

长循环超顺磁性氧化铁脂质体纳米微粒的制备及理化性质**☆

杨蕊梦¹, 许乙凯²

Initial preparation and physico-chemical properties of long-circulating superparamagnetic iron oxide liposome nanoparticles

Yang Rui-meng¹, Xu Yi-kai²

Abstract

BACKGROUND: Common superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIO) have limitations to apply to the reticuloendothelial system (RES) rather than non-RES.

OBJECTIVE: To study the preparation and physico-chemical property of long-circulating SPIO liposome nanoparticles as novel MR contrast agent.

METHODS: The long-circulating SPIO liposome nanoparticles were prepared by three steps: ① preparation of long-circulating blank liposomes by film dispersion method, using DSPG and DSPE-PEG2000 with a molar ratio of 20 : 1; ② synthesis of lauric acid-stabilized SPIO nanoparticles; ③ the two products above were dialyzed for 3 days. Then, physico-chemical property of long-circulating SPIO liposome nanoparticles was measured.

RESULTS AND CONCLUSION: ① Lauric acid-stabilized SPIO nanoparticles, long-circulating blank liposomes and long-circulating SPIO liposomes appeared as circular particles with uniform size approximately 12 nm, 20 nm, 60 nm, respectively in the electron microscope. ② XRD analysis of SPIO nanoparticles: lauric acid-stabilized SPIO nanoparticles and long-circulating SPIO liposomes nanoparticles were face-centered cubic spinel structure of Fe₃O₄, and the crystalline particles were in good form. ③ With the Malvern-3000HS, the measurements of long-circulating SPIO liposomes were: $d_1 = 78.7$ nm, peak area: 100%, peak number 1, $d_v = 76.7$ nm, peak area: 100%, peak number 1, $d_n = 73.5$ nm, peak area: 100%, peak number 1, polydispersity coefficient: 0.212. ④ Standard curve of iron: $A = 0.1947C + 0.0008$, $R^2 = 0.9982$. The Fe concentration of long-circulating SPIO liposome was 6.7213 g/L. ⑤ As the iron concentration increases, T₂ values of long-circulating SPIO liposome gradually decreased. Long-circulating SPIO liposomes were prepared with suitable sizes and distribution, and could be made into contrast agent for subcutaneous or intravenous injection.

Yang RM, Xu YK. Initial preparation and physico-chemical properties of long-circulating superparamagnetic iron oxide liposome nanoparticles. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(8): 1349-1353. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 常见的超顺磁性氧化铁纳米微粒都局限应用于网状内皮系统病变的诊断。

目的: 尝试制备新型MR对比剂长循环超顺磁性氧化铁纳米微粒脂质体纳米微粒, 并对其理化性质进行测定。

方法: 采用以下方法制备长循环超顺磁性氧化铁脂质体纳米微粒: ①精密称取一定量 DSPG、DSPE-PEG2000, 采用薄膜分散法合成空白脂质体纳米微粒。②采用化学共沉淀法, 在碱性条件下与月桂酸反应形成月桂酸稳定的超顺磁性氧化铁纳米微粒。③将上述反应产物以一定比例混合, 加入 TES 缓冲液透析 3 d, 过凝胶柱去除过大的脂质体及游离的磷脂。

结果与结论: 长循环超顺磁性氧化铁脂质体在电镜下显示为类圆形、大小较均匀。衍射图说明产物均为面心立方尖晶石结构的 Fe₃O₄, 而且粒子的结晶状态很好。多分散系数为 0.212。长循环超顺磁性氧化铁脂质体纳米微粒铁含量为 6.7213 g/L。长循环超顺磁性氧化铁脂质体 T₂ 值随着铁浓度的增加逐渐下降。提示制备的长循环超顺磁性氧化铁脂质体纳米微粒粒径大小适宜, 分布均匀, 可制成适合于皮下或静脉注射的制剂。

关键词: 超顺磁性氧化铁; 对比剂; 纳米微粒; 脂质体; 药理学

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.08.005

杨蕊梦, 许乙凯. 长循环超顺磁性氧化铁脂质体纳米微粒的制备及理化性质[J]. 中国组织工程研究, 2012, 15(8):1349-1353. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

经典型脂质体作为药物运载体的一个最大不足点, 是它进入血液循环后, 很快被单核吞噬系统(MPS), 即网状内皮系统的细胞清除, 导致脂质体半衰期短, 靶组织局限(主要在肝、脾)。这一点很类似于熟悉的网状内皮系统特异性对比剂超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)。

近年来, 用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)脂质衍生物修饰脂质体的研究, 受到广泛

关注, 原因是这类脂质体的体内循环时间极大延长, 网状内皮系统分布量减少, 从而增加非网状内皮系统组织的靶向性, 利于主动靶向递药, 具有极大的研究和应用价值。

因此, 实验就新型MR对比剂长循环SPIO脂质体纳米微粒的制备进行研究, 并初步评价其理化性质及药理学特点。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 实验于2008-01/2010-02在

¹Department of Radiology, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou Province, China; ²Medical Imaging Centre, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou Province, China

Yang Rui-meng☆, Doctor, Physician, Department of Radiology, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou Province, China ruimengyang@qq.com

Correspondence to: Xu Yi-kai, Doctor, Professor, Medical Imaging Centre, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30870708*; Medical Science and Technology Foundation of Guangdong Province, No. 20121A011023*

Received: 2011-09-16 Accepted: 2011-10-29

¹ 广州市第一人民医院放射科, 广东省广州市 510180; ² 南方医科大学附属南方医院影像中心, 广东省广州市 510515

杨蕊梦^{*}, 女, 1982年生, 重庆市人, 汉族, 2010年南方医科大学毕业, 博士, 医师, 主要从事胸部影像学诊断及分子影像学研究。
ruimengyang@qq.com

通讯作者: 许乙凯, 博士, 教授, 南方医科大学附属南方医院影像中心, 广东省广州市 510515
xuyikai888@tom.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)08-01349-05

收稿日期: 2011-09-16
修回日期: 2011-10-29 (20100916015/W · W)

南方医院药学部完成。

材料:

| 试剂及仪器 | 来源 |
|---|-------------------|
| DSPG(二硬脂酰磷脂酰甘油)、SPE-PEG2000(二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000) | 德国 Lipoid 公司 |
| 氯仿、体积分数 25%氨水和月桂酸 | 广东光华化学厂有限公司 |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O 和 FeSO ₄ ·7H ₂ O | 广东省化学试剂工程技术研究开发中心 |
| 邻二氮菲水溶液, 10%盐酸羟胺溶液, 1 mol/L 乙酸钠溶液 | 广州化学试剂有限公司 |
| 紫外分光光度计 Unicam UV550 | 美国热电公司 |
| 氮气罐 | 东莞市精诚净化工程有限公司 |
| 超声细胞粉碎仪 | 宁波新芝生物科技公司 |
| 透射电子显微镜(JEM-1010) | 华南植物研究所 |
| Malvern Zetasizer 3000HS 光子相关光谱仪 | 英国马尔文公司 |
| X 射线衍射仪(日本理学) | 日本 RIGAKU |
| D-MAX 2200 VPC | |

实验方法:

长循环空白脂质体纳米微粒的制备: 采用薄膜分散法, 按摩尔比 20:1 精密称取一定量 DSPG、DSPE-PEG2000 至茄形瓶中, 加入 30 mL 氯仿, 置于恒温磁力搅拌器中搅拌约 2 h 至上述脂材完全溶解; 将上述反应产物转入三颈瓶中, 于氮气持续作用下减压蒸发除去氯仿, 使溶液在瓶壁上形成均匀的薄膜层, 加入 TES 缓冲液(5 mmol/L, pH=7)20 mL 于超声波清洗器中分散后置于超声细胞粉碎仪(冰浴)中作用约 30 min, 离心, 取上层溶液即得长循环空白脂质体纳米微粒。

月桂酸稳定的超顺磁性氧化铁纳米微粒的制备: 采用化学共沉淀法, 按摩尔比 Fe³⁺: Fe²⁺ = 2:1 的比例称 FeCl₃·6H₂O、FeSO₄·7H₂O, 在蒸馏水中混合搅拌稀释至 25 mL; 将上述铁盐转入三颈瓶, 置于恒温磁力搅拌器上(电接点式水银温度计控温于 60 °C), 在充氮气条件下将铁盐充分混匀, 待温度达到上述温度时, 逐滴加入共约 14 mL 氨水反应约 15 min 得到黑褐色混浊液; 在外部磁场辅助作用下, 用氨水/蒸馏水(5/95)洗涤上述反应产物数次即得到超顺磁性氧化铁纳米微粒 Fe₃O₄。溶解 1 g 月桂酸于氨水/蒸馏水(5/95) 50 mL 中, 加入上述 Fe₃O₄ 纳米微粒中, 90 °C 条件下分散数分钟, 停止加热, 得到黑褐色混浊液; 透析(TES[5 mmol/L]缓冲液), 每隔 8 h 换缓冲液共 48 h; 真空干燥反应产

物得到月桂酸稳定的超顺磁性氧化铁纳米微粒 SPIO。

长循环 SPIO 脂质体纳米微粒的制备: 取长循环单层空白脂质体与吸附月桂酸的水溶性 SPIO 胶团混合(磷脂: SPIO 质量比=5:1, 加入 TES 缓冲液 5 mmol/L, pH=7.0), 透析 3 d, 每隔 8 h 换水, 过凝胶柱除去过大的脂质体及游离的磷脂。

新型 MR 对比剂长循环 SPIO 脂质体纳米微粒的理化性质检测:

透射电镜观察: 各取一份 SPIO 溶液及月桂酸稳定的 SPIO 溶液用去离子水稀释后, 用敷有支撑膜的铜网蘸取少量试液, 用滤纸小片从铜网边缘吸干多余液体, 红外灯下干燥后, 置透射电镜下观察纳米粒子的大小和形态。

各取一份长循环空白脂质体溶液以及长循环 SPIO 脂质体纳米微粒溶液用去离子水稀释后, 液滴于有支撑膜的铜网上, 静置约 5 min 后, 用滤纸小片从铜网边缘吸干多余液体, 用磷钨酸约 20 μL 负染 30~60 s 后, 用滤纸小片从铜网边缘吸干多余液体, 静置半小时晾干后置于透射电镜下观察。

X 射线粉末衍射(XRD)分析: 分别取真空干燥的长循环 SPIO 脂质体纳米微粒研细, 置 D/Max-IIIAX-射线粉末(多晶)衍射仪中测量, 将所得的图谱与国际粉末衍射标准联合会出版的 PDF 卡片比较, 以此来确定样品所具备的晶体结构。

Malvern-3000HS 光子相关光谱仪测量: 吸取 5 μL 所制备的样品, 用蒸馏水稀释至测量杯中, 放入样品槽中测试。所选激光光源的波长为 633.0 nm, 测试温度为(25.00±0.05) °C, 经样品散射后的光是在 90° 范围内变化不同的角度来测定的。光信号用 256 通道、高速数字相关器进行处理。

长循环 SPIO 脂质体纳米微粒中铁含量的测定: 采用邻二氮菲法测定长循环 SPIO 脂质体溶液中铁的含量, 在 6 支 50 mL 比色管中, 分别精密加入 0.00, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 mL 100 mg/L 铁标准溶液, 再加入 1 mL 10% 盐酸羟胺溶液, 2 mL 0.15% 邻二氮菲溶液和 5 mL 1 mol/L NaAc 溶液, 以水稀释至刻度, 摇匀。在 510 nm 波长下, 用 1 cm 比色皿, 以试剂溶液为空白, 测定各溶液的吸光度, 以铁的浓度为横坐标, 溶液相应的吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。准确吸取长循环 SPIO 脂质体微粒样品溶液 0.5 mL 置 100 mL 容量瓶中纯化水稀释至刻度, 摇匀, 再精密吸取上述液 1 mL,

置50 mL容量瓶中, 精密加入1 mL 10%盐酸羟胺溶液, 2 mL 0.15%邻二氮菲溶液和5 mL 1 mol/L NaAc溶液, 以水稀释至刻度, 摇匀, 静置10 min, 待其充分显色后, 以试剂空白为参比, 在510 nm波长处, 测定溶液的吸光度。

长循环SPIO脂质体纳米微粒的T2值的测定及T2弛豫率的计算: 为了评价所制备的长循环SPIO脂质体的信号强度, 先应用体外简化装置进行新型MR对比剂的MR成像体外效果评价。取长循环SPIO脂质体溶液适量, 分别加水稀释至铁浓度为0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16 mmol/L, 依次取这些浓度的样品稀释液10 mL分装于标号为1, 2, 3, 4, 5, 6, 7的7支管径为1.0 cm的试管中, 置于塑料试管架上, 在MR机器(Signa EXCIT HD 3.0T)上扫描, 采用8通道头部线圈, 层厚3 mm, 间隔0.5 mm, 扫描序列采用T2 map: TR 3 000 ms, TE 20, 40, 60, 80 ms, 均做试管横断面扫描。

测定T2值: 将原始数据导入ADW4.3工作站, 测量长循环SPIO脂质体的T2值。选取盛有试剂试管断面的中央区域作为感兴趣区(region of interest, ROI), 并连续测量试管中部4个层面的T2值, 取其平均值, 观察随着含Fe浓度的增加, 长循环SPIO脂质体溶液T2值的变化情况。

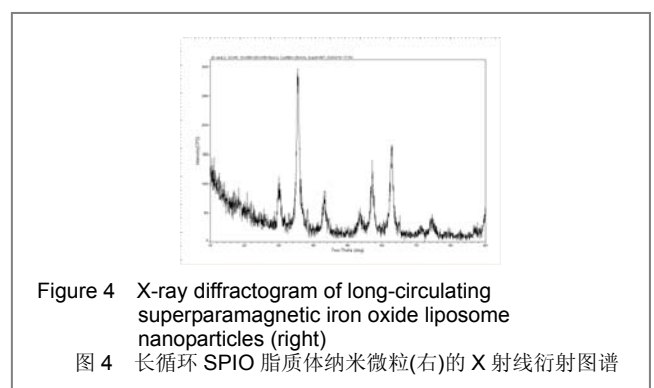
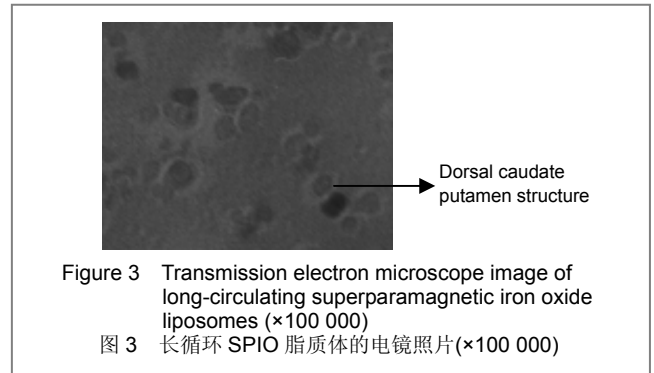
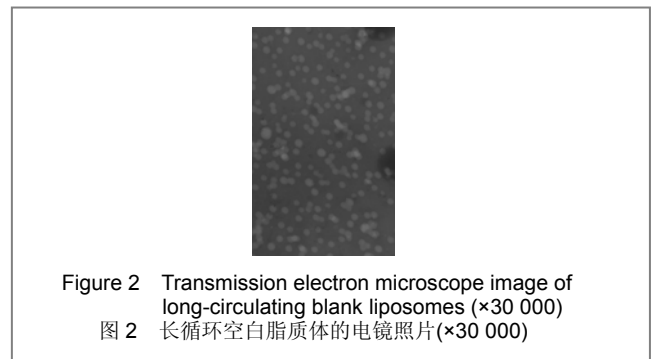
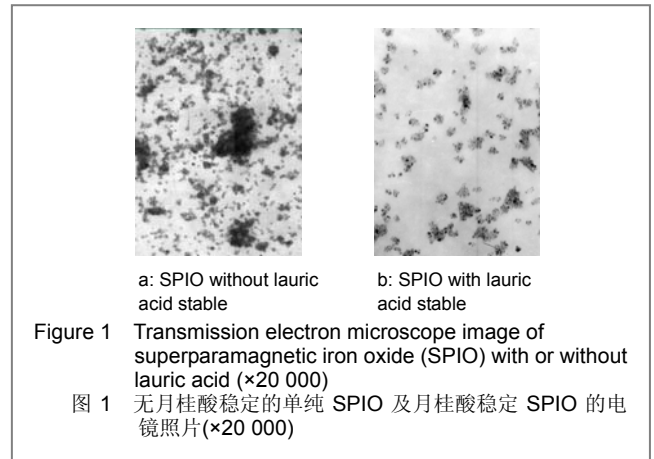
计算T2弛豫率: T2弛豫率定义为含铁浓度与1/T2直线方程的斜率。

主要观察指标: ①透射电镜下纳米微粒的形态大小。②XRD衍射物分析。③长循环SPIO脂质体粒径及其分布。④长循环SPIO脂质体铁含量。⑤长循环SPIO脂质体T2值。

2 结果

2.1 透射电镜下纳米微粒的形态大小 ①无月桂酸稳定的单纯SPIO: 电镜下出现了明显的聚集现象, 见图1a; 月桂酸稳定的SPIO: 在电镜下显示为类圆形、形态规则、大小均匀的颗粒, 仅有轻度团聚现象, 由电镜估算其平均粒径大小约为12 nm, 见图1b。②长循环空白脂质体: 在电镜下显示为类圆形、分布较均匀圆球状, 表面平滑光整, 粒子之间无粘连, 平均粒径大小约为20 nm, 见图2。③长循环SPIO脂质体: 在电镜下显示为类圆形、大小较均匀, 估算粒子平均粒径大小约为60 nm, 见图3。

2.2 XRD衍射物分析 合成的长循环SPIO脂质体纳米微粒的衍射图见图4。由特征峰值30°(220), 35.4°(311), 43.1°(400), 53.4°(422), 56.9°(511), 62.5°(440)所对应的面间距(d值)与粉末衍射标准联合会(JCPDS)编制的标准粉末衍射(PDF)卡片中19-0629卡片的d值基本一致, 说明该产物为面心立方尖晶石结构的Fe₃O₄, 图中可观察到尖锐的衍射峰, 说明Fe₃O₄粒子的结晶状态很好。



2.3 长循环 SPIO 脂质体粒径及其分布 用 Malvern-3000HS 激光粒度分析仪测定的长循环 SPIO 脂质体数据为: 强均粒径 $d_i = 78.7$ nm, 峰面积: 100%, 峰数为1; 体均粒径 $d_v = 76.7$ nm, 峰面积: 100%, 峰数为1; 数均粒径 $d_n = 73.5$ nm, 峰面积: 100%, 峰数为1; 多分散系数(Poly.index)为0.212。见图5。

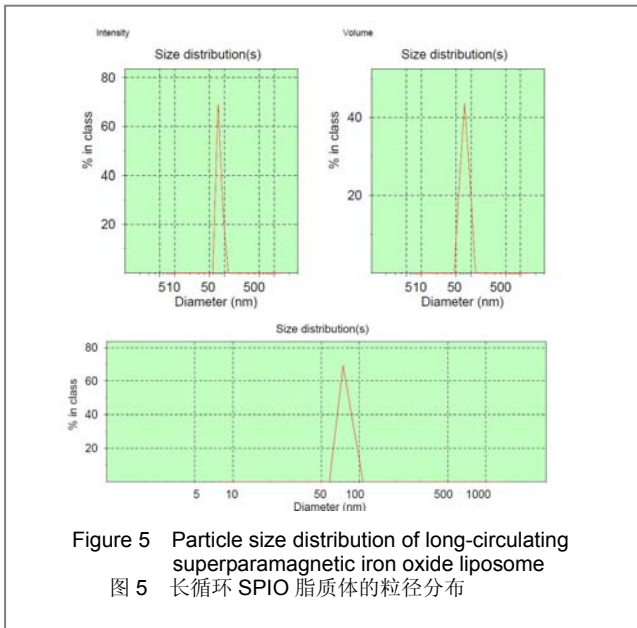


Figure 5 Particle size distribution of long-circulating superparamagnetic iron oxide liposome
图5 长循环 SPIO 脂质体的粒径分布

2.4 长循环SPIO脂质体铁含量 铁的标准曲线方程： $A=0.1947C+0.0008$ ， $R^2=0.9982$ 。长循环SPIO脂质体纳米微粒铁含量为6.7213 g/L。

2.5 长循环SPIO脂质体T2值的测量 随着铁浓度的增加，长循环SPIO脂质体的T2值逐渐下降。以铁的浓度(mmol/L)为横坐标(X)，1/T2为纵坐标(Y)作图，回归方程为： $Y=0.1581X-0.0043$ ， $R^2=0.9068$ ， $n=7$ ，所以样品的T2弛豫率为 $0.1581 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

3 讨论

3.1 脂质体概述 脂质体也称为微脂粒，是一种具有靶向给药功能的新药制剂^[1-6]，其基本结构形成原理为：所有生物膜脂质都是一些双嗜性分子，磷脂一端的磷酸和碱基是亲水性极性基团，另一端的长烃链则属疏水性非极性基团^[7]。当脂质分子在水溶液中受到激烈扰动时，脂质有可能形成含水的小囊，但这囊只能是由脂质双分子层形成，外层脂质的极性基团和囊外水分子相吸引，内层脂质的极性基团则和囊内水分子相吸引，而两层脂质的疏水性烃链将两两相对，排斥水分子在囊膜中的存在，其结构正和天然生物膜一致。这种人工形成的人工膜囊就称为脂质体，似人造细胞空壳，有很大的理论研究和实用价值。

用脂质体包载MR对比剂在国内外都已有研究，因其特有的分子结构和理化性质，脂质体具有以下的特点：①靶向性。②药物组织分布可控性。③与细胞的亲和性。④缓释性。⑤长效性。⑥无毒性。⑦给药途径多样性。由于这些特性，脂质体作为一种药物载体应用十分广泛。普通脂质体在体内很容易被巨噬细胞吞噬，被动聚集到网状内皮系统丰富的组织如肝、脾等^[8-12]，对病灶部位在其他组织器官的诊断和治疗不利，因此，研究者通过在

脂质体的成分中加入一定比例的糖脂(如单唾液酰神经节苷脂 GM1)多含多羟基的物质(如聚乙二醇)，制得长循环脂质体(Long-circulating liposome)，又称立体稳定脂质体或空间稳定脂质体^[10-14]。这样一来，脂质体的表面暴露出一些亲水性的多糖或多羟基基团，可以防止脂质体的聚集而使其稳定，同时减少与血中的蛋白、调理素、抗体、酶等的作用，避免其被网状内皮系统识别吞噬，使脂质体不易发生破裂，增加其在血液中的稳定性，持久地延长药物在血流中的时间，从而增加药物到达病灶部位的浓度^[15-17]。长循环脂质体有利于肝脾以外的组织或器官的靶向作用。这种聚乙二醇化脂质体能延长脂质体在体内的循环时间这一点已经在多种哺乳动物(包括鼠，狗以及人)上得到了证实^[8-10, 12, 17-18]。据报道，直径 $\leq 100 \text{ nm}$ 的聚乙二醇化脂质体在啮齿动物血液循环半衰期为16~24 h，在人类则高达45 h^[10, 19]。同时，将抗体或配体结合在聚乙二醇的末端，既可保持长循环，又可保持对靶体的识别。

3.2 本实验基本思想 实验所合成的长循环SPIO脂质体是一种磁性纳米脂质体，它是在聚乙二醇化脂质体中加入磁性物质而制成。由于脂质体与生物膜的特殊关系，对网状内皮系统的定向性和与癌细胞的亲和性，而成为重要的靶向载体制剂；磁流体和脂质体都可以悬浊液使用，把两种材料以特殊的技术结合起来，可以合成体囊泡悬浊液，既有铁磁流体的性能，又有脂质体的功能。通过高分子物质(常见如聚乙二醇)对脂质体表面的修饰，制成长循环脂质体，延长在体内的循环时间；若通过在脂质体表面联上特异性功能基团(抗体或受体)，可进一步增加其靶向性^[10, 20]。

3.3 药物的合成 SPIO磁性纳米微粒的合成：磁性纳米微粒以 Fe_3O_4 应用为最多，因其具有物料性质稳定、与生物相容性较好、强度较高，且无毒副作用等特点，而被广泛地应用于生物医药的多个领域。磁性纳米微粒的制备方法主要有物理方法和化学方法。目前常用的是化学共沉淀法，在制备SPIO脂质体纳米微粒时，影响磁性纳米微粒大小的因素很多，搅拌的速度、氨水滴加速度、氮气的保护、反应体系pH值等都是直接影响因素。机械搅拌是一种长程力分散，可以强化传质，使反应物料充分混合，适用于均匀混合和打开较大的团聚体，有利于反应均匀和完全，防止因局部反应物浓度过高，生成粒径较大的 Fe_3O_4 颗粒。极低的氨水滴加速度也是为了防止局部结晶速度过快而形成大的晶粒(氨水浓度增大时，粒子平均粒径增大，这是由于有许多未反应的 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 附着在粒子表面)。高速搅拌下，体系和空气的接触面积显著增大，使体系中的 Fe^{2+} 极易被氧化，因此整个反应过程必须用氮气充分保护。碱(氨水、氢氧化钠或碳酸氢钠)在SPIO形成过程中起着沉淀铁离子的作用，加入碱的 pK_b 值应足以使水介质的pH值高于沉淀引

发临界值, 所以它的用量对SPIO的有效粒径会有很大影响。当pH值>10时, 才能使反应快速顺利地进行, 但pH值过高(pH>12)时, 会造成溶液的碱性过强, 溶液中的OH⁻浓度越大, 则Fe(OH)₂越容易被氧化, 本实验选用碱性强度适中的氨水, 而且, 氨具有挥发性, 随着反应时间的延长, 体系的pH值会有少许下降, 有利于制备颗粒细小而且粒度均匀的磁性粒子。

月桂酸稳定的SPIO磁性纳米微粒的合成: 文章参照文献[21]的方法, 在实验中选用的表面活性剂是月桂酸(十二酸/正十二酸/十二烷酸), 月桂酸是含有12个碳的直链饱和脂肪酸, 具有明显的酸性, 可以与NaOH反应皂化, 分子式C₁₂H₂₄O₂, 熔点为44~46 °C, 不溶于水。为了让月桂酸能溶于水溶性的SPIO磁流体, 又避免其与NaOH发生强烈的皂化反应影响样品的合成, 作者选用弱碱性氨水(5/95), 先将月桂酸溶于氨水(5/95), 然后再加入SPIO磁流体, 在90 °C条件下分散数分钟。最终合成的月桂酸稳定的SPIO磁流体TEM观测发现, 磁流体的粒径在12 nm左右, 而且粒径分布较均一, 分散效果良好, 聚集现象远没有无月桂酸稳定的单纯SPIO磁流体那么严重, 仅于局部出现了轻微的聚集。

长循环空白脂质体的合成: 脂质体常用以下两种方法制备, 薄膜分散法和逆相蒸发法。在制备脂质体时可以有两种减少脂质体粒径的方法: 超声法和微孔滤膜挤压法。作者选用前者, 由于超声时间过长造成局部过热, 会因其脂质的降解, 故在超声时用冰水浴进行降温, 此外降低温度还可以增加脂质体颗粒的刚性, 可以避免在经过微孔滤膜挤压时造成脂膜破裂。

长循环SPIO脂质体纳米微粒的合成: 长循环SPIO脂质体纳米微粒合成的困难之处在于要将磁流体和脂质体两种胶体结合在一起, 并要保持各自的性质。通常有两种方法: 一种是直接将脂质体覆盖在磁粒子上, 其优点是粒径小、不会溶解表面活性剂类的两亲分子, 但是因其内核没有水相而在药物传递或靶向应用上受到限制。另一种方法是将磁粒子微乳化而进入脂质体内部, 这种方法由于可以同时携带药物等物质, 得到广泛应用。本次研究就效仿了Bulte等^[22]的实验方法, 先将磷脂(DSPG, DSPE-PEG2000)溶于氯仿中, 真空干燥形成脂膜, 再加入缓冲溶液, 并超声形成单层脂质体, 然后, 用透析方法使Fe₃O₄上修饰的月桂酸被磷脂取代, 从而形成最终需要的长循环SPIO脂质体纳米微粒。

结论: 文章制备的长循环SPIO脂质体纳米微粒粒径大小适宜, 分布均匀, 可制成适合于皮下或静脉注射的制剂。

4 参考文献

[1] Gabizon A, Shmeeda H, Horowitz AT, et al. Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates. *Adv Drug Deliv Rev.*2004;56(8):1177-1192.

[2] Oussoren C, Storm G. Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. *Adv Drug Deliv Rev.*2001;50(1-2):143-156.

[3] Jain R, Dandekar P, Patravale V. Diagnostic nanocarriers for sentinel lymph node imaging. *J Control Release.*2009;138(2):90-102.

[4] Phillips WT, Klipper R, Goins B. Use of (99m)Tc-labeled liposomes encapsulating blue dye for identification of the sentinel lymph node. *J Nucl Med.*2001;42(3):446-451.

[5] Thoeny HC, Triantafyllou M, Birkhaeuser FD, et al. Combined ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide-enhanced and diffusion-weighted magnetic resonance imaging reliably detect pelvic lymph node metastases in normal-sized nodes of bladder and prostate cancer patients. *Eur Urol.*2009;55(4):761-769.

[6] Dan N. Effect of liposome charge and PEG polymer layer thickness on cell-liposome electrostatic interactions. *Biochim Biophys Acta.*2002;1564(2):343-348.

[7] Blume G, Cevc G. Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim Biophys Acta.*1990;1029(1):91-97.

[8] Woodle MC, Matthey KK, Newman MS, et al. Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta.*1992;1105(2):193-200.

[9] Woodle M C, Lasic D D. Sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta.*1992;1113(2):171-199.

[10] Woodle MC, Collins LR, Sponsler E, et al. Sterically stabilized liposomes. Reduction in electrophoretic mobility but not electrostatic surface potential. *Biophys J.*1992;61(4):902-910.

[11] Allen C, Dos SN, Gallagher R, et al. Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations through use of surface grafted poly(ethylene glycol). *Biosci Rep.*2002;22(2):225-250.

[12] Gabizon A, Catane R, Uzieli B, et al. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res.*1994;54(4):987-992.

[13] Nellis DF, Giardina SL, Janini GM, et al. Preclinical manufacture of anti-HER2 liposome-inserting, scFv-PEG-lipid conjugate. 2. Conjugate micelle identity, purity, stability, and potency analysis. *Biotechnol Prog.*2005;21(1):221-232.

[14] Misselwitz B. MR contrast agents in lymph node imaging. *Eur J Radiol.*2006;58(3):375-382.

[15] Lee CM, Choi Y, Huh EJ, et al. Polyethylene glycol (PEG) modified 99mTc-HMPAO-liposome for improving blood circulation and biodistribution: the effect of the extent of PEGylation. *Cancer Biother Radiopharm.*2005;20(6):620-628.

[16] Garbuzenko O, Barenholz Y, Prieve A. Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer. *Chem Phys Lipids.*2005;135(2):117-129.

[17] Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, et al. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.*1990;268(1):235-237.

[18] Woodle MC, Newman MS, Cohen JA. Sterically stabilized liposomes: physical and biological properties. *J Drug Target.*1994;2(5):397-403.

[19] Allen TM, Newman MS, Woodle MC, et al. Pharmacokinetics and anti-tumor activity of vincristine encapsulated in sterically stabilized liposomes. *Int J Cancer.*1995;62(2):199-204.

[20] Suzuki R, Takizawa T, Kuwata Y, et al. Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin-PEG-liposome. *Int J Pharm.*2008;346(1-2):143-150.

[21] Fukuda Y, Ando K, Ishikura R, et al. Superparamagnetic iron oxide (SPIO) MRI contrast agent for bone marrow imaging: differentiating bone metastasis and osteomyelitis. *Magn Reson Med.*2006;5(4):191-196.

[22] Bulte JW, de Cuyper M, Despres D, et al. Short- vs. long-circulating magnetoliposomes as bone marrow-seeking MR contrast agents. *J Magn Reson Imaging.*1999;9(2):329-335.

来自本文课题的更多信息一

基金声明: 国家自然科学基金资助项目(30870708); 广州市医药卫生科技资助项目(20121A011023)。

作者贡献: 实验实施者为第一作者。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

创新性说明: 制备的长循环超顺磁性氧化铁脂质体纳米微粒粒径大小适宜, 分布均匀, 可制成适合于皮下或静脉注射的制剂。