

2种超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子的制备及其对大鼠肺部的急性毒性效应

田明达, 罗 聪, 朱朝敏, 龚梦嘉, 谢鸿蒙, 毕 杨

(重庆医科大学附属儿童医院、儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:分别制备壳聚糖和油酸钠修饰的超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子(superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs), 并探讨其对大鼠肺部的急性毒性效应。**方法:**采用化学共沉淀法制备壳聚糖和油酸钠修饰的 SPIONs 并对其进行表征。将 54 只 SD 大鼠随机分为生理盐水对照组($n=18$)、壳聚糖 SPIONs 组($n=18$)和油酸钠 SPIONs 组($n=18$)。口腔内气管插管给药, 对大鼠的一般情况进行观察, 分别于给药后 24、72 h 和第 14 天随机处死每组中 6 只大鼠, 腹腔静脉取血检测主要血生化指标, 取支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF), 计数细胞总数和中性粒细胞的数量, HE 染色观察肺部的病理改变。**结果:**(1)制备的 SPIONs 均为 30 nm 左右的类球形结晶。(2)大鼠一般情况好, 未发生死亡。(3)2 实验组血清中的主要血生化指标仅有 24 h 总蛋白(total protein, TP)含量和 14 d 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)含量 2 项指标与正常对照组有差异[TP(g/L) 24 h 组:壳聚糖 SPIONs 组($n=6$): 62.40 ± 3.60 , 油酸钠 SPIONs 组($n=6$): 69.95 ± 5.16 , 正常对照组($n=6$): 63.22 ± 2.55 , $F=6.344$, $P=0.010$; ALP(u/L) 14 d 组:壳聚糖 SPIONs 组($n=6$): 78.83 ± 7.92 , 油酸钠 SPIONs 组($n=6$): 106.83 ± 26.95 , 正常对照组($n=6$): 99.85 ± 9.63 , $F=4.336$, $P=0.033$)]。(4)实验组 BALF 中的细胞总数($\times 10^4$ 个)在 24 h 和 72 h 均高于正常对照组(壳聚糖 SPIONs 24 h 组($n=6$): 780.00 ± 130.58 , 油酸钠 SPIONs 24 h 组($n=6$): $1\ 000.00 \pm 166.85$, 正常对照 24 h 组($n=6$): 498.33 ± 114.75 , $F=19.605$, $P=0.000$; 壳聚糖 SPIONs 72 h 组($n=6$): 809.17 ± 197.49 , 油酸钠 SPIONs 72 h 组($n=6$): 920.00 ± 125.54 , 正常对照 72 h 组($n=6$): 580.00 ± 123.29 , $F=7.735$, $P=0.005$), 且油酸钠 SPIONs 组明显高于壳聚糖 SPIONs 组, 在 14 d 时均下降(壳聚糖 SPIONs 14 d 组($n=6$): 628.33 ± 133.29 , 油酸钠 SPIONs 14 d 组($n=6$): 654.17 ± 99.27 , 正常对照 14 d 组($n=6$): 570.83 ± 94.15 , $F=0.898$, $P=0.428$)。 (5)实验组 BALF 中中性粒细胞的数量($\times 10^4$ 个)在 24 h 和 72 h 均高于正常对照组(壳聚糖 SPIONs 24 h 组($n=6$): 45.00 ± 14.12 , 油酸钠 SPIONs 24 h 组($n=6$): 90.00 ± 24.50 , 正常对照 24 h 组($n=6$): 1.02 ± 0.33 , $F=44.565$, $P=0.000$; 壳聚糖 SPIONs 72 h 组($n=6$): 9.15 ± 8.82 , 油酸钠 SPIONs 72 h 组($n=6$): 19.17 ± 5.38 , 正常对照 72 h 组($n=6$): 1.09 ± 0.57 , $F=13.791$, $P=0.000$), 且油酸钠 SPIONs 组明显高于壳聚糖 SPIONs 组, 在 14 d 时下降至接近正常。(6)实验组的肺部 HE 染色可以明显看到肺泡断裂, 肺泡壁增厚, 炎症细胞浸润, 油酸钠 SPIONs 组炎症表现更严重。壳聚糖 SPIONs 组肺损伤有自我修复的趋势, 而油酸钠 SPIONs 组减轻不明显。**结论:**壳聚糖 SPIONs 与油酸钠 SPIONs 相比, 对肺部毒性作用小, 并且随着时间的延长, 毒性效应逐渐减轻。

【关键词】超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子; 壳聚糖; 油酸钠; 肺部毒性**【中图分类号】**R965.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-11-13

Preparation of two kinds of superparamagnetic iron oxide nanoparticles and their acute toxicity to rat lungs

Tian Mingda, Luo Cong, Zhu Chaomin, Gong Mengjia, Xie Hongmeng, Bi Yang

(Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To prepare superparamagnetic iron oxide nanoparticles(SPIONs) modified by chitosan and sodium oleate and to

作者介绍: 田明达, Email: tian_mingda@126.com,

研究方向: 肺结核的靶向治疗。

通信作者: 罗 聪, Email: lucong919@sohu.com。

基金项目: 重庆市科委重点资助项目(编号: CSTS2011ggB1004);

重庆市卫生局面上资助项目(编号: 渝卫科教[2012]33 号-

2012-2-113)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000277.html>investigate their acute lung toxicity. **Methods:** The SPIONs were prepared by coprecipitation and their properties were measured. Fifty-four SD rats were divided into three groups randomly: control group($n=18$), chitosan-SPIONs group($n=18$) and sodium oleate-SPIONs group($n=18$). The rats were exposed to SPIONs by intratracheal instillation. General condition of the rats was observed. Six rats of each group were killed randomly at

24 h, 72 h and 14 d after the exposure. The major blood biochemical indicators were analyzed with an automatic biochemical analyzer. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was taken and the total cells and neutrophil cells were counted. The pathological changes of lungs were observed with HE staining. **Results:** ①Both of the SPIONs exhibited structure of spherical crystallization with a diameter of 30 nm. ②The normal situation of rats was good and no rat died; ③Only two blood biochemical indicators including total protein (TP) of 24 h and alkaline phosphatase (ALP) of 14 d were different from those of control group (TP (g/L) 24 h group: chitosan-SPIONs group ($n=6$): 62.40 ± 3.60 , sodium oleate-SPIONs group ($n=6$): 69.95 ± 5.16 , control group ($n=6$): 63.22 ± 2.55 , $F=6.344$, $P=0.010$; ALP (u/L) 14 d group: chitosan-SPIONs group ($n=6$): 78.83 ± 7.92 , sodium oleate-SPIONs group ($n=6$): 106.83 ± 26.95 , control group ($n=6$): 99.85 ± 9.63 , $F=4.336$, $P=0.033$). ④Total cells ($\times 10^4$) in BALF of experimental groups were higher than those in control group at 24 h and 72 h and total cells of sodium oleate-SPIONs group were obviously higher than those of chitosan-SPIONs group (chitosan-SPIONs 24 h group ($n=6$): 780.00 ± 130.58 , sodium oleate-SPIONs 24 h group ($n=6$): $1\ 000.00 \pm 166.85$, control 24 h group ($n=6$): 498.33 ± 114.75 , $F=19.605$, $P=0.000$; chitosan-SPIONs 72 h group ($n=6$): 809.17 ± 197.49 , sodium oleate-SPIONs 72 h group ($n=6$): 920.00 ± 125.54 , control 72 h group ($n=6$): 580.00 ± 123.29 , $F=7.735$, $P=0.005$). Both of them were decreased to normal on 14 d (chitosan-SPIONs group ($n=6$): 628.33 ± 133.29 , sodium oleate-SPIONs group ($n=6$): 654.17 ± 99.27 , control group ($n=6$): 570.83 ± 94.15 , $F=0.898$, $P=0.428$). ⑤Neutrophil cells ($\times 10^4$) in BALF of experimental groups were higher than those of control group at 24 h and 72 h (chitosan-SPIONs 24 h group ($n=6$): 45.00 ± 14.12 , sodium oleate-SPIONs 24 h group ($n=6$): 90.00 ± 24.50 , control 24 h group ($n=6$): 1.02 ± 0.33 , $F=44.565$, $P=0.000$; chitosan-SPIONs 72 h group ($n=6$): 9.15 ± 8.82 , sodium oleate-SPIONs 72 h group ($n=6$): 19.17 ± 5.38 , control 72 h group ($n=6$): 1.09 ± 0.57 , $F=13.791$, $P=0.000$). Neutrophil cells in BALF were more in sodium oleate-SPIONs group than in chitosan-SPIONs group. ⑥HE staining showed the fracture of pulmonary alveoli, thickening of alveolar walls, and inflammatory cell infiltration in the experimental groups which were more serious in sodium oleate-SPIONs group than in chitosan-SPIONs group. **Conclusion:** Chitosan modified SPIONs have less toxicity to the rats' lungs than sodium oleate modified SPIONs and their lung toxicity reduces over time.

【Key words】superparamagnetic iron oxide nanoparticles; chitosan; sodium oleate; lung toxicity

疾病的靶向治疗一直是人们研究的热点, 药物靶向治疗可以使药物直接作用于靶点, 因此对于区域特定的疾病如癌症等有很好的作用^[1]。超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子 (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs) 是目前经美国食品和药品管理局批准的少数几种可以应用于临床的纳米粒子中的一员^[2]。它所具有的超顺磁性使其在 MRI 成像、药物靶向传递系统等方面有着广泛的应用前景^[3-4]。2007 年 *Nature* 一篇名为 *Magnetic Nanoparticles Hit the Target* 的文章^[5]阐述了磁性气雾吸入肺部靶向治疗肺部肿瘤等疾病在将来临床应用中的可行性。SPIONs 作为靶向治疗的载体, 它的生物相容性一直是人们关注的问题^[6]。人们进行了大量 SPIONs 的体外毒性实验^[7-8], 体内毒性实验很多是通过灌胃或者是静脉注射给药, 关于 SPIONs 经肺部直接给药后对肺部产生的毒性作用的报道很少。

本实验通过化学共沉淀法合成壳聚糖和油酸钠修饰的 2 种 SPIONs, 通过非暴露式口腔内气管插管肺部给药后比较它们对肺部产生的急性毒性作用, 为后期的肺部靶向给药研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

数控可调搅拌器 (IKA RW 20 digital), DENVER INSTRUMENT 电子天平 (北京赛多利斯仪器系列有限公司), RISE-2008 型激光衍射粒度分析仪 (济南润之科技有限公司), Hitachi-600 型透射电镜 (transmission electron microscope, TEM, 日本日立公司)。BMJ-B 型包埋机、BMJ-B 型病理组织包埋冷冻台、Leica 2065 石蜡切片机、PHT-III 漂烤仪 (常州市中威电子仪器有限公司), 倒置显微镜 (ECLIPSE Ti-s, Nikon), 全自动血生化分析仪, MicroSprayer® Aerosolizer-Model IA-1B (PennCentury), $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (天津光复精细化工研究所), 氢氧化钠 (成都市科龙化工试剂厂), 冰醋酸 (重庆川东化工集团有限公司化学试剂厂, AR), 壳聚糖 (青岛市桓台县金湖甲壳制品公司) (食品级) (平均分子量: 12 万), 油酸钠 (中国医药上海化学试剂公司), 瑞姬氏染液 (南京建成生物技术研究所), HE 染色试剂由实验室自备。

1.2 方法

1.2.1 SPIONs 的制备

1.2.1.1 壳聚糖 SPIONs 的制备 称取 3.92 g (0.02 mol) $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 9.64 g (0.04 mol) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于 50 ml 水中, 配置为 A 液。以 1% 的乙酸为溶剂, 配制 1% 的壳聚糖乙酸溶液, 与 A 液混合后移至三颈瓶中, 通氮气保护, 搅拌加热至 55 °C 后快

速搅拌下滴入 50 ml 6 mol/L 的 NaOH 溶液。降低搅拌速度, 85 ℃ 水浴 1 h, 制成超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒混悬液, 双蒸水洗涤 3 次后重悬于 20 ml 1% 的壳聚糖乙酸溶液中, 搅拌 30 min, 双蒸水洗涤至中性, 冻干后 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.1.2 油酸钠 SPIONs 的制备 将 50 ml A 液, 加入 50 ml 3% 的油酸钠溶液配成 B 液, 将 50 ml 6 mol/L 的 NaOH 与 50 ml 3% 的油酸钠溶液混合, 搅拌至澄清, 为 C 液, 将 B 液移入三颈瓶中, 通氮气保护, 搅拌加热至 55 ℃ 后快速搅拌下滴入 C 液, 降低搅拌速度, 85 ℃ 水浴 1 h, 制成超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒混悬液, 双蒸水洗涤 3 次后重悬于 50 ml 1% 的油酸钠溶液中, 超声处理 30 min, 双蒸水洗涤至中性, 冻干后 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 SPIONs 的表征 激光衍射粒度分析仪、TEM 分别表征 SPIONs 的粒径大小和形状。

1.2.3 SPIONs 染毒液的制备 将制备的 SPIONs 用生理盐水配制成 10 mg/ml 的颗粒悬液, 经振荡混悬后, 超声处理 1 min (每次 6 s, 间隔 10 s), 0.45 μm 滤膜过滤除菌, 4 ℃ 保存。

1.2.4 实验动物分组及处理 实验动物选择健康 SPF 级 SD 雄性大鼠 54 只, 体质量为 160~180 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 饲养于重庆医科大学实验动物中心 SPF 级动物房, 温度为 20 ℃, 相对湿度为 45%, 昼夜均为 12 h。将大鼠随机分为 3 组, 分别为生理盐水对照组、壳聚糖 SPIONs 组和油酸钠 SPIONs 组, 每组 18 只。大鼠经水合氯醛麻醉后, 采用 PennCentury 公司生产的微型喷雾器非暴露式气管内滴注法进行染毒, 隔日染毒 1 次, 每次 0.2 ml, 染毒 1 周 (共 4 次)。染毒期间, 动物可自由进食和饮水。分别于染毒结束后的 24、72 h 和 14 d 随机处死每组中的 6 只大鼠。

1.2.5 一般情况 每日观察并记录小鼠的饮食及活动情况, 有无腹泻、烦躁、嗜睡、死亡等。

1.2.6 大鼠血液生化指标的测定 腹腔静脉取血, 2 000 r/min, 离心 15 min, 吸取血清, 用 Beckman 全自动生化分析仪检测主要生化指标: 总蛋白 (total protein, TP)、白蛋白 (albumin, ALB)、球蛋白 (globulin, GLOB)、丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate transaminase, AST)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、尿素氮 (nitrogen, BUN)、肌酐 (creatinine, CREA)、尿酸 (uric acid, URCA)。

1.2.7 肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 的采集与细胞计数 水合氯醛麻醉下打开大鼠腹腔, 腹腔静脉取血, 用于血生化指标检测。腹主动脉放血处死大鼠后, 将胸腔打开, 剥离肺, 暴露气管, 结扎左肺, 在主气管处剪 1 个“v”形小切口, 插入灌洗针头, 结扎固定。用生理盐水作为灌洗液对右肺灌洗。将 37 ℃ 生理盐水缓慢注入肺内, 同时轻轻按摩胸壁, 然后缓慢抽出灌洗液。灌洗 2 次, 第 1 次注入 6 ml, 收集 3 ml, 第 2 次注入 3 ml, 收集 3 ml。BALF 以 2 500 r/min 离心 15 min, 弃上清, 沉淀用 1 ml PBS 重悬, 取 20 μl 用于细胞计数, 剩余的 1 500 r/min 离心, 弃上清, 沉淀涂片, 按照瑞姬氏染液的说明书染色, 细胞分类计数。

1.2.8 肺部组织病理学检测 取大鼠的左肺, 置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 常规脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色后, 在

光学显微镜下进行观察。

1.3 统计分析

使用 SPSS 19.0 软件进行处理, 所有数据均为计量资料, 实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间经方差齐性分析为齐性, 采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, Bonferroni 校正 *P* 值, 检验水准定为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 SPIONs 的表征

激光粒度分析仪及透射电镜检测可见壳聚糖 SPIONs 和油酸钠 SPIONs 均为粒径在 30 nm 左右的类球形结晶, 这是纳米粒具有超顺磁性的一个重要条件 (图 1)。

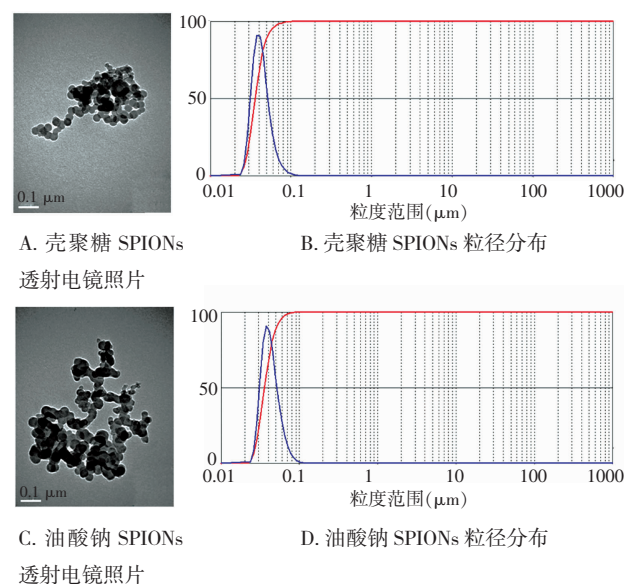


图 1 SPIONs 的表征

Fig.1 Properties of SPIONs

2.2 大鼠一般情况观察

肺部给药时大鼠出现呼吸急促伴喘鸣, 短时间症状即消失, 给药后均未发现大鼠死亡。壳聚糖 SPIONs 组第 2 次给药后, 有 2 只出现腹泻, 油酸钠 SPIONs 组给药 3 次后, 有 3 只大鼠出现神萎、烦躁, 2 只出现腹泻, 处死之前均恢复正常。

2.3 主要生化指标的观察

由表 1 可见, SPIONs 对大鼠主要生化指标的影响不明显, 壳聚糖 SPIONs 组和油酸钠 SPIONs 组的各项指标与对照组比较, 仅 24 h TP 含量、第 14 天 ALP 含量测定油酸钠 SPIONs 组高于正常对照组 ($F=6.344, P=0.010; F=4.336, P=0.033$)。

2.4 BALF 中细胞总数及中性粒细胞计数

如表 2 所示, 24 h 和 72 h 2 实验组的 BALF 中的细胞总数均明显高于对照组 ($F=19.605, P=0.000; F=7.735, P=0.005$), 且 24 h 时油酸钠 SPIONs 组亦明显高于壳聚糖 SPIONs 组, 第 14 天时壳聚糖 SPIONs 组与油酸钠 SPIONs 组 BALF 中的细胞总数均降低, 与正常对照组比较没有统计学差异 ($F=0.898, P=0.428$)。

表 1 各组大鼠主要血生化指标
Tab.1 Main blood biochemical indicators of rats

生化指标	时间	对照组 (n=18)	壳聚糖 SPIONs 组 (n=18)	油酸钠 SPIONs 组 (n=18)	F 值	P 值
TP(g/L)	24 h	63.22 ± 2.55	62.40 ± 3.60	69.95 ± 5.16 ^{ab}	6.344	0.010
	72 h	63.77 ± 1.73	66.32 ± 4.81	66.55 ± 4.13	0.994	0.393
	14 d	64.93 ± 2.24	68.40 ± 5.41	68.40 ± 6.74	0.904	0.426
ALB(g/L)	24 h	36.67 ± 1.54	35.82 ± 1.60	41.68 ± 3.54	10.370	0.001
	72 h	36.25 ± 36.25	39.30 ± 3.13	38.83 ± 2.30	2.481	0.117
	14 d	36.28 ± 2.03	38.97 ± 2.74	39.00 ± 3.23	1.982	0.172
GLOB(g/L)	24 h	16.07 ± 1.33	15.58 ± 2.57	18.97 ± 3.11	3.339	0.063
	72 h	16.17 ± 1.95	17.17 ± 1.60	17.72 ± 1.88	1.125	0.351
	14 d	15.93 ± 2.29	17.85 ± 2.88	18.42 ± 2.97	1.363	0.286
ALT(U/L)	24 h	42.06 ± 9.36	39.98 ± 6.04	43.92 ± 9.08	0.337	0.719
	72 h	43.58 ± 3.23	45.07 ± 9.83	42.98 ± 4.64	0.161	0.853
	14 d	41.42 ± 7.56	38.63 ± 4.44	40.30 ± 4.50	0.363	0.701
AST(U/L)	24 h	155.00 ± 7.01	157.82 ± 14.65	158.80 ± 14.65	0.146	0.865
	72 h	160.78 ± 14.09	161.90 ± 20.39	157.95 ± 16.93	0.083	0.921
	14 d	153.85 ± 10.29	156.55 ± 13.49	150.92 ± 3.44	0.477	0.630
ALP(U/L)	24 h	109.68 ± 21.77	94.05 ± 13.10	100.18 ± 21.70	1.000	0.391
	72 h	105.95 ± 4.66	114.70 ± 52.52	139.82 ± 47.09	1.113	0.354
	14 d	99.85 ± 9.63	78.83 ± 7.92	106.83 ± 26.95 ^b	4.336	0.033
BUN(mmol/L)	24 h	9.43 ± 2.36	6.90 ± 0.68	7.92 ± 3.51	1.587	0.237
	72 h	7.55 ± 0.97	5.74 ± 1.47 ^a	6.14 ± 1.36	3.296	0.065
	14 d	7.28 ± 0.98	6.77 ± 1.55	7.04 ± 1.98	0.166	0.848
CREA(μmol/L)	24 h	34.92 ± 6.22	35.32 ± 1.91	38.43 ± 6.44	0.795	0.470
	72 h	37.90 ± 5.25	33.08 ± 5.58	32.62 ± 3.20	2.232	0.142
	14 d	38.08 ± 6.48	34.98 ± 6.50	38.72 ± 5.54	0.625	0.549
URCA(μmol/L)	24 h	49.80 ± 9.95	47.45 ± 14.16	55.58 ± 13.34	0.661	0.531
	72 h	54.22 ± 6.39	49.20 ± 9.20	61.33 ± 9.01	3.238	0.068
	14 d	44.42 ± 8.99	53.90 ± 13.87	45.58 ± 3.69	1.680	0.220

注:a,实验组与正常对照组比较, $P<0.05$;b,油酸钠 SPIONs 组与壳聚糖 SPIONs 组比较, $P<0.05$

表 2 大鼠 BALF 中的细胞总数 (× 10⁴)
Tab.2 Total cell count in BALF of rats (× 10⁴ units)

处理时间	例数 (n)	对照组	壳聚糖 SPIONs 组	油酸钠 SPIONs 组	F 值	P 值
24 h	6	498.33 ± 114.75	780.00 ± 130.58 ^a	1 000.00 ± 166.85 ^{ab}	19.605	0.000
72 h	6	580.00 ± 123.29	809.17 ± 197.49 ^a	920.00 ± 125.54 ^a	7.735	0.005
14 d	6	570.83 ± 94.15	628.33 ± 133.29	654.17 ± 99.27	0.898	0.428

注:a,实验组与正常对照组比较, $P<0.05$;b,油酸钠 SPIONs 组与壳聚糖 SPIONs 组比较, $P<0.05$

表 3 大鼠 BALF 中的中性粒细胞计数 (× 10⁴)
Tab.3 Neutrophil cell count in BALF of rats (× 10⁴ units)

处理时间	例数 (n)	对照组	壳聚糖 SPIONs 组	油酸钠 SPIONs 组	F 值	P 值
24 h	6	1.02 ± 0.33	45.00 ± 14.12 ^a	90.00 ± 24.50 ^{ab}	44.565	0.000
72 h	6	1.09 ± 0.57	9.15 ± 8.82 ^a	19.17 ± 5.38 ^{ab}	13.791	0.000
14 d	6	1.03 ± 0.48	1.33 ± 1.51	6.26 ± 3.46 ^{ab}	10.746	0.001

注:a,实验组与正常对照组比较, $P<0.05$;b,油酸钠 SPIONs 组与壳聚糖 SPIONs 组比较, $P<0.05$

如表 3 所示,24 h 2 实验组的 BALF 中性粒细胞数量均明显高于对照组($F=44.565, P=0.000; F=13.791, P=0.000$),第 14 天时壳聚糖 SPIONs 组和油酸钠 SPIONs 组 BALF 中性粒细胞数量均下降,而油酸钠 SPIONs 组仍高于正常对照组和壳聚糖 SPIONs 组。

2.5 肺部病理切片

由图 2 可见,实验组可见明显肺泡断裂,肺泡壁增厚,炎症细胞浸润,且油酸钠 SPIONs 组比壳聚糖 SPIONs 组炎症表现更严重。壳聚糖 SPIONs 组肺部的损伤随着时间推移有逐渐减轻的趋势,而油酸钠 SPIONs 组减轻不明显。

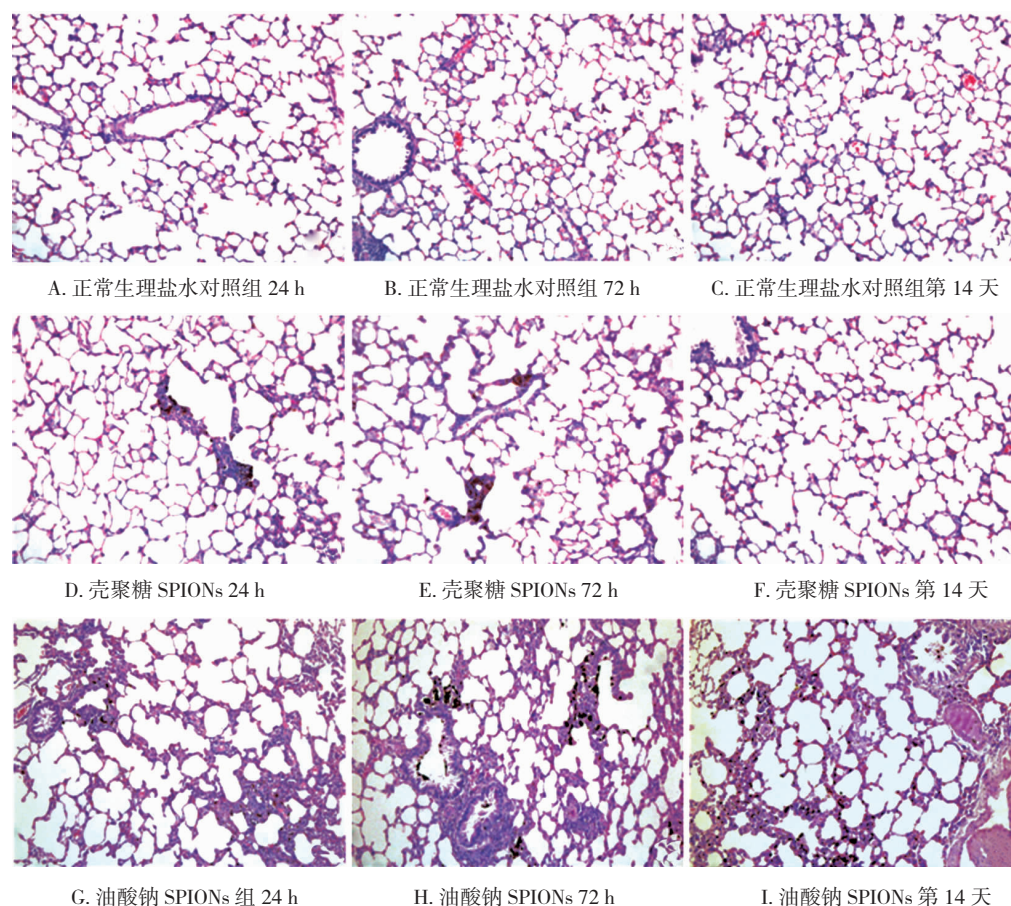


图 2 大鼠肺部病理切片 (倒置显微镜, 100 ×)

Fig.2 Pathological sections of rat lungs (inverted microscope, 100 ×)

3 讨论

目前呼吸道吸入给药已广泛应用于严重的肺部疾病如哮喘、慢性支气管炎、囊泡性纤维化等的治疗,并且关于肺癌化疗药物肺部给药的研究也越来越多,但是肺部疾病往往累及肺部的局部而不是整个肺部,因此肺部疾病的靶向治疗成为目前研究的热点^[9]。

纳米材料 SPIONs 使肺部靶向成为可能,它所具有的超顺磁性能够使其在静磁场作用下将携带的药物靶向到肺部的特定部位,从而达到靶向治疗的目的^[10]。本实验成功制备了壳聚糖和油酸钠修饰的 2 种 SPIONs,它们均为粒径在 30 nm 左右的类球形结晶,呈现超顺磁性,具有较强的磁响应性,因此可以作为后期肺部靶向治疗的载体。

肺部毒性实验多采用气管内滴注法,但是这种方式动物死亡率高并且药物的肺内分布不均匀^[11]。本实验采用 PennCentury 公司生产的微型喷雾器

MicroSprayer[®] Aerosolizer-Model IA-1B 给药,它的特有结构能够使其所喷出的液体成雾状分布,从而使药物在肺内均匀分布并且动物不容易死亡,提高了实验的准确性。

血液生化指标是检测纳米粒子动物毒性的一项有效的检测方法。张玉坤等^[12]检测了油酸钠 SPIONs 通过灌胃、腹腔注射和尾静脉注射 3 种方式给药昆明小鼠,检测血生化指标亦未发现明显变化,本实验中血液主要生化指标 24 h TP 含量和第 14 天 ALP 含量测定油酸钠 SPIONs 组高于正常对照组,对 *P* 值进行 Bonferroni 校正,非假阳性。24 h TP 含量升高说明肝功能正常,不说明油酸钠 SPIONs 对肝脏有毒性,第 14 天 ALP 含量测定油酸钠 SPIONs 组高于正常对照组,但是仅轻度升高,其他指标与正常对照组无明显差异,表明 2 种 SPIONs 对大鼠的肝肾功能没有明显影响。

由实验结果可以看到,实验组 BALF 中的细胞总数比正常对照组要高,可能由于 SPIONs 到达肺部后在肺内启动了呼吸道的清除机制包括纤毛的清

除作用、巨噬细胞介导的吞噬作用等,更多的巨噬细胞和中性粒细胞被调动到呼吸道参与清除外源纳米粒子的工作^[13],这也解释了本实验中为何观察到实验组中性粒细胞增高,该现象是判断肺部炎症的一个敏感指标^[14]。同时本研究还观察到随着时间的推移,BALF 中的细胞总数和中性粒细胞的数量有所减少,肺组织炎症反应减轻。这可能是因为机体对 SPIONs 的清除及组织相容作用使得 SPIONs 在肺内的含量逐渐减少,Kwon 等^[15]将荧光标记的 SPIONs 经鼻吸入至大鼠的肺部,发现 SPIONs 可以迅速进入循环系统,分布在肝脏、脾脏、睾丸、大脑、脾脏等处。另一个可能的原因是机体对 SPIONs 产生了一定的耐受性,Morimoto 等^[16]将多壁碳纳米管通过吸入和气管内滴注 2 种方式染毒大鼠,发现给药 1 周后大鼠 BALF 中的细胞总数和中性粒细胞的数量与给药 3 d 时相比明显下降,3 个月后与正常对照组相比没有显著差异。Rossi 等^[17]研究了二氧化硅包覆的二氧化钛纳米粒子对肺部的毒性发现,反复给药多次的大鼠肺部的炎症反应要比给药 1 次的大鼠轻。

虽然 SPIONs 对大鼠肺部造成的损伤有逐渐减轻的趋势,但是总体而言,油酸钠 SPIONs 比壳聚糖 SPIONs 对肺部的损伤要相对严重。SPIONs 的毒性反应与很多因素有关系,包括它的粒径、表面所带电荷、修饰材料等,其中表面修饰材料是决定 SPIONs 毒性的的重要因素^[18]。壳聚糖是一种氨基多糖,是甲壳素脱乙酰化的产物,具有成本低、可生物降解、生物相容性好、无毒、生物亲和性好、易于化学改性等优点,而油酸钠是一种常用的阴离子表面活性剂,常作为分散剂使用。因此,壳聚糖和油酸钠 2 种不同修饰材料可能是引起 SPIONs 对大鼠肺部毒性差异的重要原因。

综上所述,下一步本课题组将进行超顺磁性载药微球的肺部靶向实验,而本实验中壳聚糖修饰的 SPIONs 较油酸钠修饰的 SPIONs 对肺部产生的毒性反应相对较轻,因此壳聚糖修饰的 SPIONs 更适宜作为靶向载体,并且本实验中的染毒剂量远远超过后期载药微球靶向实验的所需剂量,所以壳聚糖 SPIONs 是一种安全的磁靶向载体。

参 考 文 献

[1] Azarmi S, Roa WH, Löbenberg R. Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(8): 863–875.

[2] Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(18): 3995–4021.

[3] Chen TJ, Cheng TH, Chen CY, et al. Targeted Herceptin–dextran iron oxide nanoparticles for noninvasive imaging of HER2/neu receptors using MRI[J]. *J Biol Inorg Chem*, 2009, 14(2): 253–260.

[4] Tran PH, Tran TT, Vo TV, et al. Promising iron oxide–based magnetic nanoparticles in biomedical engineering[J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(12): 2045–2061.

[5] Amirfazli A. Nanomedicine; magnetic nanoparticles hit the target[J]. *Nature Nanotechnology*, 2007, 2(8): 467–468.

[6] Yildirim L, Thanh NT, Loizidou M, et al. Toxicology and clinical potential of nanoparticles[J]. *Nano Today*, 2011, 6(6): 585–607.

[7] Watanabe M, Yoneda M, Morohashi A, et al. Effects of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles on A549 cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(8): 15546–15560.

[8] Murray AR, Kisin E, Inman A, et al. Oxidative stress and dermal toxicity of iron oxide nanoparticles in vitro[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 67(2): 461–476.

[9] Rudolph C, Gleich B, Flemmer AW. Magnetic aerosol targeting of nanoparticles to cancer: nanomagnetosols[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, (624): 267–280.

[10] Dames P, Gleich B, Flemmer A, et al. Targeted delivery of magnetic aerosol droplets to the lung[J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2(8): 495–499.

[11] 卢记明, 张炳熙. 大鼠气管插管方法学概述[J]. *中国比较医学杂志*, 2009, 19(8): 76–80.

[12] 张玉坤, 罗 聪, 朱朝敏. 超顺磁性 Fe₃O₄ 纳米粒的制备及其对小鼠的急性毒性作用[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(12): 1224–1227.

[13] Ban M, Langonne I, Huguet N, et al. Effect of submicron and nano-iron oxide particles on pulmonary immunity in mice[J]. *Toxicol Lett*, 2012, 210(3): 267–275.

[14] Henderson RF. Use of bronchoalveolar lavage to detect respiratory tract toxicity of inhaled material[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2005, 57(s1): 155–159.

[15] Kwon JT, Hwang SK, Jin H, et al. Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice[J]. *J occup Health*, 2008, 50(1): 1–6.

[16] Morimoto Y, Hirohashi M, Ogami A, et al. Pulmonary toxicity of well-dispersed multi-wall carbon nanotubes following inhalation and intratracheal instillation[J]. *Nanotoxicology*, 2012, 6(6): 587–599.

[17] Rossi EM, Pylkkanen L, Koivisto AJ, et al. Airway exposure to silica-coated TiO₂ nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice[J]. *Toxicol Sci*, 2010, 113(2): 422–433.

[18] Mahmoudi M, Hofmann H, Rothen–Rutishauser B, et al. Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles[J]. *Chem Rev*, 2012, 112(4): 2323–2338.

(责任编辑: 冉明会)