

¹⁸⁸Re - 硫化锑纳米胶粒的制备及其被兔淋巴结摄取的实验研究

林英武 魏海鹏 张秀利 李俊玲 尹端让 邱 实 汪勇先

(中国科学院上海原子核研究所 上海 201800)

摘要 制备了两种不同粒径的硫化锑纳米胶粒,研究了¹⁸⁸Re 标记两种胶粒的条件以及标记物被兔腭窝淋巴结和腹股沟淋巴结摄取的情况。实验结果表明,两种硫化锑纳米胶粒的平均粒径分别为 10.2 nm 和 44.7 nm。当 SnCl₂ · 2H₂O 的浓度为 4mg/mL,抗坏血酸的浓度为 6mg/mL 时,加入适量的¹⁸⁸ReO₄⁻ 淋洗液,60 °C 水浴加热 60min,标记率均大于 95%,而且有良好的体外稳定性。从正常的新西兰大白兔双足趾蹼皮下分别注射两种标记物,探针探测的结果表明,腭窝淋巴结对 10.2nm 和 44.7nm 胶粒的摄取在注射后 1.5—2h 之间达到最大值,分别占各自注入量的 17.4%和 19.4%;腹股沟淋巴结对 10.2nm 和 44.7nm 胶粒的摄取在注射后 2h 左右达到最大值,分别占各自注入量的 4.7%和 4.2%。

关键词 ¹⁸⁸Re - Sb₂S₃, 纳米胶粒, 淋巴结, 探针

中图分类号 R817

淋巴系统是细胞间液回流入血的体液循环系统,是机体免疫的重要组成部分。同时,淋巴系统也构成了肿瘤播散的自然途径,肿瘤细胞在早期即可进入前哨淋巴结(SLN)而扩散,增加了外科手术的难度,因而探测肿瘤的淋巴转移具有重要的意义^[1]。对于肿瘤发生淋巴结转移,如乳腺癌的腋窝淋巴转移,在临床上常常进行腋窝淋巴结清扫而非进行治疗。日本学者 Hagiwara^[2]将活性炭吸附化疗药物——氨甲喋呤用于肿瘤淋巴结转移的治疗,以清除和治疗微小转移灶和淋巴管内游离的癌细胞。国内学者则对一定颗粒范围的活性炭进行⁹⁰Y 标记^[3],然后进行瘤内注射,大颗粒滞留于肿瘤内,微粒移行至淋巴管,对肿瘤和转移的淋巴结同时起治疗作用。

¹⁸⁸Re 是核性质优良的双功能核素,分别以 79%和 20%的几率发射最大能量为 2.11MeV 和 1.97 MeV 的 β 射线,同时伴随有十分适于显像的 155keV 的 γ 射线,而且可以方便地从¹⁸⁸W - ¹⁸⁸Re 发生器中获得。用¹⁸⁸Re 及其标记化合物来进行肿瘤及各种疾病治疗,已经并正在取得日新月异的进展^[4]。对于¹⁸⁸Re 标记的微粒药物,主要是滑膜切除剂¹⁸⁸Re - 硫化锑混悬液^[5];对于¹⁸⁸Re 标记的纳米粒子,研究较多的是¹⁸⁸Re - 羟基磷灰石^[6]。我们制备了两种不同粒径的硫化锑纳米胶粒,同时研究了¹⁸⁸Re 标记两种胶粒的条件以及标记物被兔腭窝淋巴结和腹股沟淋巴结摄取的情况,目的在于初步探索不同粒径的

纳米胶粒所具有的生物学效应及其对肿瘤和肿瘤的淋巴结转移所具有的治疗前景。

1 实验材料

1.1 主要仪器

主要仪器有 HITACHI - 600 透射电镜(复旦大学高分子系)、图像分析仪(复旦大学细胞图像分析室)、FT3106 放射性活度计(上海电子仪器厂)、FT - 603 型井型闪烁探测器和 FH - 408 型定标器(北京综合仪器厂)以及 探针(上海原子核研究所科盛公司研制)。

1.2 实验动物与试剂

新西兰大白兔(上海瑞金医院提供);¹⁸⁸ReO₄⁻: 从上海科兴公司的 7.4 × 10⁸Bq¹⁸⁸W - ¹⁸⁸Re 发生器中获得,用生理盐水淋洗,放射性核纯度 > 99%,无载体;聚乙烯吡咯烷酮(PVP)为进口分装,其它试剂均为分析纯,不需要进一步提纯,仅硫代乙酰胺(CH₃CSNH₂,简称 TAA)需要新鲜配制;实验用水为去离子水。

2 实验方法

2.1 ¹⁸⁸Re - 硫化锑纳米胶粒的制备

2.1.1 传统法制备 Sb₂S₃ 胶粒^[7] 将去离子水煮沸,取 60mL 于圆底烧瓶中,用冰水混合物冷却后通 H₂S 气体至饱和。加入 5mL 一定浓度的聚乙烯基吡

第一作者:林英武,男,1976年6月出生,1999年毕业于安徽师范大学,无机化学专业,2002年于中国科学院上海原子核研究所获硕士学位
收稿日期:2001-07-17,修回日期:2002-03-19

咯烷酮(PVP),以一定的速率搅拌均匀,再逐滴加入一定量的酒石酸锑钾,得到深橙红色硫化锑胶体(ASC)。随后通氮气 20min,除去多余的 H_2S 气体。用 $0.22\mu\text{m}$ 的微孔膜除菌后冰箱内保存。

2.1.2 改进法制备 Sb_2S_3 胶粒 将新鲜配制的一定浓度的 TAA(过滤)与一定量的酒石酸锑钾混合均匀,取 70mL 放入圆底烧瓶中,移取少量 0.1mol L^{-1} HCl 至烧瓶中调节溶液 pH 值,同时加入平均粒径为 10.2nm 的 Sb_2S_3 纳米胶粒溶液 10mL。水浴加热 6h,冷却至室温后加入 5mL 一定浓度的 PVP,用 $0.22\mu\text{m}$ 的微孔膜除菌后冰箱内保存。

2.2 ^{188}Re 标记

向 10 mL 0.1mol L^{-1} 的柠檬酸溶液中通氮气数分钟,加入 60 mg 抗坏血酸和 40mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。取 1 mL 上述溶液于密封的真空玻璃小瓶中,加入 1 mL 胶体和一定量 $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$ 淋洗液,60 水浴加热 60 min。用磷酸缓冲溶液($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.940g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.488g,加水至 80mL)调节溶液 pH 值至 6—7。

2.3 ^{188}Re - Sb_2S_3 的放射化学纯度及体外稳定性

标记产物用纸层析法检测,固定相选用新华 1 号层析纸,展开剂选用生理盐水,标记反应体系中 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 、 ^{188}Re - Sb_2S_3 和 ^{188}Re -Citrate 的 R_f 值分别为 0.7—0.8、0 和 0.9—1.0。

将标记物静置于室温下,每隔一定时间测一次放化纯度,并观察标记物 ^{188}Re - Sb_2S_3 的体外稳定性。

2.4 兔淋巴结对 ^{188}Re - Sb_2S_3 的摄取

从正常的新西兰大白兔双足趾蹼皮下注射 ^{188}Re - Sb_2S_3 0.5mL,约 $3.7 \times 10^6\text{Bq}$ 。左后足注射 10.2nm 的胶粒,右后足注射 44.7nm 的胶粒,用 探测器探测注射点的放射性计数,以后每 15min 测定一次左右腿窝淋巴结和腹股沟淋巴结对应体表处的放射性计数,然后计算摄取率(每个时段的淋巴计数与注射点计数的比值)并作出摄取率-时间曲线。

3 实验结果

3.1 硫化锑纳米胶粒的大小

运用传统法和改进法制备得到的硫化锑纳米胶粒的 TEM 照片分别见图 1(左)和(右),图像分析的结果显示两者的平均粒径分别为 10.2 nm 和 44.7 nm。照片中颜色稍淡的较大颗粒均为分散剂 PVP (50—200nm),这与文献[8]报道类似。

3.2 硫化锑纳米胶粒的 ^{188}Re 标记

3.2.1 反应时间对标记率的影响 图2为反应时

间对标记率的影响。由图 2 可见,当反应时间为 60min 后,标记率的变化趋于平缓。若延长反应时间,则对胶体的稳定性不利,为避免不必要的放射性衰变,选定反应时间为 60min。

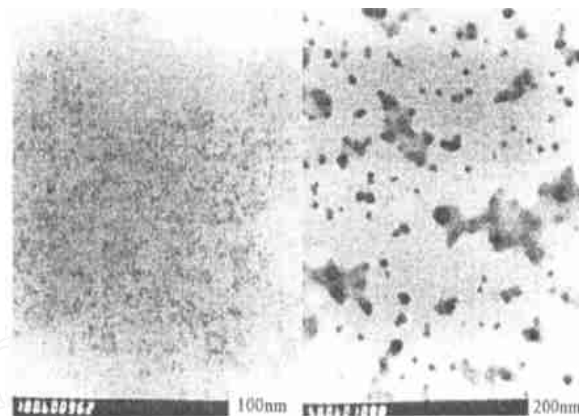


图 1 平均粒径为 10.2nm(左)和 44.7nm(右)的 Sb_2S_3 胶粒的 TEM 照片

Fig. 1 TEM photograph of Sb_2S_3 nanocolloids with mean particle size of 10.2nm (left) and 44.7nm (right)

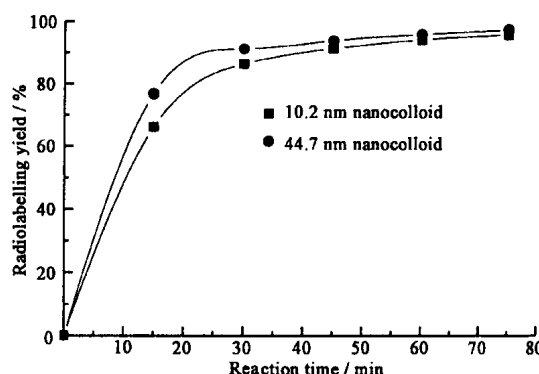


图 2 反应时间对标记率的影响

Fig. 2 The influence of reaction time on the labeling yield

3.2.2 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液浓度对标记率的影响 当其它条件不变, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液浓度对标记率的影响结果如表 1 所示。由表 1 可见,当浓度大于 1mg/mL 时,标记率大于 80%;其中浓度为 4mg/mL 时,标记率大于 95%。实验中选定 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的浓度为 4mg/mL。

表 1 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液浓度对标记率的影响

Table 1 The influence of $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ concentration on the labeling yield (%)

$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /mg mL^{-1}	^{188}Re - Sb_2S_3 (%)	
	(10.2nm)	(44.7nm)
0.5	52.0	61.4
1.0	82.9	84.3
1.5	84.6	86.5
2.0	86.3	88.7
3.0	92.8	93.2
4.0	96.1	96.8

3.2.3 抗坏血酸浓度对标记率的影响 其它条件不变,改变抗坏血酸的浓度,测定其对标记率的影响,结果如表 2 所示。表 2 显示,当浓度大于 6.0 mg/mL 时,标记率大于 95%。抗坏血酸的加入对标记率有两方面的影响,一方面对低价铼起稳定作用,另一方面可以提高标记率。

表 2 抗坏血酸浓度对标记率的影响

Table 2 The influence of Vit C concentration on the labeling yield (%)

Vit C /mg mL ⁻¹	¹⁸⁸ Re - Sb ₂ S ₃	
	(10.2nm)	(44.7nm)
0	89.6	91.3
2.0	90.5	94.0
4.0	93.2	95.9
6.0	96.1	96.8

3.3 ¹⁸⁸Re - Sb₂S₃ 的放射化学纯度

不同粒径的硫化锑胶粒在标记反应中各成份的百分含量随时间的变化关系如图 3 和图 4 所示。由

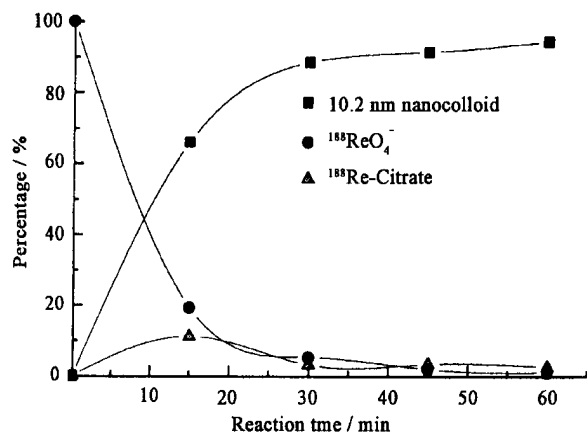


图 3 粒径为 10.2nm 的硫化锑胶粒在标记反应中各成份的百分含量随时间的变化关系

Fig. 3 Change of components with reaction time in the radiolabeling reaction of Sb₂S₃ nanocolloids (10.2nm)

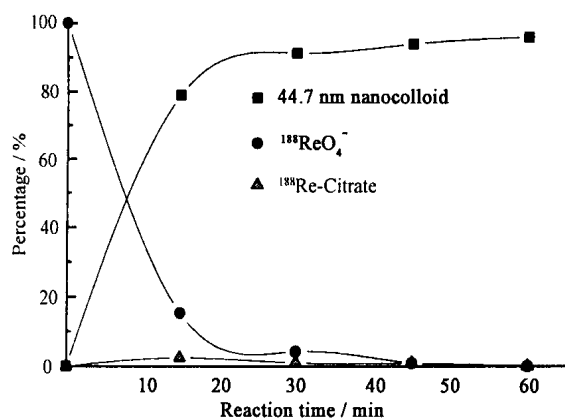


图 4 粒径为 44.7nm 的硫化锑胶粒在标记反应中各成份的百分含量随时间的变化关系

Fig. 4 Change of components with reaction time in the radiolabeling reaction of Sb₂S₃ nanocolloids (44.7nm)

图可见,粒径为 44.7nm 的硫化锑胶粒在标记反应中各成份的百分含量随时间的变化快,标记容易,而且产物的放化纯度高。同时,反应结束后,两种胶粒反应体系中¹⁸⁸Re - Citrate 的百分含量均小于 1.0%。

3.4 ¹⁸⁸Re - Sb₂S₃ 的体外稳定性

不同粒径的纳米硫化锑胶粒标记后的体外稳定性如图 5 所示。由图 5 可见,粒径为 44.7nm¹⁸⁸Re - Sb₂S₃ 的体外稳定性比粒径为 10.2nm¹⁸⁸Re - Sb₂S₃ 的体外稳定性好,24h 后标记率仍大于 90%。

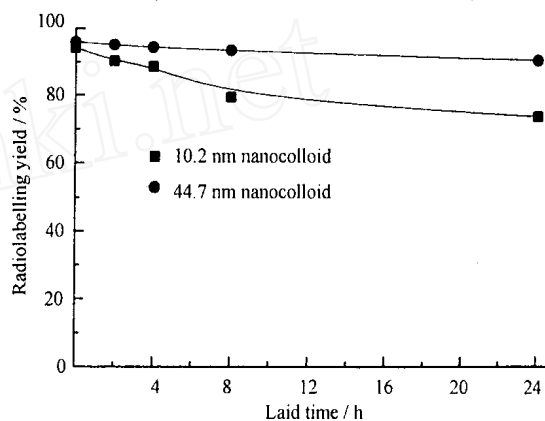


图 5 不同粒径的¹⁸⁸Re - Sb₂S₃ 的体外稳定性

Fig. 5 In vitro stability of¹⁸⁸Re - Sb₂S₃ particles with different sizes

3.5 兔淋巴结对¹⁸⁸Re - Sb₂S₃ 的摄取

兔腭窝淋巴结和腹股沟淋巴结对不同粒径¹⁸⁸Re - Sb₂S₃ 的摄取情况如图 6 和图 7 所示。由图可见,腭窝淋巴结对 10.2nm 和 44.7nm 胶粒的摄取在 1.5—2h 之间达到最大值,分别占各自注入量的 17.4% 和 19.4%,这与文献[9]报道值 18.2% 相近;腹股沟淋巴结对 10.2nm 和 44.7nm 胶粒的摄取在 2h 左右达到最大值,分别占各自注入量的 4.7% 和 4.2%。同时可以看出,粒径为 44.7nm 的硫化锑胶粒被淋巴结摄取慢,但在淋巴结中滞留的时间长。

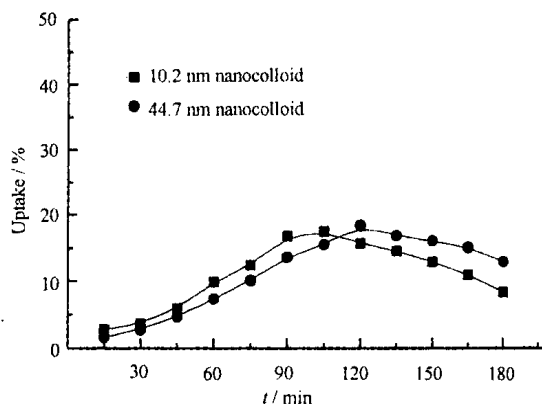


图 6 腭窝淋巴结对不同胶粒的摄取

Fig. 6 Uptake of nanocolloids with different sizes by popliteal lymph node

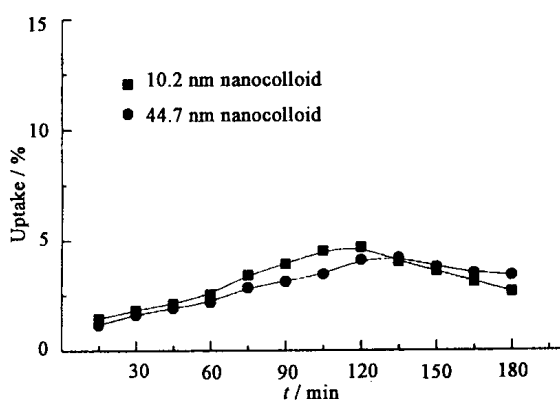


图 7 腹股沟淋巴结对不同胶粒的摄取
Fig. 7 Uptake of nanocolloids with different sizes by inguinal lymph node

4 讨论

随着放射导向手术 (RGS) 的兴起以及体内 探针的研制,对原发肿瘤发生淋巴转移所必经的第一站淋巴结——前哨淋巴结 (SLN) 进行定位与探测已经成为肿瘤学、外科学和核医学的热门话题。放射性纳米药物作为放射导向手术 (RGS) 中所使用的手术工具——探针的靶向试剂,在这一领域的应用也日益受到重视。

为了比较不同粒径纳米胶粒在前哨淋巴结中的吸收情况,我们使用传统的方法制得了平均粒径为 10.2nm 的硫化锑胶粒,同时使用改进后的制备方法,得到了平均粒径为 44.7nm 的硫化锑胶粒,两者均有较好的分散性和稳定性。同时选用了核性质优良的 ^{188}Re 对不同粒径的硫化锑纳米胶粒进行了标记条件实验,得到了最佳的标记条件,两者的标记率均

大于 95%,44.7nm 胶粒体的体外稳定性优于 10.2nm 的胶粒。在兔淋巴结摄取的动物实验中,我们选用上海原子核研究所自行研制的 探针作为探测工具,在淋巴结的体表进行放射性计数测量,操作简便。实验结果表明, ^{188}Re 标记的两种硫化锑纳米胶粒均能被 窝淋巴结和腹股沟淋巴结摄取,而且平均粒径为 44.7nm 的硫化锑胶粒在淋巴结中的滞留时间更长,其 ^{188}Re 标记物将具有更好的治疗效果。

研究表明:使用改进后的制备方法得到的平均粒径为 44.7nm 的硫化锑纳米胶粒经 ^{188}Re 标记后,在治疗肿瘤发生前哨淋巴结转移方面具有一定的应用前景。

参 考 文 献

- 1 Alazraki N P, Eshima D, Eshima L A, *et al.* Semin Nucl Med, 1997, 12:55—67
- 2 Hagiwara A, Takahashi T, Sauai K. Cancer, 1996, 15:2199
- 3 张黎,李玉田,周惠珍,等. 中国肿瘤临床, 1994, 21:802
ZHANG Li, LI Yutian, ZHOU Huizhen, *et al.* Chin J Clin Oncol, 1994, 21:802
- 4 尹端止,于俊峰,汪勇先. 核技术, 2000, 23(5):347—352
YIN Duanzhi, YU Junfeng, WANG Yongxian. Nucl Tech, 2000, 23(5):347—352
- 5 YU Junfeng, YIN Duanzhi, MIN Xiaofeng, *et al.* J Labelled Comp Radiopharm, 1999, 42:233—243
- 6 Grillenberger K G, Gatz S, Reske S N. Nuklearmedizin, 1997, 36:71—75
- 7 Ege G N, Warbick A. Br J Radiol, 1979, 52:124—129
- 8 Bergqvist L, Strand S E, Persson B R. Semin Nucl Med, 1983, 8:9—19
- 9 Juma B N, Andrey T, Ege G N, *et al.* Br J Radiol, 1985, 58:325—330

Synthesis of ^{188}Re - antimony sulfide nanocolloids and their uptake by rabbit 's lymph node

LIN Yingwu WEI Haipeng ZHANG Xiuli LI Junling
YIN Duanzhi QIU Shi WANG Yongxian

(Shanghai Institute of Nuclear Research, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

Abstract

Two different particle sizes of antimony sulfide nanocolloids were prepared and labeled with ^{188}Re . Their uptake by rabbit 's popliteal lymph node and inguinal lymph node was also studied. Results showed that the mean diameters of the two kinds of particles were 10.2nm and 44.7nm respectively. The labeling condition was optimized. When 4mg/mL $\text{Sn-Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6g/L Vit C and 1mL nanocolloids were reacted in 60 °C water bath for 60min, the labeling yield were both greater than 95% and excellent in vitro stability was also observed. White New Zealand rabbits were injected subcutaneously on the dorsum of the hind foot with two kinds of $^{188}\text{Re} - \text{Sb}_2\text{S}_3$. The uptake by popliteal lymph node and inguinal lymph node were measured quantitatively by using a gamma detecting probe. Results showed that the highest uptake of 10.2nm and 44.7nm nanocolloids by popliteal lymph node reached 17.4% and 19.4% of the total 1.5 to 2h post injection, respectively; the highest uptake by inguinal lymph node reached 4.7% and 4.2% of the total about 2h post injection, respectively.

Key words $^{188}\text{Re} - \text{Sb}_2\text{S}_3$, Nanocolloids, Lymph node, Gamma detecting probe

CLC R817