

血栓靶向相变纳米粒穿透深度与其溶栓效果相关性的实验研究

钟毅欣 叶曼 徐杰 张文丽 胡柳 方霓 郭大静

摘要 **目的** 探讨相变型纳米粒靶向动脉血栓穿透深度及其与体外溶栓效果的相关性。**方法** 通过双乳化法制备一种靶向纤维蛋白的PLGA-PFH-CREKA纳米粒,验证其理化特性。采集新西兰大白兔的动脉血制作动脉血栓模型,分别加入荧光标记的PLGA-PFH-CREKA纳米粒(兔靶向PT组)、PLGA-PFH纳米粒(兔非靶向PT组)、PLGA-CREKA纳米粒(NPT组),应用 1 W/cm^2 的低强度聚焦超声辐照,记录辐照前后血栓质量,计算溶栓率;使用共聚焦显微镜观察处理后的血凝块切片,测量穿透深度。应用线性回归分析血栓穿透深度与溶栓率的相关性。建立SD大鼠腹主动脉血栓模型,随机分为大鼠靶向PT组和大鼠非靶向PT组,评价其体内靶向能力。**结果** 制备的靶向纤维蛋白的PLGA-PFH-CREKA纳米粒平均粒径(297.8 ± 11.82)nm,表面平均电位(1.44 ± 0.22)mV,结构呈均匀球体,分散性好。体外溶栓实验显示,兔靶向PT组、兔非靶向PT组、NPT组对血栓的穿透深度分别为(293.01 ± 24.61) μm 、(114.52 ± 23.85) μm 、(116.78 ± 28.06) μm ,差异有统计学意义($F=96.187, P<0.001$);兔靶向PT组与兔非靶向PT组和NPT组比较差异均有统计学意义(均 $P<0.001$),NPT组与兔非靶向PT组比较差异无统计学意义。兔靶向PT组、兔非靶向PT组及NPT组靶向溶栓率分别为(60.67 ± 4.37)%、(45.83 ± 6.88)%、(18.67 ± 1.78)%,差异有统计学意义($F=108.508, P<0.001$);组间两两比较差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)。线性回归分析显示兔靶向PT组对血栓穿透深度与溶栓率呈正相关($R^2=0.818, P<0.05$)。体内靶向能力实验显示,大鼠靶向PT组对血栓的靶向性较大鼠非靶向PT组更好。**结论** 成功制备了靶向纤维蛋白的PLGA-PFH-CREKA纳米粒,其对血栓纤维蛋白有良好的靶向性,溶栓效果较好,对血栓穿透性佳,且相变所致溶栓率与血栓穿透深度呈正相关。

关键词 相变纳米粒;靶向;动脉血栓;溶栓率;穿透性;相关性

[中图法分类号]R445.1

[文献标识码]A

Correlation between the penetration depth and thrombolytic efficacy of phase-transitional nanoparticles in arterial thrombosis: a experimental study

ZHONG Yixin, YE Man, XU Jie, ZHANG Wenli, HU Liu, FANG Ni, GUO Dajing

Department of Radiology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

ABSTRACT Objective To investigate the correlation between the penetration depth and thrombolytic efficacy of phase-transitional (PT) nanoparticles (NPs) in arterial thrombosis. **Methods** Fibrin targeted PLGA-PFH-CREKA NPs was developed by double emulsification method, and its physical and chemical properties were verified. The preparation of arterial thrombosis was acquired through the New Zealand white rabbit, then the thrombi were collected in the PLGA-PFH-CREKA NPs (rabbit targeted PT group), PLGA-PFH NPs (rabbit non-targeted group) and PLGA-CREKA NPs (NPT group) respectively, LIFU with sound power density of 1 W/cm^2 was used to irradiate outside. The quality of thrombi was recorded before and after the experiment, the thrombolytic rate was calculated, and frozen sections of blood clot were used to measure penetration depth by confocal microscope. The correlation between thrombolytic rate and the penetration depth of NPs was analyzed by Linear regression analysis. Then the abdominal aortic thrombosis model was established in SD rats, and randomly divided into rat

基金项目:中国博士后科学基金项目(2019M663891XB、2020T130761)

作者单位:400010 重庆市,重庆医科大学附属第二医院放射科(钟毅欣、徐杰、张文丽、胡柳、方霓、郭大静);武汉大学人民医院放射科(叶曼)

通讯作者:郭大静, Email: guodaj@163.com

targeted PT group and rat non-targeted PT group to evaluate the targeting ability in vivo. **Results** The fibrin-targeted PT NPs were successfully prepared with a particle of (297.8 ± 11.82) nm and a surface Zeta potential of (1.44 ± 0.22) mV, the NPs also have a uniform spherical structure with good dispersibility. Thrombolytic assay in vitro showed that the penetration depth of thrombus in rabbit targeted PT group, rabbit non-targeted PT group and NPT group were (293.01 ± 24.61) μ m, (114.52 ± 23.85) μ m and (116.78 ± 28.06) μ m, respectively, and the difference was statistically significant ($F=96.187, P<0.001$). There were statistically significant differences between the rabbit targeted PT group, the rabbit non-targeted PT group and NPT group (all $P<0.001$), while there was no statistically significant difference between the NPT group and the rabbit non-targeted PT group. In addition, the thrombolysis rate of the rabbit targeted PT group, the non-targeted PT group and the NPT group were $(60.67 \pm 4.37)\%$, $(45.83 \pm 6.88)\%$ and $(18.67 \pm 1.78)\%$, respectively, and the differences was statistically significant ($F=108.508, P<0.001$), and there were statistical significance in pairwise comparison between all groups (all $P<0.001$). Moreover, Linear regression analysis showed a positive correlation between thrombus penetration depth and thrombolytic rate in the rabbit targeted PT group ($R^2=0.818, P<0.05$). In the SD rat model of abdominal aortic thrombosis, the targeted PT group showed better fibrin targeting than the non-targeted PT group. **Conclusion** The fibrin-targeted PLGA-PFH-CREKA NPs are successfully prepared, which have a good targeting effect to thrombus fibrin, good thrombolytic effect, and good penetration to thrombus. Meanwhile, the thrombolytic rate is positively correlated with the penetration depth of thrombus.

KEY WORDS Phase-transitional nanoparticle; Targeting; Arterial thrombus; Thrombolytic rate; Penetrability; Correlation

动脉血栓性疾病具有较高的致死率和致残率^[1],阿替普酶作为美国食品药品监督管理局唯一批准的溶栓药物,其临床应用具有一定优势,但由于其较窄的时间窗和未知的副作用,广泛应用受到限制^[2]。以纳米技术为基础的分子影像学因其制备简单、多用途的整合功能备受关注,有望突破这一瓶颈^[3]。本课题组前期已成功构建靶向血栓相变型纳米粒,低强度聚焦超声(LIFU)致全氟己烷(PFH)相变溶栓,体内外实验均取得了良好效果^[4-5]。本实验在前期研究的基础上,建立动脉血栓的体外模型,进一步分析纳米粒穿透血栓深度与溶栓效果的相关性,探讨声致相变的纳米粒在动脉血栓中的应用价值。

材料与与方法

一、实验动物

健康雌性新西兰大白兔 5 只,体质量 4.5~5.0 kg,平均 (4.75 ± 0.25) kg,均购于重庆医科大学动物实验中心。雌性 SD 大鼠 10 只,10~12 周龄,体质量 280~320 g,平均 (290.00 ± 12.80) g,均于 SPF 级动物喂养中心进行饲养。所有实验操作均经重庆医科大学动物伦理委员会批准。

二、主要实验试剂与仪器

1. 主要试剂:聚乳酸羟基乙酸(PLGA,分子量 8000,济南岱罡生物工程有限公司);PFH(北京百灵威科技有限公司);CREKA 多肽、人纤维蛋白原(江苏强耀生物科技有限公司);1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、

2-吗啉乙磺酸(MES)、聚乙烯醇(美国 Sigma-Aldrich 公司);异丙醇、二氯甲烷(成都科龙公司);DiI 染色剂(上海碧云天生物技术有限公司);OCT 包埋剂(日本樱花公司);PBS 溶液(武汉赛维公司);戊巴比妥钠(吉林大学医学院自制)。

2. 主要仪器:超声波破碎仪(美国 Sonic 公司);共聚焦显微镜(日本尼康公司);LIFU 治疗仪(重庆海扶医疗科技股份有限公司);马尔文粒径仪(Zetasizer Nano ZS90,英国马尔文仪器有限公司);透射电子显微镜(H 7500,日本日立公司);流式细胞仪(FACS Vantage,美国 Becton Dickinson 公司);倒置荧光显微镜(CKX41,日本奥林巴斯公司)。

三、实验方法

1. 制备靶向纤维蛋白的 PLGA-PFH-CREKA 纳米粒:通过改良的 W/O/W 双乳化挥发方法制备相变型纳米粒。取 50 mg PLGA 溶于 2 ml 二氯甲烷,加入 200 μ l 的 PFH 溶液作为内水相,冰浴下超声波破碎仪工作 1 min,功率 30 W;加入 4% 聚乙烯醇溶液 5 ml 作为外水相,继续声振 1 min,功率 30 W;然后加入 10 ml 浓度 2% 的异丙醇溶液,冰浴下搅拌 3 h,使 PLGA-PFH 纳米粒表面固化。根据碳二亚胺法将制得的 PLGA-PFH 纳米粒离心洗涤后,用 0.1 M 的 MES(pH 值 5.2)溶液重悬,EDC 和 NHS 按照摩尔比 2:1 加入,冰浴条件下孵育 3 h。去除未反应的 EDC、NHS,加入 0.1 M 的 MES(pH 值 8.0)重悬后加入 5 mg CREKA 多肽,冰浴条件下孵育 12 h,即制得 PLGA-PFH-CREKA 纳米粒,置于 4℃ 冰箱中备用。

2. 靶向纤维蛋白的 PLGA-PFH-CREKA 纳米粒的理化特性:以 1 ml 的注射器将样品滴于铜网上,待完全干透后置于透射电镜下观察其结构;马尔文粒径仪测量纳米粒大小及表面 Zeta 电位;流式细胞仪半定量分析纳米粒与 CREKA 多肽的连接率。将其置于特定的凝胶模具中,使用 LIFU(1 W/cm²)辐照 15 min,于光镜下观察辐照前后纳米粒的形态变化。

3. 靶向纤维蛋白的 PLGA-PFH-CREKA 纳米粒对体外血栓深度的穿透性:采血针刺入新西兰大白兔耳缘动脉,10 ml 负压采血管收集血液,置于 37℃ 的水浴锅 4 h,将血块切成小块(大小 1.0 cm×0.3 cm×0.3 cm,重约 300 mg),PBS 溶液清洗 3 次。PLGA-PFH-CREKA 纳米粒用 DiI 染色剂标记,将血凝块置于自制的凝胶模具中,加入 PLGA-PFH-CREKA 纳米粒为兔靶向 PT 组,不加 CREKA 多肽的纳米粒为兔非靶向 PT 组,以相同容量的双蒸水替代 PFH 为非相变组(NPT 组)。将制得的纳米粒按照 2 mg/ml 的浓度配置成 25 ml, LIFU(1 W/cm²)辐照 2 h,焦距 28 mm,然后用滤纸吸去血凝块表面的水分,记录其质量,计算溶栓率,公式为溶栓率=(溶栓前质量-溶栓后质量)/溶栓前质量×100%。血凝块以 OCT 包埋,制作冰冻切片,厚度 50 μm,置于共聚焦显微镜下观察血栓穿透深度(即血栓边缘到荧光消失的距离)。

4. 靶向纤维蛋白的 PLGA-PFH-CREKA 纳米粒对体内血栓的靶向性:以 1% 戊巴比妥钠麻醉 SD 大鼠,建立腹主动脉附壁血栓模型,将 Alexa 488 标记的人纤维蛋白原(10 mg/kg)注入尾静脉,备皮后打开腹腔,止血钳游离腹主动脉,10% 氯化铁溶液浸湿滤纸,包裹其外周 1 圈,4 min 后取出滤纸,并用生理盐水清洗。SD 大鼠随机分为两组,分别注射 1 mg/ml 浓度的 DiI 染色剂标记的靶向纳米粒(大鼠靶向 PT 组)和非靶向纳米粒(大鼠非靶向 PT 组)。待血液循环 3 h 后处死动物,取出该段腹主动脉,生理盐水清洗 2 次, OCT 包埋,制

作冰冻切片后倒置于荧光显微镜下观察纳米粒的体内靶向性。

四、统计学处理

应用 SPSS 22.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析;两组比较行 Post-hoc 事后检验。应用线性回归分析溶栓率与血栓穿透深度间的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

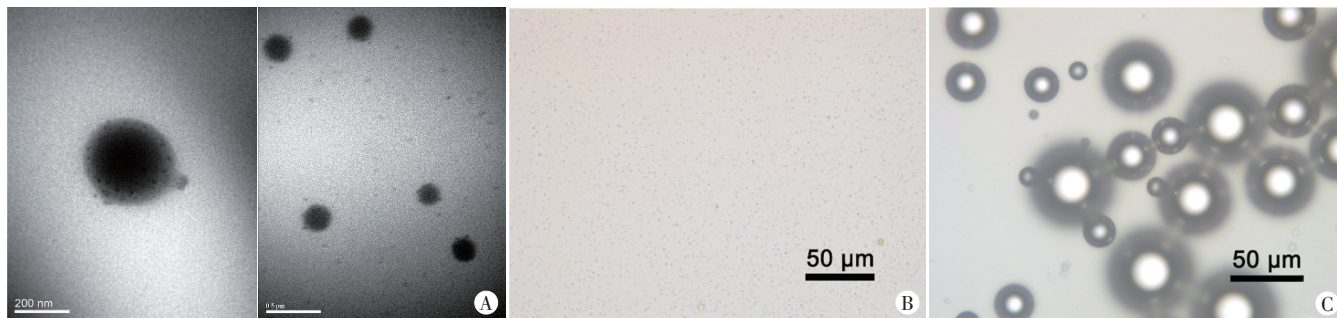
结 果

一、PLGA-PFH-CREKA 纳米粒的理化特性

制备的 PLGA-PFH-CREKA 纳米粒平均粒径为 (297.8±11.82) nm,表面平均电位为 (1.44±0.22) mV,多分散系数为 0.067±0.038。透射电镜显示纳米粒为均匀球体,分散性好(图 1A)。流式细胞仪检查示在随机计数的 10 000 个纳米粒中,有 9534 个纳米粒波长发生了改变,即 95.34% 的纳米粒与 CREKA 多肽成功连接。LIFU 辐照前后可见纳米粒明显膨胀(图 1B、C)。

二、靶向纤维蛋白的 PLGA-PFH-CREKA 纳米粒对体外血栓深度的穿透性

LIFU 辐照 2 h 后,各组对体外血栓深度的穿透性见图 2。共聚焦显微镜显示兔靶向 PT 组血栓深处可见荧光;兔非靶向 PT 组血凝块边缘荧光强度较弱,其深部未见明显荧光分布;NPT 组血凝块边缘可见荧光分布,但血凝块深部未见明显荧光信号。兔靶向 PT 组、兔非靶向 PT 组、NPT 组对血栓的穿透深度分别为 (293.01±24.61) μm、(114.52±23.85) μm、(116.78±28.06) μm,差异有统计学意义($F=96.187, P < 0.001$);兔靶向 PT 组与兔非靶向 PT 组和 NPT 组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$),NPT 组与兔非靶向 PT 组比较差异无统计学意义。兔靶向 PT 组、兔非靶向 PT 组及 NPT 组靶向溶栓率分别为 (60.67±4.37)%、(45.83±6.88)%、(18.67±1.78)%,差异有统计学意义($F=108.508, P < 0.001$);组间两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。



A:透射电镜放大图,图左放大倍数为 100 000 倍,图右放大倍数为 40 000 倍;B、C:液气相变前后的光镜观(×200)

图 1 靶向纤维蛋白的 PLGA-PFH-CREKA 纳米粒的理化特性

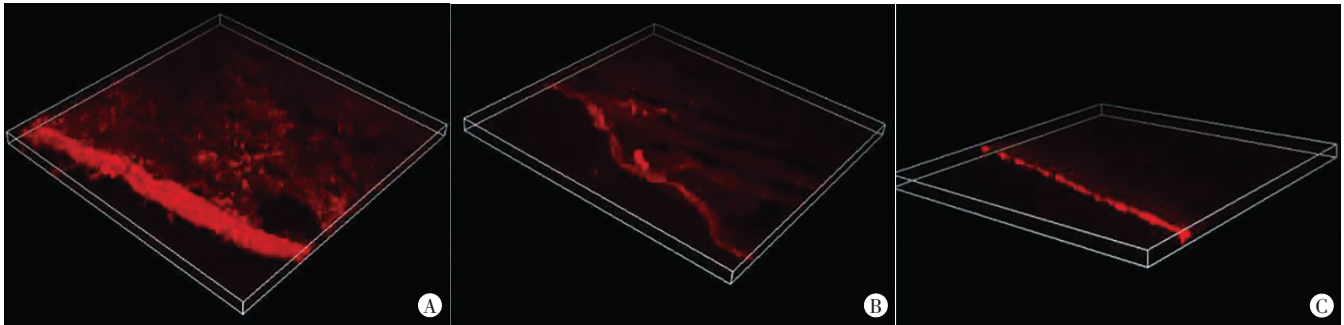
三、相关性分析

线性回归分析显示,兔靶向PT组的溶栓率与血栓穿透深度之间存在线性相关($R^2=0.818, P<0.05$);兔非靶向PT组、NPT组的溶栓率与血栓穿透深度之间无明显相关($R^2=0.005, 0.021$)。

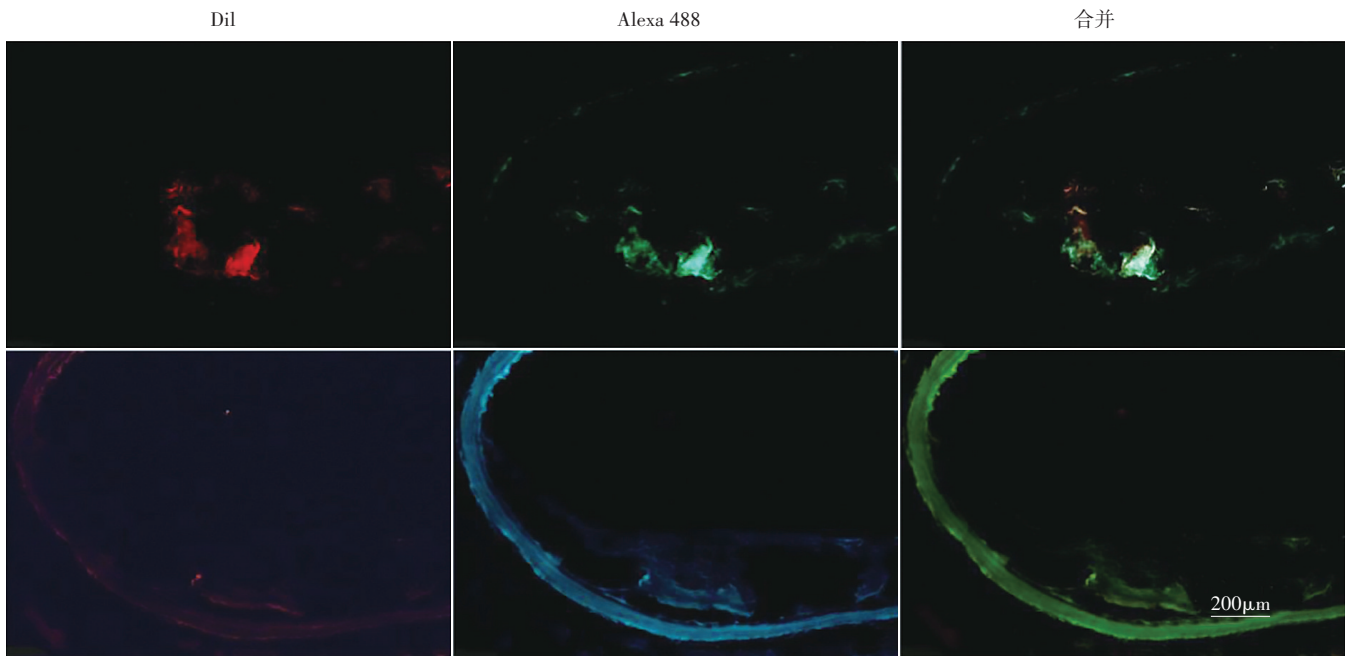
四、靶向纤维蛋白的PLGA-PFH-CREKA纳米粒

的体内靶向性

大鼠靶向PT组中,DiI染色剂标记的纳米粒呈红色,其与Alexa 488标记的纤维蛋白分布大部分一致。大鼠非靶向PT组中,DiI染色剂标记的纳米粒红色荧光较少,在通道合并图片中未与纤维蛋白明显重合(图3)。



A:兔靶向PT组;B:兔非靶向PT组;C:NPT组
图2 各组血栓切片的激光共聚焦三维重建图(×200)



上图为大鼠靶向PT组,下图为大鼠非靶向PT组
图3 大鼠靶向PT组与大鼠非靶向PT组体内荧光图(×100)

讨 论

早期发现和及时治疗对于动脉血栓形成患者的远期康复至关重要。目前的治疗方式主要使用静脉给药或通过介入手术的方式直接动脉给药,但由于阿替普酶在血液循环中不受限制,会导致患者出现症状性颅内出血、缺血再灌注损伤及神经中枢中毒等症状。因此,临床亟需探寻一种效益高、剂量可控的方式。通过双乳化法制备的PLGA-PFH-CREKA纳米粒

由于其良好的生物相容性,已在纳米给药系统中引起广泛关注,相较于单乳化法,双乳化法可提高亲水性材料的包封率^[6]。同时,分子量8000的PLGA聚合链短,降解速度更快,可保证纳米粒的安全性,这一点在前期研究^[4-5,7]中也得到证实,故本实验采用双乳化法制备靶向纤维蛋白的PLGA-PFH-CREKA纳米粒。

除外制备方式,粒径大小作为血管内给药的一项关键参数也值得注意。研究^[8]显示,粒径<10 nm的粒子通常经肾脏滤过和组织外渗而排出,>20 nm的粒子

通过网状内皮系统在血液循环中清除,而粒径为300 nm的粒子适用于血管内给药,且血管内给药的有效性具有独特优势,因此,本实验制备的PLGA-PFH-CREKA纳米粒大小均匀,分散性较好,粒径在300 nm左右,适用于血管内血栓的研究。与前期研究^[5]相比,本实验未加入氧化铁纳米粒,原因在于相变型纳米粒的溶栓主要与PFH和超声的联合作用有关,氧化铁的目的在于显像,但从显像的角度出发,需要研发一种效果更佳、更灵敏的集诊疗一体化的纳米粒,故本实验未加入除PFH的其他显像剂。

液态氟碳是含氟脂肪族化合物的一种,近年来主要用于超声和MRI显像,其特殊的液气相变过程为肿瘤治疗带来了新方法^[9]。前期研究^[5]选择携PFH及氧化铁的相变型纳米粒进行溶栓实验,发现LIFU的声功率密度仅需1 W/cm²即可将该纳米粒激活,使其从液态转变为气态,达到破坏血栓的目的。为进一步验证在1 W/cm² LIFU的辐照下相变型纳米粒穿透血栓的深度对溶栓效果的影响,本实验制备了未携带氧化铁的PLGA-PFH-CREKA纳米粒,其在溶栓方面也展现出一定优势,经LIFU辐照2 h后,兔靶向PT组的血栓穿透深度为(293.01±24.61) μm,而兔非靶向PT组和NPT组的血栓穿透深度分别为(114.52±23.85) μm、(116.78±28.06) μm,推测在LIFU的作用下,通过超声的热效应、机械效应等物理作用可以使血栓疏松,有助于纳米粒渗透,与肿瘤的相关研究^[10]结论类似。本实验结果显示,兔靶向PT组的溶栓率与血栓穿透深度呈正相关($R^2=0.818$, $P<0.05$),证实靶向纤维蛋白的PLGA-PFH-CREKA纳米粒对血栓的穿透深度在一定程度上可影响治疗效果,值得今后进一步探究。

在血栓形成过程中,纤维蛋白有重要作用,与抗体相比,本实验采用靶向纤维蛋白的多肽,血液清除率和穿透纤维蛋白网的能力均更佳,可进一步提高目标背景比^[11]。体内靶向性实验显示大鼠靶向PT组中DiI染色剂标记的纳米粒呈红色,其与Alexa 488标记的纤维蛋白分布大部分一致,进一步证实携CREKA多肽的纳米粒较未携带的纳米粒在血栓区域的滞留更多,说明携CREKA多肽的纳米粒具有良好的靶向性。另外,本实验结果显示,兔靶向PT组与兔非靶向PT组溶栓率比较差异有统计学意义($P<0.001$),说明携带靶向纤维蛋白的CREKA多肽可放大PLGA-PFH-CREKA纳米粒的溶栓效果。但受LIFU探头辐照面积和深度

衰减的影响,相变型纳米粒的溶栓效果还需进一步提高,今后可通过改进LIFU设备、相变型纳米粒的响应机制及对血栓穿透的机制进行解决,这也是未来研究的方向。

综上所述,本实验成功制备靶向纤维蛋白的PLGA-PFH-CREKA纳米粒,对血栓纤维蛋白有良好的靶向性,且与血栓穿透深度相关。这种以相变型纳米粒作为溶栓介质的方法,有望通过其机械作用及扩大溶栓治疗的时间窗为临床治疗方式的研究带来新思路。

参考文献

- [1] Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, et al. Heart disease and stroke statistics—2020 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2020, 141(9): 139–596.
- [2] Marshall RS. Progress in intravenous thrombolytic therapy for acute stroke [J]. *Jama Neurol*, 2015, 72(8): 928.
- [3] Park JH, Dehaini D, Zhou J, et al. Biomimetic nanoparticle technology for cardiovascular disease detection and treatment [J]. *Nanoscale Horizons*, 2020, 5(1): 25–42.
- [4] Xu J, Zhou J, Zhong Y, et al. Phase transition nanoparticles as multimodality contrast agents for the detection of thrombi and targeting thrombolysis: in vitro and in vivo experiments [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(49): 42525.
- [5] Zhong Y, Zhong Y, Xu J, et al. Low-intensity focused ultrasound-responsive phase-transitional nanoparticles for thrombolysis without vascular damage: a synergistic nonpharmaceutical strategy [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(3): 3387–3403.
- [6] Allahyari M, Mohit E. Peptide/protein vaccine delivery system based on plga particles [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2016, 12(3): 806–828.
- [7] Ye M, Zhou J, Zhong Y, et al. Sr-a-targeted phase transition nanoparticles for the detection and treatment of atherosclerotic vulnerable plaques [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(10): 9702–9715.
- [8] Myerson JW, Anselmo AC, Liu Y, et al. Non-affinity factors modulating vascular targeting of nano- and microcarriers [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 99(Pt A): 97–112.
- [9] 周洋, 王志刚. 液态氟碳相变的研究进展 [J]. *临床超声医学杂志*, 2012, 14(6): 402–405.
- [10] Chen M, Liang X, Gao C, et al. Ultrasound triggered conversion of porphyrin/camptothecin-fluorouracil triad microbubbles into nanoparticles overcomes multidrug resistance in colorectal cancer [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(7): 7312–7326.
- [11] Oliveira BL, Caravan P. Peptide-based fibrin-targeting probes for thrombus imaging [J]. *Dalton Trans*, 2017, 46(42): 14488–14508.

(收稿日期: 2021-01-24)