

基于稀土铕离子荧光标记的磷酸钙纳米材料 体内分布与代谢研究

汤新丽¹, 丁自友¹, 陈俊锐¹, 赵刚², 韩颖超¹

(1. 武汉理工大学 材料复合新技术国家重点实验室, 武汉 430070; 2. 华中科技大学 同济医学院协和医院, 急诊外科, 武汉 430022)

摘要: 纳米磷酸钙(nCaP)在药物递送、生物成像、抗菌、促成骨等纳米医学领域具有潜在的应用前景,但其体内分布与代谢规律尚未完全明确,有待深入研究。本研究采用稀土铕离子荧光标记法,以荷瘤裸鼠为模型,探究了两种尺寸 nCaP(纳米点 NDs: (2.53 ± 0.63) nm; 纳米颗粒 NPs: (107.76 ± 25.37) nm $\times$ (17.66 ± 1.63) nm)在肝、脾、肺、肾、肿瘤中的分布与代谢。结果显示,裸鼠尾静脉注射 200 μ L 质量浓度为 1.5 mg/mL 的两种 nCaP 溶液,4 h 后 CaP NPs 主要分布在肝脏和脾脏中,分别占比 65.70%和 29.32%,在肺脏中占比 3.83%,而在肾脏和肿瘤中仅占比 0.84%和 0.32%,表明大尺寸 CaP NPs 更容易被网状内皮(RES)系统中的吞噬细胞捕获。与 CaP NPs 相比, CaP NDs 在肝脏、脾脏和肺脏中的积聚显著减少了 89.40%、87.00%和 88.89%,而在肾脏和肿瘤中的蓄积分别提升了 3.67 倍和 3.06 倍,表明尺寸减小有利于 CaP NDs 被肾小球滤出并增强其肿瘤靶向能力。CaP NDs 在肝、脾、肺中的清除率(CLz)分别是 CaP NPs 的 6.60 倍、4.14 倍和 2.40 倍,是肾脏的 42.29%,表明尺寸减小有助于 CaP NDs 被肝脏、脾脏和肺脏内的吞噬细胞迅速代谢,但存在肾小管的重吸收作用。在肿瘤中 CaP NDs 的 CLz 值比 CaP NPs 降低了 91.9%,表明小尺寸 CaP NDs 具有显著增强的肿瘤靶向和滞留能力。进一步对荷瘤裸鼠初步建立了包含尺寸因素的 nCaP 生理药代动力学(PBPK)模型, CaP NDs 和 CaP NPs 在肿瘤部位分布的预测拟合度(R^2)分别达到 0.925 和 0.827。本研究揭示了 nCaP 的体内分布与代谢规律,为其医学应用提供了支撑。

关键词: 纳米磷酸钙; 尺寸效应; 荧光标记; 组织分布; 生理药代动力学模型

中图分类号: TQ174 文献标志码: A 文章编号: 1000-324X(2025)07-0754-11

In vivo Distribution and Metabolism of Calcium Phosphate Nanomaterials Based on Fluorescent Labeling with Rare Earth Europium Ions

TANG Xinli¹, DING Ziyu¹, CHEN Junrui¹, ZHAO Gang², HAN Yingchao¹

(1. State Key Laboratory of Advanced Technology for Materials Synthesis and Processing, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China; 2. Department of Emergency Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: Nano-calcium phosphate (nCaP) has potential applications in nanomedicine fields such as drug delivery, bioimaging, antibacterial treatment, and bone formation promotion. However, its distribution and metabolic patterns

收稿日期: 2024-12-03; 收到修改稿日期: 2025-01-17; 网络出版日期: 2025-02-13

基金项目: 国家自然科学基金(51672206); 材料复合新技术国家重点实验室开放基金(2023-KF-9)

National Natural Science Foundation of China (51672206); State Key Laboratory of Advanced Technology for Materials Synthesis and Processing (2023-KF-9)

作者简介: 汤新丽(1999-), 女, 硕士研究生. E-mail: tangxinli9@163.com

TANG Xinli (1999-), female, Master candidate. E-mail: tangxinli9@163.com

通信作者: 韩颖超, 教授. E-mail: hanyingchao@whut.edu.cn

HAN Yingchao, professor. E-mail: hanyingchao@whut.edu.cn

within the body are not yet fully understood and require further in-depth research. This study employs a rare earth europium ion fluorescence labeling method and uses tumor-bearing mice as a model to investigate the distribution and metabolism of two sizes of nCaP (nanodots NDs: (2.53 ± 0.63) nm; nanoparticles NPs: (107.76 ± 25.37) nm $\times$ (17.66 ± 1.63) nm) in the liver, spleen, lung, kidney, and tumor tissue. The results showed that after tail vein injection of 200 μ L with a mass concentration of 1.5 mg/mL nCaP into tumor-bearing nude rats for 4 h, CaP NPs were primarily distributed in the liver and spleen, accounting for 65.70% and 29.32%, respectively, with 3.83% in the lung, while only 0.84% and 0.32% in the kidney and tumor. This suggests that larger CaP NPs are more easily captured by phagocytes within the reticuloendothelial system (RES). In contrast, compared to CaP NPs, accumulation of CaP NDs in the liver, spleen, and lung decreased significantly by 89.40%, 87.00%, and 88.89%, respectively, while their accumulation in the kidney and tumor increased by 3.67 and 3.06 times. This indicates that smaller particle size facilitates CaP NDs in glomerular filtration for urinary excretion and enhances their tumor-targeting capability. The clearance rates (CL_z) of CaP NDs in the liver, spleen, and lung were 6.60, 4.14, and 2.40 times higher than that of CaP NPs, respectively, and 42.29% in the kidney. This indicates that reduced size of CaP NDs facilitates rapid metabolism by phagocytes in the liver, spleen, and lung but also results in reabsorption in the renal tubules. In tumor, the CL_z of CaP NDs decreased by 91.9%, much smaller than that of CaP NPs, suggesting that the smaller CaP NDs exhibit significantly enhanced tumor targeting and retention capability. In the meantime, a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model incorporating particle size factors was preliminarily established for tumor-bearing mice to simulate the distribution of nano-calcium phosphate. The model's predictive fit (R^2) for CaP NDs and CaP NPs in tumor sites reached 0.925 and 0.827, respectively. This study provides promising support for understanding *in vivo* distribution and metabolic patterns of nCaP and applying potential in medicine.

Key words: nano-calcium phosphate; size effect; fluorescent labeling; tissue distribution; physiologically based pharmacokinetic model

磷酸钙(Calcium phosphate, CaP)天然存在于哺乳动物骨骼和牙齿中, 因其良好的生物相容性和生物活性, 已广泛应用于牙科和骨修复等领域^[1-2]。尤其是 nCaP 在生物医学领域展现出独特的应用潜力。例如, nCaP 的高比表面积和丰富的表面吸附位点有助于提高药物装载量, 并可实现药物的肿瘤靶向递送, 从而降低毒副作用^[3-5]。此外, 通过离子掺杂可以赋予 nCaP 独特的性质。Eu³⁺、Gd³⁺等稀土离子掺杂 nCaP 可以作为安全的生物荧光成像剂^[6]; 锰离子掺杂 nCaP 与骨肉瘤细胞共培养表现出增强的光热效应和抗肿瘤性能, 同时可以作为磁共振成像的对比增强剂^[7-8]; 铜离子掺杂 nCaP 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌表现出很强的抗菌活性^[9]。

虽然 nCaP 在生物医学领域的应用不断增多, 但对其在生物体内的分布和代谢规律这一基础科学问题的研究仍不够深入, 尤其是 nCaP 的体内定量示踪和检测技术。目前, 研究人员采用有机荧光染料、放射性同位素、磁信号标记并辅以透射电子显微镜、活体成像、正电子发射断层扫描、计算机断层扫描等手段初步揭示了 nCaP 的体内分布^[10-12]。

Zhao 等^[10]将荧光染料 DiR 与直径 80 nm 的球形 S-CaP 结合, 使用小动物活体成像仪和透射电子显微镜监测其在体内的分布。研究发现, 球形 S-CaP 纳米颗粒主要分布在肝脏。该方法具有较高的空间分辨率和实时成像能力, 但其灵敏度受到荧光淬灭和染料自身荧光的影响^[13-14]。Kollenda 等^[11]将放射性同位素 ⁶⁸Ga 结合到 130 nm 的 nCaP 上, 通过正电子发射断层扫描结合计算机断层扫描, 监测其在体内的分布, 发现 nCaP 迅速进入肺脏, 随后重新分布到肝脏和脾脏中。该方法灵敏度高, 可用于定量分析, 但需要考虑放射性物质对生物体的潜在影响^[15-16]。磁共振成像是一种无创成像技术, 能够提供高分辨率的组织成像。Adamiano 等^[12]通过在羟基磷灰石(HA)中掺杂铁基磁性材料(FeHA), 提高其在磁共振成像中的对比度, 发现 FeHA 主要在肝脏和脾脏中积累。该方法的优势在于能够提供多维度的成像数据, 且无辐射危害, 但难以实现定量检测^[17-18]。本课题组前期建立了一种稀土荧光标记法^[19-20], 可以在组织中实现 nCaP 的定量检测, 初步研究 nCaP 静脉注射 8 h 后在体内的分布发现, 其在肿瘤部位的蓄积

及在脏器中的分布受 nCaP 尺寸的影响显著^[21]。该方法准确性高、检测限低、检测所需样品量少,且安全无辐射。

基于前期的初步发现,为了深入了解不同尺寸 nCaP 在体内的分布与代谢规律,本研究通过对比荷瘤裸鼠尾静脉注射磷酸钙纳米点(CaP NDs)和磷酸钙纳米颗粒(CaP NPs)在不同时间点的组织分布,以揭示尺寸对其体内分布与代谢及肿瘤靶向的影响,并建立包含尺寸因素的 nCaP PBPK 模型,以预测不同尺寸 nCaP 在小鼠肿瘤部位的分布蓄积情况。

1 实验方法

1.1 材料

二水氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、十二水磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)均购自国药集团化学试剂有限公司,六水硝酸铕($\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,聚丙烯酸(PAA, 相对分子质量约为 1800)购自 Sigma-Aldrich,胎牛血清(FBS)购自四季青公司,1640 培养基、DMEM 培养基、青霉素/链霉素(PS)均购自 Gibco 公司,CCK-8 试剂盒购自武汉 HYCEZMBIO 公司,荧光增强液购自 PerkinElmer 公司。实验所用试剂均为分析纯。

1.2 nCaP 的合成

采用 PAA 络合-沉淀法制备 CaP NDs。将 0.2376 g PAA 溶解于 10 mL 超纯水中,在搅拌条件下逐滴加入 0.05 mol/L 的 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液中,并将溶液的 pH 调节至 7.3,搅拌 1 h。随后缓慢滴加 0.03 mol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶液,并将 pH 调节至 9.3,定容至 30 mL,继续搅拌 1 h 后,静置陈化 6 h,最终得到 CaP NDs 悬浮液。

采用水热法合成 CaP NPs。称取适量 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,配制成 0.0668 mol/L 的 Ca^{2+} 溶液,将等体积的 0.04 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶液快速加入 Ca^{2+} 溶液中,并调节 pH 至 10.5,然后将混合液置于 180 °C、3 MPa 的高温高压反应釜中反应 8 h。反应完成后,用超纯水离心洗涤三次,将沉淀重新分散于 30 mL 超纯水中,并在超声条件下加入 0.3 mg/mL 的 PAA 溶液,放置 3 d,得到 CaP NPs 悬浮液。

在上述 nCaP 合成过程中,将一定量的 $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液($\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})=8.00\%$,摩尔百分比)与 Ca^{2+} 溶液混合,使 Eu^{3+} 部分取代 Ca^{2+} ,按上述两种合成方法分别得到 Eu:CaP NDs 混悬液和 Eu:CaP NPs 混悬液,基于 Eu^{3+} 自身荧光对 nCaP 进行体内示踪。

使用冷冻干燥机将悬浮液干燥 24 h 后得到固体粉末样品。

1.3 材料表征

采用透射电子显微镜(TEM, JEM-1400Plus, 日本)观察样品的形貌和微观结构,使用 ImageJ 软件对 TEM 照片中 200 个纳米颗粒进行尺寸统计分析,利用纳米粒度仪(DLS, Malvern, 英国)测试样品的水合粒径,通过傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR, Nexus, 美国)分析样品的官能团信息,使用 X 射线衍射仪(XRD, Empyrean, 荷兰)对晶体结构进行表征,采用多功能酶标仪(Molecular Devices, 美国)对组织内材料含量进行检测。

1.4 实际掺杂量

分别取 1 mg 的 Eu:CaP NDs 和 Eu:CaP NPs 粉末于离心管中,加入 10 mL 5%(摩尔百分比)稀硝酸使其完全溶解。采用全谱直读等离子体发射光谱仪(ICP-AES, Prodigy 7, 美国)测定溶液中 Ca、P 和 Eu 元素的含量,并根据测定结果计算材料的实际化学计量比。

1.5 离子释放实验

将 10 mL nCaP 混悬液置于透析袋中,分别浸泡在 pH 7.4 和 5.5 的磷酸盐缓冲液(PBS)中,将其置于 37 °C 恒温振荡器中,分别在 10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 和 48 h 取出 1 mL,并补充相同体积的缓冲液。使用荧光分光光度计(970CRT, 上海)检测透析液中铕离子的含量,进而计算材料的释放百分比。

1.6 细胞培养

将人正常肝细胞(HL7702 细胞)培养在含 1%(体积分数)PS 和 10%(体积分数)FBS 的 1640 培养基中,放入培养箱(37 °C、5%(体积分数) CO_2)孵育。将人肝癌细胞(HepG2 细胞)培养在含 1%(体积分数)PS 和 10%(体积分数)FBS 的 DMEM 培养基中,放入培养箱孵育。

1.7 生物安全性评价

使用 CCK-8 法检测细胞毒性。使用 0.22 μm 微孔滤膜过滤 CaP NDs 和 CaP NPs 悬浮液,以去除细菌等微生物。将 HL7702 细胞以 5000 个/孔的密度接种于 96 孔板中,并在培养箱中培养 24 h。待细胞完全贴壁后,弃去旧培养基。分别与不同质量浓度(0、50、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 CaP NDs 和 CaP NPs 共孵育 48 h 后,弃去旧培养基。再加入 CCK-8 试剂,在培养箱中避光孵育 2 h 后,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(OD),按公式(1)计算细胞活力(%)。

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{OD}_{\text{test}} - \text{OD}_0}{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中, OD_{test} 、 $\text{OD}_{\text{control}}$ 、 OD_0 分别是实验组、对照组、空白组在 450 nm 处的吸光度。

处理 SD 大鼠, 收集新鲜红细胞, 配制不同浓度的 CaP NDs 和 CaP NPs 溶液。将 0.5 mL 生理盐水和 0.5 mL 去离子水分别加入 0.5 mL 5%(体积分数)红细胞悬液中, 设置成阴性对照组和阳性对照组, 于 37 °C 孵育 4 h, 离心后收集上清液, 用酶标仪测定 545 nm 处的吸光度, 按公式(2)计算溶血率。

$$\text{Hemolysis rate} = \frac{\text{OD}_{\text{test}} - \text{OD}_{\text{negative}}}{\text{OD}_{\text{positive}} - \text{OD}_{\text{negative}}} \times 100\% \quad (2)$$

式中, $\text{OD}_{\text{positive}}$ 、 $\text{OD}_{\text{negative}}$ 分别表示阳性对照组、阴性对照组在 545 nm 处的吸光度。

裸鼠尾静脉分别注射 200 μL 质量浓度为 1.5 mg/mL 的 CaP NDs 和 CaP NPs 溶液 8 h 后, 取各组裸鼠的血液及主要器官(心、肝、脾、肺、肾), 对血液进行血生化分析, 器官切片经过 H&E 染色后使用光学显微镜进行观察。

1.8 细胞摄取

将 HepG2 细胞接种在培养皿中, 待细胞贴壁后更换培养基, 分别加入含有 400 $\mu\text{g/mL}$ CaP NDs、CaP NPs 的新鲜培养基。随后, 将细胞置于培养箱中孵育 24 h。弃去培养基, 用 PBS 冲洗一次; 使用 4% 多聚甲醛室温固定 15 min 后, 用 PBS 冲洗三次; 再使用 2-(4-氨基苯基)-6-吡啶氨基脒二盐酸盐(DAPI)对细胞核进行染色 3 min 后, 用 PBS 冲洗三次。最后, 通过激光共聚焦显微镜(CLSM)观察细胞。

1.9 体内组织分布与代谢

通过皮下注射 HepG2 细胞悬液于裸鼠背部, 建立荷瘤裸鼠模型。将荷瘤裸鼠随机分成对照组、CaP NDs 实验组和 CaP NPs 实验组, 对照组的荷瘤裸鼠经尾静脉注射 200 μL 生理盐水, 实验组以 1.5 mg/mL 剂量分别注射 CaP NDs 和 CaP NPs。在给药后的不同时间点(0 h、10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、12 h、24 h 和 48 h), 对各组荷瘤裸鼠注射戊巴比妥钠处死, 切除肿瘤和主要器官(肝、脾、肺和肾), 使用 PBS 清洗组织, 称重后研磨, 并将研磨后的样品与硝酸混合, 静置过夜以提取组织材料。接着, 对匀浆进行离心处理, 将适量上清液与荧光增强液混合, 利用 Eu^{3+} 荧光定量法检测组织中的材料^[20], 最后根据 Eu^{3+} 实际掺杂量计算各器官及肿瘤部位 nCaP 的浓度, 并使用 DAS2.0 软件计算主要药代动力学参数

(药时曲线下面积(AUC(0-t))和器官清除率(CL_Z)。

1.10 肿瘤部位 PBPK 模型建立

本研究利用 PBPK 模型对 nCaP 在肿瘤部位的分布情况进行建模分析。假设 nCaP 的体内生物分布由穿过器官毛细血管膜的能力和被内吞作用吸收的能力决定。利用扩散限制模型描述纳米颗粒从血液到组织隔室的运输^[22-24]。建立的荷瘤裸鼠 PBPK 模型如图 1 所示^[25], 该模型由十个隔室组成: 静脉血、动脉血、肺、脾、肝、肾、脑、肌肉、肿瘤和其余组织, 除血管和脑外, 其余隔室都分为三个子隔室。静脉给药后, nCaP 随静脉血流进入肺脏的毛细血管, 然后经过动脉血流向小鼠的其他器官, 最终回流到静脉。该模型主要使用的数学方程如下。

用线性方程和 Hill 函数描述 nCaP 的内吞作用, 如公式(3)所示。

$$K_{\text{up},T}(t) = \frac{K_{\text{max},T} \times t^{m_T}}{t_{50,T}^{m_T} + t^{m_T}} \quad (3)$$

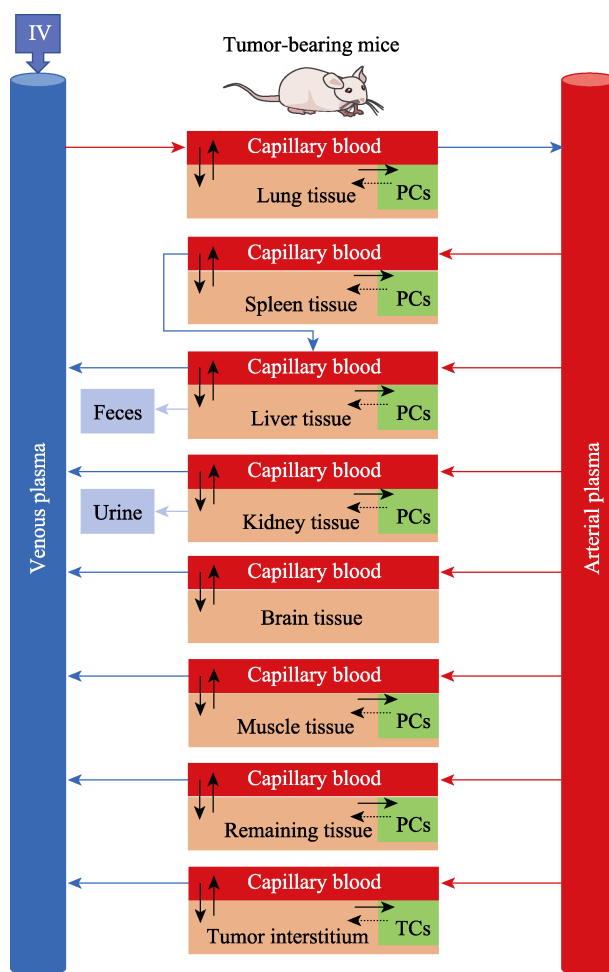


图1 荷瘤裸鼠的 PBPK 模型

Fig. 1 PBPK model of tumor-bearing mice

PCs indicate phagocytic cells; TCs indicate tumor cells

式中, t 为模拟时间(h); $K_{up,T}(t)$ 表示在特定时间 t 内肿瘤间质对 nCaP 的摄取速率常数(h^{-1}); $K_{max,T}$ 为最大摄取速率常数(h^{-1}); $t_{50,T}^*$ 为最大摄取率达到一半所用的时间(h); n_T 是 Hill 系数; 下标 T 表示肿瘤。

吞噬小室(PCs)中 nCaP 质量变化率等于 nCaP 从组织到肿瘤细胞(TCs)的摄取速率减去从 TCs 释放回到组织的速率, 实际摄取速率取决于可摄取量和摄取速率常数, 如公式(4~6)所示。

$$R_{up,T} = K_{up,T} \times A_{tissue,T} \quad (4)$$

$$R_{release,T} = K_{release,T} \times A_{Tc,T} \quad (5)$$

$$R_{Tc,T} = R_{up,T} - R_{release,T} \quad (6)$$

式中, $R_{up,T}$ 表示 nCaP 从肿瘤间质到 TCs 的摄取速率(mg/h); $A_{tissue,T}$ 表示肿瘤间质中 nCaP 的质量(mg); $R_{release,T}$ 表示 nCaP 从 TCs 到肿瘤间质的释放速率(mg/h); $K_{release,T}$ 表示肿瘤间质对 nCaP 的摄取速率常数(h^{-1}); $A_{Tc,T}$ 表示 TCs 中 nCaP 的质量(mg); $R_{Tc,T}$ 表示 TCs 中 nCaP 的质量变化率(mg/h)。

纳米颗粒的内吞作用受其尺寸的影响。研究表明, TCs 从组织中的摄取率是粒径的二次函数(式(7, 8))。

$$K_{max,T} = x_1 \times (d - y_1)^2 + z_1 \quad (7)$$

$$K_{release,T} = x_2 \times (d - y_2)^2 + z_2 \quad (8)$$

式中, x_1 、 y_1 、 z_1 、 x_2 、 y_2 、 z_2 均为常数; d 为纳米颗粒的粒径(nm)。

肿瘤部位三个子隔室之间的传质模型是基于两个主要的动力学过程, 如公式(9, 10)所示。

$$R_{blood,T} = Q_T \times (C_a - C_{VT}) - P_{AT} \times C_{VT} + \frac{P_{AT} \times C_{tissue,T}}{P_T} \quad (9)$$

$$R_{tissue,T} = P_{AT} \times C_{VT} - \frac{P_{AT} \times C_{tissue,T}}{P_T} - R_{up,T} + R_{release,T} \quad (10)$$

式中, $R_{blood,T}$ 表示肿瘤部位毛细血管亚室中 nCaP 的质量变化率(mg/h); Q_T 表示肿瘤部位的血流量(L/h); C_a 表示动脉血中 nCaP 的质量浓度(mg/L); C_{VT} 表示静脉血中 nCaP 的质量浓度(mg/h); P_{AT} 表示肿瘤部位中毛细血管与肿瘤间质的交叉渗透系数与血流量的乘积(L/h); $C_{tissue,T}$ 表示肿瘤间质中 nCaP 的质量浓度(mg/L); P_T 表示组织/血液分配系数; $R_{tissue,T}$ 表示肿瘤间质中 nCaP 的质量变化率(mg/h)。

PBPK 模型的编码和模拟使用 Berkeley Madonna 软件进行。

1.11 统计分析

所有数据以平均数±标准差表示, 采用单因素方差分析(ANOVA)评估对照组和实验组之间的显著性差异和统计学意义, $p < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 nCaP 的表征

TEM 照片显示, CaP NDs 呈球形, 颗粒尺寸均匀(图 2(a)), 平均粒径为 (2.53 ± 0.63) nm(图 2(e)), DLS 测出的水合粒径为 3.73 nm(图 2(k))。而 CaP NPs 的形貌为短棒状(图 2(c)), 对其棒状结构的长径和短径做统计分析后, 尺寸分别为 (107.76 ± 25.37) nm $\times$ (17.66 ± 1.63) nm(图 2(g, h)), 平均水合粒径为 235.96 nm(图 2(k))。掺杂 Eu^{3+} 后 nCaP 的形貌与未掺杂样品一致, 粒径分布范围相近(图 2(b, d, f, i, j))。通过 XRD 分析可知(图 2(l)), CaP NDs 在 $2\theta = 31^\circ \sim 34^\circ$ 范围内出现了弱结晶磷酸钙的衍射峰, 结合图 2(a)可知弱结晶物相是磷酸钙。CaP NPs 在 $2\theta = 25.871^\circ$ 、 31.940° 、 39.826° 、 46.725° 和 49.477° 处具有明显的衍射峰, 分别对应 HA 标准卡片(PDF #09-0432)的(002)、(211)、(310)、(222)和(213)晶面, 表明 PAA 表面修饰后未影响 CaP NPs 的晶体组成。 Eu^{3+} 掺杂前后, 样品衍射峰位置和结晶度基本一致, 未出现额外的衍射峰或峰形变化, 晶体结构未受到掺杂的显著干扰。在 FT-IR 图谱(图 2(m))中可以观察到 3448 cm^{-1} 处的吸收峰对应 PAA 分子中 O-H 的伸缩振动, 1719 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 PAA 分子中 COO-的弯曲振动。与纯 PAA 的-COOH 吸收峰相比, CaP NDs 与 CaP NPs 中 C=O 的伸缩振动吸收峰均有所偏移(1562 和 1419 cm^{-1}), 说明 PAA 分子通过带负电的-COOH 与 nCaP 表面带正电的 Ca^{2+} 之间的静电引力吸附在一起^[26-27]。在 $500 \sim 600\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰对应 nCaP 中磷酸根基团的弯曲振动, 其中 CaP NPs 吸收峰发生分裂, 结合 XRD 图谱可知, 这是由于 CaP NPs 具有良好的结晶性。掺杂 Eu^{3+} 后红外吸收峰的位置和强度未见明显漂移或变化, 表明 Eu^{3+} 掺杂未显著改变 nCaP 的化学键结构和官能团特征。

ICP-AES 结果表明 Eu:CaP NDs 和 Eu:CaP NPs 中 Eu/(Ca+Eu)的摩尔百分比分别为 7.86%和 7.82%, 接近理论掺杂量 8.00%; 且(Ca+Eu)/P 的摩尔比分别为 1.61 和 1.59, 接近理论值 1.67(表 1)。图 2(n)显示在 pH 5.5 条件下, Eu:CaP NDs 和 Eu:CaP NPs 中 Eu^{3+} 的累积释放量明显高于在 pH 7.4 条件下的累积释放量。这表明酸性环境可能加速了纳米颗粒的降解, 从而促进离子释放。然而, 在相同 pH 条件下, 两种纳米颗粒的释放行为无显著差异。

总的来说, 掺杂 Eu^{3+} 后, nCaP 在形貌、尺寸、化学结构及组成等方面无明显差异, CaP NDs 和 CaP NPs 中 Eu^{3+} 掺杂量接近于理论掺杂量, 且两者释放速率基本一致。

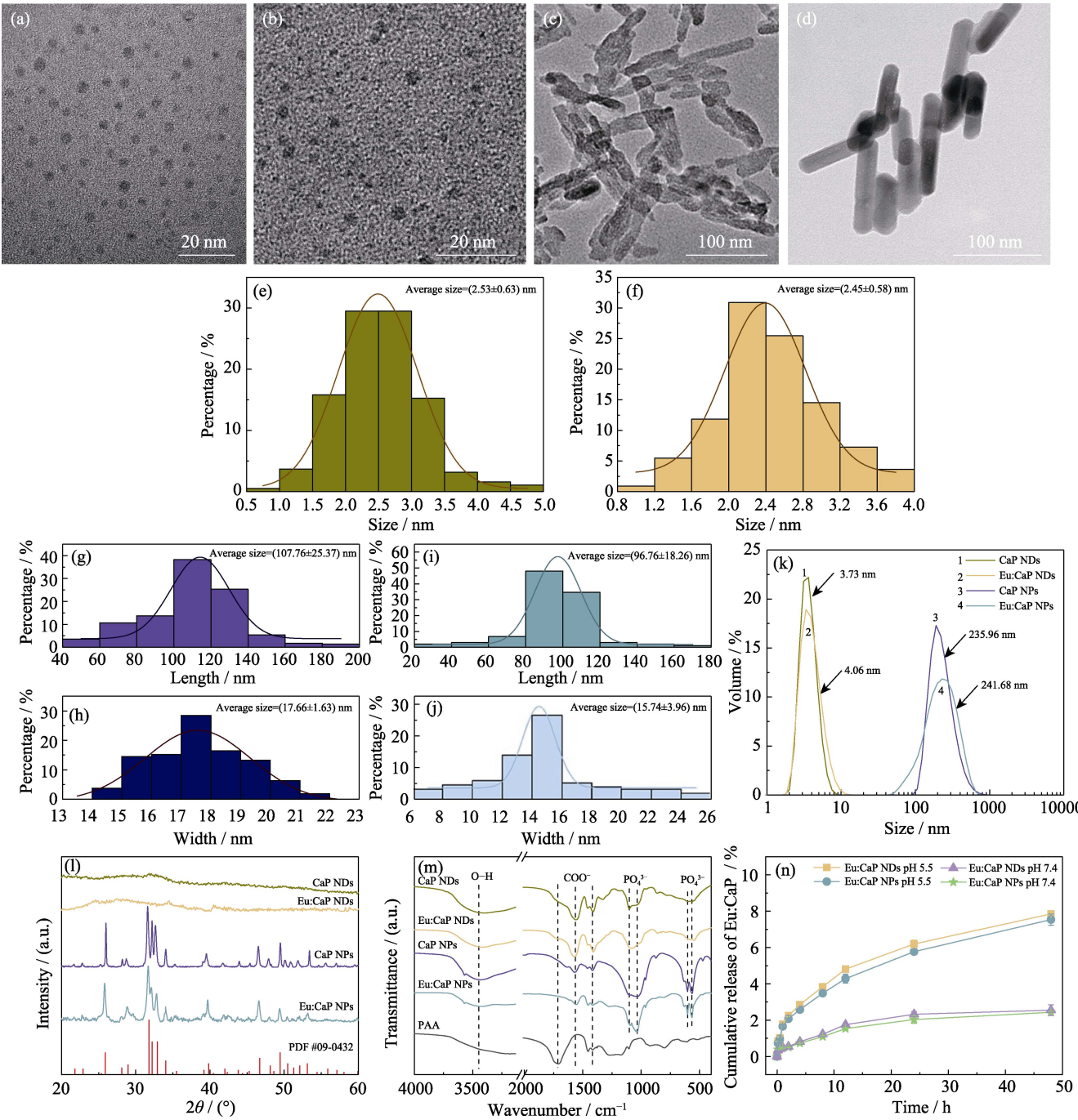


图 2 CaP NDs 和 CaP NPs 的表征

Fig. 2 Characterizations of CaP NDs and CaP NPs

(a-d) TEM images of CaP NDs (a), Eu:CaP NDs (b), CaP NPs (c), and Eu:CaP NPs (d); (e, f) Particle size statistical distributions of CaP NDs (e) and Eu:CaP NDs (f); (g-j) Length (g, i) and width (h, j) of CaP NPs (g, h) and Eu:CaP NPs (i, j); (k) DLS particle size distribution; (l) XRD patterns; (m) FT-IR spectra; (n) Europium ion release curves of Eu:CaP NDs and Eu:CaP NPs

表 1 Eu:CaP NDs 和 Eu:CaP NPs 中元素含量及摩尔比

Table 1 Elemental content and molar ratio of Eu:CaP NDs and Eu:CaP NPs

Sample	Value	Ca/(mg·L ⁻¹)	P/(mg·L ⁻¹)	Eu/(mg·L ⁻¹)	(Eu/(Ca+Eu))/%	(Ca+Eu)/P
Eu:CaP NDs	Actual	8.72	4.53	2.82	7.86	1.61
	Theoretical	—	—	—	8.00	1.67
Eu:CaP NPs	Actual	22.50	11.85	7.23	7.82	1.59
	Theoretical	—	—	—	8.00	1.67

2.2 生物安全性评价

细胞毒性数据分析表明(图 3(a)), CaP NDs、CaP NPs 分别与 HL7702 细胞共培养后, 细胞存活率均保持在 90%以上。与对照组相比, 不同浓度下细胞活力均无明显下降, 表明 CaP NDs 和 CaP NPs 均具有良好的生物相容性。溶血实验结果显示(图 3(b)), 不同浓度的 CaP NDs 和 CaP NPs 溶血率与对照组相比无明显差异, 均在 5%以下, 这一结果表明 CaP NDs 和 CaP NPs 对红细胞没有溶血性^[28]。

血生化参数是评价特定组织功能状态的关键指标。丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)作为评估肝功能的重要标志物, 其浓度水平变化能够反映肝细胞是否受损伤或功能异常^[29-30]。而肌酐(CR)和血尿素氮(BUN)则是评估肾功能的关键参数, 其浓度水平升高代表肾脏排泄功能受损^[29, 31]。图 3(c, d)显示, 与对照组相比, 血生化参数均未出现明显异常, 表明 CaP NDs 和 CaP NPs 未对裸鼠的肝脏和肾脏造成任何显著的功能障碍。组织学分析结果显示(图 3(e)), CaP NDs 组和 CaP NPs 组裸鼠的主要器官(心、肝、脾、肺、肾)结构完整, 细胞排列正常, 未

见明显的炎症细胞浸润或组织坏死现象, 进一步证实了 CaP NDs 和 CaP NPs 的安全性和生物相容性。

对比 CaP NDs 与 CaP NPs 在 HepG2 细胞内的荧光成像(图 3(f)), CaP NPs 实验组中仅有少数细胞发出微弱的红光荧光信号, 且存在局部信号聚集的现象。相比之下, CaP NDs 实验组中的所有细胞均能发出强烈且均匀分布的红色荧光信号, 这表明 CaP NDs 具有高效的细胞穿透能力, 能够大量进入细胞内部, 并在细胞内保持良好的荧光发射强度。

2.3 组织分布与代谢

2.3.1 CaP NDs 和 CaP NPs 在组织中的生物分布

nCaP 在组织中的分布表明, 两种不同尺寸的颗粒在器官中的分布不同(图 4)。总的来说, 在不同时间点(10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、12 h、24 h 和 48 h), CaP NPs 在肝脏、脾脏和肺脏中的蓄积相较于 CaP NDs 更为显著, 而 CaP NDs 在肾脏和肿瘤中分布较 CaP NPs 更多。以静脉注射后 4 h 为例, CaP NDs 在肝脏、脾脏、肺脏、肾脏和肿瘤中的含量分别为 (38.84 ± 2.07) 、 (21.26 ± 5.24) 、 (2.37 ± 2.17) 、 (21.90 ± 7.27) 和 (7.22 ± 1.85) $\mu\text{g/g}$, CaP NPs 的含量分

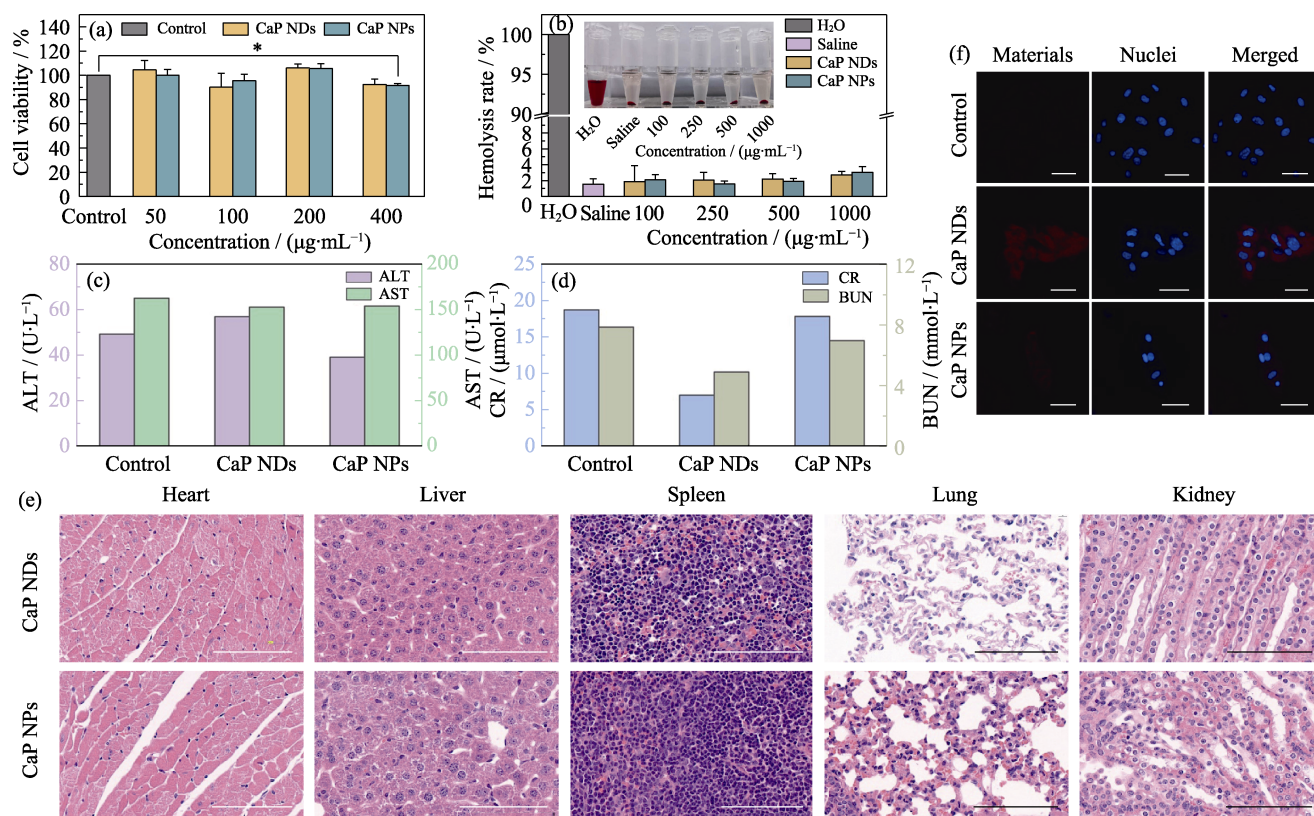


图 3 CaP NDs 和 CaP NPs 的生物安全性评价

Fig. 3 Biosafety evaluation of CaP NDs and CaP NPs

(a) Cell viability; (b) Hemolysis rate; (c, d) Blood biochemistry analysis (ALT indicates alanine transaminase, AST indicates aspartate aminotransferase, CR indicates creatinine, and BUN indicates blood urea nitrogen); (e) H&E staining images of heart, liver, spleen, lung, and kidney organs in different groups with scale bar indicating 100 μm ; (f) CLSM images of BMSC co-cultured with CaP NPs and CaP NDs for 24 h, respectively. Red: CaP NPs or CaP NDs fluorescence image excited at 458 nm. Blue: Cell nuclei stained with DAPI. Scale bar in (f) is 50 μm .

Colorful figures are available on website

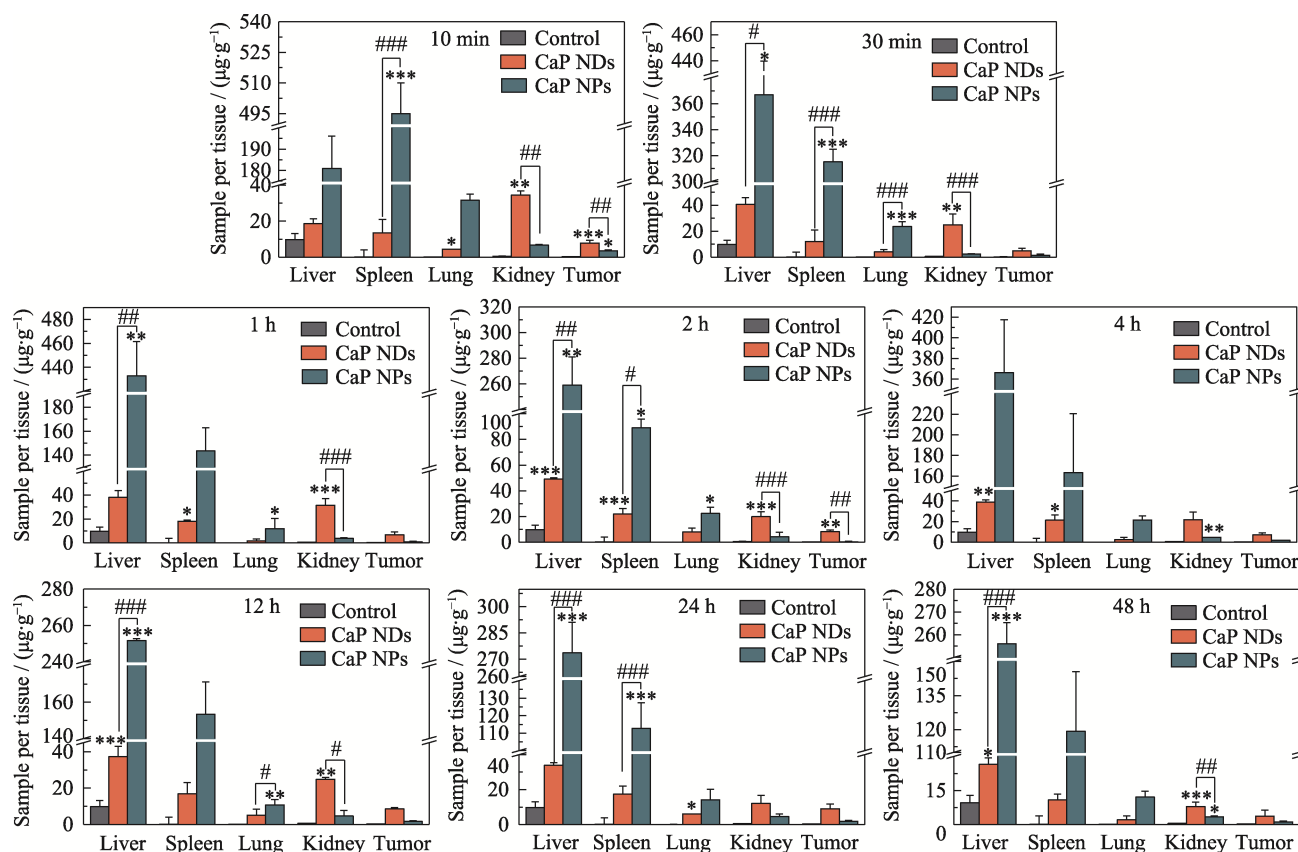


图4 注射不同时间后 CaP NDs 和 CaP NPs 在不同组织中的分布

Fig. 4 Biodistributions of CaP NDs and CaP NPs in different tissues after injection for different durations

*, #: $P < 0.05$; **, ###: $p < 0.01$; ***, ####: $p < 0.001$. Colorful figures are available on website

别为 (366.35 ± 51.08) 、 (163.48 ± 56.97) 、 (21.34 ± 4.13) 、 (4.69 ± 0.07) 和 (1.78 ± 0.18) $\mu\text{g/g}$ 。可以看出, CaP NPs 主要集中在肝脏和脾脏, 分别占比 65.70% 和 29.32%, 在肺脏中占比 3.83%, 而在肾脏和肿瘤中仅占比 0.84% 和 0.32%, 这说明 CaP NPs 更容易被 RES 系统清除, 这一结果与 Zhao 等^[10]报道的一致。肝脏和脾脏是 RES 的主要分布区, 内含大量吞噬细胞, 较大的颗粒更容易被这些细胞捕获, 从而在肝脏和脾脏中蓄积^[32]。不同的是, 与 CaP NPs 相比, CaP NDs 在肝脏、脾脏和肺脏中的蓄积显著减少了 89.40%、87.00% 和 88.89%, 在肾脏和肿瘤部位的含量较 CaP NPs 分别提升了 3.67 倍和 3.06 倍, 表明 CaP NDs 更容易经肾脏代谢, 这主要是由于 CaP NDs 颗粒尺寸较小, 容易被肾小球滤出^[33]。而肿瘤组织通常具有增强的血管通透性和滞留(EPR)效应, 这使得小尺寸纳米颗粒更容易穿透肿瘤组织的血管壁, 并在肿瘤组织内部蓄积^[34]。

其它研究表明, 纳米颗粒的粒径、形状和表面化学性质影响其在体内的生物分布, 而粒径直接决定了纳米颗粒能否跨越生物屏障到达目标组织^[35-37]。由于 EPR 效应, 当颗粒尺寸小于“渗漏性肿瘤血管孔径”上限(200 nm 左右)时, 显著依赖于尺寸特征,

50~100 nm 颗粒显示出较优的肿瘤被动靶向聚集, 但主要聚集在肿瘤血管附近, 致密肿瘤间质渗透能力不足^[38]。当颗粒尺寸接近“肾脏清除阈值”(6~8 nm)时, 可大大降低 RES 系统早期隔离, 显著促进经血管壁向肿瘤扩散及肿瘤间质渗透^[39]。

2.3.2 CaP NDs 和 CaP NPs 在组织中的代谢规律

前期研究表明, nCaP 在血液中被快速清除(3 h), 并逐步蓄积在肝、脾、肺、肾、肿瘤中^[21]。本研究进一步表明, 静脉注射 4~48 h 后两种尺寸 nCaP 表现出显著不同的体内代谢速率。表 2 列出了 CaP NDs 和 CaP NPs 荷瘤小鼠各脏器和肿瘤部位的主要药动学参数。在肝脏和脾脏中, CaP NDs 和 CaP NPs 的分布随着时间推移变化明显。如图 5(a, b)所示, CaP NDs 和 CaP NPs 在 4 h 达到最大浓度, 随后逐渐下降。CaP NDs 在肝脏和脾脏中的 CL_z 值分别为 0.033 和 0.091 L/(h·kg), 是 CaP NPs 的 6.60 倍和 4.14 倍(图 5(f))。在肺脏中, CaP NDs 和 CaP NPs 的浓度分别在 24 h 和 4 h 达到最高(图 5(c)), CaP NDs 的 CL_z 值为 0.235 L/(h·kg) (图 5(f)), 是 CaP NPs 的 2.40 倍。由于 CaP NDs 粒径较小, 更容易被肝脏、脾脏和肺脏中的吞噬细胞快速代谢。肾脏是另一个主要的代谢器官, 与体液和尿液的排泄相关。图 5(d, f)显示 CaP

NPs 在肾脏中分布较少, 在 4 h 时达到高峰并缓慢下降, 而 CaP NDs 在 12 h 达到最高水平, 随后快速下降。CaP NDs 的 CLz 值为 0.144 L/(h·kg), 是 CaP NPs 的 42.29%。这可能是由于小尺寸 CaP NDs 更容易被肾小管重吸收, 减少了其排泄量, 使得其 CLz 值较低。在肿瘤中(图 5(e, f)), CaP NDs 和 CaP NPs 在 4 h 达到较高水平, 并且 CaP NDs 持续上升至 24 h 达到高峰。与 CaP NPs 相比, CaP NDs 的 AUC(0-t)值提高了 234.60%, 且 CLz 值降低了 91.9%(表 2), 这是由于 EPR 效应使小尺寸的 CaP NDs 更容易在肿瘤组织中扩散和滞留, 表明小尺寸 CaP NDs 具有更强的肿瘤靶向能力且滞留时间长。

除纳米颗粒尺寸外, 其形貌和结晶度也会影响代谢结果。球形颗粒因其表面对称性和较小的流体动力学直径, 更容易通过尿液排泄; 而棒状或片状颗粒通常在肝脏和脾脏中的滞留时间更长。Zhao 等^[40]设计了三种不同形状(长棒、短棒和球形)的荧光中孔二氧化硅纳米颗粒, 评估了它们在小鼠体内的行为。结果表明, 在肾脏排泄过程中, 球形纳米颗粒的清除速度比棒状纳米颗粒更快。此外, 低结晶度的纳米颗粒由于结构较为无序, 易于在生物环境中

降解, 从而能够通过肾脏快速排泄。相反, 高结晶度的纳米颗粒结构更稳定, 降解速度较慢, 容易在肝脏和脾脏等器官中蓄积^[41]。

2.4 肿瘤部位 PBPK 模型建立与优化

在 PBPK 模型中, 不同类型纳米颗粒的参数通常不同, 但为了简化模型, 除肿瘤相关参数外, 其他组织的所有生理参数以及纳米材料的特异性参数与健康小鼠 PBPK 模型中使用的参数相同。肿瘤的质量分数根据试验实际情况而定, 在肿瘤部位血管所承载的血流量相对较低, 仅占心输出量的小部分, 因此, 肿瘤的血流量分数和组织血容量分数通常在 0.02~0.05 之间, 再通过 Berkeley Madonna 软件进行拟合优化。然后使用在荷瘤裸鼠中校准的 PBPK 模型分别预测 CaP NDs 和 CaP NPs 在 72 h 内肿瘤部位的蓄积情况(具体模型代码见补充材料)。

PBPK 模型显示, CaP NDs 经血液循环和被动靶向后快速到达肿瘤部位, 蓄积 15 h 后开始代谢并排出体外(图 6(a))。而 CaP NPs 在肿瘤部位的蓄积时间短, 7~9 h 内蓄积量达到最大, 然后排出体外(图 6(b))。两种尺寸颗粒的模型预测值与实验测量值具有较高的拟合度($R^2=0.925、0.827$, 图 6(c, d))^[25]。

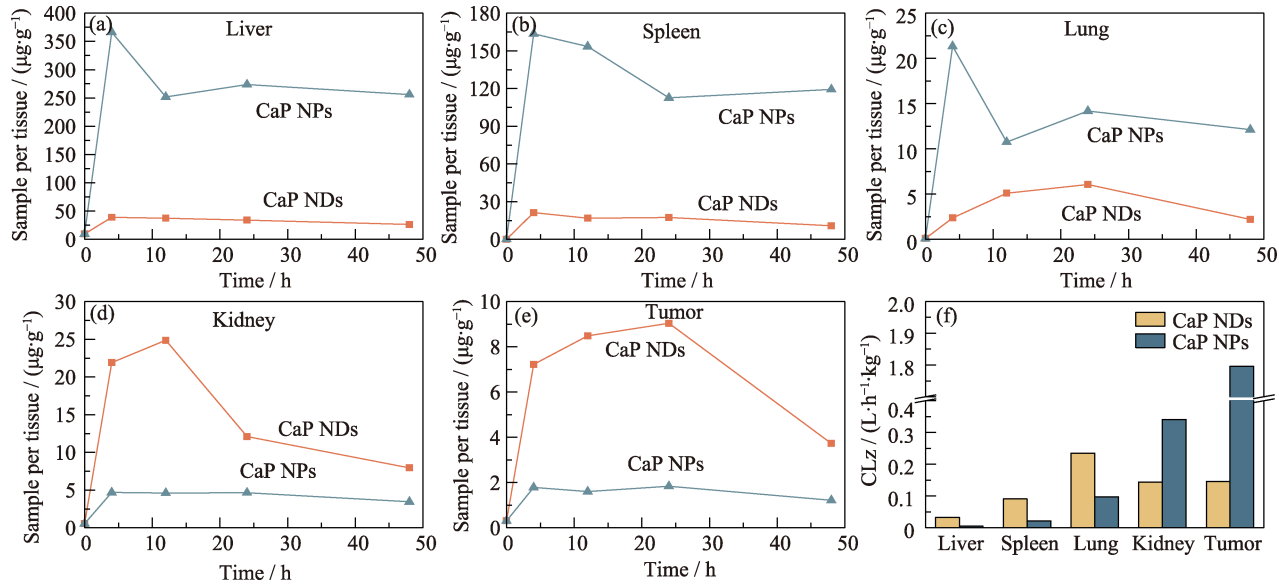


图 5 CaP NDs 和 CaP NPs 在不同组织中的代谢
Fig. 5 CaP NDs and CaP NPs metabolic patterns in different tissues
(a-e) Biodistributions of CaP NDs and CaP NPs in liver (a), spleen (b), lung (c), kidney (d), and tumor (e);
(f) Clearance rate of CaP NDs and CaP NPs in different tissues

表 2 CaP NDs 和 CaP NPs 荷瘤小鼠各脏器和肿瘤部位的主要药动学参数

Table 2 Pharmacokinetic parameters of CaP NDs and CaP NPs in organ and tumor site of tumor-bearing mice						
Sample	Parameter	Liver	Spleen	Lung	Kidney	Tumor
CaP NDs	AUC(0-t)/(mg·h·L ⁻¹)	157.78	71.35	19.34	70.61	20.31
	CLz/(L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹)	0.033	0.091	0.235	0.144	0.146
CaP NPs	AUC(0-t)/(mg·h·L ⁻¹)	1347.46	578.05	66.74	19.85	6.07
	CLz/(L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹)	0.005	0.022	0.098	0.341	1.796

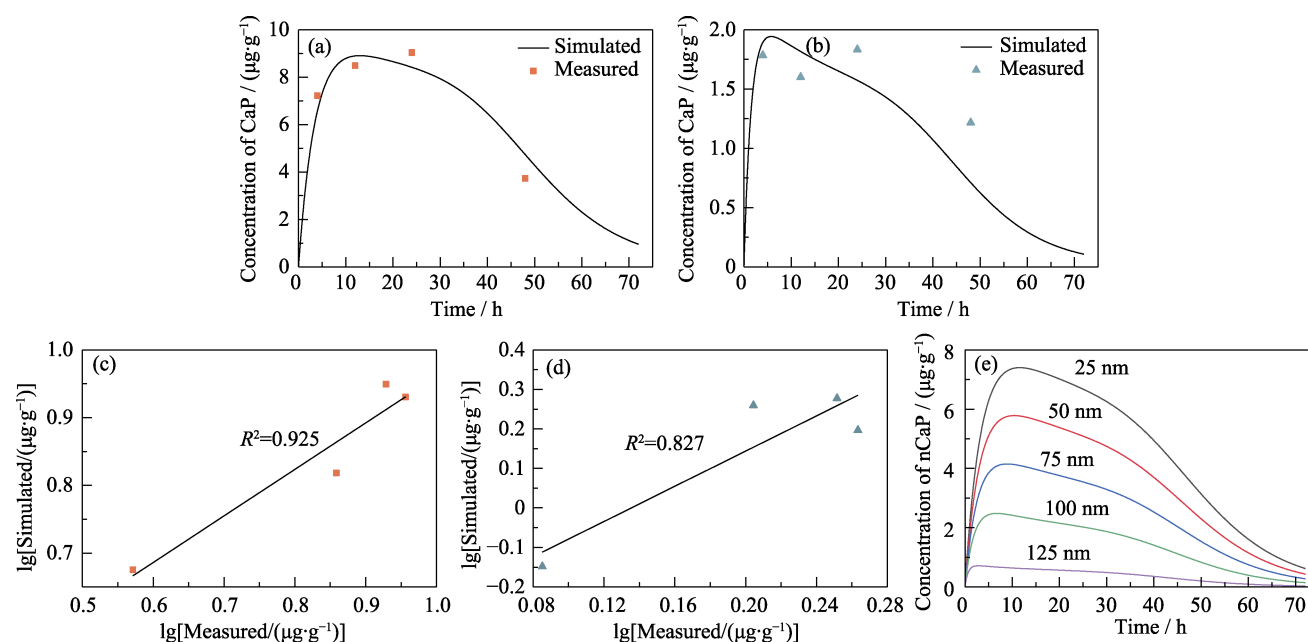


图 6 肿瘤部位 PBPK 模型的建立与优化

Fig. 6 Establishment and optimization of PBPK model for tumor bearing sites

(a, b) PBPK model of CaP NDs (a) and CaP NPs (b) in the tumor; (c, d) Linear regression results between logarithmically transformed measured and simulated concentrations of CaP NDs (c) and CaP NPs (d) with R^2 indicating the correlation coefficient; (e) Prediction of the distribution of nCaP with different sizes in tumor

此外, 通过模型分别预测 25、50、75、100 和 125 nm nCaP 在肿瘤部位蓄积量随时间的变化情况(图 6(e)), 结果表明随着 nCaP 尺寸增加, 其在肿瘤部位的蓄积量逐渐减少且达到最大蓄积量所需时间缩短。

3 结论

本研究重点探究了两种尺寸 nCaP 的体内组织分布与代谢和肿瘤靶向特性, 初步揭示了尺寸对 nCaP 体内分布与代谢的影响。大尺寸的 CaP NPs 易被 RES 系统中的吞噬细胞捕获, 在肝脏、脾脏和肺脏中分布较多; 而小尺寸的 CaP NDs 大大降低了 RES 系统的早期隔离, 在肾脏和肿瘤中分布较多, 增强了其对肿瘤的靶向能力。CaP NPs 由于体积较大, 在肝脏、脾脏和肺脏中代谢速率较慢; 而小尺寸的 CaP NDs 有利于被吞噬细胞代谢, 表现出显著增强的肿瘤靶向和滞留能力, 但存在肾小管的重吸收作用。建立包含尺寸因素的 PBPK 模型, 能够较准确地预测不同尺寸 nCaP 在肿瘤部位的动态变化过程。本研究有助于揭示 nCaP 的体内分布与代谢规律, 为其医学应用奠定了理论和代谢检测基础。

补充材料

本文相关补充材料可登录 <https://doi.org/>

10.15541/jim20240504 查看。

致谢

感谢武汉大学医学研究院靖静老师和潘敏老师在本研究中给予的测试支持与宝贵帮助。

参考文献:

- [1] SOKOLOVA V, EPPLER M. Biological and medical applications of calcium phosphate nanoparticles. *Chemistry – A European Journal*, 2021, **27**(27): 7471.
- [2] LI B, XU W F, LIAO X L. Research progress in calcium phosphate microspheres for bone defect repair. *Journal of Inorganic Materials*, 2014, **29**(10): 1009.
- [3] CHEN X, LI H Z, MA Y H, *et al.* Calcium phosphate-based nanomaterials: preparation, multifunction, and application for bone tissue engineering. *Molecules*, 2023, **28**(12): 4790.
- [4] NIE L, HOU M J, WANG T W, *et al.* Nanostructured selenium-doped biphasic calcium phosphate with *in situ* incorporation of silver for antibacterial applications. *Scientific Reports*, 2020, **10**: 13738.
- [5] 刘静霆, 韩颖超, 李世普, 等. 羟基磷灰石纳米粒子负载阿霉素的体外抗肿瘤活性研究. *中国生物医学工程学报*, 2008, **27**(4): 572.
- [6] CHEN F, HUANG P, ZHU Y J, *et al.* Multifunctional Eu³⁺/Gd³⁺ dual-doped calcium phosphate vesicle-like nanospheres for sustained drug release and imaging. *Biomaterials*, 2012, **33**(27): 6447.
- [7] LI C Y, DING Z Y, HAN Y C. *In vitro* antibacterial and osteogenic properties of manganese doped nano hydroxyapatite. *Journal of Inorganic Materials*, 2024, **39**(3): 313.
- [8] LI C Y, DING Z Y, HAN Y C. Mn-doped nano-hydroxyapatites as theranostic agents with tumor pH-amplified MRI-signal capabilities for guiding photothermal therapy. *International Journal of Nanomedicine*,

- 2023, **18**: 6101.
- [9] JACOBS A, RENAUDIN G, CHARBONNEL N, *et al.* Copper-doped biphasic calcium phosphate powders: dopant release, cytotoxicity and antibacterial properties. *Materials*, 2021, **14**(9): 2393.
- [10] ZHAO R B, REN X Y, XIE C G, *et al.* Towards understanding the distribution and tumor targeting of sericin regulated spherical calcium phosphate nanoparticles. *Microscopy Research and Technique*, 2017, **80**(3): 321.
- [11] KOLLEND A S, KLOSE J, KNUSCHKE T, *et al.* In vivo biodistribution of calcium phosphate nanoparticles after intravascular, intramuscular, intratumoral, and soft tissue administration in mice investigated by small animal PET/CT. *Acta Biomaterialia*, 2020, **109**: 244.
- [12] ADAMIANO A, IAFISCO M, SANDRI M, *et al.* On the use of superparamagnetic hydroxyapatite nanoparticles as an agent for magnetic and nuclear in vivo imaging. *Acta Biomaterialia*, 2018, **73**: 458.
- [13] ÁLAMO P, PALLARÉS V, CÉSPEDES M V, *et al.* Fluorescent dye labeling changes the biodistribution of tumor-targeted nanoparticles. *Pharmaceutics*, 2020, **12**(11): 1004.
- [14] ALTINOĞLU E I, RUSSIN T J, KAISER J M, *et al.* Near-infrared emitting fluorophore-doped calcium phosphate nanoparticles for in vivo imaging of human breast cancer. *ACS Nano*, 2008, **2**(10): 2075.
- [15] LLOP J, GÓMEZ-VALLEJO V, GIBSON N. Quantitative determination of the biodistribution of nanoparticles: could radiolabeling be the answer? *Nanomedicine*, 2013, **8**(7): 1035.
- [16] JEONG H J, LEE B C, AHN B C, *et al.* Development of drugs and technology for radiation theragnosis. *Nuclear Engineering and Technology*, 2016, **48**(3): 597.
- [17] LI P Z, WANG D D, HU J, *et al.* The role of imaging in targeted delivery of nanomedicine for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2022, **189**: 114447.
- [18] WANG T T, ZHANG D, SUN D, *et al.* Current status of in vivo bioanalysis of nano drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2020, **10**(3): 221.
- [19] XIE Y F, PERERA T S H, LI F, *et al.* Quantitative detection method of hydroxyapatite nanoparticles based on Eu³⁺ fluorescent labeling in vitro and in vivo. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, **7**(43): 23819.
- [20] HAN Y C, XING Q G, WANG X Y. Quantitative detection method of rare earth doped calcium phosphate fluorescent nanometer particles in organisms: US921123B2. 2024-03-05.
- [21] DING Z Y, XING Q G, FAN Y R, *et al.* Polyacrylic acid complexes to mineralize ultrasmall europium-doped calcium phosphate nanodots for fluorescent bioimaging. *Materials & Design*, 2022, **221**: 111008.
- [22] LE A D, WEARING H J, LI D S. Streamlining physiologically-based pharmacokinetic model design for intravenous delivery of nanoparticle drugs. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, 2022, **11**(4): 409.
- [23] DENG L J, LIU H, MA Y S, *et al.* Endocytosis mechanism in physiologically-based pharmacokinetic modeling of nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2019, **384**: 114765.
- [24] LI M, ZOU P, TYNER K, *et al.* Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling of pharmaceutical nanoparticles. *The AAPS Journal*, 2017, **19**(1): 26.
- [25] CHENG Y H, HE C L, RIVIERE J E, *et al.* Meta-analysis of nanoparticle delivery to tumors using a physiologically based pharmacokinetic modeling and simulation approach. *ACS Nano*, 2020, **14**(3): 3075.
- [26] ZHANG S Q, MA X Y, SHA D Y, *et al.* A novel strategy for tumor therapy: targeted, PAA-functionalized nano-hydroxyapatite nanomedicine. *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, **8**(41): 9589.
- [27] CHENG X, XU Y R, ZHANG Y, *et al.* Glucose-targeted hydroxyapatite/indocyanine green hybrid nanoparticles for collaborative tumor therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, **13**(31): 37665.
- [28] BERNIER A, TOBIAS T, NGUYEN H, *et al.* Vascular and blood compatibility of engineered cationic cellulose nanocrystals in cell-based assays. *Nanomaterials*, 2021, **11**(8): 2072.
- [29] SREENIVASAGAN S, SUBRAMANIAN A K, MOHANRAJ K G, *et al.* Assessment of toxicity of green synthesized silver nanoparticle-coated titanium mini-implants with uncoated mini-implants: comparison in an animal model study. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 2024, **24**(12): 944.
- [30] 高绪聪, 柴振海, 张宗鹏. 药物性肝损伤的生物标志物及其评价的研究进展. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, **26**(5): 692.
- [31] KASHANI K, ROSNER M H, OSTERMANN M. Creatinine: from physiology to clinical application. *European Journal of Internal Medicine*, 2020, **72**: 9.
- [32] ALMEIDA J P M, CHEN A L, FOSTER A, *et al.* In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine*, 2011, **6**(5): 815.
- [33] 祁禹鸣, 徐铭泽, 杜步婕. 纳米材料在肾脏中的应用与清除机制. *广州医药*, 2023, **54**(1): 1.
- [34] CHOI J S, CAO J F, NAEEM M, *et al.* Size-controlled biodegradable nanoparticles: preparation and size-dependent cellular uptake and tumor cell growth inhibition. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, **122**: 545.
- [35] LEDFORD B T, WYATT T G, VANG J, *et al.* Effects of particle size, charge, shape, animal disease state, and sex on the biodistribution of intravenously administered nanoparticles. *Particle & Particle Systems Characterization*, 2023, **40**(7): 2300001.
- [36] MELLOR R D, UCHEGBU I F. Ultrasmall-in-nano: why size matters. *Nanomaterials*, 2022, **12**(14): 2476.
- [37] WEI Y C, QUAN L, ZHOU C, *et al.* Factors relating to the biodistribution & clearance of nanoparticles & their effects on in vivo application. *Nanomedicine*, 2018, **13**(12): 1495.
- [38] TANG L, YANG X J, YIN Q, *et al.* Investigating the optimal size of anticancer nanomedicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, **111**(43): 15344.
- [39] WANG J, LIU G. Imaging nano-bio interactions in the kidney: toward a better understanding of nanoparticle clearance. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, **57**(12): 3008.
- [40] ZHAO Y T, WANG Y, RAN F, *et al.* A comparison between sphere and rod nanoparticles regarding their in vivo biological behavior and pharmacokinetics. *Scientific Reports*, 2017, **7**: 4131.
- [41] 董立乐. 几种硫属及稀土纳米材料的制备与癌症诊疗探索. 合肥: 中国科学技术大学博士学位论文, 2019.

补充材料:

基于稀土铈离子荧光标记的磷酸钙纳米材料 体内分布与代谢研究

汤新丽¹, 丁自友¹, 陈俊锐¹, 赵刚², 韩颖超¹

(1. 武汉理工大学 材料复合新技术国家重点实验室, 武汉 430070; 2. 华中科技大学 同济医学院协和医院急诊外科, 武汉 430022)

在肿瘤部位 PBPK 建模代码

```
METHOD RK4
STARTTIME = 0
STOPTIME = 72
DT = 0.00015625
DTOUT = 0.1
{Physiological parameters}
; Blood flow rate (Fraction of cardiac output, unitless)
QCC = 16.5 ; Cardiac output (L/h/kg^0.75) (Brown et al., 1997)
QLuC = 1 ; Fraction of blood flow to lung (Brown et al., 1997)
QLC = 0.02 ; Fraction of artery blood flow to liver (Brown et al., 1997, Table 23)
QBRC = 0.033 ; Fraction of blood flow to brain (Brown et al., 1997, Table 23)
QKC = 0.091 ; Fraction of blood flow to kidneys (Brown et al., 1997, Table 23)
QSC = 0.011 ; Fraction of blood flow to spleen (Davies and Morris, 1993)
QMC = 0.159 ; Fraction of blood flow to muscle (Brown et al., 1997, Tables 23 & 24)
QTC = 0.012 ; Fraction of blood flow to tumor (fitted)
QRC = 1-(QLC+QSC+QKC+QBRC+QMC+QTC) ; Fraction of blood flow to rest of body (Calculated)
; Tissue volumes (Fraction of body weight, unitless)
BW = 0.02 ; Body weight (kg) (Cho et al., 2009; 2010)
VLC = 0.055 ; Liver (Brown et al., 1997, Table 21)
VBRC = 0.017 ; Brain (Brown et al., 1997, Table 21)
VKC = 0.017 ; Kidneys (Brown et al., 1997, Table 21)
VSC = 0.005 ; Spleen (Davies and Morris, 1993)
VLuC = 0.007 ; Lungs (Brown et al., 1997, Table 21)
VBloodC = 0.06 ; Blood (Davies and Morris, 1993)
VPlasmaC = 0.0355 ; Plasma (Davies and Morris, 1993 with hematocrit of 0.41 for red blood cells)
VMC = 0.384 ; Muscle (Brown et al., 1997, Table 21)
VTC = 0.024 ; Tumor (Sykes et al., 2014)
VRC = 1-(VLC+VSC+VKC+VLuC+VBRC+VMC+VPlasmaC+VTC) ; Rest of body (Calculated)
; Blood volume fraction in organs and tissues (percentage of organs/tissues, unitless)
BVL = 0.31 ; Liver (Brown et al., 1997; Table 30)
BVBR = 0.03 ; Brain (Brown et al., 1997, Table 30)
BVK = 0.24 ; Kidneys (Brown et al., 1997, Table 30)
BVS = 0.17 ; Spleen (Brown et al., 1997, Table 30)
BVLu = 0.5 ; Lungs (Brown et al., 1997, Table 30)
BVM = 0.04 ; Muscle (Brown et al., 1997, Table 30)
```


BVR = 0.04 ; Rest of body (Brown et al., 1997, Table 30, assume equal to the muscle)

BVT = 0.02 ; Tumor (fitted)

d=2.5; nm

PL = 0.08 ; Liver

PBR = 0.15 ; Brain

PK = 0.15 ; Kidneys

PS = 0.15 ; Spleen

PLu = 0.15 ; Lungs

PM = 0.15 ; Muscle

PR = 0.15 ; Rest of body

PT = 0.08152-0.0006078*d ; Tumor (fitted)

PALC =0.001 ; Liver

PABRC = 0.000001 ; Brain

PAKC = 0.01 ; Kidneys

PASC =0.15 ; Spleen

PALuC = 0.001 ; Lungs

PAMC = 0.00005 ; Muscle

PARC = 0.00005 ; Rest of body

PATC = 0.0009107-0.000004274*d ; Tumor (fitted)

x1=0.4

y1=0.01

z1=0.5

x2=0.01

y2=0.001

z2=0.01

KLRESrelease = 0.0015 ; Release rate constant of phagocytic cells, (h-1)

KLRESmax = 0.3 ; Maximum uptake rate constant of phagocytic cells, (h-1)

KLRES50 = 48 ; Time reaching half maximum uptake rate, (h)

KLRESn = 5 ; Hill coefficient, (unitless)

KSRESrelease = 0.001 ; Release rate constant of phagocytic cells, (h-1)

KSRESmax = 5 ; Maximum uptake rate constant of phagocytic cells, (h-1)

KSRES50 = 36 ; Time reaching half maximum uptake rate, (h)

KSRESn = 5 ; Hill coefficient, (unitless)

KKRESrelease = 0.001 ; Release rate constant of phagocytic cells, (h-1)

KKRESmax = 0.12 ; Maximum uptake rate constant of phagocytic cells, (h-1)

KKRES50 = 48 ; Time reaching half maximum uptake rate, (h)

KKRESn = 5 ; Hill coefficient, (unitless)

KLuRESrelease = 0.003 ; Release rate constant of phagocytic cells, (h-1)

KLuRESmax = 0.085 ; Maximum uptake rate constant of phagocytic cells, (h-1)

KLuRES50 = 48 ; Time reaching half maximum uptake rate, (h)

KLuRESn = 5 ; Hill coefficient, (unitless)

KMRESrelease = 0.005 ; Release rate constant of phagocytic cells, (h-1)

KMRESmax = 0.4 ; Maximum uptake rate constant of phagocytic cells, (h-1)

KMRES50 = 48 ; Time reaching half maximum uptake rate, (h)

KMRESn = 5 ; Hill coefficient, (unitless)

KRRESrelease = 0.005 ; Release rate constant of phagocytic cells, (h-1)

KRRESmax = 0.4 ; Maximum uptake rate constant of phagocytic cells, (h-1)

KRRES50 = 48 ; Time reaching half maximum uptake rate, (h)

$KRRESn = 5$; Hill coefficient, (unitless)
 $KTRES_{release} = x1 \cdot (d-y1)^{z1}$; Release rate constant of phagocytic cells, (h⁻¹)
 $KTRES_{max} = x2 \cdot (d-y2)^{z2}$; Maximum uptake rate constant of phagocytic cells, (h⁻¹)
 $KTRES50 = 48$; Time reaching half maximum uptake rate, (h)
 $KTRESn = 5$; Hill coefficient, (unitless)

; Biliary excretion

$KbileC = 0.0005768 \cdot \log_{10}(d) - 0.001449$; Biliary clearance (L/hr/kg^{0.75})

; L/hr/kg changed to L/h/kg^{0.75} for interspecies extrapolation

; Urine excretion

$KurineC = 0.000003$; Urine clearance (L/hr/kg^{0.75})

; L/hr changed to L/h/kg^{0.75} for interspecies extrapolation

; Scaled parameters

; Cardiac output and regional blood flow (L/h)

$QC = QCC \cdot BW^{0.75}$; Cardiac output

$QL = QC \cdot QLC$; Blood flow to liver

$QBR = QC \cdot QBRC$; Blood flow to brain

$QK = QC \cdot QKC$; Blood flow to kidneys

$QS = QC \cdot QSC$; Blood flow to spleen

$QM = QC \cdot QMC$; Blood flow to muscle

$QR = QC \cdot QRC$; Blood flow to rest of body

$QT = QC \cdot QTC$; Blood flow to tumor

$Q_{bal} = QC - QL - QBR - QK - QS - QM - QR - QT$; Blood flow balance equation

; Tissue volumes (L)

$VL = BW \cdot VLC$; Liver

$VBR = BW \cdot VBRC$; Brain

$VK = BW \cdot VKC$; Kidneys

$VS = BW \cdot VSC$; Spleen

$VLu = BW \cdot VLuC$; Lungs

$VBlood = BW \cdot VBloodC$; Blood

$VPlasma = BW \cdot VPlasmaC$; Plasma

$VM = BW \cdot VMC$; Muscle

$VR = BW \cdot VRC$; Rest of body

$VT = BW \cdot VTC$; Tumor

$V_{bal} = BW - VL - VBR - VK - VS - VLu - VPlasma - VM - VR - VT$; Tissue volume balance equation

$VLb = VL \cdot BVL$; Weight/volume of capillary blood in liver compartment

$VLt = VL - VLb$; Weight/volume of tissue in liver compartment

$VBRb = VBR \cdot BVBR$; Weight/volume of capillary blood in brain compartment

$VBRt = VBR - VBRb$; Weight/volume of tissue in brain compartment

$VKb = VK \cdot BVK$; Weight/volume of capillary blood in kidney compartment

$VKt = VK - VKb$; Weight/volume of tissue in kidney compartment

$VSb = VS \cdot BVS$; Weight/volume of capillary blood in spleen compartment

$VSt = VS - VSb$; Weight/volume of tissue in spleen compartment

$VLub = VLu \cdot BVLu$; Weight/volume of capillary blood in lung compartment

$VLut = VLu - VLub$; Weight/volume of tissue in lung compartment

$VMb = VM \cdot BVM$; Weight/volume of capillary blood in muscle compartment

$VMt = VM - VMb$; Weight/volume of tissue in muscle compartment

$VRb = VR \cdot BVR$; Weight/volume of capillary blood in rest of body compartment

$VRt = VR - VRb$; Weight/volume of tissue in rest of body compartment

$VTb = VT \cdot BVT$; Weight/volume of capillary blood in tumor compartment

$VT_t = VT - VT_b$; Weight/volume of tissue in tumor compartment
 ; Permeability coefficient-surface area cross-product (L/h)
 $PAL = PALC * QL$; Liver
 $PABR = PABRC * QBR$; Brain
 $PAK = PAKC * QK$; Kidneys
 $PAS = PASC * QS$; Spleen
 $PALu = PALuC * QC$; Lungs
 $PAM = PAMC * QM$; Muscle
 $PAR = PARC * QR$; Rest of body
 $PAT = PATC * QT$; Tumor
 ; Endocytosis rate (h⁻¹)
 $KLRESUP = (KLRES_{max} * TIME^{KLRES_n}) / (KLRES_{50}^{KLRES_n} + TIME^{KLRES_n})$; Liver
 $KSRESUP = (KSRES_{max} * TIME^{KSRES_n}) / (KSRES_{50}^{KSRES_n} + TIME^{KSRES_n})$; Spleen
 $KKRESUP = (KKRES_{max} * TIME^{KKRES_n}) / (KKRES_{50}^{KKRES_n} + TIME^{KKRES_n})$; Kidneys
 $KLuRESUP = (KLuRES_{max} * TIME^{KLuRES_n}) / (KLuRES_{50}^{KLuRES_n} + TIME^{KLuRES_n})$; Lungs
 $KMRESUP = (KMRES_{max} * TIME^{KMRES_n}) / (KMRES_{50}^{KMRES_n} + TIME^{KMRES_n})$; Muscle
 $KRRESUP = (KRRES_{max} * TIME^{KRRES_n}) / (KRRES_{50}^{KRRES_n} + TIME^{KRRES_n})$; Rest of body
 $KTRESUP = (KTRES_{max} * TIME^{KTRES_n}) / (KTRES_{50}^{KTRES_n} + TIME^{KTRES_n})$; Tumor
 ; IV Dosing
 $Time_{iv} = 0.005$; IV infusion time (h), set, approximately 15-20 secoCaP NDs, on average 18 sec
 $PDose_{iv} = 15$; mg/kg (Karmani et al. (2013); mice, IV route)
 $Dose_{iv} = PDose_{iv} * BW$; mg
 $IVR = Dose_{iv} / Time_{iv}$; mg/h
 $RIV = IVR * (1 - \text{step}(1, Time_{iv}))$; mg/h
 $d/dt(AIV) = RIV$
 $\text{init } AIV = 0$
 ; Elimination
 $K_{bile} = K_{bileC} * BW^{0.75}$; L/h
 $K_{urine} = K_{urineC} * BW^{0.75}$; L/h
 {Blood compartment}
 ; CA = Arterial blood concentration (mg/L or µg/ml)
 $RA = QC * CV_{Lu} - QC * CA$
 $d/dt(AA) = RA$
 $\text{init } AA = 0$
 $CA = AA / (V_{Plasma} * 0.2)$
 $d/dt(AUCCA) = CA$
 $\text{init } AUCCA = 0$
 ; CV = Venous blood concentration (mg/L or µg/ml)
 $RV = QL * CV_L + QBR * CV_{BR} + QK * CV_K + QM * CV_M + QR * CV_R + QT * CV_T + RIV - QC * CV$
 $d/dt(AV) = RV$
 $\text{init } AV = 0$
 $CV = AV / (V_{Plasma} * 0.8)$
 $d/dt(AUCCV) = CV$
 $\text{init } AUCCV = 0$
 $A_{Plasma} = AA + AV$
 $C_{Plasma} = A_{Plasma} / V_{Plasma}$
 {Lung compartment (mg/kg or µg/g)}
 ; Membrane-limited model: CaP NDs in capillary blood of Lung
 $RLub = QC * (CV - CV_{Lu}) - PALu * CV_{Lu} + (PALu * CLu) / PLu$
 $d/dt(ALub) = RLub$
 $\text{init } ALub = 0$

```

CVLu = ALub/VLub
; Membrane-limited model: CaP NDs in interstitial tissue of Lung
RLut = PALu*CVLu - (PALu*CLut)/PLu - KLuRESup*ALut + KLuRESrelease*ALuRES
d/dt(ALut) = RLut
init ALut = 0
CLut = ALut/VLut
; Phagocytosis: CaP NDs in phagocytic cells of Lung tissue
RLuRES = KLuRESUP*ALut-KLuRESrelease*ALuRES
d/dt(ALuRES) = RLuRES
init ALuRES = 0
; Total CaP NDs in Lung
ALung = ALub+ALut+ALuRES
CLung = (ALub+ALut+ALuRES)/VLu
ALungt = ALut+ALuRES
CLungt = (ALut+ALuRES)/VLut
{Brain compartment (mg/kg or ug/g)}
; Membrane-limited model: CaP NDs in capillary blood of Brain
RBRb = QBR*(CA-CVBR) - PABR*CVBR + (PABR*CBRt)/PBR
d/dt(ABRb) = RBRb
init ABRb = 0
CVBR = ABRb/VBRb
; Membrane-limited model: CaP NDs in interstitial tissue of Brain
RBRt = PABR*CVBR - (PABR*CBRt)/PBR
d/dt(ABRt) = RBRt
init ABRt = 0
CBRt = ABRt/VBRt
; Total CaP NDs in Brain
ABrain = ABRb+ABRt
CBrain = ABrain/VBR
{Muscle compartment (mg/kg or ug/g)}
; Membrane-limited model: CaP NDs in capillary blood of Muscle
RMb = QM*(CA-CVM) - PAM*CVM + (PAM*CMt)/PM
d/dt(AMb) = RMb
init AMb = 0
CVM = AMb/VMb
; Membrane-limited model: CaP NDs in interstitial tissue of Muscle
RMt = PAM*CVM - (PAM*CMt)/PM - KMRESUP*AMt + KMRESrelease*AMRES
d/dt(AMt) = RMt
init AMt = 0
CMt = AMt/VMt
; Phagocytosis: CaP NDs in phagocytic cells of Muscle
RMRES = KMRESUP*AMt-KMRESrelease*AMRES
d/dt(AMRES) = RMRES
init AMRES = 0
; Total CaP NDs in Muscle
AMuscle = AMb+AMt+AMRES
CMuscle = (AMb+AMt+AMRES)/VM
AMusclelet = AMt+AMRES
CMusclelet = (AMt+AMRES)/VMt
{Rest of body compartment (mg/kg or ug/g)}
; Membrane-limited model: CaP NDs in capillary blood of Rest of body

```

```

RRb = QR*(CA-CVR) - PAR*CVR + (PAR*CRt)/PR
d/dt(ARb) = RRb
init ARb = 0
CVR = ARb/VRb
; Membrane-limited model: CaP NDs in interstitial tissue of Rest of body
RRt = PAR*CVR - (PAR*CRt)/PR - KRRESUP*ARt + KRRESrelease*ARRES
d/dt(ARt) = RRt
init ARt = 0
CRt = ARt/VRt
; Phagocytosis: CaP NDs in phagocytic cells of Rest of body tissue
RRRES = KRRESUP*ARt-KRRESrelease*ARRES
d/dt(ARRES) = RRRES
init ARRES = 0
; Total CaP NDs in Rest of body
Arestall = ARb+ARt+ARRES
Crestall = (ARb+ARt+ARRES)/VR
Aresttissue = ARt+ARRES
Cresttissue = (ARt+ARRES)/VRt
{Kidney compartment (mg/kg or ug/g)}
; Membrane-limited model: CaP NDs in capillary blood of Kidney
RKb = QK*(CA-CVK) - PAK*CVK + (PAK*CKt)/PK - Rurine
d/dt(AKb) = RKb
init AKb = 0
CVK = AKb/VKb
; Membrane-limited model: CaP NDs in interstitial tissue of Kidney
RKt = PAK*CVK - (PAK*CKt)/PK - KKRESUP*AKt + KKRESrelease*AKRES
d/dt(AKt) = RKt
init AKt = 0
CKt = AKt/VKt
; Phagocytosis: CaP NDs in phagocytic cells of Kidney tissue
RKRES = KKRESUP*AKt-KKRESrelease*AKRES
d/dt(AKRES) = RKRES
init AKRES = 0
; Total CaP NDs in Kidney
AKidney = AKb+AKt+AKRES
CKidney = (AKb+AKt+AKRES)/VK
AKidneyt = AKt+AKRES
CKidneyt = (AKt+AKRES)/VKt
; Urinary excretion
Rurine = Kurine*CVK ;mg/h
d/dt(Aurine) = Rurine
init Aurine = 0
{Spleen compartment (mg/kg or ug/g)}
; Membrane-limited model: CaP NDs in capillary blood of Spleen
RSb = QS*(CA-CVS) - PAS*CVS + (PAS*CSt)/PS
d/dt(ASb) = RSb
init ASb = 0
CVS = ASb/V Sb
; Membrane-limited model: CaP NDs in interstitial tissue of Spleen
RSt = PAS*CVS - (PAS*CSt)/PS - KSRESUP*ASt + KSRESrelease*ASRES
d/dt(ASt) = RSt

```



```

init ASt = 0
CSt = ASt/VSt
; Phagocytosis: CaP NDs in phagocytic cells of Spleen tissue
;RSRES = KSRESUP*AA-KSRESrelease*ASRES
RSRES = KSRESUP*ASt-KSRESrelease*ASRES
d/dt(ASRES) = RSRES
init ASRES = 0
; Total CaP NDs in Spleen
ASpleen = ASb+ASt+ASRES
CSpleen = (ASb+ASt+ASRES)/VS
ASpleent = ASt+ASRES
CSpleent = (ASt+ASRES)/VSt
d/dt(AUCCS) = CSpleen
init AUCCS = 0
{Liver compartment (mg/kg or ug/g)}
; Membrane-limited model: CaP NDs in capillary blood of Liver
RLb = QL*(CA-CVL) + QS*CVS - PAL*CVL + (PAL*CLt)/PL - KLRESUP*ALb + KLRESrelease*
ALRES
d/dt(ALb) = RLb
init ALb = 0
CVL = ALb/VLb
; Membrane-limited model: CaP NDs in interstitial tissue of Liver
RLt = PAL*CVL - (PAL*CLt)/PL - Rbile
d/dt(ALt) = RLt
init ALt = 0
CLt = ALt/VLt
; Phagocytosis: CaP NDs in phagocytic cells attach to Liver capillary wall
;RLRES = KLRESUP*AA-KLRESrelease*ALRES
RLRES = KLRESUP*ALb-KLRESrelease*ALRES
d/dt(ALRES) = RLRES
init ALRES = 0
; Total CaP NDs in Liver
ALiver = ALb+ALt+ALRES
CLiver = (ALb+ALt+ALRES)/VL
ALivert = ALt+ALRES
CLivert = (ALt+ALRES)/VLt
d/dt(AUCCL) = CLiver
init AUCCL = 0
; Biliary excretion
Rbile = Kbile*CLt ; mg/h
d/dt(Abile) = Rbile
init Abile = 0
{Tumor compartment (mg/kg or ug/g)}
; Membrane-limited model: CaP NDs in capillary blood of Tumor
RTb = QT*(CA-CVT) - PAT*CVT + (PAT*CTt)/PT
d/dt(ATb) = RTb
init ATb = 0
CVT = ATb/VTb
; Membrane-limited model: CaP NDs in Tumor interstitium
RTt = PAT*CVT - (PAT*CTt)/PT - KTRESUP*ATt + KTRESrelease*ATRES
d/dt(ATt) = RTt

```

```

init ATt = 0
CTt = ATt/VTt
; Phagocytosis: CaP NDs in tumor cells of Tumor interstitium
RTRES = KTRESUP*ATt-KTRESrelease*ATRES
RTRESUP = KTRESUP*ATt
RTRESrelease = KTRESrelease*ATRES
d/dt(ATRES) = RTRES
init ATRES = 0
; Total CaP NDs in Tumor
ATumor = ATb+ATt+ATRES
CTumor = (ATb+ATt+ATRES)/VT
ATumort = ATt+ATRES
CTumort = (ATt+ATRES)/VTt; mg/kg or ug/g tumor
d/dt(AUCCT) = 100*(ATumort/Doseiv)
init AUCCT = 0
Tumorperc = 100*(ATumort/Doseiv)/VTt/1000 ; %ID/g
TumorpercID = 100*(ATumort/Doseiv) ; %ID
; Mass balance
Tmass = AA+AV+ALiver+ABrain+AKidney+ALung+Arestall+AMuscle+ASpleen+Abile+Aurine+ATumor
Bal = AIV-Tmass

```

参考文献:

- [S1] BROWN R P, DELP M D, LINDSTEDT S L, *et al.* Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicology and Industrial Health*, 1997, **13**(4): 407.
- [S2] DAVIES B, MORRIS T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharmaceutical Research*, 1993, **10**(7): 1093.
- [S3] CHO W S, CHO M, JEONG J, *et al.* Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, **236**(1): 16.
- [S4] CHO W S, CHO M, JEONG J, *et al.* Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010, **245**(1): 116.
- [S5] SYKES E A, CHEN J, ZHENG G, *et al.* Investigating the Impact of nanoparticle size on active and passive tumor targeting efficiency. *ACS Nano*, 2014, **8**(6): 5696.
- [S6] KARMANI L, LABAR D, VALEMBOIS V, *et al.* Antibody - functionalized nanoparticles for imaging cancer: influence of conjugation to gold nanoparticles on the biodistribution of ^{89}Zr - labeled cetuximab in mice. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2013, **8**(5): 402.