



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102565411 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201010591290. 3

(22) 申请日 2010. 12. 08

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 阎锡蕴 庄洁 杨东玲 冯静

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

G01N 33/58 (2006. 01)

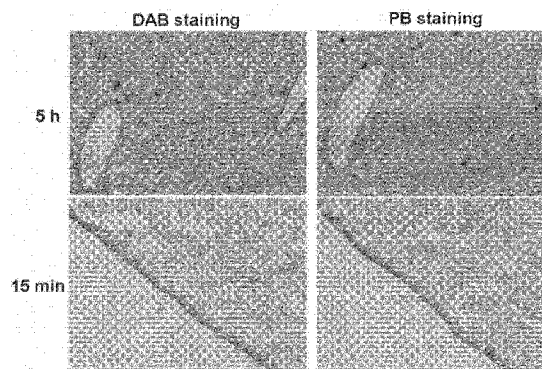
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 5 页

### (54) 发明名称

示踪磁性纳米颗粒的新方法

### (57) 摘要

本发明利用磁性纳米颗粒具有过氧化物酶活性,建立了一种新的磁性纳米颗粒体内原位、无标记检测方法。该方法包括:通过尾静脉注射的方法将磁性纳米颗粒注入小鼠体内,利用磁性纳米颗粒具有过氧化物酶活性,催化 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)在磁性纳米颗粒富集的部位生成棕黄色沉淀,从而检测磁性纳米颗粒在不同组织、器官的分布,这种新的检测方法为建立纳米材料安全性评价方案奠定重要基础。



1. 一种利用具有过氧化物酶活性的磁性纳米颗粒在哺乳动物体内示踪磁性纳米颗粒的新方法,其包括:

1) 将所述具有过氧化物酶活性的磁性纳米颗粒注入所述哺乳动物体内;

2) 在注射所述磁性纳米颗粒后经过适当时间,取所述哺乳动物的脏器组织,进行组织切片;和

3) 利用磁性纳米颗粒的过氧化物酶活性催化过氧化氢和沉淀型氢供体反应,导致氢供体生成沉淀,通过观察沉淀确定组织中磁性纳米颗粒的分布、和含量。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述的磁性纳米颗粒包括  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒和  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  磁性纳米颗粒。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其还包括在动物组织切片后,将组织切片在 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  的甲醇中孵育 30 分钟。

4. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于:所述的磁性纳米颗粒为葡聚糖修饰磁性纳米颗粒或二氧化硅包覆磁性纳米颗粒。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中步骤 2) 中所述的时间为 0.25 小时-72 小时。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中步骤 2) 中所述的时间为 5 小时。

7. 根据权利要求 5 所述的方法,其中步骤 3) 中所述的沉淀型氢供体包括 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐、四甲基联苯胺或 3-氨基-9-乙基咪唑。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述动物脏器组织为肝、脾、肺、肾、淋巴结、或胸腺。

9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述组织切片可以通过石蜡切片技术、冰冻切片技术获得。

10. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述磁性纳米颗粒主要被动物组织中的单核巨噬细胞吞噬。

## 示踪磁性纳米颗粒的新方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种示踪磁性纳米颗粒的新方法,具体的说,本发明建立了一种新的体内原位、无标记示踪磁性纳米颗粒的方法,可以用于不同磁性纳米颗粒的示踪,对于研究磁性纳米颗粒体内的分布及代谢情况,评价磁性纳米颗粒的生物安全性具有重要的意义。

### 背景技术

[0002] 磁性纳米材料指具有磁响应性的纳米材料,在外加磁场的作用下这些纳米材料具有强的磁响应信号。常用的磁性纳米材料为三氧化二铁、四氧化三铁、铁钴合金等。磁性材料可通过不同的方法制备出不同尺度(1-1000nm)和不同形貌的纳米结构,还可利用有机高分子包埋技术在磁性纳米颗粒的基础上制备微米级的磁性微球。

[0003] 磁性纳米材料具有较好的磁响应性,在生物医学和电子等方面应用前景广泛,如(1)通过DNA或蛋白质分子偶联到磁性纳米材料表面,结合纳米材料的磁性可以制备亲和层析用于生物样品的快速分离和高效纯化(参见, J. M. Nam, C. S. Thaxton, C. A. Mirkin, *Science* 301,1884(2003); Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36, R167(2003); 和 I. Safarik, M. Safarikova, *Biomagn Res Technol.* 2, 7(2004));(2)通过磁性纳米材料表面进行合适的化学修饰,使材料表面的电荷发生改变,或者特定的化学基团,可以将药物分子或基因结合在材料表面,利用外加磁场的导向,可以将药物或外源基因向特定的部位进行输送,从而实现药物或基因的靶向运输(参见, J. Panyam, V. Labhasetwar, *Adv Drug Deliv Rev* 55,329(2003);和 S. N. Morishita, et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 334,1121(2005));(3)磁性纳米颗粒可以用于活体或细胞水平的磁共振成像,建立高空间分辨率的活体实时成像技术,已经进入临床用于活体成像诊断(参见, M. G. Harishngani, et al., *N. Engl. J. Med.* 348,2491(2003); A. S. Arbab, et al., *Radiology* 229,838(2003); 和 I. J. de Vries, et al., *Nat Biotechnol.* 23, 1407(2005));(4)磁性纳米材料可以用于肿瘤的治疗,通过药物靶向和磁靶向把磁性纳米颗粒集中在肿瘤部位,在外加磁场的作用下,磁性纳米颗粒可以产生高热,杀死肿瘤部位的细胞,实现肿瘤治疗的目的(参见, A. Ito, et al., *Cancer Lett.* 212,167(2004);和 F. Sonvico, et al., *Bioconjug Chem.* 16,1181(2005))。由于磁性纳米颗粒在生物医学领域的广泛应用,因此,考察磁性纳米颗粒在体内的分布及代谢情况,建立纳米材料安全性评价方案具有重要的意义。此外,很多神经退行性疾病,比如帕金森病(PD)和老年痴呆症等,病人脑内都观察到了铁沉积(D. Berg, et al. *Ultrasound Med Biol*, 25,901(1999))。因此示踪铁在脑组织的沉积情况对于研究神经退行性疾病的发病机理,以及评价其治疗药物的治疗效果都有着重要的作用。

### 发明内容

[0004] 本发明提供一种磁性纳米颗粒的新用途,利用其具有过氧化物酶的活性,催化过氧化氢和沉淀型氢供体反应,导致氢供体生成沉淀,通过观察沉淀可以示踪其在体内的分

布及代谢情况。

[0005] 因此,利用该原理,本发明提供了利用具有过氧化物酶活性的磁性纳米颗粒在哺乳动物体内示踪磁性纳米颗粒的新方法,该方法包括:

[0006] 1) 将所述具有过氧化物酶活性的磁性纳米颗粒注入所述哺乳动物体内;

[0007] 2) 在注射所述磁性纳米颗粒后经过适当时间,取所述哺乳动物的脏器组织,进行组织切片;和

[0008] 3) 利用磁性纳米颗粒的过氧化物酶活性催化过氧化氢和沉淀型氢供体反应,导致氢供体生成沉淀,通过观察沉淀确定组织中磁性纳米颗粒的分布、和含量。

[0009] 在本发明的优选实施方案中,所述磁性纳米颗粒包括  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒或  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  磁性纳米颗粒。在本发明的另一个优选实施方案中,所述的磁性纳米颗粒为葡聚糖修饰磁性纳米颗粒或二氧化硅包覆磁性纳米颗粒。此外,本领域技术人员应该理解,本发明所用的磁性纳米颗粒不限于上述,一般地,具有过氧化物酶活性的磁性纳米颗粒都适合于本发明,例如,聚乙二醇包覆的磁性纳米颗粒、聚丙烯酸包覆的磁性纳米颗粒等。

[0010] 在本发明的优选实施方案中,所述哺乳动物包括,但不限于,小鼠、大鼠、兔、狗等。在经过纳米材料生物安全性验证后,所述磁性纳米颗粒可以进一步应用于人。因此,在本发明的更优选的实施方案中,所述哺乳动物为人。

[0011] 在本发明的一些实施方案中,上述步骤 1) 中将磁性纳米颗粒注入哺乳动物体内的方法包括,但不限于,静脉内注射、腹腔注射、皮下注射、肌肉注射、吸入等。

[0012] 在本发明的优选实施方案中,本领域技术人员经过有限次简单的实验能够确定步骤 2) 中注射所述磁性纳米颗粒后至取动物脏器组织时经过的时间,在特别优选的实施方案中,所述时间为 0.25 小时 -72 小时,优选为 5 小时,其取决于所用的磁性纳米颗粒的种类、受试的哺乳动物本身的因素、磁性纳米颗粒在哺乳动物脏器中的代谢速率等因素;其中步骤 2) 中所述动物组织脏器组织为肝、脾、肺、肾、淋巴结、或胸腺等。

[0013] 在本发明的一些实施方案中,上述步骤 3) 中所述的沉淀型氢供体包括 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐 (DAB)、四甲基联苯胺 (TMB) 或 3-氨基-9-乙基吡啶 (AEC)。在本发明的优选实施方案中,上述步骤 3) 中所述的沉淀型氢供体是 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐 (DAB)。

[0014] 在本发明的优选实施方案中,所述利用具有过氧化物酶活性的磁性纳米颗粒体内示踪磁性纳米颗粒的新方法还包括在动物组织切片后,将组织切片在 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  的甲醇中孵育 30 分钟,以抑制内源过氧化物酶的活性,去除了组织本身的背景,提高灵敏性。

[0015] 根据本发明的研究结果,证明所述磁性纳米颗粒主要被动物组织中的单核巨噬细胞吞噬(参见图 3)。

[0016] 在本发明的优选实施方案中,所述组织切片可以通过常规的石蜡切片技术、冰冻切片技术获得。

[0017] 在本发明的一个具体实施方案中,本发明提供利用具有过氧化物酶活性的磁性纳米颗粒在体内示踪磁性纳米颗粒的新方法,其包括:

[0018] 1) 将所述具有过氧化物酶活性的磁性纳米颗粒注入哺乳动物体内;

[0019] 2) 在注射所述磁性纳米颗粒后经过适当时间,取所述动物脏器组织,进行组织切片;和

[0020] 3) 加入 3,3' - 二氨基联苯胺四盐酸盐 (DAB) 显色液, 磁性纳米颗粒的过氧化物酶活性催化过氧化氢和 3,3' - 二氨基联苯胺四盐酸盐 (DAB) 反应, 导致 DAB 形成棕黄色沉淀, 通过观察棕黄色沉淀确定组织中磁性纳米颗粒的分布、和含量。

[0021] 综上所述, 本发明提供下述:

[0022] 1. 一种利用具有过氧化物酶活性的磁性纳米颗粒在哺乳动物体内示踪磁性纳米颗粒的新方法, 其包括:

[0023] 1) 将所述具有过氧化物酶活性的磁性纳米颗粒注入所述哺乳动物体内;

[0024] 2) 在注射所述磁性纳米颗粒后经过适当时间, 取所述哺乳动物的脏器组织, 进行组织切片; 和

[0025] 3) 利用磁性纳米颗粒的过氧化物酶活性催化过氧化氢和沉淀型氢供体反应, 导致氢供体生成沉淀, 通过观察沉淀确定组织中磁性纳米颗粒的分布、和含量。

[0026] 2. 根据第 1 项所述的方法, 其中所述的磁性纳米颗粒包括  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒和  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  磁性纳米颗粒。

[0027] 3. 根据第 1 项所述的方法, 其还包括在动物组织切片后, 将组织切片在 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  的甲醇中孵育 30 分钟。

[0028] 4. 根据第 2 项所述的方法, 其特征在于: 所述的磁性纳米颗粒为葡聚糖修饰磁性纳米颗粒或二氧化硅包覆磁性纳米颗粒。

[0029] 5. 根据第 1 项所述的方法, 其中步骤 2) 中所述的时间为 0.25 小时 - 72 小时。

[0030] 6. 根据第 5 项所述的方法, 其中步骤 2) 中所述的时间为 5 小时。

[0031] 7. 根据第 5 项所述的方法, 其中步骤 3) 中所述的沉淀型氢供体包括 3,3' - 二氨基联苯胺四盐酸盐、四甲基联苯胺或 3-氨基-9-乙基咪唑。

[0032] 8. 根据第 1 项所述的方法, 其中所述动物脏器组织为肝、脾、肺、肾、淋巴结、或胸腺。

[0033] 9. 根据第 1 项所述的方法, 其中所述组织切片可以通过石蜡切片技术、冰冻切片技术获得。

[0034] 10. 根据第 1 项所述的方法, 其中所述磁性纳米颗粒主要被动物组织中的单核巨噬细胞吞噬。

[0035] 传统的示踪磁性纳米颗粒体内分布的方法存在一定的局限性: (1) 放射性标记方法, 是利用  $^{59}\text{Fe}$  作为原料, 合成磁性纳米颗粒, 该方法虽然保持了材料的原有的特性且灵敏度高, 但存在放射性污染、检测复杂、费时等缺点; (2) 荧光标记方法, 是通过静电吸附或共价偶联将荧光分子与磁性纳米颗粒结合, 但荧光分子在体内不稳定, 容易淬灭, 不能很好的指示材料的代谢情况; 另外, 通过静电吸附与磁性纳米颗粒结合的荧光分子在体内容易从材料上脱落, 在没有到达组织前可能已经从材料上释放出来, 检测到的可能是游离的荧光分子, 不能很好的示踪材料在各组织、脏器的分布, 而通过共价偶联的方法修饰磁性纳米颗粒, 可能会造成材料本身特性的改变, 比如造成磁性纳米颗粒的交联; (3) 普鲁士蓝 (PB) 染色法, 是在酸性条件下, 三价铁与亚铁氰化钾作用, 形成普鲁士蓝色的亚铁氰化铁沉淀, 该方法虽然不需对材料进行预标记, 但存在检测灵敏度低的缺点。 (4) 电感耦合等离子体原子发射光谱法 (ICP-OES), 该方法是通过测定各脏器铁元素含量, 分析磁性纳米颗粒在体内的分布, 但是由于体内含有内源性铁离子, ICP 无法区别内源铁离子和注射的磁性纳米颗粒,

会对分析造成干扰。

[0036] 与传统示踪方法相比,利用磁性纳米颗粒的过氧化物酶活性示踪其在体内的分布及代谢情况,具有更多的优势:(1) 组织切片后,只需加入 DAB 显色底物,即可观察到磁性纳米颗粒在体内的分布,操作简单、方便;(2) 无需对材料进行预标记,很好的保持了材料原有的特性;(3) 由于磁性纳米颗粒具有比辣根过氧化物酶更高的催化活性,可以很好的催化 DAB 形成棕黄色沉淀,检测灵敏度高;(4) 将组织提前用过氧化氢处理,可以抑制内源过氧化物酶的活性,去除了组织本身的背景。

### 附图说明

[0037] 从下面结合附图的详细描述中,本发明的上述特征和优点将更明显,其中:

[0038] 图 1. 石蜡切片分析葡聚糖修饰磁性纳米颗粒在小鼠肝、脾、肺、肾、淋巴结和胸腺的分布:“+”表示加入 DAB 显色,“-”表示未加 DAB 显色;

[0039] 图 2. 冰冻切片分析葡聚糖修饰磁性纳米颗粒在小鼠肝、脾、肺、肾、淋巴结和胸腺的分布;

[0040] 图 3. 葡聚糖修饰磁性纳米颗粒被各脏器巨噬细胞吞噬;

[0041] 图 4. 葡聚糖修饰磁性纳米颗粒及二氧化硅包覆磁性纳米颗粒在肝脏中的代谢;

[0042] 图 5. 葡聚糖修饰磁性纳米颗粒及二氧化硅包覆磁性纳米颗粒在脾脏中的代谢;

[0043] 图 6. 葡聚糖修饰磁性纳米颗粒及二氧化硅包覆磁性纳米颗粒在肺脏中的代谢;

[0044] 图 7. 葡聚糖修饰磁性纳米颗粒催化 DAB 染色与普鲁士蓝 (PB) 染色灵敏度比较;

[0045] 图 8. 二氧化硅包覆磁性纳米颗粒催化 DAB 染色与普鲁士蓝染色灵敏度比较。

### 具体实施方式

[0046] 以下通过实施例来进一步阐明本发明。但是应该理解,所述实施例只是举例说明的目的,并不意欲限制本发明的范围和精神。

[0047] 磁性纳米颗粒的制备

[0048] 1. 葡聚糖修饰  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒

[0049] 配制 0.1mol/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (购自北京化学试剂公司) 的乙二醇溶液,加入无水醋酸钠,使其终浓度为 0.05mol/L,再加入分子量为 10000 的葡聚糖 (购自 Sigma),使其终浓度为 0.05mg/ml。将上述混合物置于密闭的 50ml 反应釜 (型号:HZ50,购自郑州合众仪器有限公司) 中,100°C 下反应 25 小时,得到葡聚糖修饰的磁性纳米颗粒 (即葡聚糖修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒)。

[0050] 2. 二氧化硅包覆  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒

[0051] 2.1  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒的制备

[0052] 将  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (购自北京化学试剂公司) 和  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (购自北京化学试剂公司) 溶液按 2 : 1 的摩尔比加入三口瓶中,  $\text{N}_2$  保护下升温至 55°C,搅拌加入二价铁摩尔数 10 倍的 NaOH 溶液 (即, NaOH 溶液的浓度是二价铁摩尔浓度的 10 倍) 并升温至 65°C 反应半小时,继续升温至 90°C,反应半小时,停止反应,搅拌下冷却至室温,产物为  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米材料,真空冷冻干燥。

[0053] 取 3g  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粉末,加入到通  $\text{N}_2$  除氧的 200ml 0.5mol/L 的柠檬酸三钠 (购自北京

化学试剂公司) 溶液中, 在超声下使  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  充分分散, 然后在  $60^\circ\text{C}$ 、通  $\text{N}_2$  搅拌 12 小时, 然后在体系冷却至室温后利用磁铁将产物分离出来, 依次用 95% 乙醇、去离子水洗涤并干燥, 得到  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粉末。

[0054] 2.2 二氧化硅包覆的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒

[0055] 取 0.2g 在 2.1 中获得的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粉末用 80ml 乙醇和 16ml 蒸馏水稀释, 超声 20 分钟, 加入 2ml 25% 氨水 (购自北京化学试剂公司), 滴加 1ml 正硅酸乙酯 (TEOS) (购自 Sigma),  $40^\circ\text{C}$  超声 5 小时, 用磁铁分离, 用 95% 乙醇、去离子水清洗数次。

[0056] 将按上述方法制备的磁性纳米颗粒用于下述实施例。上述葡聚糖修饰磁性纳米颗粒和二氧化硅包覆磁性纳米颗粒也可以通过商购途径获得, 例如, 葡聚糖修饰磁性纳米颗粒可以从中国科学院理化技术研究所购得, 二氧化硅包覆磁性纳米颗粒可以从上海交通大学购得。

[0057] 实施例 1、利用磁性纳米颗粒的过氧化物酶的活性, 示踪其在组织中的分布

[0058] 将葡聚糖修饰磁性纳米颗粒 (购自中国科学院理化技术研究所, 或按前文所述的方法制备) 按  $40\text{mg}/\text{kg}$  体重的剂量经尾静脉注射 BALB/c 小鼠 (购自北京实验动物中心, 重  $20 \pm 2$  克, 4-6 周龄), 注射葡聚糖修饰磁性纳米颗粒后 5 小时后处死小鼠, 分别取肝、脾、肺、肾、淋巴结和胸腺。利用磁性纳米颗粒的过氧化物酶活性, 催化 DAB 在磁性纳米颗粒存在的地方形成棕黄色沉淀, 检测磁性纳米颗粒在各组织、脏器的分布。

[0059] 具体方法如下: 所取的小鼠脏器组织用 4% 多聚甲醛 (购自北京化学试剂公司) 固定 12-24 小时, 用 70% 乙醇溶液冲洗, 再由 70-80-90-95-95-100% 乙醇逐级脱水 35 分钟, 浸入 1:1 乙醇/二甲苯 (购自北京化学试剂公司) 溶液 5 分钟, 取出再浸入二甲苯 20 分钟透明 2 次; 迅速投入已热熔的石蜡 (熔点  $56-58^\circ\text{C}$ ) (购自 Leica) 中 4 小时, 取出浸蜡组织移入含熔蜡的纸盒中, 切面朝下, 待石蜡表面凝结后包埋, 浸入冷水中凝固。用 Leica 石蜡切片机 (型号: RM2125, 购自 Leica) 将石蜡包埋组织切成  $4\ \mu\text{m}$  切片, 在载玻片上  $42^\circ\text{C}$  展片, 自然干燥后  $50^\circ\text{C}$  烤片 6 小时。入 100% 二甲苯 (购自北京化试剂公司) 脱蜡三次, 每次 5 分钟, 再入 100-95-80-70-50% 乙醇和蒸馏水中水化。然后在含有 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (购自北京化学试剂公司) 的甲醇中孵育 30 分钟去除内源性过氧化物酶的干扰, PBS 洗涤三次, 最后用新鲜配置的 DAB 显色液 (DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 显色操作按试剂盒说明书进行) 显色, 显色完毕之后用苏木素 (购自北京中杉金桥生物技术有限公司) 复染细胞核。

[0060] 如图 1 所示, 通过磁性纳米颗粒催化 DAB 显色, 可以清楚的观察到磁性纳米颗粒主要分布在肝、脾和肺中, 而在肾、淋巴结和胸腺中没有分布。这一结果说明, 利用磁性纳米颗粒的过氧化物酶的活性, 可以指示其在组织中的分布情况。

[0061] 由于磁性纳米颗粒具有比辣根过氧化物 (HRP) 更高的稳定性, 具有更广阔的应用范围。除了石蜡切片, 冰冻切片也是分析组织结构变化及损伤的重要手段之一。为了证实超低温对磁性纳米颗粒的酶活性没有影响, 我们将 BALB/c 小鼠组织经 OCT (optimum cutting temperature compound) 包埋,  $-80^\circ\text{C}$  冷冻, 切片。切片在预冷的丙酮 (购自北京化学试剂公司) 里固定 5 分钟, 然后再含有 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  的甲醇中孵育 30 分钟去除内源性过氧化物酶的干扰, PBS 洗涤三次, 用新鲜配置的 DAB 显色液显色 (DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 显色操作按试剂盒说明书进行), 显色完毕之后用苏木素复染细胞核。结

果如图 2 所示,磁性纳米颗粒经超低温处理依然保持着良好的催化活性,可以很好的示踪其在各组织的分布。

[0062] 实施例 2、磁性纳米颗粒主要被各脏器巨噬细胞吞噬

[0063] 磁性纳米颗粒通过尾静脉进入体内,主要是被单核吞噬细胞系统吞噬,为了证实葡聚糖修饰磁性纳米颗粒确实被各脏器巨噬细胞吞噬,我们用抗巨噬细胞特异性抗体 anti-F4/80(购自 Abcam 公司, F4/80 能够特异识别巨噬细胞)进行免疫组化。具体方法如下: BALB/c 小鼠组织经 OCT 包埋,进行冰冻切片。切片在预冷的丙酮里固定 5 分钟,然后再含有 0.3%  $H_2O_2$  的甲醇中孵育 30 分钟去除内源性过氧化物酶的干扰。PBS 洗涤三次,用 5% 羊血清(购自北京中杉金桥生物技术有限公司)封闭封片,然后加入 anti-F4/80 抗体,4℃ 孵育过夜。之后加入 HRP 标记的山羊抗大鼠二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司),孵育组织切片,最后用新鲜配置的 DAB 显色液显色(DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,显色操作按试剂盒说明书进行)。显色完毕之后用苏木素复染细胞核。如图 3 所示,葡聚糖修饰磁性纳米颗粒主要分布在抗体特异识别的巨噬细胞内(DAB 将其染色成棕黄色的细胞),说明磁性纳米颗粒主要被单核巨噬细胞吞噬。

[0064] 实施例 3、磁性纳米颗粒在体内代谢

[0065] 我们利用葡聚糖修饰磁性纳米颗粒和二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒(购自上海交通大学)的过氧化物酶活性,分析了他们在体内代谢的情况。将葡聚糖修饰磁性纳米颗粒和二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒分别以 40mg/kg 体重的剂量经尾静脉注射小鼠,分别在注射后 0.25 小时,5 小时和 72 小时后处死小鼠,取肝、脾和肺脏,分析磁性纳米颗粒在各脏器的代谢情况。

[0066] 小鼠尾静脉注射葡聚糖修饰磁性纳米颗粒后 0.25 小时,5 小时和 72 小时后,处死小鼠,分析肝脏中磁性纳米颗粒的分布,发现 5 小时后材料在肝脏内有大量散在分布,而尾静脉注射 72 小时后葡聚糖修饰磁性纳米颗粒在肝脏的分布减少(图 4 上),说明葡聚糖修饰磁性纳米颗粒在 72 小时后被肝脏所清理。

[0067] 小鼠尾静脉注射二氧化硅包覆磁性纳米颗粒后 0.25 小时,5 小时和 72 小时后,处死小鼠,分析肝脏中磁性纳米颗粒的分布,发现 5 小时后材料在肝脏内有大量散在分布,而与葡聚糖修饰磁性纳米颗粒不同,尾静脉注射 72 小时后,二氧化硅包覆磁性材料在肝脏中依然有大量分布(图 4 下),说明二氧化硅包覆磁性纳米颗粒在 72 小时后不能被肝脏所清理。

[0068] 小鼠尾静脉注射葡聚糖修饰磁性纳米颗粒后 0.25 小时,5 小时和 72 小时后,处死小鼠,分析脾脏中磁性纳米颗粒的分布,发现 5 小时后材料在脾脏内聚集分布在白髓和红髓的交界处即边缘区(marginal zone),而尾静脉注射 72 小时后葡聚糖修饰磁性纳米颗粒在脾脏中的分布减少(图 5 上),说明葡聚糖修饰磁性纳米颗粒在 72 小时后被脾脏所清理。

[0069] 小鼠尾静脉注射二氧化硅包覆磁性纳米颗粒后 0.25 小时,5 小时和 72 小时后,处死小鼠,分析脾脏中磁性纳米颗粒的分布,发现 5 小时后材料在脾脏内聚集分布在白髓和红髓的交界处即边缘区(marginal zone),而与葡聚糖修饰磁性纳米颗粒不同,尾静脉注射 72 小时后,二氧化硅包覆磁性纳米颗粒在脾脏中依然有大量分布(图 5 下),说明二氧化硅包覆磁性纳米颗粒在 72 小时后不能被脾脏所清理。

[0070] 小鼠尾静脉注射葡聚糖修饰磁性纳米颗粒后 0.25 小时,5 小时和 72 小时后,处死



小鼠,分析肺脏中磁性纳米颗粒的分布,发现 5 小时后材料在肺脏内成点状分布,而尾静脉注射 72 小时后葡聚糖修饰磁性纳米颗粒在肺脏中的分布减少(图 6 上),说明葡聚糖修饰磁性纳米颗粒在 72 小时后被肺脏所清理。

[0071] 小鼠尾静脉注射二氧化硅包覆磁性纳米颗粒后 0.25 小时,5 小时和 72 小时后,处死小鼠,分析肺脏中磁性纳米颗粒的分布,发现 5 小时后二氧化硅包覆磁性纳米颗粒在肺脏内成点状分布,而与葡聚糖修饰磁性纳米颗粒不同,尾静脉注射 72 小时后,二氧化硅包覆磁性材料在肺脏中依然有大量分布(图 6 下),说明二氧化硅包覆磁性材料在 72 小时后不能被肺脏所清理。

[0072] 实施例 4、磁性纳米颗粒催化 DAB 染色与普鲁士蓝染色灵敏度比较

[0073] 与传统检测磁性纳米颗粒在体内分布的普鲁士蓝染色比较,利用磁性纳米颗粒的催化活性示踪其分布的灵敏度更高。具体方法如下:将葡聚糖修饰磁性纳米颗粒以 40mg/kg 体重的剂量经尾静脉注射 BALB/c 小鼠,分别在注射后 0.25 小时和 5 小时后处死小鼠,取肝脏,经 OCT 包埋,进行冰冻切片。取两张连续切片在预冷的丙酮里固定 5 分钟,然后再含有 0.3%  $H_2O_2$  的甲醇中孵育 30 分钟去除内源性过氧化物酶的干扰。PBS 洗涤三次,其中一张用新鲜配制的 DAB 显色液显色(DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,显色操作按试剂盒说明书进行),另一张用普鲁士蓝显色(购自上海源叶生物科技有限公司)。结果如图 7 所示,与普鲁士蓝显色相比较,DAB 显色具有更高的灵敏度。

[0074] 利用磁性纳米颗粒的催化活性和普鲁士蓝染色两种方法示踪二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒的灵敏度比较,具体方法如下:将二氧化硅包覆的磁性纳米颗粒以 40mg/kg 体重的剂量分别经尾静脉注射 BALB/c 小鼠,分别在注射后 0.25 小时和 5 小时后处死小鼠,取肝脏,经 OCT 包埋,进行冰冻切片。取两张连续切片在预冷的丙酮里固定 5 分钟,然后再含有 0.3%  $H_2O_2$  的甲醇中孵育 30 分钟去除内源性过氧化物酶的干扰。PBS 洗涤三次,其中一张用新鲜配置的 DAB 显色液显色(DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,显色操作按试剂盒说明书进行),另一张用普鲁士蓝显色(购自上海源叶生物科技有限公司)。结果如图 8 所示,与普鲁士蓝显色相比较,DAB 显色具有更高的灵敏度。

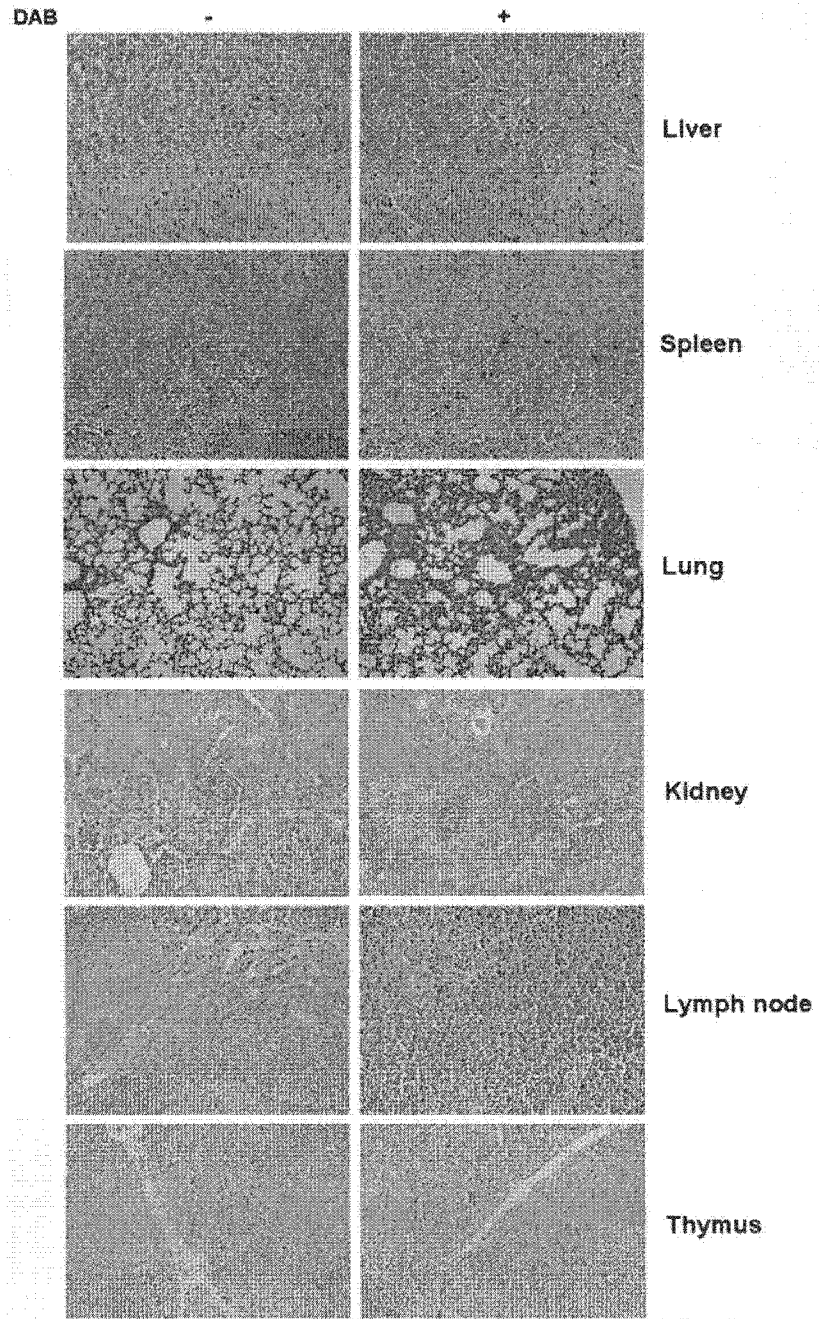


图 1

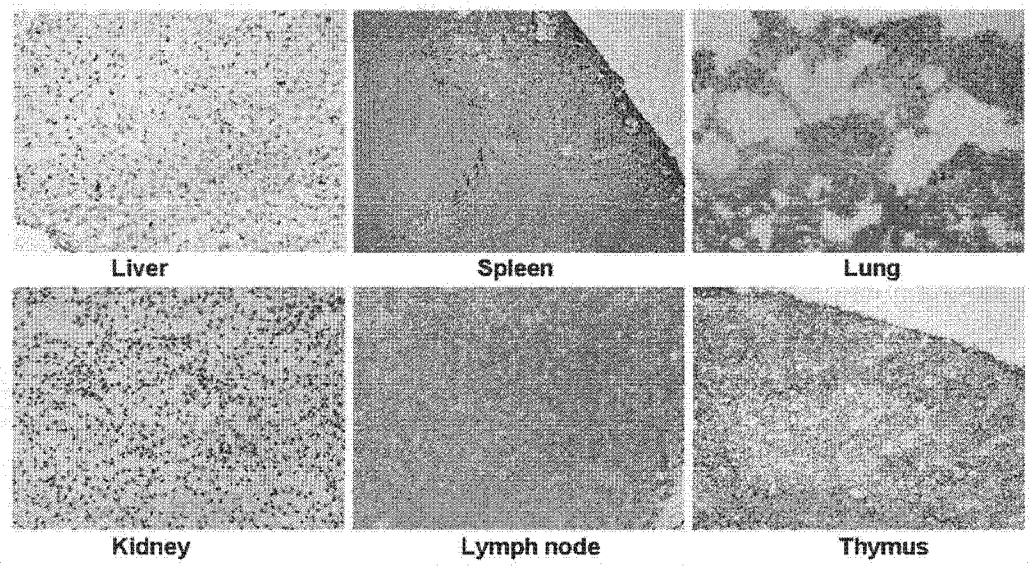


图 2

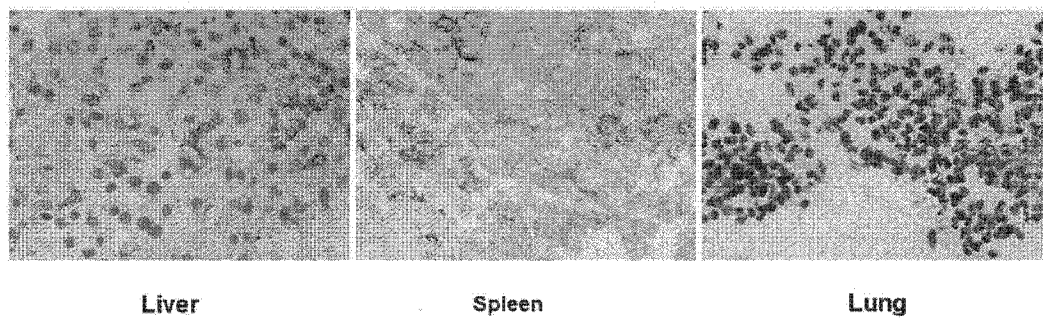


图 3

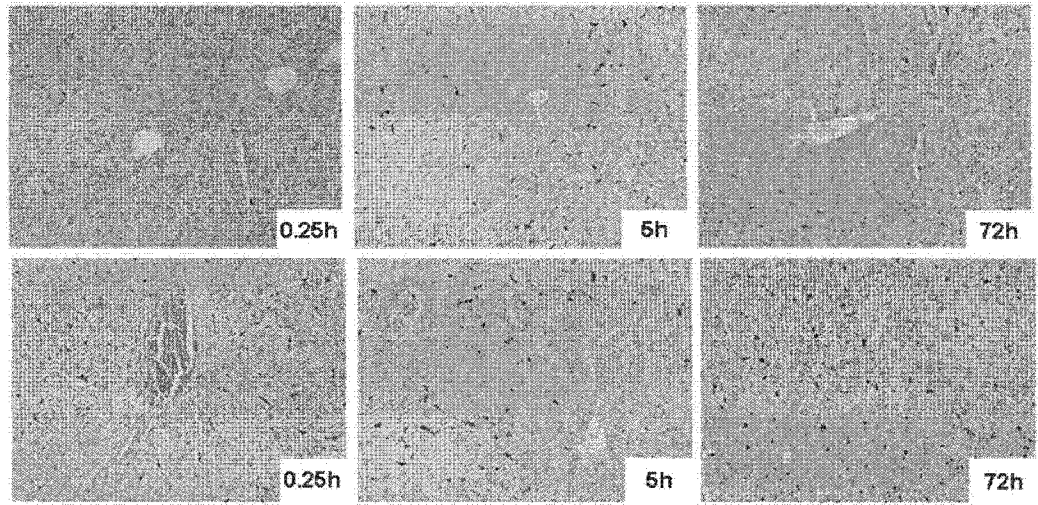


图 4

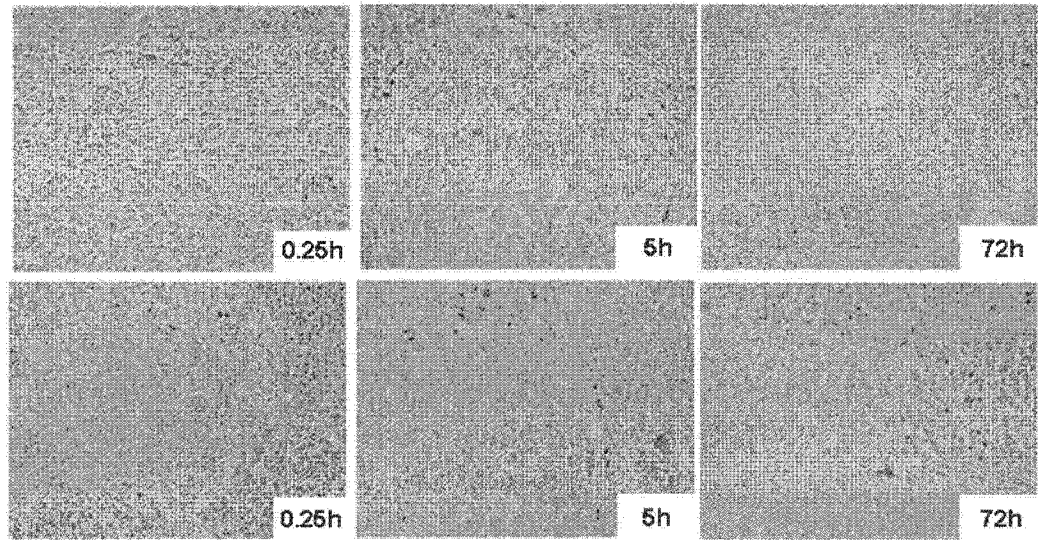


图 5

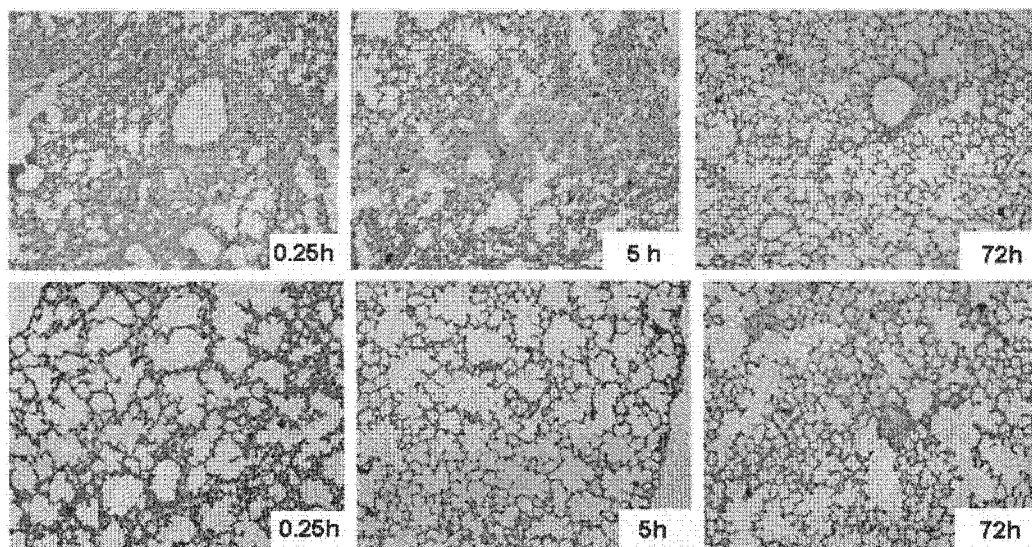


图 6

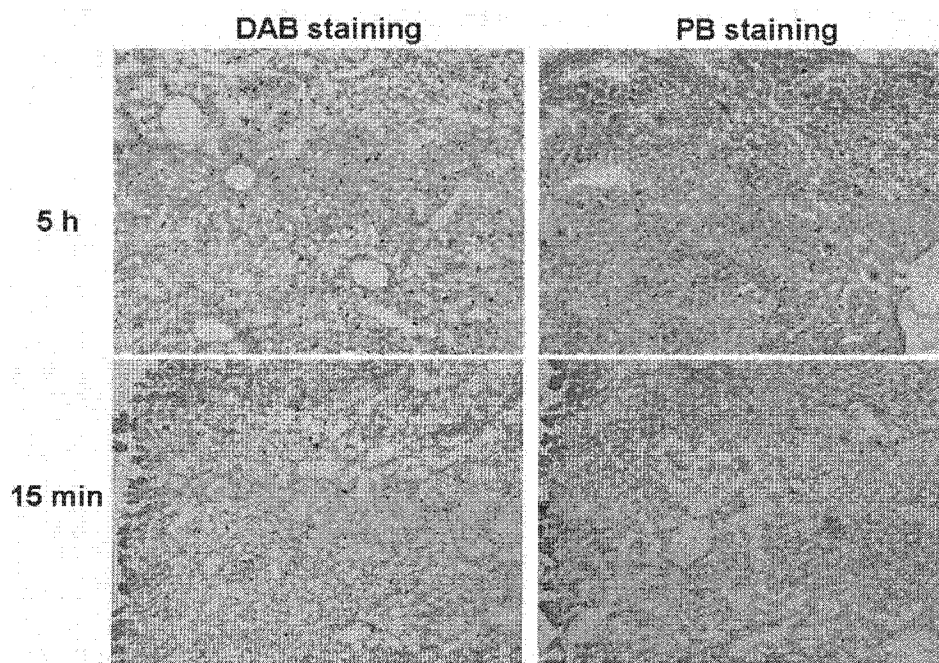


图 7

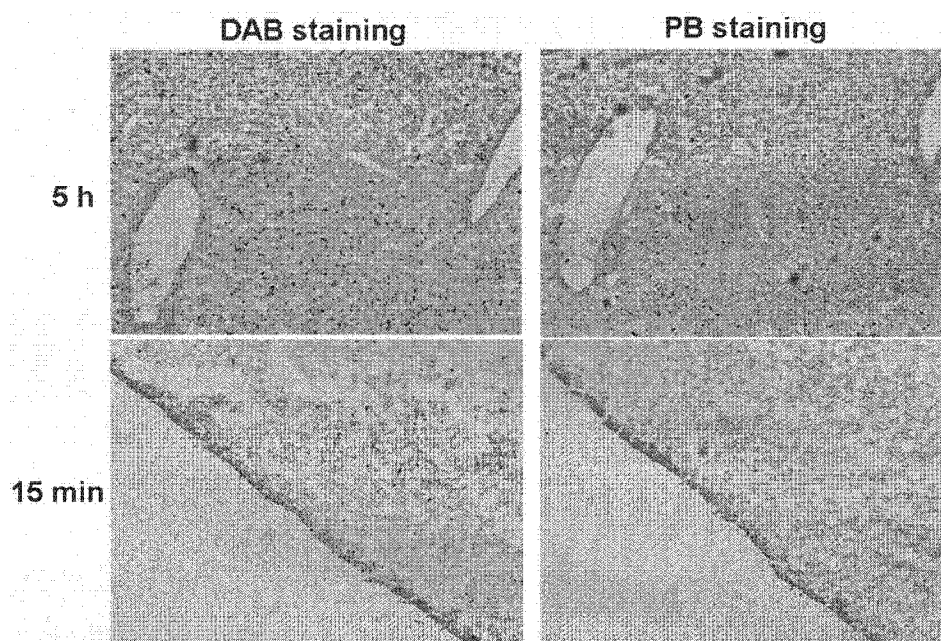


图 8