

新型纳米微泡超声造影剂的制备及超声显像研究

王 平, 尹庭辉, 郑荣琴*

(中山大学附属第三医院超声科//中山大学超声诊断与介入超声研究所, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】制备可稳定显像的新型小粒径纳米级超声微泡造影剂,并评价其体内外超声显像效果。【方法】通过薄膜-水化、声振-通气及多级分离等多步骤方法制备纳米级脂质微泡,并针对制备过程中的主要影响因素设计了正交试验,筛选出粒径小、重复性好的实验条件。通过光学显微镜及 Zeta 粒径仪检测纳米微泡大小形态、粒径分布,体外及动物体内超声显像检测其增强显像效果。【结果】纳米脂质微泡呈圆形,分布均匀,无明显聚集,粒径范围 238.6 ~ 340.7 nm,均值为 (276.0 ± 24.1) nm, Zeta 电位: (-14.0 ± 0.6) mV。体外超声检测在超声造影状态下能持续稳定显像,进入到二维灰阶状态时,瞬间破坏完全,显像效果消失,粒径变小。体内超声显像在造影状态下纳米微泡可明显增强大鼠肝脏、肾脏回声信号。【结论】通过本研究方法成功制备了粒径小、可稳定显像的新型纳米级超声造影剂,在二维灰阶高机械指数状态下该纳米微泡造影剂可被瞬间破坏,这为进一步肿瘤组织血管外靶向显像及肿瘤局部药物释放研究奠定基础。

关键词: 纳米级; 超声造影剂; 超声检查

中图分类号: R445.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2011)03-0327-04

Preparation and Ultrasonic Imaging of Novel Nanoscale Bubble Ultrasound Contrast Agent

WANG Ping, YIN Ting-hui, ZHENG Rong-qin*

(Department of Ultrasound, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University//Institute of Diagnostic and Interventional Ultrasound of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To prepare and optimize nanoscale bubble ultrasound contrast agent for stable ultrasonic imaging, and to evaluate its enhancing imaging capability in vitro and in vivo. 【Methods】 Nanoscale bubbles were prepared by multiple-step methods: film-hydration, sonication and ventilation, low-speed centrifugal classifier. In order to screen out the optimal experimental conditions for small diameter and good repeatability, orthogonal test was designed aimed to main factors. The bubble morphology was observed under light microscopy, the nanobubble size was assessed by the Zeta 90Plus/BI-MAS Brookhaven. The contrast enhancement effect was observed in vitro and in vivo. 【Results】 Nanoscale bubbles with spherical shape distributed homogeneously, without obvious aggregation. The range of diameters was $(238.6-340.7)$ nm, with the mean diameters of (276.0 ± 24.1) nm and average zeta potential of (-14.0 ± 0.6) mV. In vitro test in CPS mode nanoscale bubbles showed stable imaging. When turned to grayscale mode with high mechanical index, the bubbles were destroyed immediately with smaller diameters, and the enhancement of the image receded. Contrast imaging in vivo showed that the nanoscale ultrasound contrast agent could significantly enhance echo intensity of the vessels and parenchyma in rat livers and kidneys. 【Conclusion】 This kind of novel stable and small size nanoscale ultrasound contrast agent, which were easily destroyed in gray-scale mode with high mechanical index, would lay a foundation for extravascular tumor targeting imaging and local drug delivery.

Key words: nanoscale; ultrasound contrast agent; ultrasonography

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(3): 327-330]

研究表明,疾病(如肿瘤)状态中的血管内皮间隙可允许直径小于 700 nm 的颗粒穿过^[1],这为

纳米级超声造影剂应用于血管外靶组织显像、实现病变组织特异性诊断提供了理论依据,也促使

收稿日期:2011-02-17

基金项目:国家自然科学基金(30870717, 81071167, 81000191)

作者简介:王平,硕士,主治医师,研究方向:腹部、浅表器官超声诊断及超声分子影像学, E-mail: wangping3915@sohu.com; * 通信作者: 郑荣琴, E-mail: zhengrongqin@hotmail.com

纳米级超声造影剂成为近年来研究的热点。目前纳米级超声造影剂有包被固体颗粒的纳米粒子、包负液态氟碳的纳米乳剂、包负气体的纳米微泡^[2],因制备方法、成膜材料及包载内容物不同所制备的造影剂粒径差别较大、成像效果也不一。粒径小穿透力强、可稳定显像是对纳米级超声造影剂的理想要求。目前文献报道的纳米微泡粒径偏大^[3-5],且缺乏声场稳定性的方面的信息。本课题组制备了粒径小、可稳定显像的纳米级脂质微泡,改变显像条件时可瞬间破坏微泡,为今后的靶向显像和载药治疗研究提供基础。

1 材料与方 法

1.1 试 剂

氯仿、甘油(广州东征化玻仪器有限公司)、全氟丙烷气体(C3F8,天津核工业理化工程研究院),氯化卵磷脂(HEPC)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)、二棕榈磷脂酸(DPPA)(Lipoid,上海东尚实业有限公司),泊罗沙姆 124(武汉祥和精细化工有限公司),磷酸盐缓冲液(PBS,广州威佳科技有限公司)。

1.2 仪 器

恒温摇床(ZHWY-200B,上海智城分析仪器制造有限公司),超声波发生器(Vibra cell sonicator, Sonics 美国),Zeta 电位及粒度分析仪(90Plus/BI-MAS Brookhaven 美国),倒置荧光显微镜(ZEISS 1021640222 蔡司光学仪器(上海)国际贸易有限公司),超声显像系统(Acuson Sequoia 512, Siemens 美国)。

1.3 纳米级脂质微泡的制备

采用薄膜水化、声振法制备纳米级脂质微泡:称取一定量的 HEPC、DSPE、DPPA 完全溶解于氯仿中,将磷脂溶液置于直径 9 cm 的培养皿,在通风橱中待氯仿自然挥发形成磷脂薄膜。上述成膜的培养皿中加入 4 mL 水化液(PBS:甘油=9:1(体积比),内加入一定量泊洛沙姆 124 的溶液),室温下摇床上水化 60 min。将洗下的磷脂膜与水化液混匀转移至 50 mL 离心管内,超声破碎仪进行声振,边声振边通入全氟丙烷气体。所制备液体静止 10 min,低速离心,吸取下层乳白色液体。再将样品洗涤、重悬即获得纳米级脂质微泡造影剂。

为了获得显像效果及粒径均稳定的纳米微

表 1 L9(34)正交试验及粒径结果

Table 1 L9(34) orthogonal test and diameter results

ID	X_1 /mg:mg	X_2 /min	X_3 /%	X_4 /min	Y/nm
Sample 1	2:0	6	60	5	1109.2 ± 202.4
Sample 2	2:0	8	80	10	983.1 ± 118.3
Sample 3	2:0	10	100	15	743.5 ± 95.0
Sample 4	1:1	6	80	15	278.9 ± 24.5
Sample 5	1:1	8	100	5	333.6 ± 32.0
Sample 6	1:1	10	60	10	336.8 ± 21.7
Sample 7	0:2	6	100	10	339.9 ± 27.3
Sample 8	0:2	8	60	15	266.9 ± 27.1
Sample 9	0:2	10	80	5	434.7 ± 35.6

泡,针对制备过程中的影响因素,设计了正交试验对制备纳米微泡过程中影响微泡粒径 Y 的因素(包括 DPPE:DPPA 即 DPPE 与 DPPA 质量比 X_1 、通气时间 X_2 、声振幅度 X_3 、离心时间 X_4)进行优化(详见表 1)。并按上述优化条件后的方法制备了空白脂质体进行显像效果的对照(声振过程中不通气,其余方法同前)。

1.4 纳米微泡理化性质的测定

400 倍光镜观察微泡的大小、形态、分布。Zeta 电位及粒径分析仪对纳米微泡粒径、电位进行测量。

1.5 体外超声显像

用 1 mL 注射器吸取一定量纳米微泡溶液,置于恒温水浴中,水浴底部粘附有厚度为 1 cm 的海绵层作为消声层,将超声探头置入水中进行超声显像。仪器:超声仪器 Siemens Sequoia 512,探头型号 15L8W-S,频率 P7.0 MHz,增益 0 dB,先进入对比脉冲序列(contrast pulse sequencing, CPS)进行观察,再进入二维灰阶超声进行观察。根据初浓度样品的显像效果调整不同稀释倍数,直至声像图无明显衰减,内部出现均匀的回声信号。每次超声显像条件保持一致,并采取了局部放大功能。声束与注射器长轴垂直进行扫查并进行图像存储。并对二维灰阶超声显像后样品粒径进行测量。

1.6 统计学方法

利用 SPSS 13.0 软件包,配对 t 检验分析超声辐照前后粒径大小变化情况, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

1.7 体内超声显像

Wistar 大鼠 5 只,均为雄性,质量 200 ~ 250 g。实验前采用 100 g/L 的水合氯醛腹腔注射麻醉,剂

量为 4 mL/kg。用脱毛膏脱去大鼠肝区、肾区体毛,将其固定于实验台上。用头皮针经尾静脉建立静脉通道后团注纳米微泡 (0.5 mL/kg), 即刻尾注 0.5 mL 生理盐水冲洗管道。使用 Siemens Sequoia 512 彩色超声诊断仪, 15L8W-S 线阵探头, 频率 7.0 MHz, CPS 条件下进行显像观察, 每次显像条件一致, 机械指数 (mechanical index, MI) 设定为 0.2, 增益 0 dB, TGC、聚焦范围等参数均调至最佳状态, 用超声仪内部工作站存储动静态显像资料。

2 结果

2.1 一般结果

当 DPPE:DPPA (质量比)=1:1、通气 10 min、声振强度 100%、离心 15 min 时, 制得纳米微泡粒径最小, 稳定性也最好。影响效果从大到小依次为 DPPA 浓度、离心时间、声振振幅、通气时间。纳米微泡外观呈乳白色悬液, 不透明, 光镜下见纳米脂质微泡分布均匀, 分散性好, 未见明显聚集 (图 1)。通过激光粒径仪测量粒径为 238.6~340.7 nm, 平均 (276.0 ± 24.1) nm, Zeta 电位: (-14.0 ± 0.6) mV。

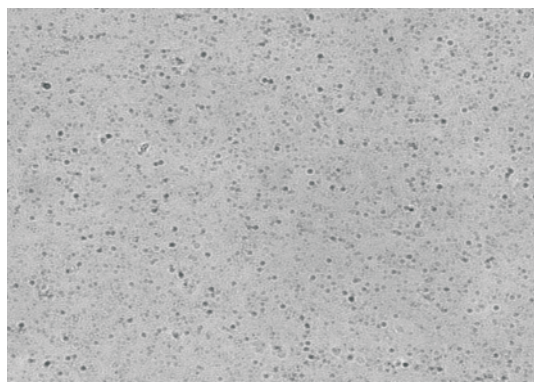


图 1 光镜下见纳米脂质微泡

Fig.1 Light microscopy of nanobubble

Uniform distribution of nanobubble with good dispersion, no significant aggregation ($\times 400$)

2.2 体外超声评价

超声显像 CPS 状态下: 空白脂质体无显像效果呈无回声; 纳米微泡有显著的显像效果 (图 2), 且持续观察 30 min 无明显减退, 进入二维灰阶高机械指数状态时声像图瞬间变为无回声, 肉眼观察纳米微泡由乳白色悬液变为接近透明清亮液体 (图 3), 通过激光粒径仪对二维灰阶超声显像前

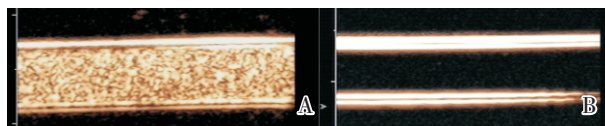


图 2 CPS 状态下超声显像

Fig.2 Ultrasonic imaging under CPS

Nanobubble obviously enhanced ultrasound imaging (Dilution 1:80), blank liposome could not enhance ultrasound imaging. A: nanobubble; B: blank liposome

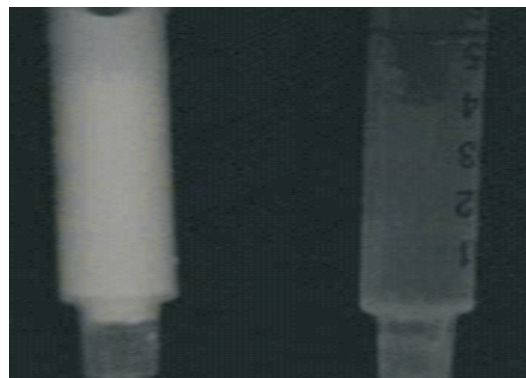


图 3 纳米微泡二维灰阶超声辐照前后的变化

Fig.3 Change of nanobubbles scanned by the two-dimensional ultrasound

Milky suspension (left) changed into approximately transparent clear liquid (right)

后粒径测量发现粒径较辐照前变小 ($P = 0.022 < 0.05$; 图 4)。

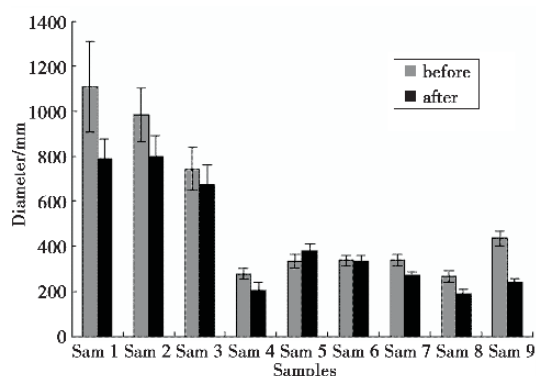


图 4 9 个样品二维灰阶超声辐照后粒径较前变小

Fig.4 The diameters of the nine samples scanned by the two-dimensional ultrasound became smaller

($P = 0.022 < 0.05$)

2.3 体内超声显像

大鼠尾静脉注射纳米微泡超声造影剂后可见肝脏、肾脏回声均显著增强, 持续增强达 30 min。

3 讨 论

超声造影技术是利用造影剂增强超声回声信号以提高病变与周围组织之间的回声,达到检出、诊断病变的目的。目前常规超声造影剂含大量微气泡,注入体内后可改变扫查界面的声阻抗差,产生造影显像效果,在临床上应用广泛^[6]。但其粒径为微米级,不能透过血管内皮间隙,属于血池显像,非肿瘤特异性成像。粒径小于 700 nm 的造影剂可穿越肿瘤组织血管内皮间隙到达肿瘤靶区,在肿瘤组织中富集实现被动靶向^[7],通过对其表面进行靶向修饰可识别肿瘤表面特异性分子并与之结合,实现主动靶向,达到肿瘤特异性成像的目的^[8]。而且物质的尺寸减小到纳米级后,分子特性发生很大改变,表现出许多特有的性质:半衰期长、表面反应活性高、强烈的吸附能力以及不易受体内和细胞内各种酶的降解等^[9]。因此纳米级造影剂在生物医学领域具有广泛的应用前景。

目前,国内外学者报道的纳米微泡造影剂因其成膜材料的组份及制备工艺不同,所制备的纳米微泡在粒径大小、成像效果等方面存在较大差异。超声造影剂为实现肿瘤组织血管外靶向显像,必须保证在其表面链接相应配体后仍能顺利通过肿瘤血管内皮间隙(700 nm),进而在肿瘤靶区聚集,且能在超声造影条件下稳定显像,因此粒径小穿透力强、显像效果好、声场稳定性好的纳米微泡才能满足上述要求。本研究采用薄膜-水化、声振-通气及多级分离等多步骤方法成功制备了新型纳米级脂质微泡造影剂,其粒径为(238.6~340.7) nm,而国内学者王冬、李攀等^[4-5]报道的纳米级超声微泡造影剂粒径分别为 278.8~697.0 nm 及 400~950 nm,与本研究制备的纳米微泡相比粒径大且分布范围广;该造影剂显像效果持续而稳定,在体外超声显像 CPS 状态下持续观察 30 min 纳米微泡始终有明显的显像效果,保持了良好的声场稳定性,相关文献报道较少。同时本研究通过正交试验观察了 DPPA 含量对纳米微泡粒径的影响,研究发现加入 DPPA 组所得的纳米微泡粒径较无 DPPA 组小。原因可能是带负电荷 DPPA 使纳米微泡间因电荷的排斥作用不易聚集,保持了极小的颗粒状态。

本研究中发现该纳米微泡造影剂从显像条件

CPS 状态进入到二维灰阶高机械指数状态时,其声像图瞬间变为无回声,肉眼观察纳米微泡由乳白色悬液变为近似透明清亮液体,分析原因超声造影检查 CPS 状态时机械指数较低,仅为 0.2 左右,能量不足以破坏纳米微泡,可持续稳定显像,二维灰阶状态下机械指数达 1.2 以上,较高的能量可瞬间破坏大量的纳米微泡。二维灰阶超声显像后粒径测量较显像前变小也说明纳米微泡破裂后气体溢出形成了的较小的磷脂碎片。大鼠体内超声显像观察,本研究制备的纳米微泡在超声造影条件下即 CPS 下可明显增强大鼠肝脏、肾脏等脏器,且显像效果可持续 30 min。

本研究成功制备了粒径小、可稳定显像的纳米级脂质微泡造影剂,其分布均匀、分散性好、体内外显像效果强且声场稳定性好,为下一步制备具有肿瘤细胞表面分子识别功能的高效性的靶向超声造影剂奠定了基础;同时其在超声造影状态下可稳定显像、二维灰阶状态下瞬间破坏完全的特性为病变组织局部靶向药物治疗提供了新思路。

参考文献:

- [1] Oeffinger BE, Wheatley MA. Development and characterization of a nano-scale contrast agent [J]. *Ultrasonics*, 2004, 42(9): 343-347.
- [2] 张勇,王志刚.纳米级超声造影剂的研究进展[J].*临床超声医学杂志*, 2007, 9(2): 105-107.
- [3] Wang D, Yang K, Gao YH, et al. Preparation and characterization of a nanoscale ultrasound contrast agent [J]. *Clin Imaging*, 2010, 34(4): 288-292.
- [4] 王冬,谭开彬,杨珂,等.纳米级超声微泡造影剂的制备及其性状的初步研究 [J]. *临床超声医学杂志*, 2007, 9(12): 709-711.
- [5] 李攀,郑元义,陈松,等.自制脂质纳米级超声造影剂体外基本特性和造影增强的实验研究[J].*中国超声医学杂志*, 2008, 24(2): 100-102.
- [6] 郑荣琴,吕明德 主编.超声造影新技术临床应用[M].广州:广东科技出版社,2007:1.
- [7] Maeda H, Wu J, Sawa T, et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review[J]. *J Control Release*, 2000, 65(1-2): 271-284.
- [8] Kirpotin DB, Drummond DC, Shao Y, et al. Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(13): 6732-6740.
- [9] 徐辉碧,杨祥良.纳米医药[M].北京:清华大学出版社,2004:9-12.

(编辑 王晓鹰)