

## <sup>125</sup>I标记外泌体在Pan02胰腺癌荷瘤小鼠体内的生物分布研究

陶巧玉<sup>1,2,3</sup>, 许波华<sup>2</sup>, 秦天<sup>2</sup>, 赵晶<sup>4</sup>, 陈晓庆<sup>4</sup>, 李曼琪<sup>5</sup>, 宋鑫<sup>1,2,3</sup>, 刘楚乔<sup>1,2,3</sup>, 付莉莉<sup>1,2,3</sup>, 常艳<sup>5\*</sup>

1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012
2. 益诺思生物技术南通有限公司, 江苏 南通 226000
3. 南通市海门长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133
4. 深圳市亦诺微医药科技有限公司, 广东 深圳 518000
5. 中国医药工业研究总院 上海益诺思生物技术有限公司, 上海 201203

**摘要:** 目的 旨在开发用<sup>125</sup>I-NaI标记外泌体的方法, 并通过 $\gamma$ 计数器考察其在Pan02胰腺癌荷瘤小鼠体内的生物分布特征。方法 通过非放射性NaI对用于治疗胰腺癌的工业化外泌体进行冷标记, 采用透射电子显微镜、纳米粒子跟踪分析和Western blotting实验对标记前后外泌体进行表征。在此基础上采用Iodogen法进行外泌体的放射性<sup>125</sup>I-NaI标记, 分离纯化后测定<sup>125</sup>I-NaI的标记率, Radio-HPLC法测定给药前后<sup>125</sup>I-外泌体的放化纯度以考察其稳定性; 将<sup>125</sup>I-外泌体单次尾iv于Pan02胰腺癌荷瘤小鼠体内, 分别于给药后2、6、24、72 h(每个时间点雌雄各3只)经CO<sub>2</sub>麻醉后心脏放血处死小鼠, 取血清、主要组织器官及肿瘤,  $\gamma$ 计数器测量其放射性计数, 计算各组织/血清在不同时间点的蛋白沉淀率; 并计算在不同时间点的每克组织(或每毫升血清)放射性计数占总注入放射性计数的百分比(%ID·g<sup>-1</sup>或%ID·mL<sup>-1</sup>)。结果 外泌体表征的结果显示, 标记前后的外泌体形态一致, 均成圆形或茶托样结构; 标记前外泌体粒径峰值为113 nm, 标记后外泌体粒径峰值为122 nm, 粒径大小主要分布在50~200 nm; 均表达其标志性蛋白CD63及TSG101, 符合外泌体特征。<sup>125</sup>I-NaI标记外泌体的标记率为27.82%, 纯化后HPLC法测得即时放化纯度为100%, 给药后放化纯度为(93.34±5.48)%。在小鼠尾iv给药后2 h, 标记的外泌体主要分布在肝脏[(10.899 2±1.518 1)%ID·g<sup>-1</sup>]和脾脏[(2.566 4±0.799 8)%ID·g<sup>-1</sup>], 肿瘤中为[(0.291 0±0.056 0)%ID·g<sup>-1</sup>], 脑、心脏、脂肪和肌肉组织摄取较少; 给药后72 h, 肝脏中仍有较高摄取, 肿瘤中仍有放射性分布。给药后2~6 h各组织脏器的蛋白沉淀率较低, 表明<sup>125</sup>I-NaI标记外泌体稳定性有所降低。结论 外泌体可以进行<sup>125</sup>I标记, 而且标记同位素前后对外泌体物理形态、生物学活性无明显影响; <sup>125</sup>I标记外泌体的方法简便, 标记率和放化纯度均较高; 该外泌体产品在荷瘤小鼠体内大部分血流丰富的组织器官均有分布, 且具有一定的肿瘤靶向定位能力。

**关键词:** Iodogen法; <sup>125</sup>I-NaI; 外泌体; 放射性同位素标记; 生物分布

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)05-1032-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.05.012

## Biodistribution of <sup>125</sup>I labeled exosomes in Pan02 pancreatic cancer tumor bearing mice

TAO Qiaoyu<sup>1,2,3</sup>, XU Bohua<sup>2</sup>, QIN Tian<sup>2</sup>, ZHAO Jing<sup>4</sup>, CHEN Xiaoqing<sup>4</sup>, LI Manqi<sup>5</sup>, SONG Xin<sup>1,2,3</sup>, LIU Chuqiao<sup>1,2,3</sup>, FU Lili<sup>1,2,3</sup>, CHANG Yan<sup>5</sup>

1. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012, China
2. InnoStar Biotechnology Nantong Co., Ltd., Nantong 226000, China
3. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong 226133, China
4. ImmVira Co., Ltd., Shenzhen 518000, China
5. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai InnorStar Biotech Co., Ltd., Shanghai 201203, China

**Abstract: Objective** This study was aimed to develop a <sup>125</sup>I-NaI labeling method for exosomes, and to investigate their biological distribution in Pan02 pancreatic cancer tumor bearing mice by gamma counter. **Methods** Exosomes were cold-labeled with non-

收稿日期: 2022-12-26

基金项目: 江苏省新药一站式高效非临床评价公共服务平台建设(BM2021002)

第一作者: 陶巧玉, 女, 硕士研究生, 研究方向为药物代谢动力学。E-mail: 1104300272@qq.com

\*通信作者: 常艳, 女, 博士生导师, 研究方向为药物毒理学。E-mail: ychang@ncdser.com

radioactive NaI. Exosomes were characterized before and after labeling by transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis and Western blotting. On this basis, Iodogen method was used for radioactive  $^{125}\text{I}$ -NaI labeling of exosomes, and the labeling rate of  $^{125}\text{I}$ -NaI was determined after isolation and purification. Radio-HPLC method was used to determine the radiochemical purity of  $^{125}\text{I}$ -exosomes before and after drug administration to understand its stability.  $^{125}\text{I}$ -exosome was injected into Pan02 pancreatic cancer tumor bearing mice by a single caudal vein, and the mice were killed by cardiac bloodletting after  $\text{CO}_2$  anesthesia at 2, 6, 24, 72 h (three males and three females at each time point). Serum, major tissues, organs and tumors were collected and their radioactivity counts were measured. The percentage ( $\% \text{ID} \cdot \text{g}^{-1}$  or  $\% \text{ID} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) of the total injected radioactivity count per gram of each tissue and organ at different time points was calculated, so as to investigate the biological distribution of  $^{125}\text{I}$ -NaI labeled exosomes in tumor-bearing mice. **Results** The morphology of exosomes before and after labeling was consistent with that of round or saucer-like exosomes. The peak particle size of exosomes was 113 nm before labeling and 122 nm after labeling, and the particle size was mainly distributed in the range of 50 ~ 200 nm. Both of them expressed their signature proteins CD63 and TSG101, which were consistent with exosome characteristics, indicating that isotope labeling did not affect their biological characteristics. The labeling rate of  $^{125}\text{I}$ -NaI labeled exosomes was 27.82%, and the purity was 100% by HPLC after purification, and (93.34±5.48)% after administration. The labeled exosome was mainly distributed in liver [(10.899 2±1.518 1)  $\% \text{ID} \cdot \text{g}^{-1}$ ] and spleen [2.566 4±0.799 8)  $\% \text{ID} \cdot \text{g}^{-1}$ ] at 2 h after administration in the tail vein of mice. Meanwhile, (0.291 0±0.056 0)  $\% \text{ID} \cdot \text{g}^{-1}$  was found in tumor. After 72 h of administration, there was still high uptake in liver and radioactive distribution in tumor. The protein precipitation emissivity of various tissues and organs was low 2 ~ 6 h after administration, indicating a decrease in the stability of  $^{125}\text{I}$ -NaI labeled exosomes. **Conclusion** Extracellular vesicles can be labeled with  $^{125}\text{I}$ , and there is no significant effect on their physical morphology and biological activity before and after isotope labeling. The method of labeling exosomes with  $^{125}\text{I}$  is simple, with high labeling rate and radiochemical purity. This exosomes product is distributed in most blood rich tissues and organs of tumor bearing mice, and has certain tumor targeting and localization capabilities.

**Key words:** iodogen method;  $^{125}\text{I}$ -NaI; exosome; isotope labeling; biodistribution

外泌体是由多泡体(MVBs)的膜内陷形成的,在MVBs与质膜融合时释放到细胞外空间,粒径50~150 nm,可由大多数细胞类型分泌,携带着核酸、蛋白质和脂质等多种生物分子,可用于母细胞与受体细胞间的信息和功能传递,通过介导细胞间通讯参与调控病理生理学过程<sup>[1-2]</sup>。由于其固有的稳定性、低免疫原性和优异的组织/细胞穿透能力等独特性质,目前越来越多的研究集中在其作为治疗剂和药物递送载体的应用上,有望成为靶向药物/基因递送的先进平台<sup>[3-4]</sup>。

然而由于靶向能力不足或效率低,外泌体的实际应用可能会受到限制,为了克服这些现有挑战,已有研究者应用各种方法来设计工程化外泌体以获得更高的选择性和有效性。基于外泌体疗法的另一个局限性在于对其体内生物学行为了解有限,有效使用取决于其生物分布谱和循环动力学的确定,对特定细胞或组织的靶向能力的确定,摄取途径以及受体细胞的转运效率的确定<sup>[5-6]</sup>。对体内外泌体递送的准确检测是开发基于外泌体疗法的首要关键步骤,不仅会提高对其生物学的了解,而且有可能最大限度地发挥其作为纳米治疗工具的应用。目前光学成像和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术可被用于研究外泌体的体内生物分布,但光学

成像在量化和信号组织穿透等方面存在挑战<sup>[7-9]</sup>,而qRT-PCR步骤繁多复杂、耗时长,均具有一定的局限性。放射性核素可以轻松克服这些限制,实现高度敏感和定量,在动物和人体中都可以无限穿透组织,目前放射性核素 $^{125}\text{I}$ 标记技术已广泛应用于分子生物学、免疫学等基础医学研究及相关临床领域。

本研究标记对象是用于治疗胰腺癌的工程化外泌体产品(见图1,本图由Figdraw绘制),目前胰

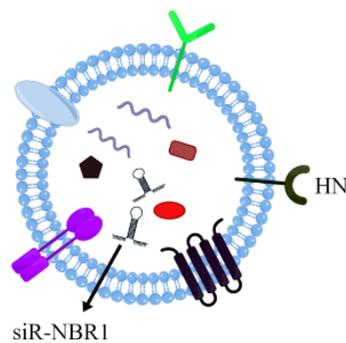


图1 外泌体结构示意图  
Fig. 1 Exosome structure diagram

腺癌治疗面临的主要障碍是免疫逃逸,肿瘤细胞表面用于抗原递呈的主要组织相容性复合体(MHC-I)类分子与特异性自噬受体NBR1结合,后者通过自噬依赖性途径促进MHC-I运输至溶酶体,使胰腺癌

细胞产生免疫逃逸<sup>[10]</sup>。该基因工程改造的外泌体腔内装载能够靶向下调NBR1表达的小干扰RNA(siRNA);膜表面表达新城疫病毒蛋白HN(血凝素-神经氨酸酶)。新城疫病毒HN本身具有肿瘤的趋向性,系统给药后可以在一定程度上富集于肿瘤部位;siR-NBR1进入肿瘤细胞后通过下调NBR1表达,抑制自噬,恢复胰腺癌细胞表面的MHC-I表达水平,进一步逆转胰腺癌免疫逃逸,借助免疫系统实现抗肿瘤的目的。

本研究选择正常免疫活性的小鼠及鼠源性胰腺癌细胞Pan02构建荷瘤小鼠模型,并建立1种<sup>125</sup>I-NaI体外标记外泌体的方法,考察该外泌体产品在荷瘤小鼠体内的组织分布特征,进而验证其作为药物递送系统的可行性。

## 1 材料

### 1.1 主要试剂

外泌体(深圳市亦诺微医药科技有限公司提供,批号20220831);BCA蛋白浓度检测试剂盒(Solarb公司,批号20220628);磷酸盐(PBS)缓冲液(Gibco公司,批号10010023);Iodogen管(Thermo公司,批号WJ324176);<sup>125</sup>I-NaI(Mc MASTER公司,批号MNR M220530-8)。

### 1.2 主要仪器

1266生物安全柜(Biox公司);CCL-170B-8二氧化碳培养箱(ESCO公司);CKX53倒置显微镜(日本Olympus公司);BSG-24电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);Sorvall ST 40R台式冷冻离心机(美国Thermo Fisher Scientific);Vortex3 S025涡旋混匀器(德国IKA公司);ME204电子天平(梅特勒-托利多);CRC-55tR放射性活度计(美国Capintec公司);i3x多功能酶标仪(MOLECULAR公司);Wallac1470  $\gamma$ 计数仪(美国PerkinElmer<sup>TM</sup>公司);JEM-1400透射电子显微镜(日本JEOL公司);NS3000纳米粒子跟踪分析仪(英国Malvern公司);6300化学发光成像仪(上海勤翔科学仪器有限公司)。

### 1.3 细胞株

PAN02小鼠胰腺癌细胞与完全培养基(含10%胎牛血清及1%青链霉素)购自武汉尚恩生物技术有限公司;胰酶购自Gibco公司;0.4%台盼蓝染液购自Biological Industries公司。

### 1.4 实验动物

雌性C57BL/6小鼠,体质量11~18 g;雄性C57BL/6小鼠,体质量12~22 g。小鼠均为4~6周

龄,购自浙江维通利华实验动物有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(浙)2019-0001,动物群养:每笼3只,每12小时明暗交替,饲养环境湿度为40%~70%,温度为20~26 °C,动物自由饮水和摄食。

所有动物实验均经益诺思生物技术南通有限公司动物护理和使用委员会(IACUC)批准,批准号为IACUC-2022-m-552。

## 2 方法

### 2.1 非放射性NaI标记前后外泌体的相关表征

通过非放射性NaI对外泌体进行冷标记,标记方法同“2.2”项,对标记前后的外泌体进行表征。

**2.1.1 透射电子显微镜(TEM)观察** 将10  $\mu$ L PBS重悬提取的外泌体溶液,用50  $\mu$ L 2%(体积分数)多聚甲醛室温固定30 min,取上述混合液8  $\mu$ L滴加至孔径2 nm的载样碳涂层铜网格上,静置风干10 min,再用1%(体积分数)醋酸双氧铀染色2次,每次6 min。用滤纸从滤网侧边吸干液体,将铜网装入透射电镜,设置电压,观察形态并拍照。

**2.1.2 纳米粒子跟踪分析** 取10  $\mu$ L提取的外泌体悬液,PBS稀释100倍后使用纳米粒子跟踪分析仪记录布朗运动下外泌体的运动轨迹,并通过仪器自带的分析软件进行分析,测量流体动力学直径和浓度,用于确定粒径分布。

**2.1.3 Western blotting实验** 取50  $\mu$ L提取物悬液,加入20  $\mu$ L的1% RIPA裂解液,冰上裂解30 min,超声破碎1 min。4 °C条件下12 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心30 min提取蛋白,蛋白浓度测定试剂盒(BCA法)检测蛋白浓度。将蛋白溶液按照4:1的比例加入5 $\times$ 蛋白上样缓冲液,100 °C沸水浴变性15 min。配制12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)和5%浓缩胶,将制胶器放入电泳槽后加足够电泳液上样电泳,浓缩胶电压75 V,分离胶电压120 V,电泳至溴酚蓝里最底部大约1 cm终止电泳。蛋白转移到0.45  $\mu$ m经甲醇活化的二氟乙烯(PVDF)膜上,300 mA恒流转膜0.5 h,转膜过程中将转膜设备放在冰水中降温。转印完的膜放入装有TBST的孵育槽中快速涮洗1次,加脱脂牛奶后于脱色摇床上室温封闭30 min,弃封闭液后加入一抗CD63和TSG101,4 °C孵育过夜;回收一抗,用TBST洗膜3次,每次5 min,用抗兔IgG抗体(1:1 000)孵育30 min;TBST洗膜3次,每次5 min;应用发光检测试剂盒进行显影和定影,凝胶成像系统曝光。

## 2.2 $^{125}\text{I-NaI}$ 标记外泌体的制备与纯化

向 Iodogen 管中依次加入待标记外泌体样品(160  $\mu\text{g}$ 、200  $\mu\text{L}$ )、 $^{125}\text{I-NaI}$  溶液(6  $\mu\text{L}$ , 1.294 mCi), 在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下 400  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡孵育 30 min; 用蛋白纯化仪进行纯化, 将碘化标记反应后的混合物通过预先用 0.01  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS 缓冲液平衡过的 Superose 6 Increase 10/300 GL 柱, 用 0.01  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS 缓冲液洗脱至放免管中, 体积流量为 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 每 30 秒收集 1 管洗脱液, 连续收集 50 管, 以放射性活度计测定各管的放射性活度, 确定标记物峰(相对分子质量较大的先洗脱出来), 以洗脱管数为横坐标, 放射性活度为纵坐标绘制洗脱曲线; 合并相应组分超滤离心, 吸取上层截留液体作为本次标记产物  $^{125}\text{I}$ -外泌体。用 Radio-HPLC 法对纯化后样品的放射性化学纯度进行测定(色谱柱: Yarra<sup>TM</sup> 3  $\mu\text{m}$  SEC-3000 LC Column 300  $\text{mm}\times 7.8$   $\text{mm}$ , 流动相 0.01  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS, 体积流量 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )。

标记率 = 产品的放射性 / 用于标记的总放射性

纯化纯度 = 产品峰的放射性 / 所有峰的放射性

## 2.3 细胞培养

**2.3.1 细胞复苏** 从液氮内取出含有细胞的冻存管, 标识核对无误后立即将其置于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中, 反复振荡使管内细胞悬液在 1 min 内全部融化; 用酒精棉球擦拭消毒冻存管外部, 在无菌超净台中旋开管盖, 吸出细胞悬液加至分装有 9 mL 完全培养基的离心管中, 混匀, 900  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 4 min, 弃上清液, 于离心管内的细胞沉淀物中重新加入完全培养基, 吹打均匀后分瓶接种, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下于恒温培养箱中加湿培养。

**2.3.2 细胞传代** 培养至细胞贴壁 80% 左右, 即至对数生长期时, 弃去瓶/皿中原培养基, 加常温 PBS 轻轻润洗细胞 10~20 s, 弃去 PBS, 重复 2 遍, 加入 1 mL 胰酶, 轻轻晃动培养瓶以使胰酶铺匀瓶底细胞层, 将培养瓶放入 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中消化, 待细胞完全皱缩变圆后加入完全培养基终止胰酶消化。吹打吸出细胞悬液置于离心管中, 900  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 4 min, 弃上清, 加新的完全培养基轻轻重悬细胞, 均匀分到新的培养瓶中, 补足完全培养基, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下于恒温培养箱中加湿培养。

## 2.4 肿瘤模型构建

收集处于对数生长期的小鼠胰腺癌细胞, 消化离心后用 PBS 润洗 2 遍, 进行细胞计数并用 PBS 缓冲液调整细胞密度至  $1\times 10^7\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 小鼠剃除接种部位被毛后于生物安全柜中消毒接种部位, 固定小

鼠, 针尖轻轻挑起小鼠右侧腋下皮肤, 按每只 100  $\mu\text{L}$  接种细胞悬液, 慢慢旋转退出, 注射后轻轻按压注射点, 防止细胞悬液从针孔漏出; 接种后定期观察小鼠生长及出瘤情况, 待注射部位出现肿瘤, 且肿瘤生长至体积约 150  $\text{mm}^3$  时用于体内组织分布研究。

## 2.5 $^{125}\text{I-NaI}$ 标记外泌体的生物分布

选用 24 只 C57BL/6 荷瘤小鼠随机分为 4 组, 每组 6 只, 雌雄各半, 外泌体标记纯化后单次尾 iv 于小鼠体内(每只约 5  $\mu\text{Ci}$ ), 各组小鼠分别于注射后 2、6、24、72 h 经  $\text{CO}_2$  麻醉后心脏放血处死, 取血清、脑、肌肉、脂肪、骨骼、肾上腺、性腺、胰腺、脾脏、胃、十二指肠、肺、心脏、肾脏、肝脏、甲状腺和肿瘤共 17 种体液和组织。各组织用生理盐水清洗后置于滤纸上晾干, 放入已经称质量的放免管中准确称质量后加入适量生理盐水并将其剪碎, 用移液器吸取 400  $\mu\text{L}$  组织匀浆液(血清取 50  $\mu\text{L}$ ), 加入相同体积的 20% TCA 沉淀蛋白, 4 500  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min 后利用  $\gamma$  计数器测定各管的总放射性, 弃上清后再次测定沉淀放射性, 计算各组织/血清在不同时间点的蛋白沉淀率; 并计算在不同时间点的每克组织(每毫升体液)放射性计数占总注入放射性计数百分比(%ID $\cdot\text{g}^{-1}$ 或%ID $\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 得出不同时间点荷瘤小鼠体内的放射性分布数据。

蛋白沉淀率 = 沉淀放射性 / 总放射性

组织放射性(%ID $\cdot\text{g}^{-1}$ ) = (组织的放射性计数 / 注射药物的放射性计数) / 脏器质量

血清放射性(%ID $\cdot\text{mL}^{-1}$ ) = (血清的放射性计数 / 注射药物的放射性计数) / 取样体积

## 2.6 数据处理

用 Microsoft Excel 软件处理实验数据, 数据以  $x\pm s$  表示, 用 GraphPad Prism 软件作图。

## 3 结果

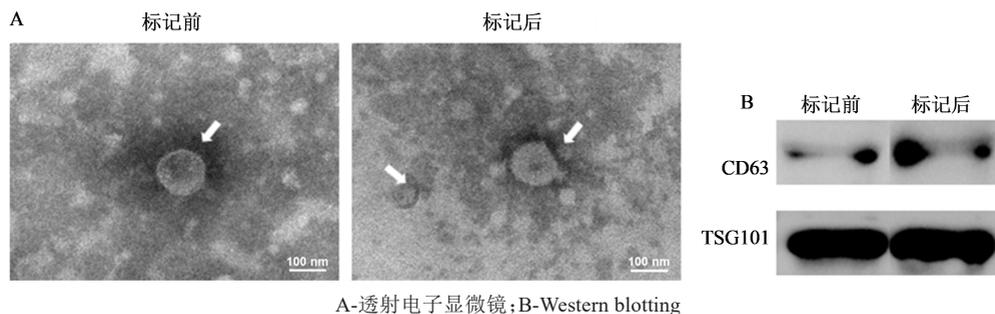
### 3.1 非放射性 NaI 标记前后外泌体的相关表征

透射电镜考察外泌体的形态, 结果显示标记前后外泌体形态均呈圆形或茶托样(图 2-A); 通过 Western blotting 测定外泌体表面特征性蛋白, 结果也证实标记前后均存在 CD63 和 TSG101(图 2-B)。

纳米粒子跟踪分析测定结果显示标记前外泌体的粒径峰值为 113 nm, 标记后外泌体粒径峰值为 122 nm, 粒径范围主要分布在 50~200 nm, 符合其尺寸范围(图 3)。

### 3.2 $^{125}\text{I-NaI}$ 标记外泌体的制备与纯化

蛋白纯化仪收集管放射性洗脱曲线见图 4, 第 1 峰为  $^{125}\text{I}$ -外泌体, 约在第 18 管出现至第 20 管结束,



A-透射电子显微镜; B-Western blotting  
A-transmission electron microscope; B-Western blotting

图2 外泌体标记前后表征

Fig. 2 Characterization of exosomes before and after labeling

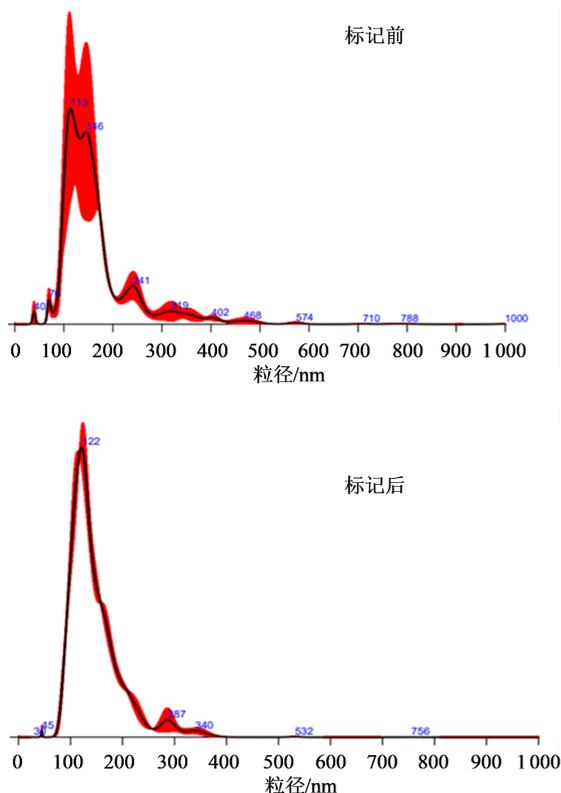


图3 纳米粒子跟踪分析

Fig. 3 Nanoparticle tracking analysis

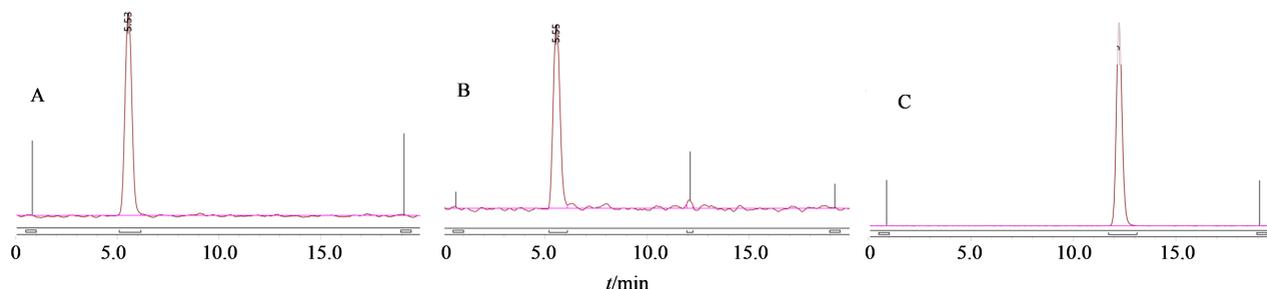


图5  $^{125}\text{I}$ -外泌体标记后(A)、 $^{125}\text{I}$ -外泌体给药后(B)、 $^{125}\text{I}$ -NaI(C)Radio-HPLC放射性图谱

Fig. 5 Radio-HPLC radio chromatogram of  $^{125}\text{I}$ -exosome after labeling (A) and after administration (B) and  $^{125}\text{I}$ -NaI (C) 性分布较高、清除较快,在肝脏 [ (10.899 2 ± 1.5181) %IDg<sup>-1</sup> ]、脾脏 [ (2.5664 ± 0.7998) %ID·g<sup>-1</sup> ]、肾脏和肺脏等血流丰富的组织有较高的放射性摄取,随着时间的延长血液中的放射性计数逐渐降低,相应组织的放射性分布也随之减少;脑、心脏、脂肪和肌肉组织摄取较少;胃肠道也含有一定放射

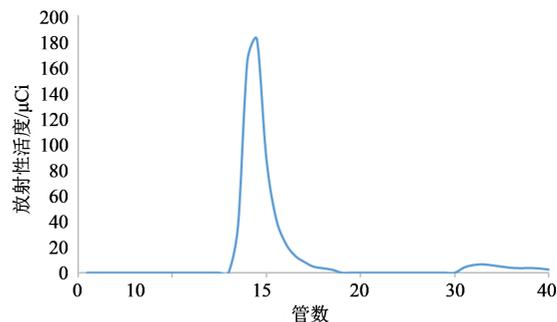


图4 收集管放射性曲线

Fig. 4 Curve of collecting pipe radioactivity

合并超滤测得上层截留液体放射性为360  $\mu\text{Ci}$ ,  $^{125}\text{I}$ -NaI 标记外泌体的标记率为27.82%;纯化后 Radio-HPLC 法测得即时放化纯度为100%,给药后放化纯度为(93.34 ± 5.48)%,稳定性稍有降低,  $^{125}\text{I}$ -外泌体及游离  $^{125}\text{I}$ -NaI 的放射性图谱见图5,  $^{125}\text{I}$ -外泌体的放射性保留时间为5.5 min 左右,游离  $^{125}\text{I}$ -NaI 放射性保留时间为12.25 min。

### 3.3 $^{125}\text{I}$ -NaI 标记外泌体的生物分布

荷瘤小鼠单次 iv 给予  $^{125}\text{I}$ -外泌体后不同时间点总放射性与沉淀放射性的分布情况见图6、7,大部分组织沉淀放射性与总放射性分布相似,血清放射

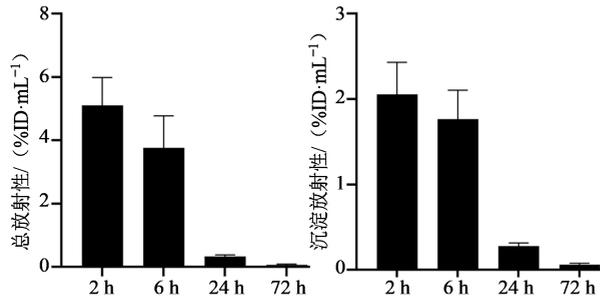


图6 荷瘤小鼠单次iv <sup>125</sup>I-外泌体后血清的放射性分布  
Fig. 6 Radioactivity distribution in serum after single iv injection of <sup>125</sup>I-exosome in tumor-bearing mice

性,可能为游离碘,也可能表明给药后经粪便排泄;在肿瘤部位有一定的放射性富集 [(0.291 0±0.056 0) %ID·g<sup>-1</sup>];证明该外泌体具有一定的靶向性分布特征。给药后72 h,肝脏中仍有较高摄取,肿瘤中仍有放射性分布。不同时间点各组织的蛋白沉淀率见表1,2~6 h各组织脏器的蛋白沉淀率较低,结合Radio-HPLC图谱及组织分布结果,表明<sup>125</sup>I-NaI标记外泌体稳定性有所降低,可经脱碘过程形成游离<sup>125</sup>I,有研究结果表明游离<sup>125</sup>I可分布至胃组织中。

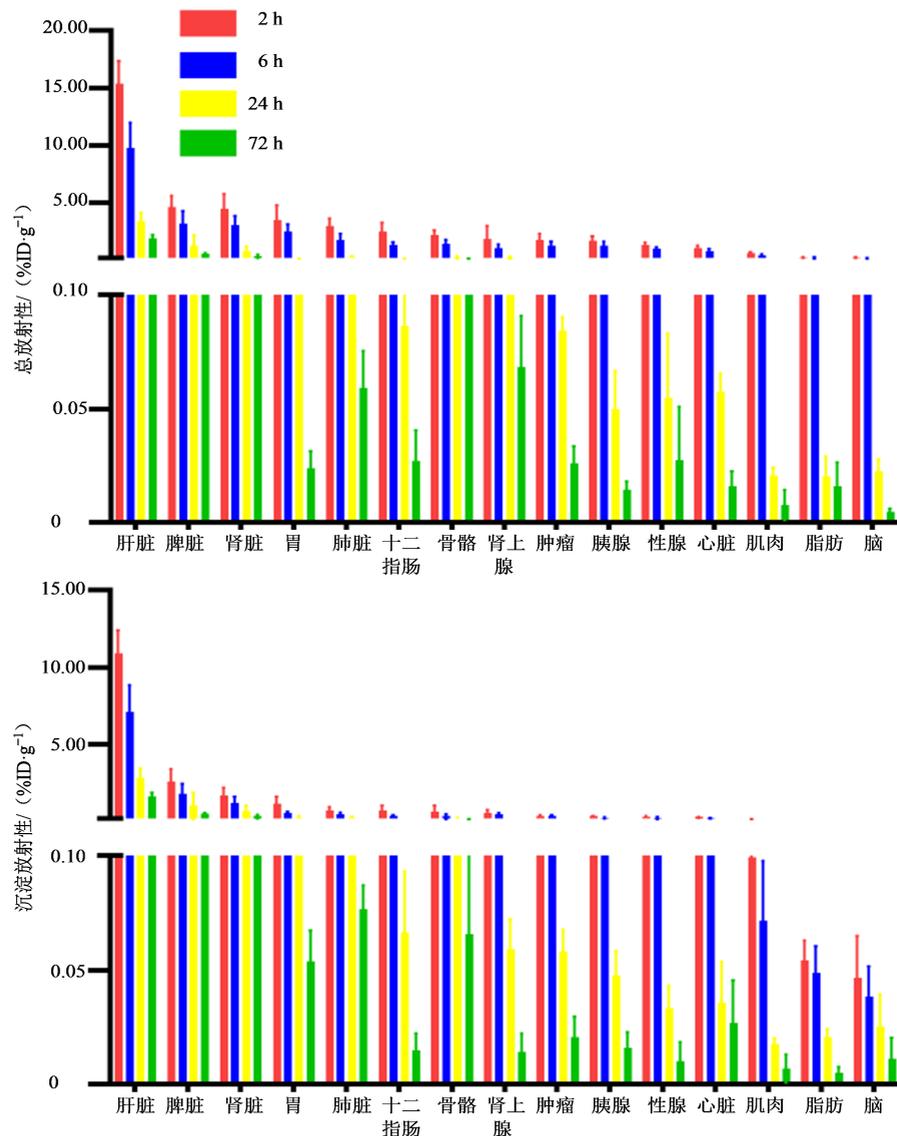


图7 荷瘤小鼠单次iv <sup>125</sup>I-外泌体后各组织的总放射性、沉淀放射性分布

Fig. 7 Total radioactivity distribution and precipitated radioactivity distribution in tissues after single intravenous injection of <sup>125</sup>I-exosome in tumor-bearing mice

#### 4 讨论

本研究结果表明,外泌体可进行<sup>125</sup>I放射性标记且几乎不影响物理及生物学特性;<sup>125</sup>I标记外泌体操作简便,方法稳定可靠,重复性好,标记产物具有良

好的标记率和放化纯度。荷瘤小鼠iv <sup>125</sup>I-外泌体后的生物学分布显示总放射性分布与沉淀放射性分布相似,药物广泛分布于全身大部分组织器官,血流丰富的组织放射性分布较高,而血流不丰富的组

表1 蛋白沉淀率  
Table 1 Protein precipitation rate

组织	蛋白沉淀率/%			
	2 h	6 h	24 h	72 h
血清	40.28	46.79	83.81	89.51
脑	28.29	35.88	91.68	96.70
肌肉	18.13	20.16	84.72	89.77
脂肪	23.31	24.77	80.16	69.67
骨骼	31.69	29.75	69.45	72.09
肾上腺	29.37	27.55	80.35	96.12
性腺	16.74	16.93	65.19	96.78
胰腺	15.40	15.16	66.73	71.46
脾脏	55.48	55.42	83.19	87.62
胃	15.45	15.75	54.72	59.22
十二指肠	28.08	23.24	76.99	55.53
肺脏	36.78	28.37	78.49	90.75
心脏	26.00	24.79	83.38	99.02
肾脏	36.11	37.60	84.31	87.95
肝脏	70.99	71.99	81.53	86.29
肿瘤	16.96	21.66	68.96	79.77

织放射性分布较低,同时结果表明工程化改造的外泌体具有一定的肿瘤靶向性的分布特征。

外泌体是由多种细胞主动向外分泌的磷脂双分子层包围的纳米囊泡结构,体内发挥细胞与细胞间的通讯和物质传递作用。近年来,外泌体的基本生物学研究取得了很大进展,其来源广泛,凭借生物相容性、稳定性、低免疫原性和低毒性成为药物开发和递送的理想候选者,具有较大的临床应用潜力,工程化外泌体则可在一定程度上增强靶向性,提高递送效率。

临床研究外泌体需要更好地了解其体内分布行为,在不断发展的纳米技术领域,放射性同位素技术有助于指导外泌体在医学诊断和治疗方面的应用,常见研究外泌体组织分布的方法有光学成像,但荧光信号在组织的深部穿透能力较弱,而放射性核素发射的 $\gamma$ 光子穿透力强,不受组织深度限制;此外其灵敏度高于磁共振成像,可定量分析被标记物的生物分布。 $^{125}\text{I-NaI}$ 作为一种放射性示踪剂为外泌体提供一种简单、有效和直接的放射性标

记方法,可定量研究外泌体的生物分布和肿瘤靶向性,通过实现对外泌体的体内追踪,从而更好地研究外泌体作为纳米治疗药物载体的潜在作用,可以促进基于外泌体的药物递送系统的开发。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Jabalee J, Towle R, Garnis C. The role of extracellular vesicles in cancer: Cargo, function, and therapeutic implications [J]. *Cells*, 2018, 7(8): 93.
- [2] Robbins P D, Morelli A E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3): 195-208.
- [3] Chen H Z, Wang L Y, Zeng X L, et al. Exosomes, a new star for targeted delivery [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 751079.
- [4] Yi Y W, Lee J H, Kim S Y, et al. Advances in analysis of biodistribution of exosomes by molecular imaging [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2): 665.
- [5] Di Rocco G, Baldari S, Toietta G. Towards therapeutic delivery of extracellular vesicles: Strategies for *in vivo* tracking and biodistribution analysis [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 1-12.
- [6] Morishita M, Takahashi Y, Nishikawa M, et al. Pharmacokinetics of exosomes—An important factor for elucidating the biological roles of exosomes and for the development of exosome-based therapeutics [J]. *J Pharm Sci*, 2017, 106(9): 2265-2269.
- [7] Kourembanas S. Exosomes: Vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy [J]. *Annu Rev Physiol*, 2015, 77: 13-27.
- [8] Li Y J, Wu J Y, Wang J M, et al. Emerging strategies for labeling and tracking of extracellular vesicles [J]. *J Control Release*, 2020, 328: 141-159.
- [9] Wiklander O P B, Nordin J Z, O'Loughlin A, et al. Extracellular vesicle *in vivo* biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting [J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4(1): 26316.
- [10] Yamamoto K, Venida A, Yano J, et al. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I [J]. *Nature*, 2020, 581(7806): 100-105.

[责任编辑 兰新新]