

苏州大学

---

硕士学位论文

---

叶酸靶向紫杉醇纳米脂质体的制备及其生物学效应的研究

---

姓名：汪梅花

---

申请学位级别：硕士

---

专业：放射医学

---

指导教师：许玉杰

---

20080501

## 中文摘要

紫杉醇是从红豆杉中提取出的具有高效抗肿瘤功能的天然药物，是目前临床一线化疗药物。紫杉醇水溶性差，临床应用中以聚氧乙烯蓖麻油和乙醇（V: V=1: 1）为溶剂，而聚氧乙烯蓖麻油是导致临床用药出现过敏反应的主要原因，同时，它的体内代谢动力学参数不利于药物疗效的发挥。采用生物相容性好的可生物降解的脂质纳米粒为载体，能够解决紫杉醇溶解性问题。研究表明：脂质体表面覆盖聚合物 PEG 可明显增强脂质体体内半衰期及其在肿瘤微血管的渗透，显著提高疗效。国内外已有报道，在脂质体表面连接适当的肿瘤细胞识别分子，如抗体、配体等，可以提高药物对肿瘤细胞的靶向性。叶酸是一个非常适合的配体，因为在多种肿瘤细胞的表面有过量的叶酸受体表达，通过以 PEG 为桥梁，间接连接叶酸与脂质体，必定可以提高药物靶向性，同时也能提高脂质体药物的血浆半衰期，从而提高肿瘤的治疗效果。

**目的：**合成 FA-PEG-DSPE 复合物；构建新型叶酸靶向紫杉醇纳米脂质体（TAX-NLC-FA），并研究药物的理化性质及其对 KB 细胞的效应；为进一步研制新型抗肿瘤靶向药物提供实验依据。研究放射性同位素  $^{125}\text{I}$  直接标记紫杉醇的方法，为开展新的纳米化紫杉醇制剂体内分布与代谢动力学的研究，提供合格的示踪剂。

**方法：**采用室温酰化反应分步合成 FA-PEG-DSPE，IR 及  $^1\text{H-NMR}$  等鉴定合成产物。采用高压乳匀法—冷乳匀法制备 TAX-NLC-FA，激光粒度仪检测纳米粒的粒径及其分布。MTT 细胞生长抑制试验观察 TAX-NLC-FA 对 KB 细胞的生长抑制作用。使用 Ch-T、改良 Ch-T、 $\text{HNO}_3$  氧化法等三种方法，进行紫杉醇的  $^{125}\text{I}$  标记，并通过纸层析、IR 鉴定标记产物。

**结果：**1. 以 DCC/NHS 活化羧基方法合成 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 方法简单，HPLC 液相分离条件适合，FA-PEG-NH<sub>2</sub> 与 FA 可以达到较好的分离，FA 与 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 保留时间（retention time ,RT）分别为 2.368min、3.340min，产物连接比例  $30.63\% \pm 2.34\%$ （n=10），产率  $16.7\% \pm 1.43\%$ （n=10）。DSPE、SUC-DSPE 的 RT 分别为 1.997 min、1.663min，连接比率  $90.9\% \pm 1.03\%$ （n=3），产率  $60.9\% \pm 2.17\%$ （n=3）。终产物 FA-PEG-DSPE 以 DCC 活化羧基方法合成终产物，产率  $19\% \pm 1.06\%$ （n=4）

方法，磁共振氢谱证实，终产物为 FA-PEG-DSPE。总体产率约为 2%，产率低。

2. 新型 TAX-NLC-FA 的粒径分布  $134 \text{ nm} \pm 18 \text{ nm}$  ( $n=3$ )，与非靶向紫杉醇纳米脂质体粒径(TAX-NLC) ( $66 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm}$ ) 相比显著增加。

3. 通过 MTT 实验，新型 TAX-NLC-FA 对 KB 细胞的生长抑制作用明显增强，在作用 24h 后，新型 TAX-NLC-FA 对 KB 细胞 24h 的  $IC_{50}$  为 TAX-NLC 1/6 倍左右。

4. 对三种标记方法进行了比较，结果表明，改良 Ch-T 法标记率为  $63.1\% \pm 5.7\%$  ( $n=5$ )，放射化学纯度为  $96.3\% \pm 1.3\%$  ( $n=5$ )，储存于  $4^\circ\text{C}$  生理盐水或乙醇储存体系 24h、120h 分别在 95% 以上、90% 左右；在血浆中稳定性也较好，在  $4^\circ\text{C}$ 、 $37^\circ\text{C}$  放置 24h，放化纯分别为  $92.3\% \pm 0.4\%$ 、 $89.5\% \pm 0.6\%$ 。Ch-T 法所得标记率为  $21.4\% \pm 3.3\%$  ( $n=3$ )，标记方法简单，但标记率低，无法得到稳定的标记产物。HNO<sub>3</sub> 法标记率为  $72.6\% \pm 6.0\%$  ( $n=6$ )，标记率较高，产物相对较稳定，但实验当中采用  $80^\circ\text{C}$  反应体系，不易操作及控制；由于温度高，过多的 <sup>125</sup>I 升华可能会造成更多的放射性污染及吸入，影响研究人员的身体健康，并降低放射性 <sup>125</sup>I 的利用率。改良 Ch-T 法标记紫杉醇是一个方法简便、标记率高、标记产物稳定性较好的方法，标记产物能够满足体内放射性示踪实验的要求。

**结论：**采用室温酰化反应分步合成 FA-PEG-DSPE，方法简单，但总体产率约为 2% 左右。产率低。新型 TAX-NLC-FA 粒径为  $134 \text{ nm} \pm 18 \text{ nm}$  ( $n=3$ )，对 KB 细胞的生长抑制作用与 TAX-NLC 相比明显增强，24h 的细胞毒性达到 TAX-NLC 的 6 倍左右。采用改良 Ch-T 法标记紫杉醇，标记方法简单、易操作，标记率达  $63.1\% \pm 5.7\%$ ，放化纯达  $96.3\% \pm 1.3\%$ ，纯化后的标记产物在血清、生理盐水和乙醇中有较好的稳定性，能满足体内药代动力学示踪实验的要求。通过本实验的研究，为进一步研制新型靶向性的纳米化紫杉醇，开展体内药物分布与代谢动力学的研究，奠定了良好的实验基础。

**关键词：** 叶酸； 脂质体； 紫杉醇； 靶向； 脑磷脂

作 者：汪梅花

指导教师：许玉杰

# The preparation and the biological effect of folate-mediated targeting nanostructure liposome-entrapped paclitaxel

## Abstract

The paclitaxel which extracts from yews is a highly effective anti-cancer natural medication. It is the forefront medication for chemotherapy for treating cancer. The paclitaxel has a poor water-solubility, so people use solid lipid nanoparticle which has a good biological compatibility and can be biologically degraded to solve the paclitaxel deliquescent problem. The research shows that the PEG which covered with appearance of the lipid substance can extend the the blood half-life time and increase the microvascular infiltrating of the tumor. At domestic and abroad, Much research have utilized the covalence between folate and chemical agent or biological agent. *in vivo* and *in vitro* experiment verificate that they can significantly increase to deliver medicine for masculine of the folate receptor. PEG is the bridge of it, which connect the folic acid with the lipid substance. It can improve the target of the medication, and at the same time, it also can improve the half life of the blood in the medication of lipid substance.

**Purpose:** Synthesizing FA-PEG-DSPE, a new pattern Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped paclitaxel was obtained. To study the pharmacal physico-chemical property of liposome drug and cell-growth inhibitory effect on KB cell, we use radioisotope  $^{125}\text{I}$  labeling paclitaxel directly, accordingly, providing qualified tracer agent for new nanometer paclitaxel, by which drug disposition and metabolism dynamics *in vivo* can be studied.

**Methods:** FA-PEG-DSPE was synthesized via acylation reactivity at room temperature. Folate-mediated tumor cell targeting of nanoparticle liposome-entrapped paclitaxel was prepared by high pressure galacte equal and galact equal method; The diameter and distributing of nanoparticle were detected by LASER particle diameter meter. Under the new type Folate-mediated tumor cell targeting of nanometer

liposome-entrapped paclitaxel (TAX-NLC-FA) effected on KB cells, the growth inhibiting was studied by MTT. The Oxidants of  $^{125}\text{I}$  labeling paclitaxel were Ch-T,  $\text{HNO}_3$ . The product was identified by thin paper chromatography and infrared spectrometry(IR).

## Results

1. Synthesising FA-PEG-NH<sub>2</sub>, with DCC or/and NHS to activate carboxyl group, HPLC condition was suited, FA-PEG-NH<sub>2</sub> and folic acid can be better separated. The retention time of FA and FA-PEG-NH<sub>2</sub> were 2.368min and 3.340min respectively, the corresponsive proportion of production was  $30.63\% \pm 2.34\%$  (n=10). And the yield of the FA-PEG-NH<sub>2</sub> was  $16.7\% \pm 1.43\%$  (n=10), The RT of DSPE and SUC-DSPE were 1.997min and 1.663min respectively, with the proportion of  $90.9\% \pm 1.03\%$  (n=3). The yield of the SUC-DSPE was  $60.9\% \pm 2.17\%$  (n=3), The yield of the final production FA-PEG-DSPE was  $19\% \pm 1.06\%$  (n=4). the final production FA-PEG-DSPE was confirmed by the nuclear magnetic resonance hydrogen spectrum ( $^1\text{H-NMR}$ ), The total yield of product was about 2%, which was adequately low.

2. Particle diameter of TAX-NLC-FA was  $134 \text{ nm} \pm 18 \text{ nm}$  (n=3), which was extended significantly compared to non-targeted TAX-NLC ( $66 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm}$ ).

3. Growth inhibition of TAX-NLC-FA on KB cell was increased significantly, observed by MTT, TAX-NLC-FA took action on KB cell after 24h, The 50% inhibiting concentration of TAX-NLC-FA was 1/6 times compared to TAX-NLC.

4. Experiment results showed that, The radiolabeling ratio of the labeled compound produced by the modified Ch-T method was about  $63.1\% \pm 5.7\%$  (n=5) with radiochemical purity about  $96.3\% \pm 1.3\%$  (n=5). 24 hours later, stored them in NS or alcohol system at 4°C, The radiochemical purity of the product was above 95% and 90% after 120 hours. The labelled product was also stable in serum, after 24h stored at 4°C and 37°C, the radiochemical purities were  $92.3\% \pm 0.4\%$  and  $89.5\% \pm 0.6\%$  respectively. The traditional Ch-T method was simple, The radiolabeling ratio of which was  $21.4\% \pm 3.3\%$ , but it was impossible to obtain the stable radiolabeling product. The radiolabeling ratio of the labeled compound produced by the nitric acid oxidization method was  $72.6\% \pm 6.0\%$  (n=6), the radiolabeling products of the nitric acid oxidization

method was much higher, and the stability of the product of the nitric acid oxidization method was good relatively. At 80°C reaction system, the nitric acid oxidization experiment became difficult to deal and control, also, due to the high temperature, sublimation of the redundant  $^{125}\text{I}$  could cause much more radioactive contamination and was unavoidable to breath in, which would be adverse to the health of the research worker and reduce the yield of  $^{125}\text{I}$ . Generally, the modified Ch-T method was simple and convenient, the radiolabeling ratio was high and the labeled compound was stable, as so qualified for the isotopic tracing experiment in vivo.

### Conclusion

To synthesis FA-PEG-DSPE, step-by-step acylation at room temperature, the reaction is not complicated, but the final total yield was not so good, only about 2%. TAX-NLC-FA particle is about 134 nm±18 nm in diameter, and its growth inhibition on KB cell is significant. Measured by MTT, TAX-NLC-FA takes action on KB cell after 24h, and the cytotoxicity of TAX-NLC-FA was 6 times compared to TAX-NLC. Labelling paclitaxel by modified Ch-T and the ratio was high, moreover, the labeled compound was stable. It was qualified for the isotopic tracing experiment in vivo. This method was simple and convenient, and was easy to handle with, the radiolabel ratio of the compound produced by the modified Ch-T method was about 63.1%±5.7%, with purity about 96.3%±1.3%. The stability in serum, normal saline and alcohol of the labeled product after purification was better. It could meet with the requirement of pharmacokinetics tracer experiment. In this study, we have done some basic work for further and better development of the novel targeting nanometer paclitaxel, through analyzing its distribution and pharmacokinetics in vivo.

**key words:** folic acid; liposome; paclitaxel; target; DSPE

Written by: Wang Mei-hua

Supervised by: Xu Yu-jie

# 苏州大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不含为获得苏州大学或其它教育机构的学位证书而使用过的材料。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人承担本声明的法律责任。

研究生签名： 汪梅花 日期： 2008.5.15

## 学位论文使用授权声明

苏州大学、中国科学技术信息研究所、国家图书馆、清华大学论文合作部、中国社科院文献信息情报中心有权保留本人所送交学位论文的复印件和电子文档，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。除在保密期内的保密论文外，允许论文被查阅和借阅，可以公布（包括刊登）论文的全部或部分内容。论文的公布（包括刊登）授权苏州大学学位办办理。

研究生签名： 汪梅花 日期： 2008.5.15

导师签名： 汪梅花 日期： 2008.5.15

## 研究背景

紫杉醇 (paclitaxel, TAX), 分子式:  $C_{47}H_{51}NO_{14}$ . 分子量: 853.90, 化学名称:  $5\beta, 20$ -环氧-1,  $2\alpha, 4, 7\beta, 10\beta, 13\alpha$ -六羟基紫杉烷-11-烯-9-酮-4, 10-二乙酸酯-2-苯甲酸酯-13-[(2'R,3'S)-N-苯甲酰-3'-苯基异丝氨酸酯], 化学结构如图 2-1。紫杉醇最早是从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*) 的树皮中分离出的化学结构新颖、作用机理独特的新型抗肿瘤活性成分,主要用于治疗转移性卵巢癌和乳腺癌,被誉为 90 年代国际上抗癌药三大成就之一<sup>[1]</sup>, 是目前临床一线化疗药物, 1992 年 12 月 29 日美国 FDA 正式批准用于晚期卵巢癌、肺癌、子宫癌的治疗, 它是经 FDA 认证, 目前最好的天然抗癌药物之一, 是治卵巢癌、乳腺癌的首选药物, 对白血病、肺癌、脑癌、直肠癌等疗效也显著。由于紫杉醇水溶性差, 市售紫杉醇注射液采用聚氧乙烯蓖麻油等辅料以增加其溶解性, 聚氧乙烯蓖麻油, 有(中性) 粒细胞减少等剂量限制性毒性和骨髓抑制、室性心律不齐等毒副作用, 并可引起严重的过敏反应, 因此临床应用受到限制。解决紫杉醇用药时的溶解性问题成为当前关键问题之一。

### 1) 紫杉醇溶解性的解决

随着药物学研究和生物纳米科学的发展, 目前已有各种高分子材料和无机材料用于载体药物的研究, 材料的选择必须满足于组织、血液、免疫等生物兼容性的要求。载体对药物吸附, 包裹和键合, 通过载体药物进入人体, 使药物在释放部位、速度和方式等具有选择性和可控性, 实现药物的缓释和靶向传输, 从而更好的发挥药物疗效。

脂质体作为载体是一个研究热点。脂质体作为载体具有以下特点<sup>[2]</sup>: 脂质体进入体内被生物降解, 不会在体内积累, 免疫原性小、无毒; 可包埋运载水溶性和脂溶性药物, 使药物缓慢释放, 药效持续时间长; 脂质体通过细胞内吞和融合作用, 可直接将药物送入细胞内, 减少不良反应; 脂质体是两性分子的集合, 它的大小、电荷、成分和分子结构容易控制。传统脂质体(liposomes)是一种由排列有序的脂质双分子层组成的多层微囊, 具有类似生物膜双分子层的近晶型液晶结构, 大小通常为几十纳米到几十微米, 目前广泛应用于递送蛋白质、基因及抗菌抗肿瘤药物等。传统脂质体通过细胞内吞和融合作用, 可将药物送入细胞内, 它

是一种定向的靶向给药载体，是无副作用或减少副作用的释药体系，脂质体与细胞亲和力强，能增强被封装的药物透过细胞的能力，可使药物集中在病灶处，提高药物的疗效。脂质体纳米粒的粒径分布一般在80~300nm，相比较适合的脂质体粒径100 nm左右，其被单核吞噬细胞系统截流的量最少，血循环时间最长，在肿瘤组织中被截留的量最多<sup>[3]</sup>，调节脂质体的粒径使其血循环时间延长、适合于从血液转移至肿瘤、在肿瘤组织中易被截留。

固体脂质纳米粒（solid lipid nanoparticles, SLN）是以固态的天然或合成的类脂为载体材料，将药物包裹或内嵌于类脂中的纳米给药系统。其以毒性低、生物相容性好的脂质材料为载体，克服了传统脂质体体内易解离、突释的特点；易消毒灭菌，贮存稳定性好，适合多种给药途径，可以解决TAX溶解性问题，避免严重的过敏反应的发生。在SLN的基础上，近年发展的纳米脂质载体（nanostructure lipid carrier, NLC）展现了其优势。与SLN的单一固体脂质基质相比，NLC由几种熔点不同的固、液混合脂质作基质，可以避免脂质形成完整晶格而将药物排挤出来，因此能够增加药物的载带；同时，NLC继承了SLN的一些优点，如生理相容性好、保护药物不受化学降解，它成本低廉、制备方法简单，NLC作为药物载体是理想的选择之一。

紫杉醇脂质体从20世纪90年代初开始研究，至目前为止临床前已研究取得一些有理论意义及实用价值的实验结果。商业供应的紫杉醇脂质体(力扑素)是用卵磷脂等将紫杉醇进行包裹，去除了原来的溶媒，紫杉醇脂质体较传统的紫杉醇注射液引起的过敏反应发生率低，在耐受性方面前者优于后者<sup>[4-5]</sup>。研究显示<sup>[6]</sup>脂质体作为两性霉素、紫杉醇载体可以较大地提高疏水性药物的水溶性，并有效地降低药物毒性。

脂质体作为紫杉醇的载体在使用中有如下优点<sup>[7]</sup>：解决了紫杉醇的溶解性问题；提高了紫杉醇在溶液中的稳定性；避免过敏反应而不影响抗肿瘤活性；减少患者对紫杉醇的耐药性；提高机体对紫杉醇的耐受性，有可能增加给药剂量，进而提高疗效；缩短滴注时间，使用方便；紫杉醇脂质体还有腹腔给药的可能性。

## 2) 延长血浆半排期，提高生物利用度，提高靶区药物聚集

脂质体作为药物载体，具有一定的靶向性和缓释性，能降低药物给药剂量，减轻药物毒副作用，提高药物的稳定性。然而普通脂质体进入循环系统后，易被网状内皮系统(reticuloendothelial system, RES)吞噬和破坏，半衰期很短，从而影响

药物到达预定的治疗靶区<sup>[8]</sup>。

普通脂质体是指未加其他分子成分修饰的脂质体，血循环时间短。包覆脂质体（coated liposome）是指有分子成分修饰，通过对脂质体大小、电荷以及表面水化作用的控制使之稳定，以减缓它在循环中的清除作用。包覆脂质体是一种新型的膜修饰脂质体，与普通脂质体相比，它可增加脂质体双层膜的稳定性，提高脂质体的体内外稳定性，延缓脂质体中的药物释放；能够给脂质体外层周围提供一个亲水性屏障，阻止血浆蛋白对脂质体表面的吸附，静注给药可延长脂质体在体内的循环时间，增加药物的靶向性。常用的包覆材料有多糖（如壳聚糖、藻酸盐）及其衍生物、聚乙烯醇衍生物（PVA-R）、胶原蛋白、右旋糖苷衍生物等。聚乙二醇（PEG）是乙二醇单体聚合而形成的线性高分子材料，是一种主链由两个亚甲基和一个氧原子重复构成的一种人工合成高分子材料，它既可溶于水，又可溶于一些有机溶剂，无毒，免疫原性低，是美国食品与药物管理局（FDA）唯一认可的可用于食品和药物的人工合成高分子材料。国外的抗癌药物脂质体的研究已历经30多年，主要成果是长循环技术，其中聚乙二醇(PEG)类研究较多。聚乙二醇具有优良的生物相容性，在体内能溶于组织液中，能被机体迅速排出体外而不产生任何毒副作用。PEG分子末端羟基通过适当方式活化或改造可与各类分子相偶联，通过化学反应，它可以连接到其他一些分子或表面上去，形成与生物相容的保护膜，在新型生物材料的合成和改性中PEG作为材料的一部分，赋予材料新的特性和功能，如亲水性、柔性等。决定脂质体与RES产生亲和作用的是脂质体与RES细胞的非特异性疏水作用和一些血浆成分(主要是调理素, opsonin)对脂质体的特异性调理作用。兼有亲水性和柔顺性的聚乙二醇高分子能在脂质体表面形成一层水化膜，阻碍血浆成分与脂质体表面的吸附，PEG化脂质体的PEG层空间障碍和表面亲水性减少了联结到脂质体上的血液蛋白,从而降低网状内皮系统对脂质体的识别和摄取，使脂质体在体循环中的时间延长。聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺（PEG-DSPE）PEG-DSPE 是聚乙二醇的磷脂衍生物，为两性高分子化合物，既含有亲水的聚乙二醇又含有疏水的脑磷脂，在水中的性质近似于表面活性剂，以胶束的形式存在，**当PEG-DSPE与脂质体混合时，其疏水端插入脂质体双分子膜，使PEG-DSPE亲油的羧基嵌入脂质体形成稳定的聚乙二醇保护层，亲水性的长链留在纳米粒的表面，可以吸附大量的水分子，从而脂质体纳米粒表面形成一层水分子的空间位阻，减少体内巨噬细胞对纳米粒的吞噬，延长了脂质体在血液中的循环**

时间。采用PEG修饰药物载体表面,防止RES(网状内皮系统)吞噬脂质体,实现了肿瘤的被动靶向治疗。研究表明,脂质体表面覆盖聚合物PEG可明显增强脂质体的血液半衰期及其在肿瘤部位微血管的渗透<sup>[9]</sup>。Crosasso 等<sup>[10]</sup>制备了载有紫杉醇的经PEG修饰的脂质体,是以卵磷脂:磷脂酰甘油:胆固醇:PEG5000-二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)为9:1:2:0.7(摩尔比:molar ratios,MR),与传统紫杉醇脂质体相比,经过修饰的紫杉醇脂质体在体内的 $t_{1/2\beta}$ (药物消除半衰期)为48.6h(传统紫杉醇脂质体的 $t_{1/2\beta}$ 为9.27h),药效学实验证明,PEG修饰的载药脂质体与游离药物的活性相当。陈大兵等<sup>[11]</sup>制备的长循环的紫杉醇硬脂酸纳米粒是采用“乳化蒸发-低温固化”法制备纳米粒,它是硬脂酸为载体材料制备成紫杉醇的长循环脂质纳米粒,所制备的长循环纳米粒在小鼠体内的血浆半衰期( $T_{1/2\beta}$ ,10.06 h)高于普通纳米粒( $T_{1/2\beta}$ ,2.63 h)和紫杉醇注射剂( $T_{1/2\beta}$ ,1.36 h)。Robert J. Lee 等<sup>[12]</sup>叶酸紫杉醇脂质体主要是以二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)/磷脂酰甘油(DMPG)/mPEG-DSPE/FA-PEG-DSPE(MR:85.5:9.5:4.5:0.5)为载体材料,靶向PEG化紫杉醇脂质体与非靶向PEG化紫杉醇脂质体的血浆半衰期分别为12.33 h、14.23 h,而以聚氧乙烯蓖麻油为佐剂的游离紫杉醇注射剂的血浆半衰期为1.78h。PEG的柔韧性的亲水性长链使脂质体空间结构发生变化及亲水性增强而被RES摄取减少,PEG的长链越长,则脂质体亲水性越强。然而不同分子量的PEG在肿瘤组织中的积聚程度不同,分子量增大,PEG化脂质体在血液中停留时间延长,而在肿瘤组织的渗透速率却减慢。不论PEG分子量如何,以及肿瘤位于何种部位,PEG化脂质体均表现出对肿瘤部位的高积聚性,停留时间也比在正常组织中长<sup>[13]</sup>。药物载体表面覆盖PEG,可降低免疫原性,可逃避RES系统的吞噬作用,且大大增加其在血浆中的寿命,延长半衰期,提高疗效。

### 3) 提高药物靶向性,增强靶区疗效,降低损伤

靶向治疗是能将治疗性药物通过靶向载体/靶向制剂送达到预定目标部位的药物制剂,它可使到达需要部位药量比例大大增加,从而减少用药剂量,减轻毒副作用。

脂质体的靶向作用可分为主动靶向和被动靶向两大类:主动靶向脂质体是指表面结合有抗体或配体的脂质体,包括配体靶向脂质体和免疫脂质体。被动靶向脂质体是指脂质体表面没有靶向物质,仅靠其本身的趋化特性作用于组织,包括普通脂质体和长循环脂质体。与未加修饰的脂质体相比,主动靶向性脂质体(Active

targeted liposome) 可更加精确的到达靶向目标, 使得药物在局部聚集。所谓配体靶向脂质体是脂质体表面结合有能识别细胞表面分子的物质, 通过配体分子的特异性, 专一地与靶细胞表面的互补分子相互识别与作用, 使脂质体聚集到在靶区并释放药物。这类配体有: 各种糖脂或糖蛋白、植物凝集素、肽类激素和其他蛋白质, 可以根据临床需要来选择不同配体。

发展选择性破坏肿瘤组织的肿瘤靶向治疗已成为当今肿瘤治疗的主导方向。近年来, 有关专家主要致力于研制主动靶向的长循环抗癌药物脂质体, 即把肿瘤靶向配体连接到长循环脂质体的PEG链末端, 以实现肿瘤的主动靶向。国内的肿瘤靶向抗癌药物脂质体的研究始于上世纪八十年代末期。目前采用的肿瘤靶向配体主要有肿瘤细胞靶向的单克隆抗体或其活性片段和叶酸等小分子, 以及肿瘤血管靶向的小分子环状肽等<sup>[14-15]</sup>。

叶酸受体(Folate receptor, FR)是一种由糖基化磷脂酰肌醇(GPI) 连接的胞膜糖蛋白, 是肿瘤相关性抗原, 分子量为38~40 kD。在正常组织中表达高度保守, 而在上皮组织来源的恶性肿瘤如卵巢癌、宫颈癌、肾癌、乳腺癌、结肠癌、鼻咽癌等组织中高度表达。FR有FR- $\alpha$ , FR- $\beta$ , FR- $\gamma/\gamma'$  3种叶酸的异构体, 前两者是细胞膜偶联蛋白, 与GPI锚链。叶酸辅酶、5-甲基四氢叶酸对FR- $\alpha$ 亲和力显著高于FR- $\beta$ <sup>[16]</sup>, 叶酸对FR- $\alpha$  (Kd ~ 0.1 nM)亲和力略高于FR- $\beta$  (Kd ~ 1 nM)<sup>[17]</sup>, 正常组织如造血组织及非上皮组织表达FR- $\beta$ , 一些髓细胞性白血病和胃癌高度表达FR- $\beta$ , FR- $\gamma/\gamma'$ 缺少修饰GPI羧基末端信号肽, 是一种分泌型蛋白<sup>[18]</sup>。鉴于许多恶性肿瘤细胞膜表面叶酸受体活性和数量显著高于正常细胞, 叶酸脂质体通过叶酸分子修饰脂质体所获得的主动受体型靶向脂质体, 在肿瘤靶向治疗中具有潜在应用价值。

叶酸化学结构上游离 $\gamma$ 羧基(FA- $\gamma$ -COOH)与游离叶酸(两羧基未衍生化, 处于游离状态)对叶酸受体具有相似的亲和力, 而FA- $\alpha$ -COOH羧基对叶酸受体几乎没有亲和力<sup>[19]</sup>。因此叶酸偶联物质中保留游离 $\gamma$ 羧基( $\gamma$ -COOH)以确保叶酸仍能够保持与其受体特异结合的活性。叶酸及其衍生物与膜表面叶酸受体结合, 富集在靶细胞膜特定区域, 该区域向胞浆内陷形成胞内体, 在酸性(pH5.0~5.5)胞内体中受体与配体分离, 受体返回细胞膜表面, 而内化的配体或被溶酶体降解, 或由此释放入胞液。

叶酸作为靶向治疗的导向试剂具有许多优点, 如: 水溶性的维生素、高度特异性亲和力 (Kd~ $10^{-10}$  M)、分子量小、更易浸润肿瘤部位、免疫原性低、可多次

给药、原料易得、成本低廉、偶联物制备简单、性能稳定、生理相容性好、易于储存、不被溶酶体破坏、可以通过内化和循环机制来提高转运效率、当叶酸摄入量受限时,肿瘤细胞摄取叶酸的能力要明显增强。国内外已有很多报道,利用叶酸与某些药物偶连,能够明显增强叶酸受体阳性细胞的药物摄取<sup>[20-22]</sup>。目前叶酸受体介导的肿瘤靶向治疗国内外已有相关研究<sup>[23-24]</sup>。但目前仍然处于细胞实验阶段,但其治疗策略在肿瘤靶向治疗中已显示出良好的临床应用前景。Robert J. Lee等<sup>[25]</sup>以二硬脂酰磷脂酰胆碱(distearoyl phosphatidylcholine;DSPC)、胆固醇(cholesterol)及FA-PEG-DSPE为主要原料制备的叶酸靶向脂质体,首次将叶酸与脂质体连接,获得叶酸柔红霉素脂质体,结果显示靶向柔红霉素脂质体对KB细胞的细胞毒性为非靶向脂质体药物的86倍,KB瘤细胞摄取靶向脂质体能力明显提高。Zhang<sup>[26]</sup>等制备的叶酸柔红霉素脂质体(主要材料为DSPC/cholesterol/FA-PEG-DSPE—56:40:0.1)对HeLa-IU1和Caco-2细胞2h杀伤效应分别为非靶向柔红霉素脂质体9.5、119.5倍。Robert J. Lee等<sup>[12]</sup>研究的叶酸靶向脂质体主要是以卵磷脂及脑磷脂为材料,类似细胞膜结构,其制备的叶酸靶向紫杉醇脂质体对KB细胞24h的杀伤效应是非靶向脂质体的3.8倍,但类细胞膜结构可能导致药物在细胞缓慢释放。Stephenson等<sup>[27]</sup>制备的叶酸柔红霉素脂质体显示对KB细胞的杀伤效应为非靶向脂质体偶联的柔红霉素的18倍。国内<sup>[28]</sup>报道的叶酸脂质体包裹钙黄绿素以FA-PEG-DSPE、胆固醇、卵黄磷脂酰胆碱(egg yolk phosphatidyl choline, EPC)以10:40:56配比,用成膜-水化结合冷冻-熔融超声法制备内含钙黄绿素叶酸-脂质体,用荧光显微镜结果显示HeLa细胞摄取叶酸-脂质体影响程度进入HeLa细胞量相对与非靶向脂质体4倍。体外研究证据已提示叶酸脂质体在肿瘤靶向治疗中的潜在应用价值<sup>[29]</sup>。体外试验证明<sup>[30、31]</sup>,叶酸-脂质体可与受体特异性结合,有效地将药物导入靶细胞,并显著提高药物作用效果。提示叶酸脂质体在肿瘤靶向治疗中的潜在应用价值。

本课题旨在探索叶酸-PEG-脑磷脂的合成方法并对产物进行高效液相色谱(high performance liquid chromatogram, HPLC)、红外光谱(infrared spectroscopy, IR)、磁共振氢谱(nuclear magnetic resonance- hydrogen spectra, <sup>1</sup>H-NMR)等鉴定;采用高压乳匀法,以硬脂酸、玉米油、卵磷脂、胆固醇、脑磷脂、紫杉醇等为材料按一定比例制备新型的叶酸靶向纳米紫杉醇脂质体(TAX-NLC-FA),并对其进行物理及生物学特性鉴定。生物材料要选择几种熔点不同的固、液混合脂质作基

质,可以避免脂质形成完整晶格而将内部的药物排挤出来,能够增加药物的载带,稳定紫杉醇纳米脂质体。

#### 4) 新型叶酸靶向紫杉醇纳米脂质体体内示踪实验示踪剂的制备

紫杉醇是一种二萜类化合物,化学结构特殊,到目前为止,国内外尚无以放射性碘的同位素直接标记紫杉醇的报道。目前文献报道的紫杉醇药代动力学资料大都是通过高效液相色谱检测<sup>[32~34]</sup>得到,工作量大,灵敏度相对低。以放射性同位素标记的紫杉醇作为示踪剂是研究紫杉醇相关制剂的一种较为简便的检测手段,可大大减轻高效液相色谱检测的繁琐,降低成本等。Deukjoon Kim等<sup>[35]</sup>用三甲基锡化的紫杉醇作为标记底物,将放射性核素<sup>123</sup>I替换三甲基锡基团,获得紫杉醇标记物,但方法烦琐,一般实验室无法进行,且标记率也只有63%~65%。Buchsbaum DJ<sup>[36]</sup>等以衍生化的紫杉醇3'-OH-PTXSX (3'-(4-Hydroxyphenyl)paclitaxel-2'-succinate)为底物,以Iodogen法引入<sup>125</sup>I得到<sup>125</sup>I-PTXSX (<sup>125</sup>I-3'-(4-Hydroxyphenyl)paclitaxel-2'-succinate, <sup>125</sup>I-3'-OH-PTXSX),其标记率为98.5%,标记率较高,但底物一般实验室难以获得。传统的一步氯胺T法标记紫杉醇,标记率低且不稳定,无法满足示踪实验的要求。本课题拟改进Ch-T标记法,先用稳定的NaI与紫杉醇作用,然后再以放射性Na<sup>125</sup>I标记紫杉醇,以期获得能够满足示踪实验要求的标记产物,从而为研制新的纳米化紫杉醇、开展体内药物分布与代谢动力学的研究,提供合格的示踪剂。

## 第一部分 叶酸-PEG (3350) -脑磷脂的合成及分析

### 1 材料与仪器

#### 1.1 仪器

多功能型时间分辨和稳态荧光光谱仪 (FLS920, EDINBURGH instruments, Scotland,UK); 恒温磁力搅拌器 (DF-II, 金坛市医疗仪器厂); 旋转蒸发器 (R-201, 上海申江机械厂); 高速离心机 (Allegra™ 64R Centrifuge, BECKMAN COULTERTM); 722型光栅分光光度计; Waters 2695 alliance®高效液相色谱仪, Waters 2487 紫外检测器, 自动进样器 (SM7, WATERS); 电子天平 (FA1004, 上海天平仪器厂); 超纯水系统 (Barnstead D8982-33, U.S.A); 红外光谱测定仪器 (VARIAN,FT-IR, 型号: Excalibur HE 3100);核磁共振谱仪 (型号:UNITY INOVA 400, 美国瓦里安公司); 冷冻干燥机 (FreeZone 6 Liter Benchtop Freeze Dry systems,Labconco); 线性离子阱质谱(QTRAP MS/MS Applied biosystem/MDS SCIEX,USA,三极四极杆串联线性离子)

#### 1.2 试剂与材料

叶酸 (Folic acid,Folate,FA,sigma,98.9%); 聚乙二醇二胺 ( $H_2N-PEG-NH_2$ , Sigma); 脑磷脂 (distearoylphosphatidylethanolamine,DSPE, Sigma); 丙酮 (AR); 甲醇 (Fisher,HPLC); 氯仿 (HPLC); 透析袋 (MW1000, 上海绿鸟科技发展有限公司); DMSO (GC, $H_2O < 0.005\%$ ); 三乙胺 (TEA, AR); 琥珀酸酐 (SUC,Sigma); 羟基琥珀酰亚胺 (NHS,FLuKa公司); 二环己基碳二亚胺 (DCC,FLuKa公司); 纤维素磷酸盐阳离子交换树脂 (CPCER,Sigma公司); 磷酸二氢钠 (AR); 磷酸氢二钠 (AR)

### 2 实验步骤

#### 2.1 FA-PEG-NH<sub>2</sub>合成

##### 2.1.1 FA与PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> N-酰化反应——顺序加样法

根据文献<sup>[12, 37]</sup> 稍作变动, FA 65.8mg,  $H_2N-PEG-NH_2$ 400mg、NHS 35mg、DCC 62mg、TEA 120 $\mu$ L (摩尔比例FA: PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>: DCC: NHS: TEA=(MR:1:0.8: 2:2:5)分别溶解在DMSO中, 依次顺序加入, 氮气保护, 黑暗状态下室温搅拌反应

24h, 50℃搅拌(500r/min)反应6h, 反应结束后减压蒸发去除三乙胺, 有机系滤膜(孔径: 0.45μm)过滤去除副产物DCU, 粗产品留样待HPLC检测。

纯化方法一: 粗产品用 50mM NaHCO<sub>3</sub> 2L清洗三次, 每次12h, 去除未反应的FA; 去离子水透析六次, 每次24h, 去除DMSO。获得的产品经低压冷冻干燥。粗产品重新溶解在去离子水中, 通过CPCER柱, 10mM的NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (PH8.0) 淋洗, 分段收集各组分, 去除未反应的H<sub>2</sub>N-PEG-NH<sub>2</sub>, 再37℃水浴搅拌蒸发去除NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 产品经低压冷冻干燥, 获得纯化的终产物。

纯化方法二: 根据Karen Vogel<sup>[38]</sup>等实验的纯化方法, 本实验以冷氯仿45mL加入混匀, 除去未反应的FA及副产物FA-PEG-FA, 旋转蒸发去除有机溶剂氯仿, 去离子水透析去除DMSO, 产品经过低压冷冻干燥。反应步骤如图1-1。但是因游离H<sub>2</sub>N-PEG-NH<sub>2</sub>溶于氯仿, 因此单纯用此方法并未除去过剩的H<sub>2</sub>N-PEG-NH<sub>2</sub>。

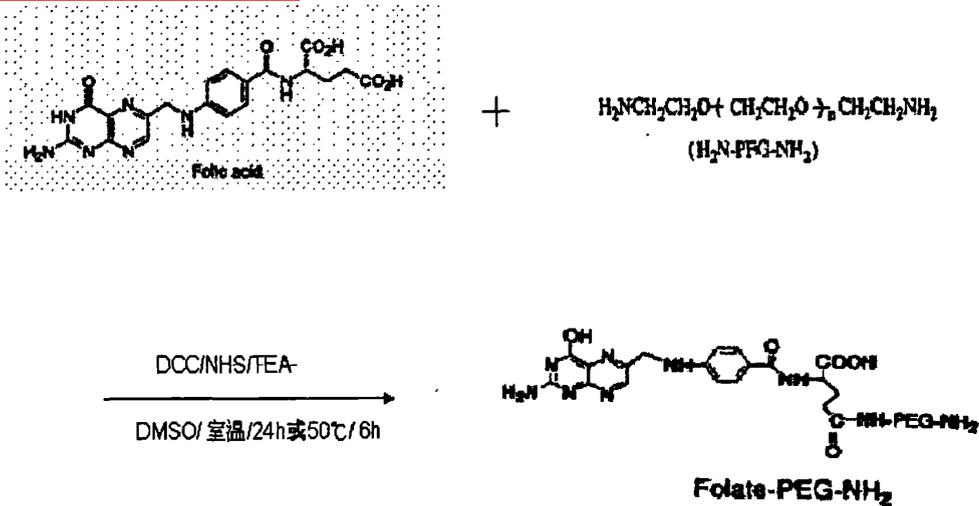


图 1-1 FA 与 PEG 二胺 N-酰化反应式(2.1.1 ——顺序加样法)

### 2.1.2 FA与PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N-酰化反应-----活化酯法

反应条件根据文献<sup>[39-43]</sup>, 稍作变动。主要为FA 100 mg, DCC 93 mg 和 NHS 52mg 溶解在 5mL 的 DMSO, 氮气流吹拂 10min, 黑暗状态下室温反应 18h, 离心去除副产物 DCU。30%除水丙酮/70%无水乙醚沉淀并清洗叶酸活化物质FA-NHS(取出部分沉淀物真空干燥后行红外光谱及磁共振氢谱检测)。沉淀物质重新溶解在 2mL DMSO 中。H<sub>2</sub>N-PEG-NH<sub>2</sub> 400mg 溶解在 2mL 的 DMSO 中, 120μL 的 TEA, 1.3 mL 的 FA-NHS 逐滴加入, 边加边搅拌, 氮气保护黑暗状态下反应 24h。减压蒸发去除 TEA, 有机系滤膜 (孔径: 0.45μm)过滤去除副产物 DCU, 粗产品留

样 HPLC 检测。冷氯仿 45mL 加入除去未反应的 FA 及副产物 FA-PEG-FA，旋转蒸发去除有机溶剂氯仿，去离子水透析去除 DMSO，产品低压冷冻干燥。反应步骤如图 1-2。

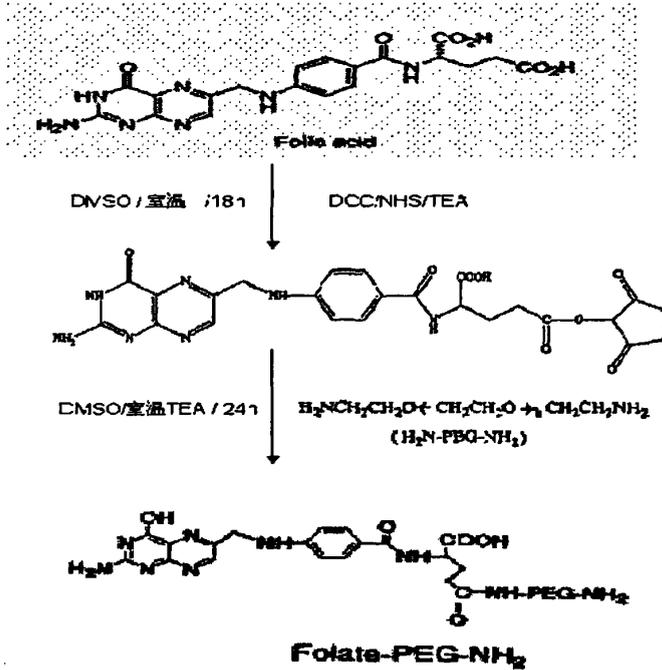


图 1-2 FA 与 PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> N-酰化反应化学式 (2.1.2——活化酯法)

### 2.1.3 FA与PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> N-酰化反应——草酰氯法

FA 65.8mg 溶解在 1mL 的 DMSO，加入 18uL(1.2 摩尔比例)的草酰氯，通入氮气，室温搅拌(500r/min)反应 2h，减压蒸发去除未反应的草酰氯，H<sub>2</sub>N-PEG-NH<sub>2</sub> 400mg 溶解于 2mL DMSO 中，FA 酰氯逐滴加入 PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 体系，边加边搅拌 (500r/min)，加入过量 TEA50μL，氮气保护，黑暗状态下室温反应 3h，反应结束后减压蒸发去除 TEA (粗产品以去离子水为稀释剂，作 HPLC 检测)。冷氯仿 45mL 加入除去未反应的 FA 及副产物 FA-PEG-FA，旋转蒸发去除有机溶剂氯仿，去离子水透析去除 DMSO，产品低压冷冻干燥。反应步骤如图 1-3。

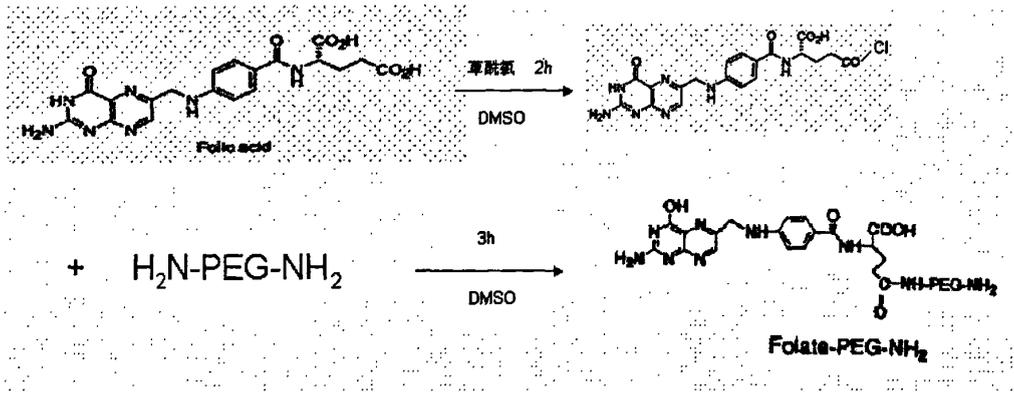


图 1-3 FA 与 PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> N-酰化反应化学式 (2.1.3——草酰氯法)

### 2.1.4 高效液相色谱 (HPLC) 检测FA-PEG-NH<sub>2</sub>条件

色谱柱:GPC-1000 (4.6\*250mm, 5μm) Fuji, Silysia; 流动相: 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0)与甲醇梯度淋洗; 柱温: 30℃; 流速: 1mL/min; 检测波长(?): 363nm/254nm

### 2.1.5 红外光谱 (Infraed ) 检测

池窗材料: KBr ; 红外光谱能量: 40 mW; 波数范围 ( $\bar{\nu}$ ): 400-4000cm<sup>-1</sup>

### 2.1.6 磁共振检测

频率: 400MHZ; 溶剂: 氘代 DMSO(d<sub>6</sub>-DMSO); 扫描范围 (d) : 0-13ppm

## 2.2 琥珀酸酐与脑磷脂的连接 (SUC-DSPE) 及鉴定方法

### 2.2.1 琥珀酸酐与脑磷脂的连接

根据文献<sup>[25]</sup> 稍作调整, 2.5mL的CHCl<sub>3</sub>溶解50mg DSPE, 0.5mL DMSO溶解15mg琥珀酸酐后, 逐滴加入前一体系, 加入50μL TEA 或10 μL吡啶, 500r/min搅拌室温下搅拌反应24小时, 反应结束时减压蒸发去除TEA与氯仿, 残留少许液体, 45mL无水冷丙酮沉淀析出产物, 20 000g离心15min, 弃上清, 冷丙酮继续清洗沉淀3次。真空干燥, 产物重新溶解在氯仿中, -20℃储存, 留样待行HPLC及质谱检测鉴定。反应式如图1-4。

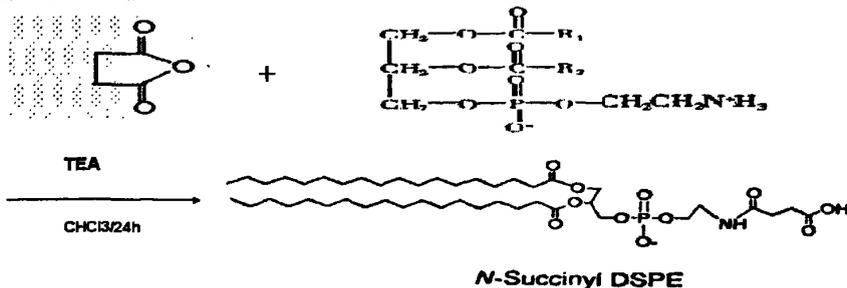


图 1-4 SUC与DSPE N-酰胺反应化学式(2.2.1)

### 2.2.2 HPLC检测产物色谱条件

色谱柱: C18(4.6×150mm, 5 $\mu$ m, waters symmetry); 流动相: 10 mM磷酸钠 / 甲醇=8/92 (体积比); 流速: 1mL/min; 进样: 10 $\mu$ L; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 254nm

### 2.2.3 LC-MS 质谱鉴定产物条件

进样方式:直接进样; 电喷雾电压: -4200V(负离子模式, EMS-); 去簇电压(Declustering potential, DP): 80.0V; 加热温度: 250 $^{\circ}$ C; 质量扫描范围: 500-1000(m/z)

## 2.3 FA-PEG- DSPE 连接及鉴定

### 2.3.1 FA-PEG- DSPE连接

将纯化后低压冷冻干燥的SUC-DSPE重新溶解在3mL的CHCl<sub>3</sub>中, 在室温下与26mg DCC反应4h活化羧基, 取 250mg FA-PEG-NH<sub>2</sub>溶解在2mL的CHCl<sub>3</sub>中后转入上面的反应体系中, 加入TEA 20 $\mu$ L。室温整夜搅拌反应24h, 旋转蒸发器减压蒸发去除混合物中的溶剂氯仿与TEA, 冷丙酮沉淀并清洗产物。产物真空干燥后待<sup>1</sup>H-NMR检测。化学反应式如图1-5。

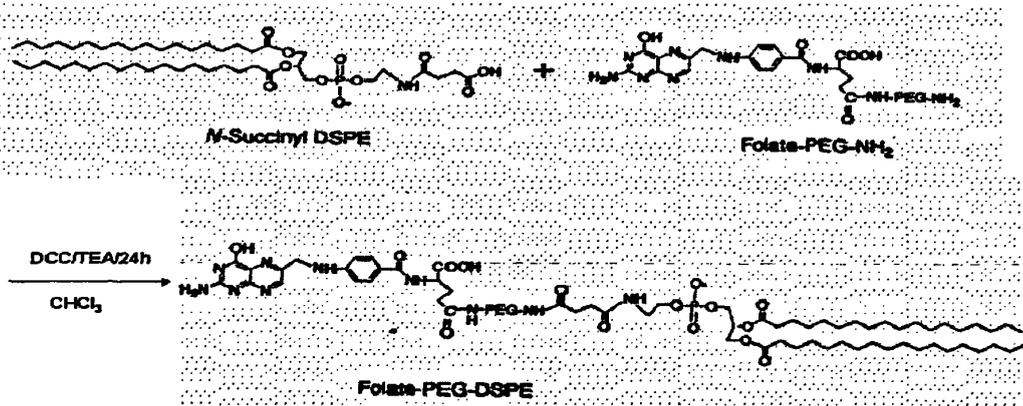


图 1-5 FA-PEG与SUC-DSPE N-酰胺反应化学式

### 2.3.2 FA-PEG- DSPE终产物磁共振鉴定条件

频率: 400MHZ; 溶剂: 氘代氯仿 (d<sub>1</sub>-CHCl<sub>3</sub>); 扫描位移 ( $\delta$ ): 0-13ppm

## 3 统计学分析: 统计学检验采用SPSS 13.0 作统计分析

## 4 结果

### 4.1 FA活化酯的鉴定

#### 4.1.1 FA活化酯红外光谱鉴定

图1-6为FA-NHS活化产物的红外光谱分析的结果, 在红外光谱图上,

$1607.4\text{cm}^{-1}$ 为叶酸上苯环所特有的吸收峰， $1737.3\text{cm}^{-1}$ 为羟基琥珀酰亚胺的特征吸收峰，由此可知，FA与NHS生成了所需的FA活化酯。

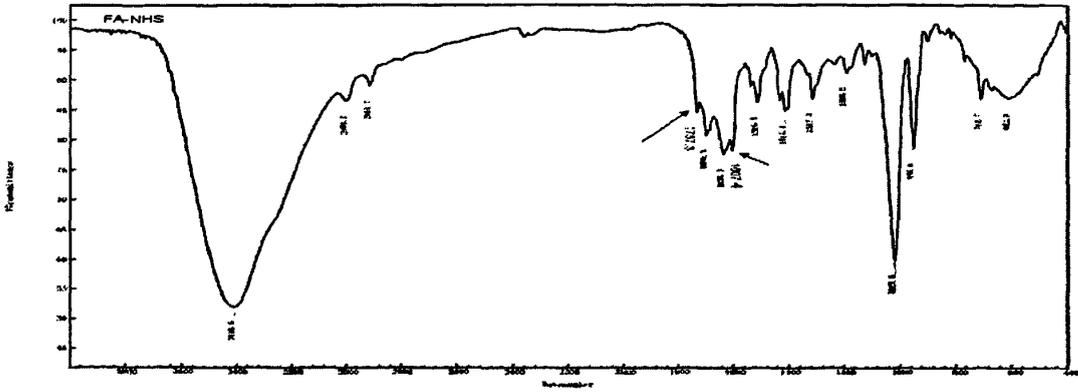


图1-6: 为FA-NHS活化产物的红外光谱

注：红箭头所示  $1607.4\text{cm}^{-1}$  为叶酸上苯环结构特征吸收峰

蓝箭头所示  $1737.3\text{cm}^{-1}$  为羟基琥珀酰亚胺特征吸收峰

#### 4.1.2 FA活化酯磁共振谱分析

图 1-7 为 FA-NHS 活化产物的磁共振氢谱分析的结果，以  $\text{d}_6\text{-DMSO}$  为溶剂，与叶酸相比，FA-DCC 在 2.72ppm 出现氢峰，为 DCC 的碳二亚胺所有，FA-NHS 2.82ppm 氢峰为 NHS 氢的位移点，由此可知，叶酸与 DCC 可以形成活化酯 FA-DCC，进而可与 NHS 生成活性较强的 FA-NHS 活化酯。

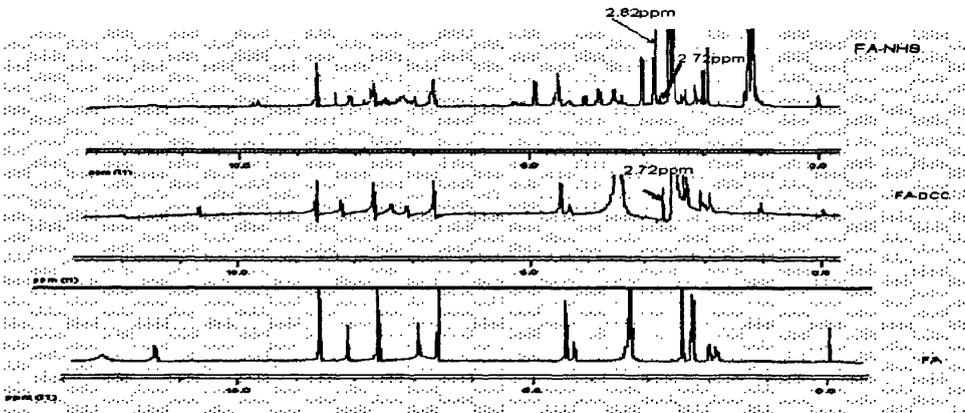


图1-7: FA-NHS活化产物的磁共振氢谱

注：黑色箭头所示的 2.72ppm 为 DCC 所产生的氢位移峰

红色箭头所示的 2.82ppm 为 NHS 所产生的氢位移峰

4.2 FA-PEG-NH<sub>2</sub>的鉴定

4.2.1 FA-PEG-NH<sub>2</sub>的 HPLC 鉴定

4.2.1.1 FA 定性分析, 标准曲线制备

叶酸 10mg, 以 DMSO 为溶剂配制母液 10mg/mL, 以去离子水系列稀释 6 个终浓度点分别为: 100, 500、1000、2500、5000、10000ng/mL, 作为标准曲线的 6 个点。表 1-1 为 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 进行 HPLC 分析时的流动相与梯度洗脱时间表。图 1-8 为叶酸的 HPLC 色谱图, FA 保留时间 (Retention time, RT): 2.368min。FA 标准曲线如图 1-9, 标准曲线相关性良好, 250、1500、5000 ng/mL 三种浓度日内变异分别为: 3.82%、1.31%、0.78% , 日间变异分别为: 4.62%、1.36%、1.34% , 精密度良好。

表 1-1 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 梯度洗脱时间表( the time of gradient)

梯度	时间 min	流量 mL·min <sup>-1</sup>	%(磷酸钠缓冲液)	%(甲醇)
1	0	1	1	99
2	3	1	1	99
3	3.5	1	100	0
4	6	1	1	99
5	10	1	1	99

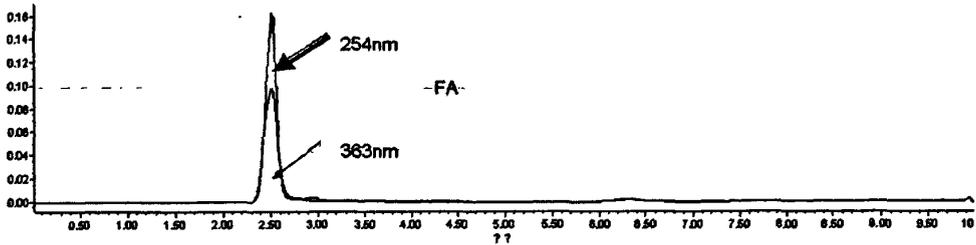


图 1-8 FA 的 GPC-HPLC 在 363/254nm 通道色谱图 RT:2.368min

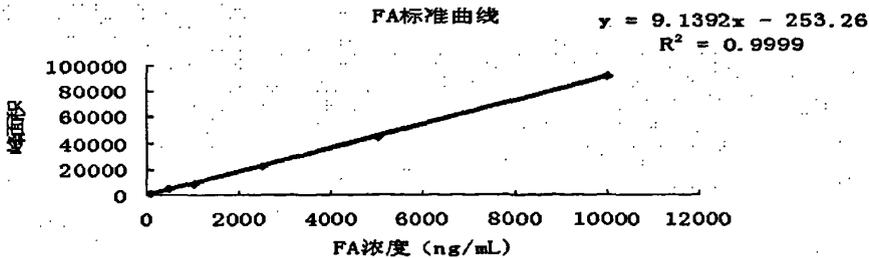
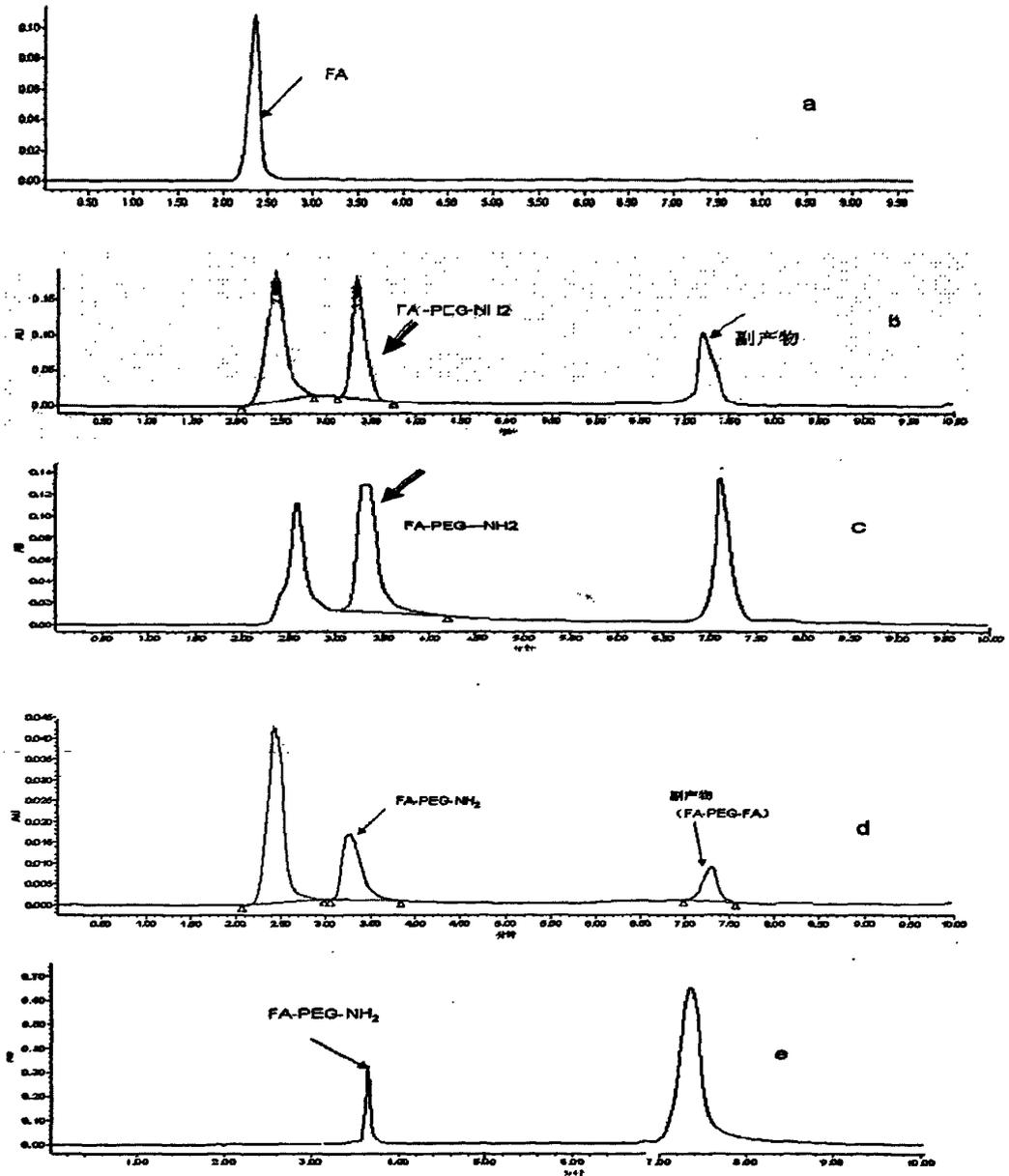


图 1-9 FA 的标准曲线(GPC-HPLC)

4.2.1.2 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 粗产品的 HPLC 色谱分析

如图 1-10 显示各种方法所得 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 粗产品 HPLC 色谱( $\lambda=363\text{nm}$ ), FA-PEG-NH<sub>2</sub> 的 RT: 3.340min, 副产物(主要为 FA-PEG-FA)的 RT: 7.371min.



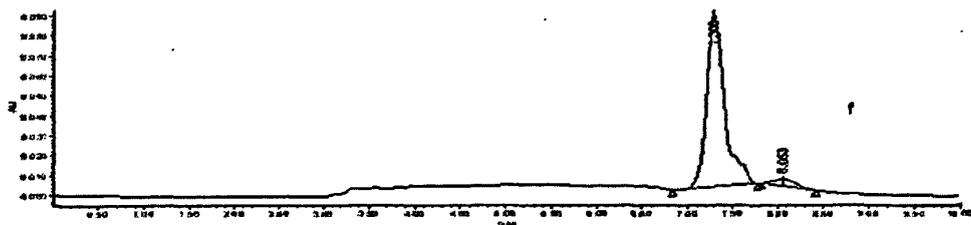


图 1-10 不同方法下 FA 与 PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N-酰化反应粗产物的 HPLC 色谱图

注：a 为单纯 FA 的 GPC-HPLC 色谱图

b 为顺序加样法室温所得粗产品的 GPC-HPLC 色谱图

c 为顺序加样法 50℃ 反应条件下所得粗产品的 GPC-HPLC 色谱图

d 为活化酯法所得粗产品的 GPC-HPLC 色谱图

e 为草酰氯法所得粗产品的 GPC-HPLC 色谱图

f 为过量草酰氯活化条件下所得粗产品的 GPC-HPLC 色谱图

表 1-2 FA-PEG-NH<sub>2</sub>/副产物反应产率 (% ,  $\bar{x} \pm s$ , n>3)

反应方式	连接比率	
	FA-PEG-NH <sub>2</sub>	副产物
顺序加样法常温反应 24h	30.63±1.28	23.50±1.16
顺序加样法 50℃ 反应 6h	36.98±1.65	33.49±1.21
活化酯法	25.01 ±1.85	17.35±1.45
草酰氯法	8.22±1.47	91.78±1.47

以 FA 为标准，通过峰面积计算各种不同反应条件下 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 连接比率，如表 1-2 所示。统计学检验显示顺序加样常温反应 24h 与 50℃ 反应 6h 条件相比 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 连接比率具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )，但后者的副产物比率较高；FA 活化酯法相比与前两者相比，FA-PEG-NH<sub>2</sub> 连接比率有统计学差异 ( $P < 0.05$ )，副产物亦有统计学差异 ( $P < 0.05$ )，FA 活化酯法所得产物连接比率低；草酰氯法所得产物 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 连接比率最低，但副产物产率较高，草酰氯法作为 FA 与 PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N-酰化反应不可取。

顺序加样常温反应 24h 透析后所得粗产品冻干后称重约 330mg，经 CPCER 过柱后收集产物冻干后约 75 mg，终产物产率约 16%；顺序加样常温反应 24h 粗产品经氯仿纯化的产物约 210 mg；50℃ 反应 6h 条件下经氯仿纯化后约 190mg；FA 活

化酯法经氯仿纯化后的产物约 225 mg; 草酰氯方法所得产物经收集未见明显产物。

### 4.2.1.3 纯化后的FA-PEG-NH<sub>2</sub>的 HPLC分析

#### 4.2.1.3.1 透析后所得产物的HPLC色谱图

顺序加样常温条件下产物未透析产物所示FA所占比例约46.5%，FA-PEG-NH<sub>2</sub>所占比例约31.6%，副产物约22%；经透析后所得产物显示：游离FA仍有32.8%，FA-PEG-NH<sub>2</sub>比例约为41.8%，副产物约25.4%。可见透析后游离FA去除效果不好，而相关文献并未提示透析效果，本实验中发现经透析后游离FA去除效果不理想。

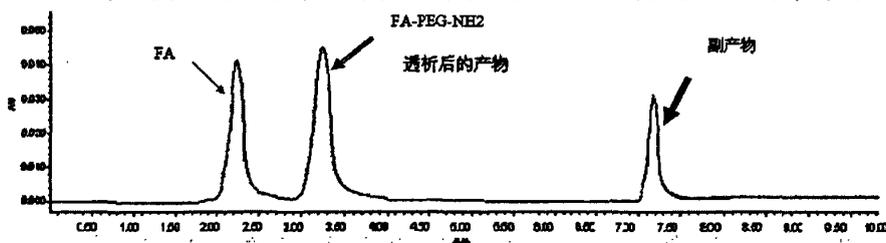


图1-11 顺序加样常温条件下粗产物透析后的HPLC色谱图

#### 4.2.1.3.2 氯仿纯化法所得产物的HPLC色谱图

顺序加样常温条件下的粗产品经氯仿纯化后所得产物的HPLC产品峰所占比例约为75%，游离FA仍有5%，副产物约20%。氯仿纯化后的废弃沉淀物质的HPLC分析显示，游离FA占沉淀物质的比例约63%，副产物比例约33%,FA-PEG-NH<sub>2</sub>约为4%。

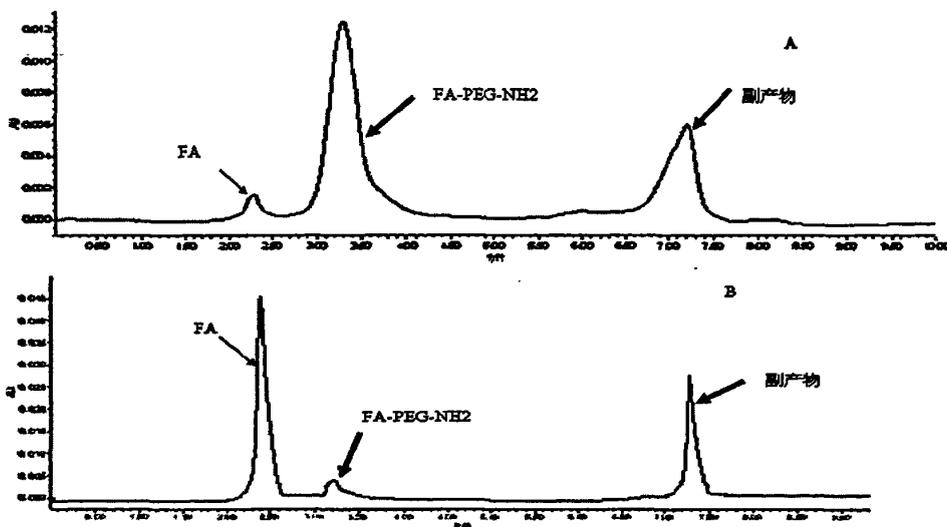


图1-12 氯仿纯化法所得产品/沉淀物质的HPLC色谱图

注：A图为氯仿纯化后的产物的GPC-HPLC

B图为氯仿纯化后的废弃沉淀物质的GPC-HPLC

#### 4.2.2 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 红外光谱 (IR) 分析

##### 4.2.2.1 纯化后的产物 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 红外光谱 (IR) 分析

图 1-13 是纯化后产物 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 的红外光谱 (IR) 图, 由图可见, 相比 PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 的红外光谱图 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 的红外图上出现苯环的特征峰(1607.4 cm<sup>-1</sup>), 显示成功制备了 FA-PEG-NH<sub>2</sub>, 但由透析后产品的 HPLC 色谱图可知, 纯化后的产品内仍含有少量的 FA, 因此此 IR 图谱不能证实产物确已连接。

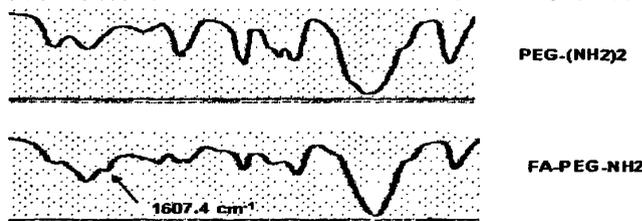


图 1-13 纯化后的产物 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 红外光谱图

##### 4.2.2.2 HPLC收集RT为3.340min峰的红外光谱分析

图 1-13 是收集 RT 为 3.340 min、经过 HPLC 纯化后的产物 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 的红外光谱 (IR) 图, 由图可见, 相比 PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 的红外光谱图 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 的红外图上出现苯环的特征峰(1607.4 cm<sup>-1</sup>), 显示成功制备了 FA-PEG-NH<sub>2</sub>。

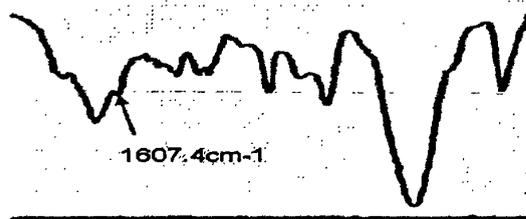


图 1-14 HPLC 纯化后的产物 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 红外光谱图

#### 4.2.3 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)分析

图 1-14 是通过 HPLC 纯化收集 RT 为 3.340 min 的产品峰行 <sup>1</sup>H-NMR 检测, 6.0-9.0ppm 之间为叶酸苯环结构上氢峰, 3.56-3.75ppm 为聚氧乙烯氢峰, 两者的存在说明产物结构中有 FA 及聚氧乙烯的存在, 说明成功制备了理论上所需的产物。

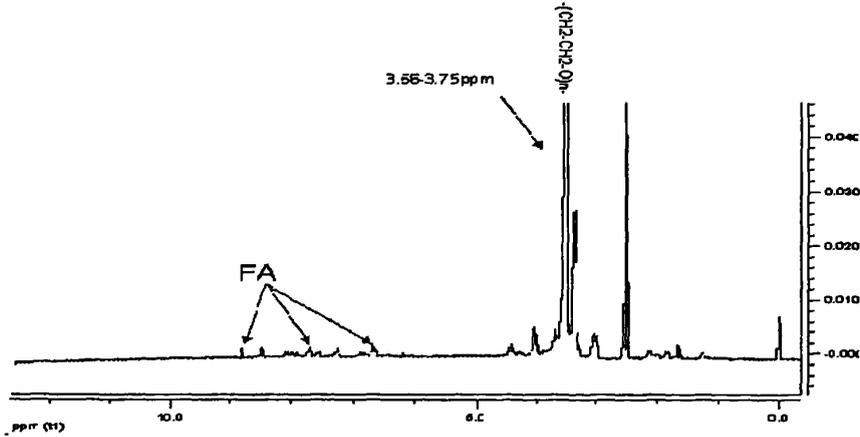


图1-15 FA-PEG-NH<sub>2</sub>的<sup>1</sup>H-NMR谱图

注：3.56-3.75ppm处箭头所示为聚氧乙烯片段中的氢位移峰

6.9-9.0ppm处三个箭头所示为FA苯环中的氢位移峰

### 4.3 SUC-DSPE鉴定

#### 4.3.1 SUC-DSPE的HPLC分析

如图 1-16：单纯 DSPE 的 RT 为 1.997min，SUC-DSPE 的 RT 为 1.663min，根据峰面积计算得到 DSPE 与 SUC 连接占总加入 DSPE 的比例约 90.9%±1.03% (n=3)。

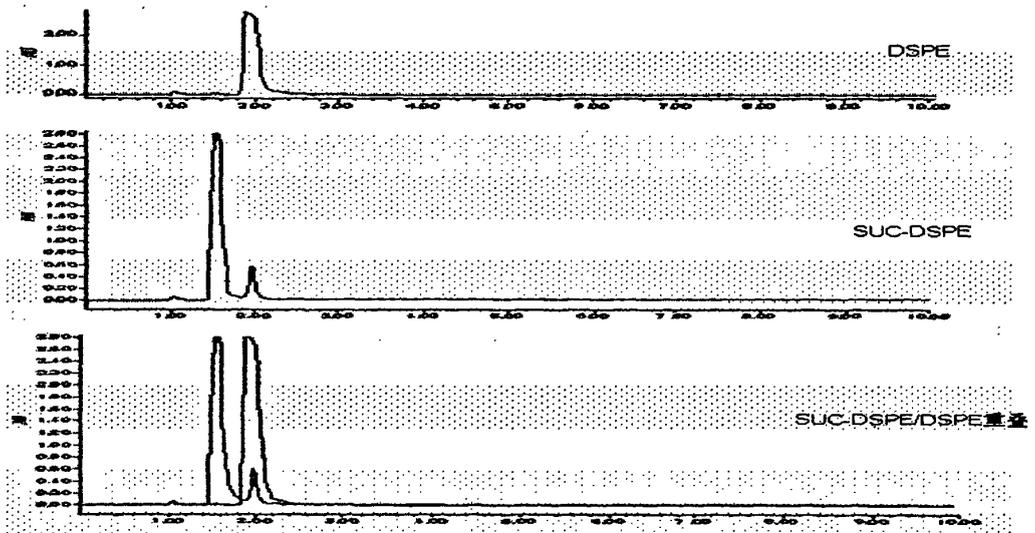


图1-16 SUC-DSPE/DSPE 高效液相色谱图

注：黑色线条色谱图为单纯游离的脑磷脂的 HPLC 色谱图

蓝色线条色谱图为合成产物 SUC-DSPE 的 HPLC 色谱图

### 4.3.2 SUC-DSPE 质谱分析

负离子质谱扫描 DSPE 和 SUC-DSPE，溶剂：甲醇（色谱级），质谱结果如图示：DSPE 经 EMS 负离子扫描，746.6 分子峰为 DSPE ( $M_{DSPE}-[H^+]=747.6-1$ )，SUC-DSPE 经 EMS 负离子扫描，与 746.6 峰相对应，出现分子峰 846.6 为产物 SUC-DSPE ( $M_{SUC-DSPE}-[H^+]=M_{DSPE} + M_{SUC} - 1 = 747.6+100-1=846.6$ )。收集产物真空干燥后精密称量约为 33mg，根据 HPLC 检测所得 DSPE 与 SUC 连接比例约 91%，计算终产率约 61%。

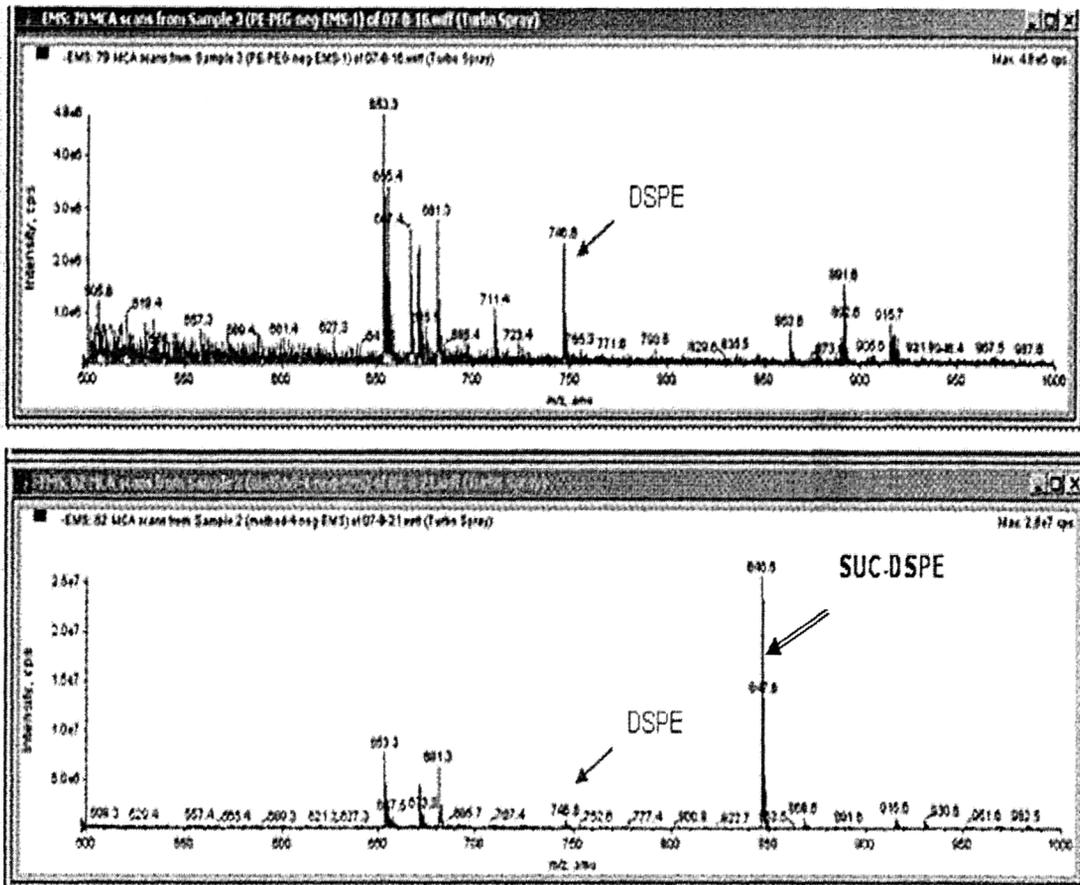


图 1-17 DSPE/SUC-DSPE 负离子质谱扫描图

注：粉红色箭头所示为 DSPE 的峰位

蓝色箭头所示为 SUC-DSPE 的峰位

### 4.4 FA-PEG- DSPE的磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)结果

FA-PEG- DSPE 粗产品经丙酮沉淀（去除未反应的 FA-PEG-NH<sub>2</sub>），真空干燥后溶解于氘代氯仿（CD<sub>3</sub>Cl），由图 1-18 显示 6.0-9.0ppm 之间为叶酸苯环氢峰，3.56-3.75ppm 为聚氧乙烯氢峰，1.22ppm 为亚甲基峰，三者的存在表明

FA-PEG-DSPE 终产物的合成。终产品真空干燥后精密称量约 46mg, 终产率约 19%。

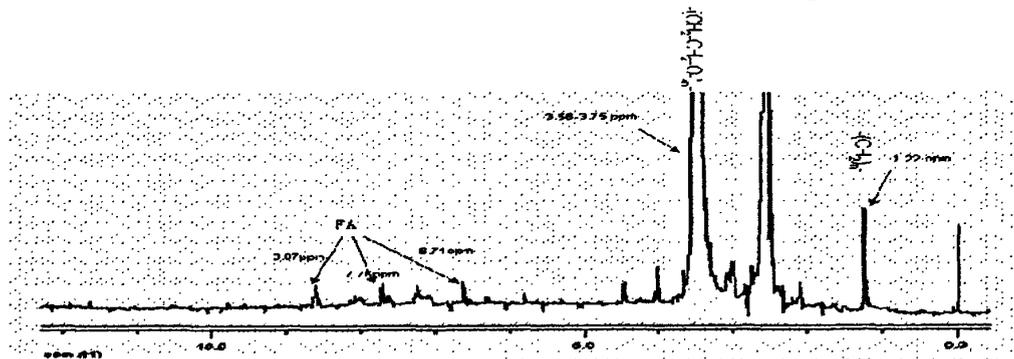


图 1-18 FA-PEG-DSPE 的磁共振氢谱( $^1\text{H-NMR}$ )

注：黑色箭头所示为 FA 结构上氢峰；蓝色箭头所示为 PEG 结构中乙烯氧片段中氢峰；

红色箭头所示为 DSPE 中亚甲基的氢峰

## 5 讨论

有关 FA 与 PEG-( $\text{NH}_2$ )<sub>2</sub> 的连接文献多是采用室温顺序加样反应，但是有关每一步骤所得产物的连接比例、产率及其鉴定并无详细报道。本实验中采用四种方法，比较不同合成方法对连接比例、产率的影响，并对主要产物行 HPLC、IR、 $^1\text{H-NMR}$ 、EMS (-) 等鉴定。

FA 活化酯法可去除过剩的 DCC/NHS，不需要加水使 DCC 转变为 DCU 后再除去，简化 DCC 清除步骤，但 FA 活化酯法在 FA-NHS 中间产物纯化中需要 30% 无水丙酮/70% 无水乙醚，无水条件要求严格，操作较为复杂，受本实验室条件限制且产率较低，FA 活化酯法非最佳的选择。

草酰氯化的 FA 活性极强，基本上 FA 全部形成酰氯（此点可从产物的 HPLC 色谱图无游离 FA 峰得以证实），得到的产物亦较少，而副产物占极大部分。实验当中也发现加入冷氯仿沉淀副产物及未反应的 FA 时大部分被沉淀下来，而根据 HPLC 反应的粗产品（未经氯仿纯化）可看出，基本上无游离 FA 的存在，说明沉淀物质基本为副产物，上清经减压蒸发后残留物用水溶解，透析去除 DMSO 后冻干，基本收集不到产物，产率极低。草酰氯法不可取还有其他因素如：草酰氯活性太强，FA- $\gamma$ -COOH 和 FA- $\alpha$ -COOH 两羧基基本上无选择性的被酰氯化，这样难以保留所需要的 FA- $\gamma$ -COOH，失去对其受体的靶向作用；另一方面，草酰氯加入体系后短时间产生大量热量，易爆炸，因此一般要在冰浴中反应，待充分接触

后方可室温反应，而 DMSO 在 18℃ 以上处于液体状态，难以在冰浴条件下反应，因此操作时保持良好通风，滴速慢，但草酰氯体系容易受环境影响，应避氧，造成操作困难；FA 作为生物样品应使用温和的活化剂，以保持 FA 的活性，满足实验的需求。综上因素，草酰氯法活化 FA 不适作为 N-酰化反应的活化剂，因此此方法不可取。

顺序加样 50℃ 反应条件下，反应产率较高，但副产物相对也较高，经氯仿纯化后的产率约有 45%（内含过剩的 PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>，FA-PEG-NH<sub>2</sub> 的含量可以根据叶酸标准曲线定量，经 HPLC 检测显示 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 的含量约占总产率分量的 35% 左右）。顺序加样室温反应条件下副产物相对高温条件下降低，产率相对略低，但此反应条件温和，操作简单，此条件作为首选。其次为 50℃ 反应体系。根据以上情况，本实验选择室温顺序加样反应。

SUC 与 DSPE 的反应程序中，发现根据文献方法无法实现两者的酰胺连接。根据文献提示条件是以单纯氯仿为溶剂，加入少量 TEA/吡啶催化反应 24h，负离子质谱鉴定并无 SUC-DSPE 的生成。实验中发现，加入氯仿后 SUC 基本保持结晶状态，至 24h 仍未见明显溶解，考虑为 SUC 不溶解的缘故，补加整个体系 1/6 体积的 DMSO 或 1/6 体积的 DMSO 溶解 SUC 后转入 DSPE 的氯仿体系，反应 24h，经负离子质谱鉴定生成理论所需产物，实验当中分别以 TEA、吡啶为催化剂，SUC-DSPE 连接比率无明显变化。

终产物 FA-PEG-DSPE 反应产率较低，经丙酮沉淀清洗后，磁共振氢谱证实成功了 FA-PEG-DSPE。FA 与 PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 室温顺序加样 N-酰化反应实验中考虑即使 PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 过剩，与下一步骤中的反应物 SUC-DSPE 会生成 PEG-DSPE 不会影响药物的靶向性，反而掺入部分 PEG-DSPE 能够增加药物的水化膜，延长药物的半排期，更多的药物的能够有较多时间富集于肿瘤组织，脂质体中掺入 PEG-DSPE 不会影响药物的靶向性<sup>[12, 39, 45]</sup>，PEG-DSPE 化的脂质体亦可增加脂质体药物的血液循环时间，增加药物半衰期，故本实验最后采用省略去除过剩 PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 步骤以简化反应条件，反应最终产物中有 PEG-DSPE 及 FA-PEG-DSPE。

## 6 结论

顺序加样法合成 FA-PEG-NH<sub>2</sub>，方法简单，连接比例约 31%，产率约 16%，产率较低；但 FA-PEG-NH<sub>2</sub> 液相色谱条件适合，分离度较好。SUC 与 DSPE 室温 N-酰胺反应连接比例约 91%，产率约 61%；最后的 FA-PEG-DSPE 终产物产率约 19%；总体产率约 2%，产率低。

## 第二部分 叶酸靶向紫杉醇纳米脂质体的制备及其对 KB 细胞的杀伤效应

### 1 主要仪器及试剂

高压微射流设备 (110S, NEWTON, MASSACHUSETTS, USA); 粒径分析仪 (HPPS5001, MALVERN, UK); 超声波细胞粉碎机 (JY92-2D, Ningbo Scientz Biotechnology Co., LTD); 恒温磁力搅拌器 (DF-II, 金坛市医疗仪器厂); 旋转蒸发器 (R-201, 上海申江机械厂); 电子天平 (FA1004, 上海天平仪器厂); 超纯水系统 (Barnstead D8982-33, U.S.A); HERA CO<sub>2</sub> 培养箱(德国 Kedro)

紫杉醇 (99.5%标准品, 批号 03090.D, 四川朝汇生物科技有限公司); 硬脂酸 (AR, 批号 030423, 中国菱湖精细化工厂·浙江); 胆固醇 (沪试 AR, 批号 F20030410); 卵磷脂 (AR, 批号 20030305, 中国医药集团上海化学试剂公司); 玉米油 (Sigma, 德国); 吐温-80 (E.M.K 进口分装, 上海化学试剂采购站); 无水乙醇 (AR); 去离子水; 无叶酸 1640 培养基 (GIBCO 公司); 小牛血清 (GIBCO 公司); 叶酸 (Folate, Folic acid, FA, sigma); KB 细胞(中科院上海细胞库)

### 2 叶酸靶向紫杉醇纳米脂质体的制备

精密称取紫杉醇 25mg, 硬脂酸 500mg, 胆固醇 125mg, 卵磷脂 250mg, 玉米油 300mg, 溶解于无水乙醇, 磁力搅拌器搅拌加热至 70℃使其溶解并充分混匀, 1 h 后保持温度, 去除有机溶剂即得药物脂质混和膜。375mg 吐温-80 与 35mL 去离子水混匀, 叶酸-PEG-DSPE 30mg (溶解于氯仿) 旋转蒸发去除有机溶剂氯仿后用吐温水溶液溶解混匀, 保持温度, 缓慢滴加药物脂质混和膜进入吐温水相, 边加边搅拌, 加完后续搅 2 h, 快速冷却到室温, 即得叶酸靶向紫杉醇纳米脂质体 (TAX-NLC-FA) 初乳。在进口压 60psi (96MPa) 下高压乳匀 6 个循环, 迅速冷却后得到所需 TAX-NLC-FA 产品, 粒径测定仪测定所得产品粒径及其分布。

### 3 平均粒径及其分布的测定方法及条件

TAX-NLC-FA 的水分散液以去离子水稀释 20 倍, 用激光散射粒度分析仪测定纳米粒的平均粒径和分布, 测试角: 173°, 测试温度: 25℃, 其中平均粒径采用数量分布 (Number distribution) 的结果, 多分散性指数 (Polydispersity Index, PDI)

采用单峰分布(Unimodal distribution)的结果。

#### 4 MTT 细胞生长抑制试验检测 TAX-NLC-FA 对 KB 细胞生长抑制效应

##### 4.1 细胞准备

人口腔上皮癌 KB 细胞系购于中科院上海细胞库。KB 细胞用 15%小牛血清的无叶酸 RPMI-1640 培养七天, 培养箱 CO<sub>2</sub> 浓度 5%, 温度 37℃。

##### 4.2 MTT 法检测细胞的抑制率

将  $2 \times 10^5$ /mL 的 KB 细胞接种于 96 孔板中, 设置 6 个复孔, 每孔终体积为 90 $\mu$ L。37℃培养 24 小时后, 每孔分别加入 TAX-NLC-FA、TAX-NLC 各 10 $\mu$ L, 使其终浓度分别为 1, 10, 100, 1000, 10000 nmol/L, 空白对照加入 10 $\mu$ L 的无血清 1640 培养基, 37℃培养 3 小时后除去药物, PBS 200 $\mu$ L 洗涤 2 次, 加入 100 $\mu$ L 培养基继续 37℃培养 24h, 上机测试前四小时加入 10 $\mu$ L MTT (5mg/mL), 上机前吸去上清液, 加入 100 $\mu$ L DMSO, 轻微震荡 10min, 直至沉淀完全溶解, 用 570nm/630nm 处波长测各孔吸光值。每组重复 3 次。不同浓度下 TAX-NLC-FA 与 TAX-NLC 对 KB 细胞的抑制率 = (1 - 剂量组 OD 值 / 对照组 OD 值)  $\times$  100%。

## 5 结果

### 5.1 TAX-NLC-FA 平均粒径及其分布结果

由图 2-1 可知, TAX-NLC-FA 脂质体粒子平均粒径在 134nm 左右, 图 2-1 所示脂质粒径为 127nm, 分布宽度 15.64nm, 从粒径分布图来看, 小粒径的占主要部分 (99%), 仍有小部分 (约占 1%) 大颗粒存在。说明所合成 TAX-NLC-FA 粒子粒径主要分布在小粒径范围内。多分散性指数(Polydispersity Index, PDI)为 0.085, 表明所合成纳米脂质体稳定性较好。经统计 TAX-NLC-FA (134 nm $\pm$ 18 nm) 与刘敏<sup>[46]</sup>所得的非靶向紫杉醇纳米脂质体(TAX-NLC) (66 $\pm$ 6 nm) 相比较, 考虑为体系中引入大分物质 PEG(MW  $\sim$ 3350)而增加了脂质药物的粒径。

Z-Average size (nm): 823.8      Peak 1 Mean: 127.4      % (Number): 99      Width: 15.84  
 Polydispersity Index: 0.085      Peak 2 Mean: 0      % (Number): 0      Width: 0  
    Peak 3 Mean: 0      % (Number): 0      Width: 0

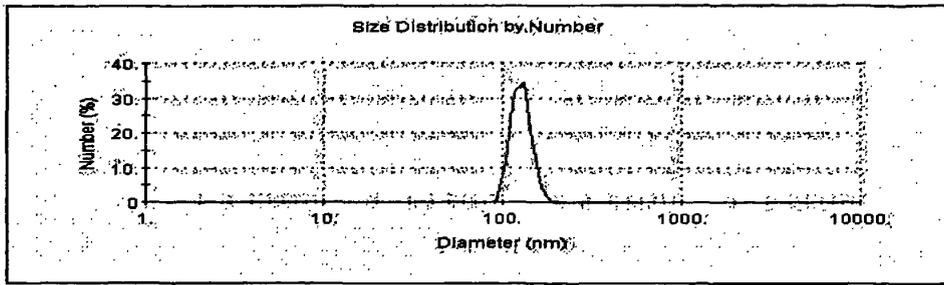


图 2-1 FA-NLC-TAX 粒径分布图

5.2 TAX-NLC-FA 对 KB 细胞 MTT 结果

在药物与细胞培养作用 3 小时后，洗去多余的药物，继续培养 24 小时，MTT 法观察其对 KB 细胞生长抑制作用。由图 2-2 看出，TAX-NLC-FA 对 KB 细胞的杀伤效应在 1-100nm/L 低浓度范围内与 TAX-NLC 相差较明显，高浓度范围两者虽有差异，但差异不显著。TAX-NLC-FA 的 IC<sub>50</sub> 为 95.27nm/L，TAX-NLC 的 IC<sub>50</sub> 为 543.18nm/L，TAX-NLC-FA 对 KB 细胞 24h 的毒性约为 TAX-NLC 的 6 倍。

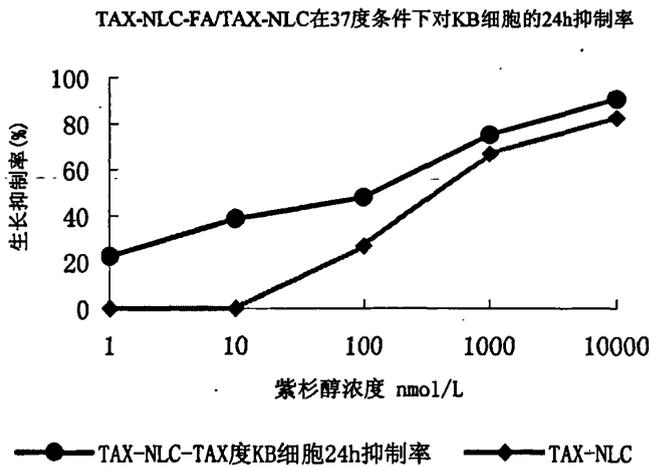


图 2-2 TAX-NLC-FA/ TAX-NLC 在 37℃条件下对 KB 细胞的 24h 生长抑制曲线

讨论：紫杉醇是从红豆杉中提取出的具有高效抗肿瘤功能的天然药物，是目前临床一线化疗药物。紫杉醇水溶性差，临床应用中以聚氧乙稀蓖麻油和乙醇 (V: V=1: 1) 为溶剂，而聚氧乙稀蓖麻油是导致临床用药出现过敏反应的主要原因，因此临床应用受限。脂质体作为载体具有许多优点，脂质体的应用可以解决紫杉醇的溶解性问题；提高了紫杉醇在溶液中的稳定性；避免过敏反应而不影响抗肿

瘤活性；减少患者对紫杉醇的耐药性；提高机体对紫杉醇的耐受性，有可能增加给药剂量，进而提高疗效；缩短滴注时间，使用方便；脂质体作为载体进入体内被生物降解，不会在体内积累，免疫原性小、无毒，具有良好的生物性相容性，脂质体作为载体是一个理想的选择。

本实验以紫杉醇，硬脂酸，胆固醇，卵磷脂，玉米油为材料，溶解并充分混匀，去除有机溶剂即得药物脂质混和膜；FA-PEG-DSPE 30mg（溶解于氯仿）旋转蒸发去除有机溶剂氯仿后用吐温水溶液溶解混匀，保持温度；缓慢滴加药物脂质混和膜进入吐温水相（含 FA-PEG-DSPE），搅拌 2 h，快速冷却到室温，在进口压 60psi (96MPa) 下高压乳匀 6 个循环，迅速冷却后得到所需产品，粒径测定仪测定所得产品测定粒径为  $134\text{nm}\pm 18\text{nm}$ ，与刘敏<sup>[46]</sup>所得的 TAX-NLC ( $66\pm 6\text{nm}$ ) 相比较大，考虑为体系中引入大分物质 PEG(MW~3350)而增加了脂质药物的粒径。相较 Robert J. Lee<sup>[12]</sup>等所制备的叶酸靶向紫杉醇纳米脂质体 (93.4 nm) 较大。MTT 实验表明 TAX-NLC-FA 对 KB 细胞的为 24h 的  $\text{IC}_{50}$  为 95.27nmol/L, TAX-NLC 为 543.18nmol/L; TAX-NLC-FA 对 KB 细胞的毒性是非靶的 6 倍左右，原因为 TAX-NLC-FA 在叶酸的介导下紫杉醇纳米脂质体药物进入细胞速率增大，因而同样作用时间内，与 TAX-NLC 药物相比，靶向药物进入细胞的药物总量也较高。此点在以后的实验中可通过其他实验技术如激光共聚焦或游离叶酸竞争抑制的方法观察 TAX-NLC-FA 对 KB 细胞疗效显著提高是否为叶酸介导所致。Robert J. Lee<sup>[12]</sup>等制备的叶酸靶向紫杉醇脂质体对 KB 细胞的  $\text{IC}_{50}$  48nmol/L, 非靶向的紫杉醇脂质体约为  $\text{IC}_{50}$  184nmol/L, 两者相比表明本实验制备的靶向脂质体药物疗效可能不及后者，分析原因可能为本实验在合成 TAX-NLC-FA 中并未除去过剩的游离的 FA-PEG-DSPE，至于其过剩的量也未有相关方面的分析及鉴定，此方面在以后的实验中有待继续考证。至于非靶向的紫杉醇脂质体疗效亦不如后者，分析原因可能为后者的脂质体成份为类细胞膜结构，与细胞相容性较好，易于融合与细胞膜融合，因此单位时间进入细胞的药物总量增加，具体原因还有待进一步实验确定。至于靶与非靶的疗效相比本实验制备的脂质体药物 (6 倍) 相比后者 (3.8 倍) 较好。原因可能为本实验中药物是作用 3h 后弃去，而后者是作用 2h 后弃去，这很可能是导致靶/非靶相对较高的主要因素。本实验采用药物作用 3h 后除去是根据本实验研究人员提供的已有经验，为进一步考证是否为单纯药物作用时间问题所致还是其他因素，下一步将采取相关方面的实验进行药物作用 2h 后的结果对比。

**结论：**靶向紫杉醇脂质体作用 KB 细胞比非靶向脂质体疗效显著提高，靶向紫杉醇脂质体有望进一步提高紫杉醇纳米药物对 KB 细胞的生物学疗效。

## 第三部分 放射性核素 $^{125}\text{I}$ 标记紫杉醇的方法学研究

### 1 材料与方法

#### 试剂及仪器

紫杉醇 (TAX, 99.5%标准品, 批号 03090.D, 四川朝汇生物科技有限公司);  $\text{Na}^{125}\text{I}$ (放射性浓度 9.25 TBq/L, 放化纯度约 97.8%, 北京原子高科股份有限公司); Ch-T(98%, Chloramine-T hydrate, Aldrich); 偏重亚硫酸钠(化学纯); LG10-3A 型高速冷冻离心机(北京医用离心机厂); GC-1200 $\gamma$  型放射免疫计数器(中国科技大学中佳光电仪器公司); RM905 活度计(Radioactivity Meter); XY-1 型低压吸引器(上海合力医疗器械厂); FA1004 电子天平(上海天平仪器厂); 超纯水系统(Barnstead D8982-33,U.S.A); 85-A 型漩涡混合仪(上海优浦科学仪器有限公司)

#### 主要试剂配制方法

##### 0.5 M PB 液 (PH 7.5)

精密称取  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  7.8g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  17.9g, 蒸馏水 480mL, 用 1M NaOH 调节 PH 值至 7.5, 蒸馏水补足体积 500mL。

##### 0.05 M PB 液 (PH7.5) :

**A 液:** 精密称取  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3.9g, 加蒸馏水至 480mL, 用 1M NaOH 调节 PH 值至 7.5, 蒸馏水补足体积 500mL, 一滴氯仿, 室温储存。

**B 液:** 精密称取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  8.95g, 加蒸馏水至 480mL, 用 1M NaOH 调节 PH 值至 7.5, 蒸馏水补足体积 500mL, 加一滴氯仿, 室温储存。取 A 液 40mL, B 液 210mL, 混匀, 即得 0.05M PB 液。

**2 mg/mL Ch-T:** 精密称取 Ch-T 4mg, 0.05M PB 液 2mL 溶解, 混匀。即配即用。

**2mg/mL 偏重亚硫酸钠:** 精密称取偏重亚硫酸钠 4mg, 0.05M PB 液 2mL 溶解, 混匀。即配即用。

**8mg/mL 紫杉醇:** 紫杉醇 8 mg, 乙醇 1mL 溶解, 漩涡混匀。

**40 $\mu\text{g}$ /mL NaI:** 8mg NaI, 2mL dH<sub>2</sub>O, 漩涡混匀, 从 4mg/mL 中取 50 $\mu\text{L}$ , 配制成终浓度为 40 $\mu\text{g}$ /mL。

## 2 $^{125}\text{I}$ 标记 TAX 方法及标记产物鉴定

### 2.1 $^{125}\text{I}$ 标记 TAX 方法

#### 2.1.1 $^{125}\text{I}$ 标记 TAX 实验流程—— $\text{HNO}_3$ 氧化法

200  $\mu\text{L}$  2 g/L 的 TAX、37 MBq  $\text{Na}^{125}\text{I}$  及 50  $\mu\text{L}$  0.1 mol/L  $\text{HNO}_3$ ，80  $^\circ\text{C}$  下反应 30 min，用一滴氨水终止反应，2 mL 乙醇稀释反应体系。纸层析法测定标记率及其在 4  $^\circ\text{C}$  乙醇体系中的稳定性。

#### 2.1.2 $^{125}\text{I}$ 标记 TAX 实验流程——Ch-T 法

1.5 mL eppendorf (EP) 管中加入 25  $\mu\text{L}$  8 mg/mL 的 TAX、37 MBq  $\text{Na}^{125}\text{I}$ 、50  $\mu\text{L}$  0.5 mol/L PB 液和 50  $\mu\text{L}$  Ch-T，室温震荡反应 5 min，立即加入 2 g/L 偏重亚硫酸钠 200  $\mu\text{L}$  终止反应，漩涡混匀，纸层析法测定标记率。

#### 2.1.3 $^{125}\text{I}$ 标记 TAX 实验流程——改良 Ch-T 法

1.5 mL EP 管中加入 25  $\mu\text{L}$  8 g/L 的 TAX、5  $\mu\text{L}$  NaI、50  $\mu\text{L}$  0.5 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (PB, PH7.5)、50  $\mu\text{L}$  Ch-T，室温震荡反应 5 min，立即加入 200  $\mu\text{L}$  偏重亚硫酸钠终止反应，漩涡混匀，10 000 g 离心 15 min，弃上清，200  $\mu\text{L}$  0.05 mol/L PB 液清洗沉淀，重复离心 1 次，弃上清。加入 50  $\mu\text{L}$  0.5 mol/L PB 液、50  $\mu\text{L}$  Ch-T 和 37 MBq  $\text{Na}^{125}\text{I}$ ，室温振荡反应 5 min，用 200  $\mu\text{L}$  偏重亚硫酸钠终止反应。反应结束后，用纸层析及 HPLC 法测定标记产物的标记率。10 000 g 离心 10 min，用 200  $\mu\text{L}$  0.05 mol/L PB 液清洗沉淀，0.5 mL 乙醇溶解沉淀，待用。活度计测定产物的活度，计算产物的放射性比活度。纸层析法测定标记产物放化纯度并进行稳定性检测。

#### 2.1.4 改良 Ch-T 法稳定 $^{127}\text{I}$ 标记 TAX

采用改良 Ch-T 法以稳定  $^{127}\text{I}$  标记 TAX，方法同 2.1.3。不同的是第二步反应中以非放射性  $^{127}\text{I}$  代替放射性  $^{125}\text{I}$ ，加入量为 9  $\mu\text{L}$  (4 g/L)，纯化后的产物以去离子水清洗 3 次，产品冷冻干燥。

## 2.2 $^{125}\text{I}$ -TAX 产物鉴定

### 2.2.1 纸层析法测定 $^{125}\text{I}$ -TAX 标记率及放射化学纯度的条件及方法

固定相：新华一号层析纸，制成 1 cm $\times$ 10 cm 层析纸条；流动相：以生理盐水为展开剂。步骤：用毛细玻管吸取样品，点样，吹干后放入流动相中，待液面移至距原点 9cm 时，取出层析纸条，晾干后测定每格的放射性计数率 ( $\text{min}^{-1}$ )，以层析距离 (cm) 为横坐标，放射性计数率 (cpm) 为纵坐标，绘制  $^{125}\text{I}$ -TAX 放射性纸层析色谱图。标记率为各峰放射性计数率之和 (除游离碘峰之外且扣除本底)

与所有峰放射性计数之和的比值,放化纯度为所需产品峰与所有峰的放射性计数的和之比。

### 2.2.2 红外光谱(infrared spectra ,IR)鉴定改良Ch-T法标记产物

冷冻干燥后得到纯化的 $^{125}\text{I}$ -TAX与透光材料KBr混合压片制样;调整红外光能量为40 mW,波数范围( $\bar{\nu}$ ):400-4000 $\text{cm}^{-1}$ 。

### 2.2.3 标记物 $^{125}\text{I}$ -TAX 稳定性检测

溶剂的选择:分别置标记物 $^{125}\text{I}$ -TAX于乙醇,生理盐水、血浆三种不同体系;温度选择:室温,4℃冰箱、37℃孵育;层析条件:新华一号层析纸作固定相,NS作展开剂,点样。

2.3 统计分析:统计学检验采用SPSS 13.0 作统计分析

## 3 结果

### 3.1 纸层析结果

#### 3.1.1 $\text{HNO}_3$ 氧化法 $^{125}\text{I}$ -TAX 标记率测定

纸层析法测得游离碘( $^{125}\text{I}^-$ )的 $R_f=0.8-0.9$ 。 $^{125}\text{I}$ -TAX的 $R_f$ 为0.1-0.2。图3-1所示为 $\text{HNO}_3$ 氧化法 $^{125}\text{I}$ -TAX标记率纸层析色谱图,标记率达72.6%±6.0%(n=6),标记率较高。图3-2为 $\text{HNO}_3$ 氧化法所得产物 $^{125}\text{I}$ -TAX与游离碘对比纸层析色谱图。

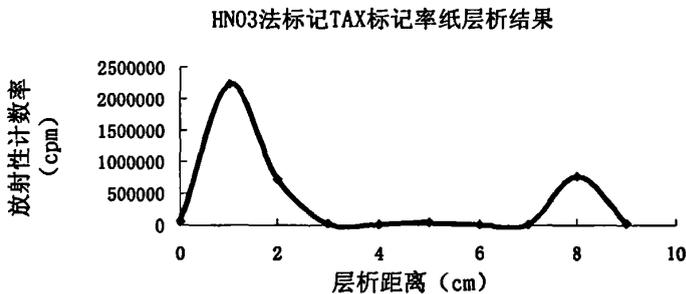


图3-1  $\text{HNO}_3$ 氧化法所得产物 $^{125}\text{I}$ -TAX标记率:72.6%±6.0%

HNO<sub>3</sub>法标记TAX标记率与游离碘纸层析对比图

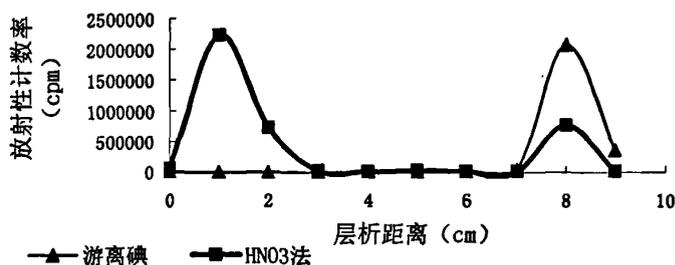


图 3-2 HNO<sub>3</sub>所得标记产物 <sup>125</sup>I-TAX 标记率与游离碘对比层析图

### 3.1.2 Ch-T 法 <sup>125</sup>I-TAX 标记率

图 3-3 为 Ch-T 法 <sup>125</sup>I-TAX 标记率：21.4%±3.3%，标记率较低。标记产物无法纯化，<sup>125</sup>I 利用率低。如图 3-3 所示。

Ch-T法标记TAX标记率纸层析

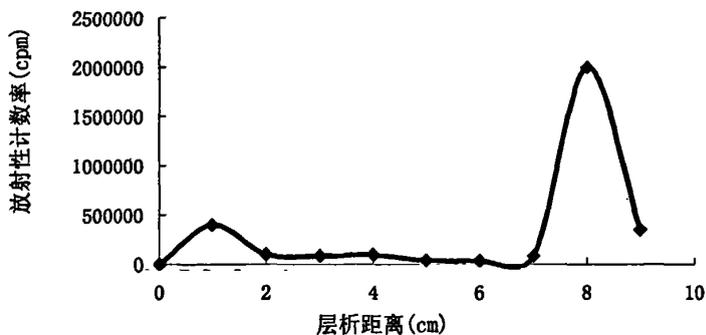


图 3-3 <sup>125</sup>I-TAX 标记率：21.4%±3.3%

### 3.1.3 改良 Ch-T 法 <sup>125</sup>I-TAX 标记率及放化纯度

图3-4为改良Ch-T法标记率层析结果，<sup>125</sup>I-TAX标记率为63.1%±5.7%(n=6)。

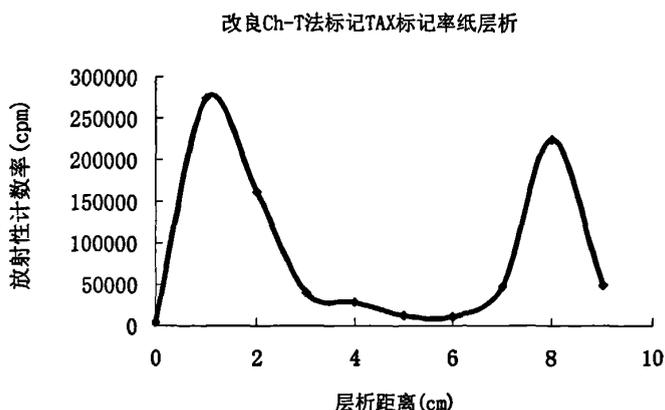


图 3-4 改良 Ch-T 法  $^{125}\text{I}$ -TAX 标记率纸层析色谱图

图3-5为三种标记方法制备 $^{125}\text{I}$ -TAX及游离碘的放射性纸层析色谱图对比图。由图可知， $\text{HNO}_3$ 法标记率最高，为 $72.6\% \pm 6.0\% (n=6)$ ，其次为改良Ch-T法，其标记率为 $63.1\% \pm 5.7\% (n=6)$ ，Ch-T法所得标记率最低，只有 $21.4\% \pm 3.3\% (n=3)$ 。对三种方法所得结果进行统计学分析可知， $\text{HNO}_3$ 法与改良Ch-T法结果相比，有统计学差异， $P < 0.05$ ，由于 $\text{HNO}_3$ 氧化法中需要 $80^\circ\text{C}$ 反应体系，在此体系 $^{125}\text{I}$ 升华严重，操作较困难，不易控制，故此种标记方法不作为首选。Ch-T法所得标记率只有 $21.4\% \pm 3.3\%$ ，标记率较低，标记产物无法纯化，难以获得稳定的标记产物。改良Ch-T法与Ch-T法相比，具有显著性差异， $P < 0.01$ 。故改良Ch-T法为紫杉醇的首选标记方法。

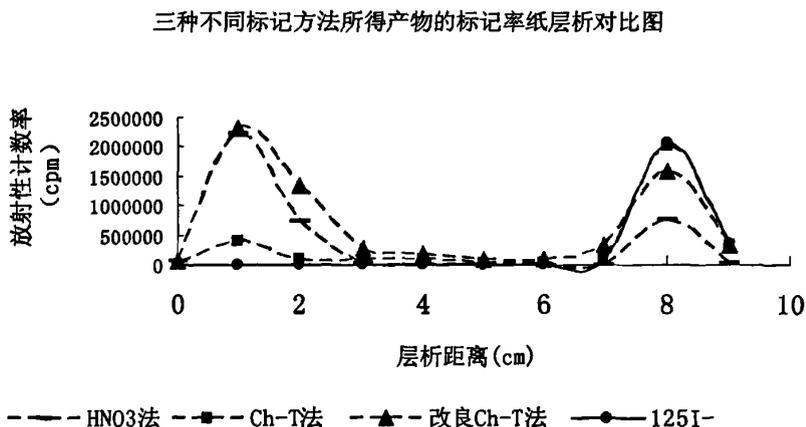


图 3-5 三种不同标记方法所得产物的标记率及游离碘纸层析图

改良Ch-T法所得标记产物经离心纯化后,纸层析法测得<sup>125</sup>I-TAX放化纯度如图示3-6,放化纯度为96.3%±1.3%(n=5)。经活度计检测离心纯化后的产物活度约为20.7 MBq,产物的比活度约为103.6 TBq/g。结果显示改良Ch-T法得到的<sup>125</sup>I-TAX标记率相对较高,放化纯度 > 95%,满足示踪实验的基本要求。

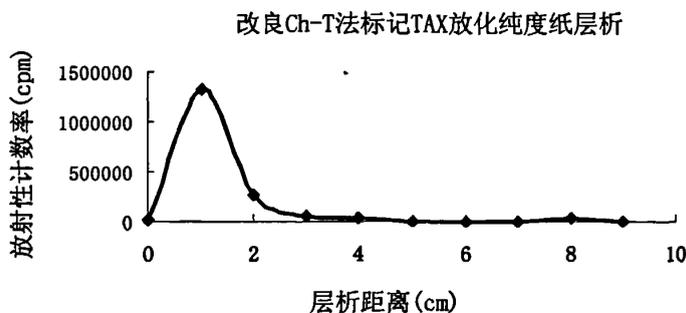


图 3-6 改良 Ch-T 法 <sup>125</sup>I-TAX 放射化学纯度纸层析色谱图

### 3.2 <sup>127</sup>I-TAX 红外图谱分析

<sup>127</sup>I-TAX 的红外光谱检测结果于图 3-7。由图 3-7 显示, <sup>127</sup>I-TAX 与 TAX 相比, 出现 1710、1630、1533.6cm<sup>-1</sup>, 与 Byung-Tae Kim [35]等报道的 <sup>123</sup>I-TAX 相比红外图谱资料相比, 出现相似的峰, 表明碘标记在紫杉醇结构上。

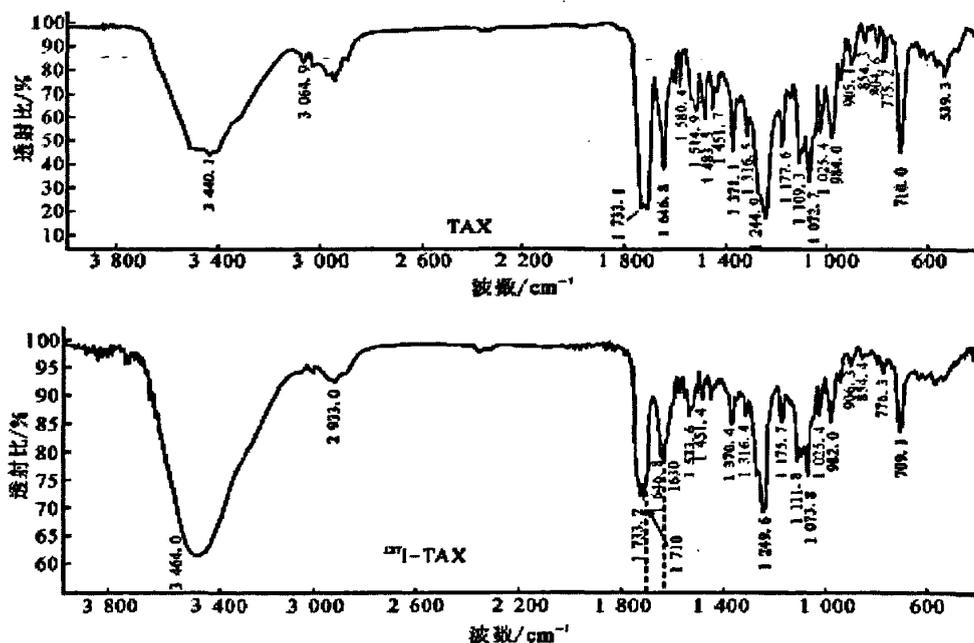


图 3-7 <sup>127</sup>I-TAX/TAX 的红外光谱图

### 3.3 $^{125}\text{I}$ -TAX 稳定性检测 (改良 Ch-T 法标记的紫杉醇)

改良Ch-T法得到的 $^{125}\text{I}$ -TAX在不同储存条件下的放化纯度示于图3-8。由图可知,标记产物在NS、乙醇中均具有较好的稳定性,在4℃下保存至24 h,放化纯度仍>95%,至120 h时仍约为90%;放置于血浆中的标记产物同样具有较好的稳定性,在4℃和37℃下放置24 h,放化纯度分别为92.3%±0.4%与89.5%±0.6%。

温度对标记物稳定性有一定影响,4℃与37℃储存条件下的放化纯度具有统计学差异( $P<0.05$ );室温与4℃下储存,在144 h内无统计学差异( $P>0.05$ ),之后两者具有统计学差异( $P<0.05$ ),室温下,放化纯度显著下降。

储存溶剂对放化纯度的影响不明显( $P>0.05$ )。考虑标记产物的溶解性,样品选择储存在4℃乙醇体系中。

改良Ch-T法标记产物稳定性分析

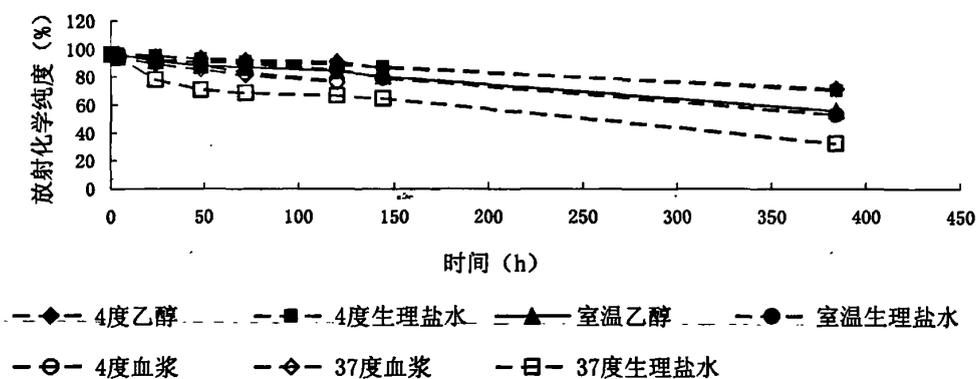


图 3-8 纸层析法测定改良 Ch-T 法标记的 TAX 稳定性

改良Ch-T法与 $\text{HNO}_3$ 法所得 $^{125}\text{I}$ -TAX在4℃乙醇中的稳定性于图3-9。由图3-9可以看出,与改良Ch-T法得到的标记产物相比较, $\text{HNO}_3$ 法以所得标记产物稳定性较差,4 h时已明显下降,至96 h时,已下降至约63.2%。表明,改良Ch-T法标记产物经纯化后稳定性较好。

改良Ch-T法和HNO<sub>3</sub>法标记产物在4度乙醇中稳定性分析

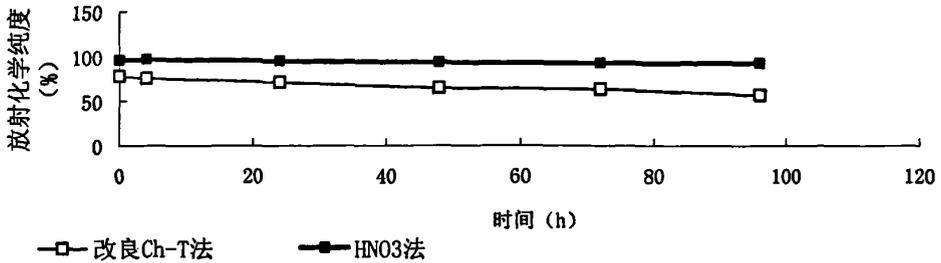


图 3-9 改良 Ch-T 法和 HNO<sub>3</sub> 法标记产物在 4°C 乙醇中稳定性分析

### 讨论

紫杉醇最早是从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*) 的树皮中分离出的化学结构新颖、作用机理独特的新型广谱抗癌药物,主要用于治疗转移性卵巢癌和乳腺癌。紫杉醇是一种二萜类化合物,文献至今为止还未曾有报道放射性碘同位素直接标记紫杉醇,文献报道的紫杉醇药代动力学资料大都是通过高效液相色谱检测,工作量大。本实验中旨在建立新的稳定方法,以Na<sup>125</sup>I标记紫杉醇,为紫杉醇示踪实验提供一个更简易的途径。

以放射性同位素<sup>125</sup>I标记紫杉醇开始使用Iodogen 法室温孵育30min仍未见明显标记产物峰,标记率极低;采用HNO<sub>3</sub>加热氧化法所得标记率为72%左右,标记率较高,产物相对较稳定,尽管HNO<sub>3</sub>法标记率最高,但实验当中采用80°C反应体系,不易操作及控制,另一方面,由于温度高,过多的<sup>125</sup>I升华可能会造成更多的放射性污染及吸入,影响研究人员的身体健康,并降低放射性<sup>125</sup>I的利用率,因此,不宜用于实验;Ch-T法标记紫杉醇方法简单,但标记率仅为21.4%±3.3%,无法得到稳定的标记产物;改良Ch-T法标记紫杉醇,可在室温中完成,方法简单,易操作,高速离心纯化产物简单易行,标记率达63.1%±5.7%,与文献<sup>[35]</sup>报道的间接法得到的标记产物的标记率63%~65%相当,经离心纯化后放射化学纯度约96.3%±1.3%。

改良 Ch-T 法标记产物稳定性实验表明,4°C条件下,在生理盐水与乙醇储存体系中稳定性均较好,至 24h 放射化学纯度仍在 95%以上,至 6d 仍在 90%左右,在血浆中稳定性也较好,4°C放置 24h,放化纯有 92.3%±0.4%,37°C放置 24h,放化纯 89.5%±0.6%。改良 Ch-T 法标记紫杉醇方法简单,通过本方法获得的 <sup>125</sup>I 紫杉醇标记物稳定性较好,能够满足放射性示踪实验的要求。

本实验中采用改良 Ch-T 法标记紫杉醇, 与 Ch-T 法相比放射性  $^{125}\text{I}$ -TAX 标记率显著提高, 其机理可能是 Ch-T 氧化过量的稳定碘, 稳定碘取代紫杉醇结构上的氢元素, 得到的产物中, 连接上稳定碘的紫杉醇分子数量大大增加, 然后放射性同位素与稳定碘发生同位素取代反应, 从而大幅提高了标记率, 达到 Ch-T 法的约 3 倍; 也可能稳定碘与紫杉醇结合后, 改变了紫杉醇空间位阻, 使紫杉醇上的氢易于被放射性碘置换, 从而提高了标记率。

当然, Ch-T 法标记的药物如果不及时纯化, 稳定性较差。本实验中也发现, 改良 Ch-T 法标记的紫杉醇若不及时纯化, 标记产物稳定性也较差, 易脱碘, 半小时后放化纯度从原来的  $68.9\% \pm 0.6\%$  降至  $10.9\% \pm 0.9\%$  左右, 但通过纯化后, 标记物在生理盐水、血清和乙醇中均有较高的稳定性, 可较长时间保存待用 (图 3-8)。Ch-T 法标记的产物未及时纯化稳定性较差, 分析原因可能为未纯化的产物里面成分较为复杂, 杂质较多,  $^{125}\text{I}$  射线作用后产生的自由基多, 进一步作用则使标记产物易于脱碘, 纯化后的标记产物杂质较少, 则标记物质较稳定。因此标记完的产物应立即纯化, 以使产物更加稳定。

## 结 论

采用改良 Ch-T 法标记 TAX, 标记方法简单, 易操作, 室温标记, 标记率达  $63.1\% \pm 5.7\%$ , 放化纯度达  $96.3\% \pm 1.3\%$ , 纯化后的标记产物在血清、生理盐水和乙醇中有较好的稳定性, 能满足体内药代动力学示踪的要求, 从而为研制新的纳米化紫杉醇, 开展体内药物分布与代谢动力学的研究, 提供合格的示踪剂。

## 参考文献

- [1]鲁明波,梅兴国译.紫杉醇的临床应用进展[J].国外医药:合成药、生化药、制剂分册.1997, 18(2):94
- [2]杨莉,成丽,魏于全.脂质体在肿瘤靶向治疗中的应用[J].华西医学, 2005, 20(2): 387-388
- [3]杨莉斌,沈静,胡荣.抗肿瘤药物脂质体粒径对肿瘤靶向性的影响.华西药理学杂志 2007, 22(4): 428~430
- [4]刘斌.紫杉醇新剂型——紫杉醇脂质体(力扑素)临床应用观察[J],中国医院用药评价与分析.2007,7(1):59-60
- [5]Sharma A, Mayhew E, Bolicsak L, et al. Activity of paclitaxel liposome formulations against human ovarian tumor xenografts[J]. Int J Cancer, 1997, 71(1):103
- [6]Tyagi P, Wu P C, Chancellor M, et al. Recent advances in intravesical drug/gene delivery[J]. Mol Pharm, 2006, 3(4): 369-379
- [7]钱皓,凌沛学,王凤山,张天民.脂质体靶向治疗恶性肿瘤的应用研究进展.食品与药品, Food and Drug 2007, 9(3):46-49
- [8]Overmoyer B, Silverman P, Holder LW. Pegylated liposomal Doxorubicin and cyclophosphamide as first-line therapy for patients with metastatic or recurrent breast cancer. Clin Breast Cancer, 2005, 6(2):150-157
- [9]H. Maeda, The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting, Adv. Enzyme Regul. 2001 (41):189-207
- [10]Crosasso P, Ceruti M, Brusa P, et al. Preparation, characterization and property of sterically stabilized paclitaxel containing liposomes[J]. J Controlled Release, 2000, 63(1):19-30
- [11]陈大兵,吕万良,杨天智,等.紫杉醇表面修饰脂质纳米粒的制备和性质[J].北京大学学报, 2002, 34(1):57-60
- [12] Jun Wu, Qing Liu, Robert J. Lee. A folate receptor-targeted liposomal formulation for paclitaxel, International Journal of Pharmaceutics 2006 (316): 148-153
- [13] Zalipsky, S., Brandeis, E., Newman, M. S., and Woodle, M. C. Long circulating, cationic liposomes containing amino-PEG-phosphatidylethanolamine. FEBS Lett.

- 1994(353):71-74
- [14]马洁, 曹利人.包裹外毒素III 的抗CD19 脂质体靶向杀伤人B淋巴瘤.中华肿瘤杂志,2003,25(1):36- 38
- [15] 侯新朴, 谢蜀生.第三代载药免疫脂质体及体内外寻靶研究.药学学报,2001,36(7):539- 542
- [16] X. Wang, F. Shen, J.H. Freisheim, L.E. Gentry, M. Ratnam, Differential stereospecificities and affinities of folate receptor isoforms for folate compounds and antifolates, *Biochem. Pharmacol.* 44 (1992) 1898–1901
- [17]M. da Costa, S.P. Rothenberg, Purification and characterization of folate binding proteins from rat placenta, *Biochim.Biophys. Acta* 1292 (1996) 23–30
- [18]Shen F, WuM, Ross JF, et al. Folate receptor type gamma is primarily a secretory protein due to lack of an efficient signal for glycosylphosphatidylinositol modification: protein characterization and cell type specificity [J]. *Biochem*, 1995, 34 (16) : 5660 – 5665
- [19]Chun-Yen Ke, Carla J. Mathias, Mark A. Green.Folate-receptor-targeted radionuclide imaging agents,*Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004) 1143–1160
- [20]Pan XQ, Lee RJ. In vivo antitumor activity of folate receptor-targeted liposomal daunorubicin in a murine leukemia model. *Anticancer Res* 2005(25):343–346
- [21]Gabizon A, Shmeeda H, Horowitz AT, Zalipsky S. Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates. *Adv Drug Deliv Rev* 2004 (56) :1177–1192
- [22]Sun Hwa Kim, Hyejung Mok, Ji Hoon Jeong, Sung Wan Kim, and Tae Gwan Park, Comparative Evaluation of Target-Specific GFP Gene Silencing Efficiencies for Antisense ODN, Synthetic siRNA, and siRNA Plasmid Complexed with PEI-PEG-FOL Conjugate,*Bioconjugate Chem.* 2006 (17):241-244
- [23]Sharma, A., Mayhew, E., Straubinger, R.M. Antitumor effect of paclitaxel-containing liposomes in a paclitaxel-resistant murine tumor model. *Cancer Res.* 1993(53): 5877–5881
- [24]Sody, M.S., Strieth, S., Krasnici, S., Sauer, B., Schulze, B., Teifel, M., Michaelis, U, Naujoks, K, Dellian, M. Neovascular targeting therapy: paclitaxel encapsulated in cationic liposomes improves antitumoral efficacy. *Clin. Cancer Res.* 2003(9):2335–2341

- [25] Robert J. Lee, Philip S. Low. Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 1233(1995):134-144
- [26] Yonghua Zhang, Lili Guo, Roger W. Roeske, Amok C. Antony, and Hiremagalur N. Jayaram. Pteroyl- $\gamma$ -glutamate-cysteine synthesis and its application in folate receptor-mediated cancer cell targeting using folate-tethered liposomes. *Analytical Biochemistry* 332 (2004) 168-177
- [27] Ni S, Stephenson SM, Lee RJ. Folate receptor targeted delivery of liposomal daunorubicin into tumor cells[J]. *Anticancer Res*, 2002, 22: 2131-2135
- [28] 陆伟跃, 刘敏, 潘俊, 力弘, 马俊. 叶酸-脂质体制备及对HeLa 细胞靶向作用. *上海医科大学学报*, 2000 9, 27(1): 4-8
- [29] Guangfeng Shi, Wenjin Guo, Stacy M. Stephenson, Robert J. Lee. Efficient intracellular drug and gene delivery using folate receptor-targeted pH-sensitive liposomes composed of cationic / anionic lipid combinations. *Journal of Controlled Release* 80 (2002): 309-319
- [30] 蒋建伟, 张涓. 叶酸受体介导的药物靶向投递系统研究进展[J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2004, 25 (4) : 345 - 347
- [31] Zhou W, Zhou W, Yuan X, Wilson A. et al. Efficient intracellular delivery of oligonucleotides formulated in folate receptor-targeted lipid vesicles. *Bioconjug Chem*, 2002, 13: 1220-1225
- [32] 周卫, 吕琦, 翁帼英. 紫杉醇脂质体在大鼠体内的药动学. *中国药科大学学报* 2000, 31 (6) : 443-446
- [33] 张恩娟, 张昭, 陈湘潘. 紫杉醇的药代动力学研究概况. *中国药房*. 1999, 10 (4): 187-188
- [34] 谭燕, 周建平, 全新勇, 冯芳. 紫杉醇脂质体大鼠体内药动学考察. *江苏药学与临床研究* 2006, 14 (2) : 69-71
- [35] Byung-Tae Kim, Dae Yoon Chi, and Deukjoon Kim, Radiolabeling of Paclitaxel with Electrophilic  $^{123}\text{I}$ , *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 8 (2000) : 65-68
- [36] Bonner JA, Khazaeli MB, Buchsbaum DJ. et al. Site-specifically traced drug release and biodistribution of a paclitaxel-antibody conjugate toward improvement of the linker structure. *Bioconjugate Chemistry*. 15(6):1264-74, 2004 Nov-Dec
- [37] Eun Seong Lee, Kun Na, You Han Bae. Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting. *Journal of Controlled Release* 91 (2003): 103-113

- [38] Karen Vogel, Susan Wang, Robert J. Lee, Jean Chmielewski, and Philip S. Low .Peptide-Mediated Release of Folate-Targeted Liposome Contents from Endosomal Compartments .American Chemical Society,118 (7) ,1996:1581-1586
- [39] Fabio Sonvico, Ste'phane Mornet, Se'bastien Vasseur, Catherine Dubernet, Danielle Jaillard, Jeril Degrouard, Johan Hoebeke, Etienne Duguet, Paolo Colombo, and Patrick Couvreur Folate-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles for Solid Tumor Targeting as Potential Specific Magnetic Hyperthermia Mediators: Synthesis, Physicochemical Characterization, and in Vitro Experiments. *Bioconjugate Chem.* 2005, 16, 1181-1188
- [40] W.W. Gu, Z.H. Xu, Y. Gao, L.L. Chen, Y.P. Li, Transferrin-mediated PEGylated nanoparticles for delivery of DNA/PLL complexes, *Nanotechnology* 17 (2006) 617-621
- [41] Liangke Zhang, Shixiang Hou, Shengjun Mao, Dapeng Wei, Xiangrong Song, Yi Lu. Uptake of folate-conjugated albumin nanoparticle to the SKOV3 cells *International Journal of Pharmaceutics* 287 (2004) 155-162
- [42] Peggy Chan et al, Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(ethylene glycol)-folate as a non-viral carrier for tumor targeted gene delivery, *Biomaterials* (2006), *biomaterials*.2006.(8)1-10
- [43] Fabio Sonvico, Ste'phane Mornet, Se'bastien Vasseur, Catherine Dubernet, Danielle Jaillard, Jeril Degrouard, Johan Hoebeke, Etienne Duguet, Paolo Colombo, and Patrick Couvreur Folate-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles for Solid Tumor Targeting as Potential Specific Magnetic Hyperthermia Mediators: Synthesis, Physicochemical Characterization, and in Vitro Experiments. *Bioconjugate Chem.* 2005, 16, 118-188
- [44] Van Steenis JH, van Maarseveen EM, Verbaan FJ, Verrijk R, Crommelin DJA, Storm G, et al. Preparation and characterization of folate-targeted PEG-coated pDMAEMA-based polyplexes. *J Control Release* 2003;87:167-176
- [45] Hyuk Sang Yoo, Tae Gwan Park. Folate-receptor-targeted delivery of doxorubicin nano-aggregates stabilized by doxorubicin-PEG-folate conjugate. *Journal of Controlled Release* 100 (2004): 247-256
- [46] 刘敏, 许玉杰, 胡明江. 高效液相色谱法测定紫杉醇及其脂质纳米粒包封率的方法学研究. *分析实验室*, 2007 (26): 1-4

## 放射性核素靶向治疗的研究现状及其进展

**摘要:** 放射性核素靶向治疗是恶性肿瘤一种很有前景的靶向治疗手段。恶性肿瘤靠单一治疗手段往往难以达到根治效果, 必须采用多学科的综合治疗方法, 放射性核素内照射治疗作为手术、化疗、放疗等的补充手段逐渐受到重视。放射性核素靶向治疗以能高度选择性聚集在肿瘤组织的物质作为载体, 将放射性核素靶向运送到病灶内, 核素发出的射线( $\alpha$ 粒子、 $\beta^-$ 射线、内转换电子及俄歇电子等) 局部作用于病变组织, 辐射剂量集中于病变部位而降低对周围正常组织产生的损伤。放射性核素的靶向性治疗肿瘤近年来国内外研究比较多, 现就这一方面作综述。

**关键词:** 放射性核素; 靶向治疗; 载体; 基因转移;

**Abstract:** Radioactive nuclide targeted therapy is a kind of targeted therapeutic method for malignant tumor. To depend on single therapeutic tool, it is hard to get to radical cure effective, it is must using multidisciplinary combined therapy approach, radioactive nuclide internal-radiation therapy is gradually to suffer reconstruction as a supplementary means of operation/chemical therapy/radiotherapy. radioactive nuclide targeted therapy utilize material which concentrates highly selectively on tumor tissues as supporter, and transport radioactive nuclide aimly to focus of infection, nuclide emitting ray ( $\alpha$ particle,  $\beta$ ray, ICE, Auger electron, and so on ) locally effect on pathological changes, radiation dose concentrate on diseased region and reduce injury of neighborhood normal tissue . In recent years , domestic and overseas ,the studying on radioactive nuclide targeted therapy is more relatively, now, I will make a review on this respect.

**Keywords:** radioactive nuclide; targeted therapy; carrier; gene transfer

### 引言

恶性肿瘤是一类严重危害人类健康的主要病种之一, 对人们的生命和健康造成了严重的危害, 单一治疗手段往往难以达到根治效果, 必须采用多学科的综合治疗方法。传统的三大疗法(手术, 化疗, 放疗)因缺乏靶向性而不能达到良好的抗肿瘤效果, 放射性核素靶向治疗是一种很有前景的肿瘤靶向治疗手段, 与传统治疗手段相比, 放射性核素靶向治疗具有其独特的优点, 它以能高度选择性聚集在

肿瘤组织的物质作为载体(如单克隆抗体、生物活性肽等),将放射性核素靶向运送到病变组织或细胞,放射性核素发出的射线粒子( $\alpha$ 粒子、 $\beta$ 射线、内转换电子及俄歇电子等)通过电离辐射效应局部作用于病变组织或细胞,发挥最大的治疗作用,而降低对正常组织的损伤。

常用的治疗用的放射性核素有 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{89}\text{Sr}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{103}\text{Pd}$ 、 $^{32}\text{P}$ 等,这些核素能量适宜用于放射治疗,其中有些核素发射 $\gamma$ 射线利于定位。

放射性核素靶向治疗的目的是杀灭全身播散的肿瘤而不损伤正常组织,治疗用的放射性药物联合亲肿瘤性的试剂达到靶向聚集于肿瘤的目的。通过连接靶向基因可以获得对肿瘤的主动靶向。将放射性核素准确导向定位于肿瘤细胞是提高肿瘤部位核素摄取以及靶/非靶比值(T/NT)的关键。也是核素治疗取得较好疗效的基础。放射性核素靶向治疗很大程度上取决于核素靶向系统的发展。理想的载体应具备高特异性、高选择性和高亲和性、穿透力强以及运载能力大等特点,选择合适的载体为进一步提高放射性核素靶向治疗疗效主要问题之一。

$^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{89}\text{Sr}$ 、 $^{32}\text{P}$ 等与体内稳定核素具有相同或相似的化学性质,可直接用于相应组织的内照射治疗。而对于不摄取该放射性核素的组织脏器不能达到特异的杀伤效果,选择合适的载体成为近几年研究动向。

## 1 代谢类似物 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{89}\text{Sr}$ 、 $^{32}\text{P}$ 等

### 1.1 $^{131}\text{I}$ ( $^{131}\text{I-NaI}$ )

甲状腺恶性肿瘤较常见,女性多发,大部分为分化型甲状腺癌, $^{131}\text{I}$ 是放射性核素治疗应用最多的一种核素,手术+ $^{131}\text{I}$ +sTSH治疗已被常规用于分化型甲状腺癌患者,有效率达90%,对于低分化DTC患者摄取 $^{131}\text{I}$ 能力低,癌组织通过多种途径如微甲酸的诱导<sup>[1]</sup>,去甲基化<sup>[2]</sup>,钠-碘同向转运体钠(Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>-symporter, NIS)基因的载入<sup>[3]</sup>等增加组织对 $^{131}\text{I}$ 的摄取以达到治疗的效果。 $^{131}\text{I}$ 对甲状腺癌的疗效与病理类型关系不大,与转移部位有较大关系,淋巴结转移者疗效最明显,而骨转移者疗效相对较差, $^{131}\text{I}$ 治疗DTC隐匿性转移和孤立的小转移灶的疗效特别显著。

### 1.2 $^{89}\text{Sr}$

骨转移性癌常见于恶性肿瘤晚期,临床报道约80%是由前列腺癌、乳腺癌、晚期肺癌转移引起,常伴有剧烈的骨痛,患者难以忍受且对常规放疗治疗效果较差,一旦发生骨转移,减轻骨疼痛及提高患者生存质量将是临床医师面临的主要问题<sup>[4]</sup>。外照射治疗能有效缓解骨癌疼痛,但对于多发性骨转移癌放疗作用是有

限的。利用一种高度亲骨性放射性治疗药物治疗骨转移癌和缓解肿瘤骨转移引起的疼痛，是近年来治疗核医学发展最快的领域之一。

$^{89}\text{Sr}^{2+}$ ：纯 $\beta$ 发射体，生物化学特性类似于 $\text{Ca}^{2+}$ ，锶与骨内羟基磷灰石结晶中的钙离子可进行离子交换，使锶离子进入骨骼，是亲骨元素，易在骨中沉积。经静脉注射后锶自血液中很快消失而聚集在成骨细胞组织，骨转移癌的摄取量可为正常骨的2—25倍，其发射的 $\beta$ 射线的能量为1.46MeV，半衰期50.6d， $\beta$ 射线穿透范围为3mm，能有效地杀死周围肿瘤细胞。对于骨转移癌局部， $^{89}\text{SrCl}_2$ 照射量大而全身其它正常组织的照射量少。注射后90d，其在骨转移灶内的滞留量仍可达20.0%~80.0%，对骨癌引起的疼痛具有相当好的镇痛效果，前列腺癌效果最好，其次为乳腺癌和肺癌<sup>[5]</sup>，可持久地维持药效，更广泛和持久的缓解疼痛，提高患者的生活质。 $^{89}\text{SrCl}_2$ 发射的 $\beta$ 射线能直接杀死肿瘤细胞。还可通过降低血液中碱性磷酸酶和前列腺素的浓度，有减轻骨质溶解，修复骨质的作用<sup>[6]</sup>，因而 $^{89}\text{SrCl}_2$ 除了起到镇痛作用之外还可以治疗转移灶，使骨转移病灶缩小或消失，以缓解病情，延长病人的生命。

### 1.3 $^{32}\text{P}$

$^{32}\text{P}$ 在淋巴结和某些肿瘤组织浓集量大，在细胞内的浓集程度与细胞分裂的速度成正比，血液病对 $^{32}\text{P}$ 具有选择吸收能力。 $^{32}\text{P}$ 磷酸盐或磷酸二氢钠治疗淋巴瘤，慢性淋巴细胞性白血病以及多发性骨髓瘤等，方法简便，效果好。 $^{32}\text{P}-\text{Na}_3\text{PO}_4$ 用于缓解骨疼痛，但由于其骨髓中毒性副作用作为治疗手段未被广泛接受。

## 2 放射性核素偶联代谢物或其类似物

### 2.1 $^{153}\text{Sm}-\text{EDTMP}$ ( $^{153}\text{Sm}$ —乙二胺四亚甲基磷酸)

用于肿瘤骨转移疼痛的治疗。放射性核素 $^{153}\text{Sm}$ 物理半衰期为46.3 h，生物半减期为520 h，其发射的 $\beta$ 射线能量810 KeV(20%)、710 KeV(50%)和640(30%)KeV， $\beta$ 射线射程平均为3 mm，对周围组织影响小。 $^{153}\text{Sm}-\text{EDTMP}$ 静脉注射后2—3 h，约60%被骨组织的羟基磷灰石晶体吸收，病变骨/正常骨放射性摄取比值为16:1<sup>[7]</sup>。 $^{153}\text{Sm}-\text{EDTMP}$ 在体内具有抗水解和降解作用，而且还具有导向性和杀伤性，又可抑制骨病灶对疼痛物质的分泌。 $^{89}\text{SrCl}_2$ 与 $^{153}\text{Sm}-\text{EDTMP}$ 对恶性肿瘤骨转移的止痛疗效相当，均是简单可靠、有效、经济的办法，不仅缓解骨痛，改善患者的生活质量，而且也以对骨病灶有一定的修复作用。但由于 $^{153}\text{Sm}-\text{EDTMP}$ 的骨髓抑制作用明显比 $^{89}\text{SrCl}_2$ 严重<sup>[8]</sup>，所以临床应用应以 $^{89}\text{SrCl}_2$

为首选。

## 2.2 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ —HEDP( $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ —羟基亚乙基膦酸盐)

用于肿瘤骨转移疼痛的治疗。 $^{186}\text{Re}$ 由反应堆生产， $^{188}\text{Re}$ 由 $^{188}\text{W}$ — $^{188}\text{Re}$ 发生器得到，它们均发射低能 $\gamma$ 射线，有利于跟踪观察治疗中病变的进程。

## 3 抗体介导的放射性核素靶向治疗

一些抗原在肿瘤细胞表面高表达或特异性表达，而正常组织弱表达或不表达，利用肿瘤细胞与正常组织细胞表面抗原存在差异制备其相应的单克隆抗体，并用放射性核素加以标记，利用放射性核素标记的单克隆抗体(monoclonal antibodies, McAb)具有能高度特异识别和选择结合肿瘤细胞相关抗原的特性，而逐步发展的放射免疫治疗(radioimmunotherapy, RIT)技术，但RIT除了在B淋巴细胞瘤靶向显著外，其它组织细胞靶向不理想。

### 3.1 RIT

是治疗B细胞NHL安全有效的治疗措施，B细胞靶向特异性单克隆抗体的出现为惰性淋巴瘤的治疗提供了新的策略。淋巴瘤对辐射较为敏感，应用 $^{131}\text{I}$ 标记抗-CD20单克隆抗体(商品名: Bexxar, 通过了FDA认证)治疗对化疗无效的非霍奇金淋巴瘤(NHL)患者，安全而有效的，Bexxar可能在复发性和顽固性NHL的二线治疗上发挥重要作用。其优势在于能将个体化辐射剂量集中于肿瘤组织，而对正常组织的毒性较低。Bexxar毒性作用主要是骨髓抑制<sup>[9]</sup>。 $^{90}\text{Y}$ -替伊莫单抗和 $^{131}\text{I}$ 托西莫单抗对低度恶性，滤泡性的或转移的NHL临床疗效显著， $^{90}\text{Y}$ - ibritumomab tiuxetan and  $^{131}\text{I}$ - tositumomab可产生较好的临床疗效，作用持久，甚至在一些化疗失败的患者<sup>[10]</sup>。李因等<sup>[11]</sup>采用基因工程研制的针对B细胞CD20的表面抗原人源化抗体美罗华，治疗有效率为35%-45%， $^{131}\text{I}$ -美罗华可以提高治疗有效率。与 $^{131}\text{I}$ - Bexxar治疗相比，美罗华靶结合位点与作用机制完全一致，但美罗华采用人源化抗体，因此理论上发生人抗鼠抗体(HAMA)几率低。

### 3.2 癌胚抗原

是一种肿瘤相关抗原，它为许多肿瘤所表达。鼠单克隆抗癌胚抗原抗体可以碘标的形式用于放免治疗<sup>[12]</sup>。因其易引起机体产生鼠源性抗体而限制其应用。寻找小分子量的可以抗原结合的抗体片段，减弱鼠源特异序列，使得人抗鼠源性抗体降至最低。

### 3.3 抗胰腺癌的单克隆抗体 (Nd2)

Nd2是抗胰腺癌的单克隆抗体, 重组人鼠嵌合抗体Nd2 (chimeric- Nd2,C-Nd2) 对胰腺癌具有相似的特异性与反应而不会产生人抗鼠抗体。 $^{131}\text{I}$ -C-Nd2在治疗鼠移植胰腺癌的实验明显抑制肿瘤生长并延长了生存时间, 而且Nd2具有诱导细胞毒效应机制的能力,  $^{131}\text{I}$ -嵌合体的Nd2可能在治疗胰腺癌上具有较高的临床应用价值<sup>[13]</sup>。但肿瘤靶区药物剂量低, 且经改造后的单抗仍有一定程度的免疫原性。Vaughan<sup>[14]</sup> et al报导RIT的平均价值, 病变组织浓聚放射性占注射剂量的0.005%, 远达不到治疗根治肿瘤所需的剂量, 原因是抗体的特异度低, 分子量大渗透能力小, 且鼠源性抗体导致宿主产生人抗鼠抗体, 因此, 改变鼠源特异区域, 使其免疫原性达到最小, 采用能够结合抗原的抗体片段及单链抗体、单链多价抗体的出现有望提高治疗效果。

## 4 配体介导的放射性核素靶向治疗

肿瘤细胞上常常过度表达某些受体或是表达正常组织不表达的受体, 利用配体与受体结合具有高特异性、高选择性和高亲和性等特性, 用适当治疗用的放射性核素标记相应的配体或其类似物, 利用受体的介导作用, 可将核素导向到含有高密度相应受体的肿瘤组织而发挥内照射的治疗效果。

### 4.1 多肽配体

应用放射性核素标记多肽进行受体靶向治疗在肿瘤治疗领域已变得非常重要, 现已成功开发的放射性核素标记的配体主要有生长抑素类似物, 胃泌素 (GRP)、神经紧张素、血管活性肠肽、蛙皮素、P物质、神经肽Y、缩胆囊素类似物、黑色素细胞刺激素等, 在多肽配体中, 研究最多的是SST类似物奥曲肽。

许多神经内分泌肿瘤多含有丰富的生长抑素(somatostatin, SST)受体(SST receptor, SSSTR, 包括SSSTR1、2、3、4、5等), 应用与这些受体具有亲和力的SST的类似物奥曲肽(octreotide)。用合适的放射性核素加以标记则可用于治疗相关肿瘤的药物。使用 $^{111}\text{In}$ 标记的奥曲肽治疗生长抑素受体阳性肿瘤显示出很好的结果, 使进展期肿瘤处于稳定状态者占很高的比例。然而, 这种治疗对晚期肿瘤和大体积肿瘤效果欠佳。 $^{111}\text{In}$ 除发射 $\gamma$ 射线外, 还发射俄歇电子, 其射程与DNA双螺旋直径相当, 此必须内化到细胞核内方能起到治疗作用。 $^{90}\text{Y}$ 发射的 $\beta$ 射线最高能量为2.27MeV, 组织内最大射程12mm, 适于作为治疗核素。 $^{177}\text{Lu}$ 同时发射适合于显像的射线和适合于治疗的中低能 $\beta$ 射线(最大能量0.50MeV)。

胰腺癌的生存率很低，主要因确诊时多发生恶性进展及转移，且对各种现有治疗方式抵抗<sup>[15]</sup>，<sup>90</sup>Y-DOTATOC治疗的患者15%—33%有效<sup>[16]</sup>，动物实验发现，对于一些小的胰腺肿瘤，<sup>177</sup>Lu-DOTATOC有效率在50—60%<sup>[17]</sup>，发射 $\alpha$ 粒子的<sup>213</sup>Bi，高LET (T1/2=45.6 min; Emax=5.87 MeV)，在同样的吸收剂量前提下，<sup>213</sup>Bi-DOTATOC降低胰腺癌细胞存活率比<sup>177</sup>Lu-DOTATOC更有效<sup>[16]</sup>。

<sup>90</sup>Y、<sup>177</sup>Lu是目前用于受体靶向放射多肽治疗的最佳放射性核素。主要治疗的病种包括不摄取<sup>131</sup>I的分化型甲状腺癌转移灶、Hurthle细胞甲状腺癌、甲状腺髓样癌、来自胃肠胰的神经内分泌肿瘤、小细胞癌、嗜铬细胞瘤等<sup>[18]</sup>。

#### 4.2 间碘苄胍

<sup>131</sup>I -MIBG(<sup>131</sup>I -间碘苄胍)：间碘苄胍为肾上腺结构类似物，可与肾上腺素能受体结合而用来治疗高度表达此类受体的肿瘤细胞，恶性嗜铬细胞瘤、嗜铬细胞瘤转移灶、神经母细胞瘤交感神经节神经细胞瘤，以及有浓聚<sup>131</sup>I -MIBG功能的甲状腺髓样癌和类癌均可考虑<sup>131</sup>I -MIBG治疗。

### 5 基因辅助放射性核素靶向治疗

#### 5.1 肿瘤相关抗原或肿瘤特异抗原基因辅助

放射免疫治疗的一个障碍就是肿瘤细胞表面抗原呈递水平低，通过转移编码肿瘤抗原决定簇的基因诱导肿瘤细胞表达高浓度的与放射性核素标记的单抗结合的抗原可提高肿瘤治疗效果。

放射性核素标记的癌胚抗原(CEA)的单克隆抗体已广泛应用于多种肿瘤的实验，临床诊断和治疗。Raben<sup>[19]</sup>等体外研究发现，腺病毒介导的CEA基因转入不表达CEA的肿瘤，结果导致肿瘤细胞可与放射性核素标记的CEA单抗结合的CEA高表达。Stackhouse<sup>[20]</sup>等研究发现，以erb-2或MUC1为启动子连同GPR基因转移后，许多种肿瘤细胞过度表达GPR，在GPR限制表达的人乳腺癌及胆管癌取得较好的效果。

#### 5.2 受体基因辅助

与抗体介导的靶向治疗相比，配体介导的有其独特的优点：分子量小，渗透性高，无免疫原性，高选择性，高稳定性。

##### 5.2.1 生长抑素受体基因(SSTR)

Rogers<sup>[21]</sup>等体内外研究发现，通过重组腺病毒转移hSSTR2基因入小细胞肺癌A472及卵巢癌可诱导产生与<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-octreotide特异结合hSSTR2，增加靶组织辐射剂量，肾脏是<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-octreotide代谢清除的主要器官，辐射

剂量大, 通过给予一定量的左旋赖氨酸降低肾脏的辐射剂量。

### 5.2.2 钠-碘同向转运体钠 (NIS) 基因

NIS除在甲状腺组织表达外, 在一些非甲状腺组织如唾液腺, 泪腺, 胃黏膜, 肾脏, 胎盘及乳腺等也表达NIS mRNA和蛋白, 超过80%的乳腺癌表达NIS, 对乳腺癌的治疗提供了一条新策略。动物体内外实验表明, NIS基因载入有望成为多种非甲状腺组织来源癌治疗手段, 外源性NIS的导入能增加肿瘤细胞对 $^{131}\text{I}$ 摄取.但NIS的表达增加 $^{131}\text{I}$ 的摄取同时也会加快 $^{131}\text{I}$ 的溢出, 缩短 $^{131}\text{I}$ 在肿瘤细胞的滞留时间, 降低疗效<sup>[22]</sup>。

Zhang,L<sup>[23]</sup>等体内外研究发现, 与单纯载体入NIS基因相比, 同时载入NIS基因与TPO基因, 可以增加非小细胞肺癌细胞 $^{131}\text{I}$ 滞留时间, 显著的诱导细胞的凋亡, 经NIS/TPO改良的NSCLC预先用碘孵育后可通过电离辐射的旁观者效应产生杀癌效应, 增加癌细胞的杀伤, 旁观者效应与增加细胞间缝隙连接活性及缝隙连接蛋白43有关, 碘可能是联合基因治疗模式中显著提高放射治疗的强化因子。但Achim Wenzel<sup>[24]</sup>等研究认为TPO基因转染合并NIS表达的甲状腺癌细胞并不显著引起碘的聚集增加, 碘的聚集不依赖NIS基因的表达, 而是与TPO表达有关。亦有研究发现TPO/NIS基因一起载入宫颈癌细胞,  $^{131}\text{I}$ 在细胞内半排期未见明显差异。 $^{188}\text{Rhenium}$  ( $^{188}\text{Re}$ )是technetium (Tc) 的结构类似物, 能被NIS转运, 可行性研究发现, 表达NIS的乳腺癌细胞摄取 $^{188}\text{Re-perrhenate}$ 与 $^{131}\text{I}$ , 前者的辐射剂量是后者4.5倍<sup>[25]</sup>,  $^{188}\text{Re}$ 对于低碘滞留的肿瘤有代替 $^{131}\text{I}$ 的希望。

### 5.2.3 去甲肾上腺素转运体 (noradrenaline transporter, NAT) 基因

$^{131}\text{I}$ -MIBG是最佳的放射性靶向治疗试剂之一, 但只有少数几种肿瘤表达NAT, 因此限制了其的应用, 研究发现, 在不表达NAT转运体的人恶性胶质细胞瘤转染NAT基因后, 细胞摄取 $^{131}\text{I}$ -MIBG的能力增强至少50倍<sup>[26]</sup>。膀胱癌占男性恶性肿瘤发病率第四位, 在女性排第八位, 90%的膀胱癌为移行上皮细胞癌, 对膀胱癌的治疗方式主要是根治性膀胱切除术和放疗根治术, 前者会使患者生活质量下降, 后者照射剂量大对周围正常组织产生损伤, 70%的病人会发生急性膀胱自限及肠道并发症, 50%的患者晚期并发膀胱挛缩, 尿路刺激, 出血性膀胱炎<sup>[27]</sup>。通过使用结合有亲肿瘤药物的放射性核素能选择性辐射病灶及旁观者效应, 增强对病灶组织的杀伤同时减轻周围正常组织的损伤, 降低复发率, 提高疗效。活体外研究发现<sup>[28]</sup>: 膀胱癌EJ138通过CMV,TR (human telomerase RNA, hTR),启动子转染NAT基因可

使EJ138主动摄取<sup>131</sup>I-MIBG, 呈现剂量依赖性的杀伤效应, 以端粒末端转移酶启动子CMV/hTR或人端粒末端转移酶逆转录酶 telomerase reverse transcriptase, hTERT), 对膀胱癌EJ138转染NAT基因后, EJ138主动摄取<sup>131</sup>I-MIBG, 呈现剂量依赖性细胞杀伤, 此措施有望成为膀胱癌的一种新的治疗方法。

5.3 针对原癌基因异常, 采用反义寡核苷酸, 反义RNA 或Ribozyme等治疗策略。反义寡核苷酸通过碱基互补和降解抑制活化的致癌基因的表达, 它是临床治疗恶性肿瘤的有潜力的因子

<sup>90</sup>Y-Bn-EDTA-磷硫酰反义寡核苷酸 (<sup>90</sup>Y-Bn-EDTA-phosphorothioate antisense oligonucleotide, <sup>90</sup>Y-Bn-EDTA-PAO) 标记后不损伤杂交特性, 稳定性好, 标记3 h 放化纯度后100±0.0%, 72 h 达98.7±0.4%, 正常人血浆孵育72h后90.3 ±0.9%, 相对稳定<sup>[29]</sup>。血浆孵育72h电泳发现宽的电泳迁移, AO可能结合血浆和组织的蛋白, 特别是成纤维细胞生长因子和血管内皮生长因子<sup>[30]</sup>。动物实验发现反义寡核苷酸会引起一些副作用如低血压, 静脉注射后抗凝效应, 呈现剂量依赖性<sup>[31]</sup>, <sup>90</sup>Y-Bn-EDTA-PAO有望降低AO治疗剂量, 降低其毒副作用<sup>[29]</sup>, 减低毒性。AO作为治疗剂, 应用的最重要的问题就是为多聚阴离子, 具有不易透过细胞膜、细胞难于吸收、胞内积累少等特点, 并且在转运过程中还易被核酶降解。阳离子脂质体(cationic liposomes)通过静电作用与反义寡核苷酸结合成聚合物, 载带核酸的脂质体可以抵御核酸酶的水解, 延缓反义寡核苷酸的降解, 安全可靠。脂质体作为一种载体具有制备简单、材料无毒性、无免疫原性和运载量大等特点。阳离子脂质体本身就具有一定的靶向性, 具体机制还不十分清楚, Nakanishi等<sup>[32]</sup>认为复合体与细胞膜结合后通过内吞方式进入细胞。Win-Ping Deng<sup>[33]</sup>等用放射性核素<sup>111</sup>In和<sup>177</sup>Lu-labeled的脂质体静脉注射裸鼠BALB/cByJ (结肠直肠癌, colorectal cancer CT-26 cells ,CT-26) 后, 血浆放射性从1 h 23.14%ID/g 至72 h降低至0.027%ID/g, 血浆半衰期10.2h, 肿瘤靶区浓聚放射性48h达到高峰。两种放射性脂质体有相似的血浆清除率和生物分布, 且靶与非靶辐射剂量比, <sup>177</sup>Lu比<sup>111</sup>In-labeled-脂质体高四倍。国外许多研究显示FA-PEG-脂质体靶向性高, 有可能成为体内靶向治疗肿瘤良好的载体。通过连接靶向性配体有望提高放射性核素标记的反义寡核苷酸治疗效果。Wang<sup>[34]</sup>等研究发现, 包裹反义寡核苷酸的叶酸-PEG-脂质体, 就每一叶酸携带的反义寡核苷酸而言, 叶酸脂质体更具有靶向性。

## 结论

放射性核素靶向治疗主要涉及寻找合适的载体以达到对肿瘤特异性杀伤,降低对周围正常组织的损伤。治疗的目的是杀灭全身播散的肿瘤而不损伤正常组织,对于非实体瘤放射性核素靶向治疗效果明显,对于实体瘤治疗体积较小者效果较好,体积大者效果较差,因此放射性核素靶向治疗仍不能作为治疗肿瘤单一的手段,应联合其他的治疗方式以达到最佳的治疗效果。以抗体介导的放射性核素靶向治疗在血液系统的恶性病变如B淋巴瘤有显著疗效,但抗体本身具有一定的弊端,如鼠源性(HAMA),分子量大(向组织渗透能力低),特异性相对低(靶/非靶比值低)等,随着人源化的抗体,单链抗体,单链多价抗体等的出现,由抗体介导的放射性核素靶向治疗效果有所提高,寻找更高特异性的抗体也是未来医学研究领域的一个方向。以配体作为靶头目前研究较多的是放射性核素标记的小分子多肽生长抑素,其治疗神经内分泌起源的肿瘤疗效较好。众多的研究虽然提示了辅助基因转染可增强放射性核素靶向治疗的效果,但是基因转染技术高,效率低,特异导向癌细胞能力低,而且由病毒载体转染存在风险,脂质体作为新颖的载体,它具有生物相容性,具有一定的靶向性,通过脂质体载带治疗性药物对于肿瘤治疗方面将是一大突破,但脂质体介导的基因转染效率低,因此基因辅助核素靶向治疗的胜利仍然需要众多人员进一步的研究,随着基因转染领域的发展,必将极大地推动核素靶向治疗肿瘤疗效。

## 参考文献

- [1] Sabrina M. Coelho<sup>1</sup>, Mário Vaisman<sup>1</sup>, et al. Tumour Re-Differentiation Effect of Retinoic Acid: A Novel Therapeutic Approach for Advanced Thyroid Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 2005, 11: 2525-2531.
- [2] C.H. Baker and J.C. Morris. The Sodium-Iodide Symporter. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 2004, 4, 167-174.
- [3] C.H. Baker and J.C. Morris, The Sodium-Iodide Symporter, *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 2004, 4, 167-174.
- [4] Robinson RG, Preston DF, Spicer JA, et al. Radionuclide therapy of intractable bone pain: Emphasis on strontium-89[J]. *Semin Nucl Med*, 1992, 22(1): 28—32.
- [5] 张智勇, 吴晓凤, 宋惠宁. <sup>89</sup> Sr治疗骨转移瘤的临床观察, 西北国防医学杂志

- (Med J NDFNC) 2005 Aug;26(4).
- [6] Dafermou A, Colamussi P, Gigami M, et al. A multicentre observational study of radionuclide therapy in patients with distant bone metastases of prostate cancer. *Eur J Nucl Med* 2001;28:788-798.
- [7] 邓侯富. 放射性药物治疗骨肿瘤的现状[J]. 国外医学放射医学核医学分册, 1992, 16:121-122
- [8] 陈志军, 周爱清, 马涛, 王雷琴, 邬海燕.  $^{153}\text{Sm}$ -EDTMP与  $\text{SrCl}_2$ 治疗骨转移瘤疗效比较, 江西医学院学报 2006, 46(1):59-61
- [9] 陈立波, 朱瑞森. Bexxar治疗非霍奇金淋巴瘤的研究现状. 国外医学. 放射医学核医学分册. 2005, 29(2):67-70
- [10] Roger M. Macklis M.D. Brad Pohlman M.D. Radioimmunotherapy for non-Hodgkin's lymphoma: A review for radiation oncologists
- [11] 李因, 林保和等. CD20阳性B细胞NHL  $^{131}\text{I}$ -美罗华放射免疫治疗剂量个体化的临床研究. *Journal of Isotopes*, 2004, 17(4):204-208
- [12] Juweid ME, Hajjar G, Swayne LC, et al. Phase I / II trial of  $^{131}\text{I}$ -MN-1 4F(ab) $_2$ : anti carcinoembryonic antigen monoclonal antibody in the treatment of patients with metastatic medullary thyroid carcinoma[J]. *Cancer*, 1999, 85(6):1828—1842
- [13] Yamamoto, A. Sawada, T. Yamashita, et al. Radioimmunotherapy of orthotopically transplanted pancreatic cancer with  $^{131}\text{I}$ -labeled chimeric monoclonal antibody Nd2. *Oncology Reports*. 6(1):179-84, 1999 Jan-Feb
- [14] A. T. M. Vaughan, A. R. Bradwell, P. W. Dykes and P. Anderson. Illusions of tumour killing using radiolabelled antibodies, *The Lancet*, Volume 327, Issue 8496, 28 June 1986, Pages 1492-1493
- [15] Ko AH, Tempero MA. Treatment of metastatic pancreatic cancer. *J Natl Compr Cancer Netw* 2005;3:627-36
- [16] Robert W. Atchard, Michael G. Stabinc, et al. Somatostatin-receptor-targeted  $\alpha$ -emitting  $^{213}\text{Bi}$  is therapeutically more effective than  $\beta$ -emitting  $^{177}\text{Lu}$  in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Nuclear Medicine and Biology* 34 (2007):185-193
- [17] De Jong M, Breeman WA, Bernard BF, Bakker WH, Schaar M, VanGameren A, et

- al. [ $^{177}\text{Lu}$ -DOTA0,Tyr3] octreotate for somatostatinreceptor-targeted radionuclide therapy. *Int J Cancer* 2001;92:628– 633
- [18]马寄晓, 叶大铸. 奥曲肽及其类似物用于肿瘤治疗的进展, 国外医学. 放射医学核医学分册 2005, 29 (2) : 79-83
- [19]David Raben, Murray Stackhouse, Donald J. Buchsbaum, Galeena Mikheeva, M. B. Khazaeli, et al. 2207 Genetic induction of the gastrin releasing peptide receptor on tumor cells for radiolabeled peptide binding ,*International Journal of Radiation Oncology\*Biolog\*Physics*, Volume 36, Issue 1, Supplement 1, 1996, Page 378
- [20]Stackhouse MA. Buchsbaum DJ. Kancharla SR. Specific membrane receptor gene expression targeted with radiolabeled peptide employing the erbB-2 and DF3 promoter elements in adenoviral vectors. *Cancer Gene Therapy*. 6(3):209-19, 1999 May-Jun.
- [21] Buck E. Rogers, Donald J. Buchsbaum, Richard L. Kirkman,et al. In Vivo Localization of [ $^{111}\text{In}$ ]-DTPA-D-Phe1-Octreotide to HumanOvarian Tumor Xenografts Induced to Express the SomatostatinReceptor Subtype 2 Using an Adenoviral Vector1. *Clinical Cancer Research*, Vol( 5): 383–393, 1999 February
- [22] H. Shimura, K. Haraguchi, A. Miyazaki, T. Endo, T. Onaya, Iodide uptake and experimental  $^{131}\text{I}$ - therapy in transplanted undifferentiatedthyroid cancer cells expressing the Na/I- symporter gene,*Endocrinology* 138 (1997): 4493–4496
- [23] Zhang, L. Sharma, S. Hershman, J. M.Iodide sensitizes genetically modified non-small cell lung cancer cells to ionizing radiation *Cancer Gene Therapy*; Jan2006, 13 (1) , p74-81
- [24] Achim Wenzel , Geeta Upadhyay , Thomas L. Schmitt and Ulrich Loos, Iodination of proteins in TPO transfected thyroid cancer cells is independent of NIS. *Molecular & Cellular Endocrinology*. 213(1):99-108, 2003 ,Dec 31
- [25] Dadachova E. Bouzahzah B. Zuckier LS. Pestell RG. Rhenium-188 as an alternative to Iodine-131 for treatment of breast tumors expressing the sodium/iodide symporter (NIS). *Nuclear Medicine & Biology*. 29(1):13-18, 2002 Jan
- [26] Boyd M. Cunningham SH. Brown MM. Mairs RJ. Wheldon TE. Noradrenaline

- transporter gene transfer for radiation cell kill by  $^{131}\text{I}$  meta-iodobenzylguanidine. [J]. Research Support, Non-U.S. Gov't, Gene Therapy. 6(6):1147-52, 1999 Jun
- [27] Sengelov L, von der Maase H. Radiotherapy in bladder cancer. *Radiother Oncol* 1999;52(1):1-14
- [28] Lesley Wilsona, Marie Boyd, et al. Application of Targeted Radiotherapy/ Gene Therapy to Bladder Cancer Cell Lines. *European Urology* 47 (2005) 250-256
- [29] Shuji Tanada, Hajime Murata, Yasuhito Sasaki, et al. Labeling of Phosphorothioate Antisense Oligonucleotides with Yttrium-90, *Nuclear Medicine & Biology*, Vol. 26, 239-243, 1999
- [30] Guvakova M. A., Yakubov L. A., Vlodavsky I., Tonkinson J. L. and Stein C. A. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix. [J]. *Biol. Chem.* 1995, 270, 2620-2627
- [31] Ho P. T. C. and Parkinson D. R. Antisense oligonucleotides as therapeutics for malignant diseases. *Semin. Oncol*, 1997, 24, 187-202
- [32] Nakanishi M, Noguchi A. Confocal and probe microscopy to study gene transfection mediated by cationic liposomes with a cationic cholesterol derivative [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 52(3):197-207
- [33] Win-Ping Deng, Hsin-El Wang, Hung-Man Yu, et al. Internal radiotherapy and dosimetric study for  $^{111}\text{In}/^{177}\text{Lu}$ -pegylated liposomes conjugates in tumor-bearing mice, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 569 (2006); 533-537
- [34] S Wang, RJ Lee, G Cauchon, et al. Delivery of Antisense Oligodeoxyribonucleotides Against the Human Epidermal Growth Factor Receptor into Cultured KB Cells with Liposomes Conjugated to Folate via Polyethylene Glycol, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92(8), 3318-3322

## 在校期间已发表或即将发表的文章

1、《同位素》2008年5月

$^{125}\text{I}$  标记紫杉醇的方法

汪梅花、许玉杰、王宗站、刘敏、李智慧、翁婉雯、范我

2、《苏州大学学报 2007 哲学社会科学版研究生论文集（下）》

$^{125}\text{I}$  标记紫杉醇的方法学研究

汪梅花、许玉杰

3、《肿瘤》

紫杉醇纳米粒子作用 KB/SKOV3 细胞的抑制作用

王宗站、许玉杰、汪梅花、刘敏、李智慧、翁婉雯、张刘珍

## 致 谢

首先感谢导师许玉杰副教授三年来的谆谆教导。三年来，许老师不仅给我们创造了十分优越的实验条件，而且在实验选题、实验设计、实验进程以及论文写作等环节都给予悉心指导。许老师严谨的治学态度、惊人的敬业精神、渊博的专业知识、活跃的学术思维、诲人不倦的风范和宽以待人的胸襟给我留下了深刻的印象，并将使我受益终生。衷心感谢导师在学习、工作、生活等各方面给予我的关心和照顾。

本课题的完成得到了放射医学与公共卫生学院各位领导和老师的关怀和支持。三年来，童建院长、陆思东书记、涂曦副院长、缪世林副院长、钟宏良老师、朱本兴老师、段蓉芳老师、戴建英老师等自始至终都给予了我热情的帮助和培养，感谢学院给我创造了温馨的环境！

在论文完成的过程中，基础核医学教研室和中心实验室的范我研究员、王畅副教授、朱然讲师、张友九副研究员、刘敏老师、张保国研究员、洪承皎老师、胡明江老师、万建美老师、王道锦老师以及蚌埠医学院核医学教研室主任孙俊杰老师等都对我的科研设计、实验过程进行了具体的指导与帮助，在此表示衷心感谢！

衷心感谢刘芬菊教授、曹建平教授、文万信研究员等对我的热心帮助和指导。

感谢俞泽阳博士，王宗站、翁婉雯、张刘珍、李智慧、王永青、李栋庆硕士给予的支持和帮助。

最后，对在百忙之中精心审阅论文的各位评委和老师致以最诚挚的谢意！

# 叶酸靶向紫杉醇纳米脂质体的制备及其生物学效应的研究



作者：[汪梅花](#)  
学位授予单位：[苏州大学](#)

本文链接：[http://d.g.wanfangdata.com.cn/Thesis\\_Y1296729.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Thesis_Y1296729.aspx)