.
- [9] Holgado MA, Martin-Banderas L, Alvarez-Fuentes J, et al. Drug targeting to cancer by nanoparticles surface functionalized with special biomolecules. *Curr Med Chem*, 2012, 19(19): 3188-3195.
- [10] Maeda H. Nitroglycerin enhances vascular blood flow and drug delivery in hypoxic tumor tissues: analogy between angina pectoris and solid tumors and enhancement of the EPR effect. *J Control Release*, 2010, 142(3): 296-298.

(收稿日期: 2012-07-12)

· 消息 ·

全国核医学技术交流会议稿件统计通告

全国核医学技术学术交流会征稿工作于 2012 年 08 月 22 日开始, 截稿 2013 年 03 月 20 日, 历时 7 个月, 收到稿件总数 415 篇。稿件征集期间得到了总会领导、各省核医学分会领导、各医院核医学科科主任的大力支持, 总会秘书组、技术学组各成员在此期间做了大量的具体工作, 在此一并感谢。以下是会议稿件的具体统计情况, 用以向全体同仁汇报, 希望继续受到您的关注和支持。1、投稿前 5 名的地区: 天津(100 篇)、北京(76 篇)、广东(32 篇)、上海(29 篇)、山西(22 篇); 2、投稿前 5 名的单位: 天津医科大学总医院(30 篇)、北京协和医院(20 篇)、北京 301 医院(18 篇)、第四军医大学西京医院(17 篇)、内蒙古医科大学第一附属医院(15 篇); 3、投稿 3 篇以上的个人: 孟召伟(天津医科大学总医院核医学科, 8 篇)、张阳(兰州军区乌鲁木齐总医院, 4 篇)、黄克敏(广东省佛山市第一人民医院, 3 篇)、张伟雄(北京 301 医院, 3 篇)、王猛(北京中日友好医院, 3 篇)、冯学民(天津市第一中心医院核医学科, 3 篇)、李宁(天津医科大学总医院 PET-CT 诊断科, 3 篇)、郭勇(兰州军区乌鲁木齐总医院, 3 篇)、王渊恺(上海复旦大学附属华山医院, 3 篇)。

中华医学会核医学分会技术学组秘书 欧阳晓晖 赵光宇