文章编号:1000-5404(2008)23-2161-03

论著

纳米液态氟碳脂质微球超声造影剂的制备及体外聚集实验研究

陈 松,康 娟,王志刚,李 攀,伍 星,许川山 (重庆医科大学附属第二医院超声影像学研究所,重庆 400010)

摘 要:目的 制备一种新型超声造影剂——纳米液态氟碳脂质微球造影剂,并研究其体外基本特性及聚集后增强超声显影性能。**方法** 采用高压均质法制备纳米液态氟碳脂质微球超声造影剂,检测一般理化性质,再制备生物素化微球,以空白微球为对照组,分别在加入亲和素前后,观察体外聚集情况及超声显影效果,并用DFY超声图像定量分析统计软件计算、比较超声图像平均灰度值。**结果** 所制备的液态氟碳脂质微球为外观呈乳白色的混悬液,镜下微球形态圆整,大小均一,性质稳定,粒径(171.9±91.0)nm;制备的生物素化微球在加入亲和素后聚集成团状,并可增强超声显影,经DFY软件分析,加入亲和素前后超声图像平均灰度值差异有统计学意义。**结论** 成功制备出稳定的纳米液态氟碳脂质超声造影剂,并采用生物素亲和素法证明了该微球具有聚集后增强超声显影性能。

关键词: 纳米;液态氟碳;超声造影剂
中图法分类号: R943; R965; R981 **文献标识码:** A

Preparation and *in vitro* aggregation of a novel ultrasound contrast agent, perfluorocarbon lipid nanoparticles

CHEN Song, KANG Juan, WANG Zhi-gang, LI Pan, WU Xing, XU Chuan-shan (Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To develop a novel nanoscale ultrasonic contrast agent, perfluorocarbon lipid nanoparticles and to investigate its basic characteristics and capability to enhance ultrasound images when aggregated. **Methods** Perfluorocarbon lipid nanoparticles were prepared by lecithin and liquid perfluorocarbon with a high pressure homogen. The physico-chemical properties of the nanoparticles were detected. Strepavidin was added to the preparation procedure to produce biotinylated perfluorocarbon lipid nanoparticles. Blank nanoparticles with or without biotinylation served as control. The 4 kinds of nanoparticles were used for ultrasound imaging. The aggregation, contrast effect of these agents were studied, and the average gray scale value of the captured ultrasound images were analyzed by the DFY software. **Results** These nanoparticles were uniform and stable, and with a mean size of (171.9±91.0) nm. There was no visible ultrasound signals scattered with the nanoparticles before adding strepavidin, while obviously ultrasound echo signals were observed in those biotinylated nanoparticles, with significant difference between the ultrasound images before/after biotinylation. **Conclusion** A steady perfluorocarbon lipid nanoparticles are prepared, and can aggregate together in the existence of strepavidin and enhance the ultrasound image. The aggregated nanoparticles might be regarded as a ultrasound contrast agent.

Key words: nanometre; perfluorocarbon; ultrasound contrast agent

随着分子生物学技术的发展和延伸,超声造影不再局限于仅仅获取组织的血流灌注信息,而是逐渐应用于特异性的超声分子成像[1]。与CT、MRI相比,超声对造影剂微泡有更高的敏感性,能显示低浓度,甚至单个微泡[2],因而超声分子成像一诞生,便迅速引起广泛的关注,它并不是对传统超声造影概念的简单替代,而是通过靶向作用于生物分子来突出显示病变组织,大幅度提高影像诊断的准确性和灵敏性。因此,作为其成像基础的靶向性超声造影剂立刻成为第三代超声造影剂研究的主流。目前国内外已研制出多种靶向

基金项目: 国家高技术研究发展计划("863"计划)(2006AA02Z4F0);国家自然科学基金重点项目(30430230);重庆市自然科学基金面上项目(2005BA5024)
Supported by the Tackling Program of the National "863" Key Research Project of China (2006AA02Z4F0), the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30430230) and the General Program of the Natural Science Foundation of Chongqing (2005BA5024)
作者简介: 陈 松,男,重庆市人,硕士研究生,主治医师,主要从事超声造影方面的研究。电话:(023)63719612,E-mail:cs20012001@163.com
通信作者: 王志刚,电话:(023)63719612
收稿日期: 2008-01-17;**修回日期:** 2008-07-28

性超声造影剂,主要针对血栓、炎症及肿瘤血管,取得了很好的显像和诊断效果[3,4]。但由于这些造影剂为微米级,直径相对太大,无法穿过血管壁到达靶细胞(如癌细胞),因此仍局限于血池内的显影,难以实现血管外靶向显影的目的。本实验旨在制备出一种稳定的纳米级超声造影剂,并初步检验其体外聚集增强超声显影性能。

1 材料与方法

1.1 试剂

卵磷脂(国药集团化学试剂有限公司),液态氟碳 Perfluorooctylbromide(PFOB,法国 Elf Atochem 公司),链霉亲和素(Sigma 公司),Biotin-PE(北京海德生物有限公司),PBS 缓冲液,氯仿溶液。

1.2 仪器

78-1 型磁力加热搅拌器(江苏荣华仪器制造公司),RE-52 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),FJ-200 高速分散均质机(上海标本模型厂),GYB40-10S 高压均质机(上海东华公司),FA2004 电子天平(上海精天电子仪器有限公司),GE vivid7 超声诊断仪,电子显微镜,DFY 超声图像定量分析统计软件。

1.3 液态氟碳脂质微球的制备

将 5 g 卵磷脂溶于 10 ml 氯仿溶液中,同时用磁力搅拌器进行搅拌,在搅拌时用封口膜将烧杯口封住,以避免氯仿溶液迅速挥发。待其完全溶解后,移至旋转蒸发仪,旋转蒸发至形成一薄膜,将其移至烧杯中,加入 150 ml pH 7.4 的 PBS 缓冲液,加热搅拌至完全溶解。再用高速电动分散机搅拌,并同时将液态氟碳 5 ml 逐滴加入上述溶液中。然后将此混合溶液转入高压均质机内 70 MPa 乳化 5 min,得到液态氟碳脂质微球。

1.4 生物素化的液态氟碳脂质微球的制备

将 5 g 卵磷脂与适量 Biotin-PE 溶于 10 ml 氯仿溶液中,其后方法同前,即可得到生物素化的液态氟碳脂质微球。

1.5 液态氟碳脂质微球的理化性质测定

于光镜下观察微球形态分布,并用血球计数板测定浓度,粒径及电位由重庆科美纳米生物技术有限公司测定,并于电子显微镜下观察微球形态及大小。

1.6 生物素化液态氟碳脂质微球的体外聚集实验

将上述方法制备的生物素化液态氟碳微球取 10 ml 用双蒸水稀释 5 倍,分别置于 10 只玻璃试管中,即每管加入 5 ml 稀释微球。然后分别向每只试管内加入 1 mg/ml 链霉亲和素溶液 0(即空白对照组)、0.01、0.02、0.04、0.08、0.16、0.32、0.64、1.28、2.56 ml,摇匀后静置约 5 min。先用肉眼观察溶液外观变化,再分别取 20 μl 试管底部溶液于光镜下观察。

1.7 生物素化液态氟碳脂质微球体外超声显影实验

各取空白微球和生物素化微球 10 ml 稀释 20 倍后用于超声显像实验。将两组稀释后的 200 ml 微球各置于一塑料容器内,固定超声探头(13.5 MHz),使探头与乳液液面接触,在两组微球中加入 4 mg 链霉亲和素前后分别采取超声图像,进行 DFY 超声图像定量分析。该实验重复进行 5 次。

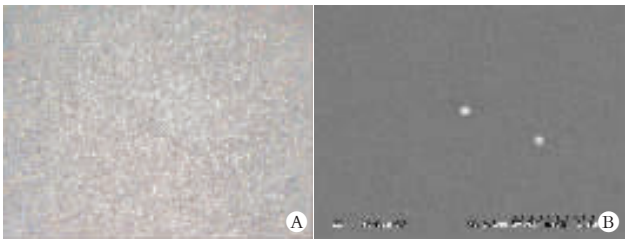
1.8 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,DFY 统计软件计算其平均灰度值,采用 SAS 9.0 统计软件行方差分析。

2 结果

2.1 液态氟碳脂质微球的理化性质

所制备的液态氟碳脂质微球造影剂为外观呈乳白色的混悬液,光镜及电镜下观察:微球形态圆整,大小均一,浓度(1~2)$\times 10^{10}$ ml^{-1},粒径(171.9±91.0)nm(图 1),平均电位 -85.1 mV,3 d 内在 4 ℃冰箱能够保持稳定状态,并在此期间未见乳剂颜色改变或者沉淀现象。



A:光镜观察 (×400);B:电子显微镜观察 (×12 000)

图 1 液态氟碳脂质微球形态观察

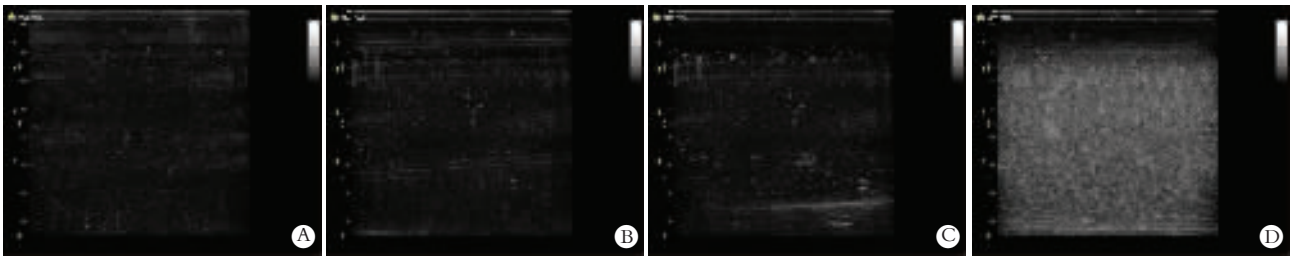
2.2 生物素化液态氟碳脂质微球的体外聚集实验

肉眼观察:空白对照组即未加亲和素组,溶液呈均匀较透明乳液状;加入 0.01 ml 亲和素组,肉眼观察溶液外观无明显变化,但试管底部似乎有极少许沉淀;加入 0.02 ml 亲和素组,溶液可见分为两层,上层依然呈乳剂状,但下层出现白色沉淀物;加入 0.04 ml 亲和素组,溶液上层依呈乳剂状,下层沉淀物增多;加入 0.08、0.16、0.32、0.64 ml 亲和素组,溶液逐渐呈不透明乳液状,下层沉淀物逐渐增多;加入 1.28、2.56 ml 亲和素组,溶液仍呈不透明乳液状,下层见多量沉淀物。

显微镜下观察:空白对照组即未加亲和素组,整个显微视野为均匀分散的微球,未见凝集现象;加入 0.01、0.02、0.04、0.08、0.16、0.32、0.64、1.28、2.56 ml 组,底部溶液内均可见大量微球聚集(图 2)。



图 2 光镜观察生物素化液态氟碳脂质微球加入 1.28 ml 亲和素后形态 (×400)



A:空白液态氟碳微球加入亲和素前;B:空白液态氟碳微球加入亲和素后,超声显示为无回声;C:生物素化液态氟碳微球加入亲和素前,超声显示为无回声;D:生物素化液态氟碳微球加入亲和素后,超声显示为密集的点状高回声

图 3　空白液态氟碳微球与生物素化液态氟碳微球加入亲和素前后超声显像

2.3　体外超声显影实验

加入亲和素前,空白对照组和生物素化组超声下显示均以无回声为主,伴散在点状低回声;加入 4 mg 亲和素后,空白对照组超声回声信号均未见明显改变,而生物素化组超声下显示呈密集的点状高回声 (图 3)。空白对照组加入亲和素前后超声图像灰度值分别为(18.89 ± 8.67)、(19.09 ± 10.46),生物素化组加入亲和素前后超声图像灰度值分别为(21.11 ± 12.29)、(82.83 ± 18.81),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3　讨论

肿瘤是超声诊断的主要适应证,肿瘤良恶性的鉴别也一直是困扰超声医学的一个重要难题。研制针对肿瘤细胞自身特异性抗原的靶向性超声造影剂,以实现对肿瘤细胞特异性的分子成像,具有很大的意义[5]。但目前常用的超声微泡造影剂直径相对太大(多为微米级),不易穿过血管内皮细胞到达靶细胞,而且微泡内包含气体,其本身具有先天性反射和背向散射特征,使观测目标与背景的对比度不强,因此要利用微泡造影剂实现肿瘤的分子成像还存在一定的困难。

为了克服目前存在的这些困难,国外有研究单位正在积极探索液态氟碳微球在超声造影方面的应用。本实验所制备的即是这种脂质包被的液态氟碳微球超声造影剂,最早由 Lanza 等[6]研制。其外壳由脂质构成,内部包含液态氟碳,为一实心球体,特点是:①由于微球内部包含物为液态氟碳,因此性质非常稳定,对压力、空气暴露、热、剪切力等不敏感;②微球颗粒直径非常小,介于数十纳米至 300 nm,有利于其穿过肿瘤新生血管内皮细胞间隙(多为 380 ~ 780 nm)[7];③微球数量众多,在血管内存留时间长,在体内的循环半衰期可达数小时;④微球内部不含气体,只有大量聚集时才具有较强的反射和背向散射性能而显影,未聚集时并不显影,这一特性可以明显增强对比信号,使观测背景显得相对干净,有利于提高诊断的准确性。

本研究参考了国外有关文献制备液态氟碳微球的方法,并根据本实验室具体条件进行多次预实验,对其工艺及配方组成作出了适宜调整。通过采用高压均质技术,所制备的微球粒径(171.9 ± 91.0) nm,均一性好,形态圆整,浓度高,性质稳定。进一步制备生物素化液态氟碳微球,并通过体外实验发现,加入亲和素后,该微球即可通过生物素亲和素系统而发生显著聚集,并在超声下显示为高回声,证实了其聚集后增强超声显影的特性。由于该微球较小的粒径可以穿过血管内皮细胞间隙到达血管外,若制备成靶向微球[8],则可望达到血管外靶向显像的目的。新近研究还表明,液态氟碳微球若与半磁性物质或核医学物质联接可制备多功能的造影剂[6],允许同时用 MRI、PET 以及超声对靶向器官进行显像,从而提高诊断的准确性。

参考文献:

[1] Wunder A, Straub R H, Gay S, *et al*. Molecular imaging: novel tools in visualizing rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology (Oxford), 2005, 44(11):1341 - 1349.

[2] Klibanov A L, Rasche P T, Hughes M S, *et al*. Detection of individual microbubbles of ultrasound contrast agents: imaging of free-floating and targeted bubbles[J]. Invest Radiol, 2004, 39(3): 187 - 195.

[3] 夏红梅,高云华,卞爱娜,等. 亲血栓性靶向超声造影剂增强兔腹主动脉新鲜血栓显像的实验研究[J]. 中国超声医学杂志,2004, 20(11):810 - 813.

[4] 马立康,徐军明,侯方高,等. 超声微泡造影剂的肿瘤靶向治疗研究进展[J]. 临床超声医学杂志,2007,9(3):166 - 168.

[5] Klibanov A L. Targeted delivery of gas-filled microspheres, contrast agents for ultrasound imaging[J]. Adv Drug Deliv Rev, 1999, 37(1 - 3): 139 - 157.

[6] Lanza G M, Winter P M, Caruthers S D, *et al*. Magnetic resonance molecular imaging with nanoparticles[J]. J Nucl Cardiol, 2004, 11(6):733 - 743.

[7] Cyrus T, Winter P M, Caruthers S D, *et al*. Magnetic resonance nanoparticles for cardiovascular molecular imaging and therapy[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2005, 3(4):705 - 715.

[8] Mattrey R F, Nemcek A A Jr., Shelton R, *et al*. *In vivo* estimation of perfluorooctylbromide concentration in tissues[J]. Invest Radiol, 1990, 25(8):915 - 921.

(编辑　邓强庭)