文章编号:1000-5404(2010)19-2105-04

论著

# 乳酸羟基乙酸共聚物微泡声学造影剂的制备与评估实验研究

李奇林,全学模 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院超声科)

【摘要】 目的 制备乳酸羟基乙酸共聚物(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)微泡声学造影剂,考察其理化及声学特性。方法 复乳法制备不同聚乳酸/聚羟基乙酸(PLA/PGA)的微泡,考察其理化特性;体内外显影评价不同剂量、不同机械指数条件下微泡造影剂的声学密度(AD)变化规律。结果 PLGA微泡成品呈白色粉末状,以生理盐水或PBS稀释溶解后为乳白色混悬液,pH为6.5±0.3;光镜显示微泡大小均匀,分散程度好;微泡平均粒径1.2 μm;Coulter计数显示0.01 g多聚体微泡冻干粉溶于10 ml蒸馏水中的浓度为(2~4)×$10^9$/ml;4 ℃与常温干燥储存的PLGA微泡10周后再分散其浓度、粒径、pH值无明显差异;体外显影显示声学密度随微泡浓度的升高而增大,同浓度下声学密度与机械指数(mechanical index, MI)呈直线相关关系;兔心脏造影检查可观察到PLGA微泡造影剂能顺利通过肺循环实现左心显影,当MI为0.2时,左室内声学密度值较其他3组(MI为0.6、1.0、1.2)均有非常显著性差异。结论 PLGA微泡造影剂具有较高的可控性和稳定性,微泡共振频率较高,可以顺利通过肺循环实现左心室显影。

【关键词】 声学造影剂;乳酸羟基乙酸共聚物;理化性质
【中图法分类号】 R934;R961;R981 【文献标志码】 A

# Preparation of poly lactic-co-glycolic acid microbubble ultrasonic contrast agent and its evaluation

Li Qilin, Quan Xuemo (Department of Ultrasonography, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

【Abstract】 Objective To prepare the poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) microbubble ultrasonic contrast agent and evaluate its physicochemical and acoustic properties. Methods Different PLA/LGA microbubble ultrasonic contrast agents were prepared with the double emulsion method. Their physicochemical properties and acoustic signal intensity change were evaluated *in vitro* using different doses and mechanical index (MI) of PLGA microbubble ultrasonic contrast agent. Results A cream white suspension was obtained by dissolving the white PLGA microbubble powders in saline or PBS with a pH value of 6.5±0.3. Light microscopy showed that the microbubbles were uniform in size and well dispersed. The average diameter of microbubbles was 1.2 μm. Coulter count showed that the concentration of 0.01 g polymicrobubble dry powders dissolved in 10 ml distilled water was $2.0\times10^9$/ml $-4.0\times10^9$/ml. No significant difference was observed in concentration, diameter and pH value in 10 weeks after the PLGA microbubbles were kept at 4℃ or at common temperature. *In vitro* study showed that the acoustic intensity of PLGA microbubbles increased with their concentration, and was linearly correlated with their mechanical index (MI). Rabbit cardioroentgenography showed that PLGA microbubbles passed through the pulmonary circulation and achieved the left ventricular imaging *in vivo*. A significant difference was found in left ventricle acoustic intensity when the MI value was 0.2 compared with when it was 0.6, 1.0, and 1.2. Conclusion PLGA microbubble ultrasonic contrast agent has a rather good controllability and stability with a higher resonance frequency, thus being able to pass through the pulmonary circulation and achieve left ventricular imaging.

【Key words】 ultrasound contrast agent; poly lactic-co-glycolic acid; physicochemical properties

Corresponding author: Li Qilin, E-mail: chenhj_1999@163.com

血管内超声造影剂已有30多年的研究历程,自Feinstein等[1]应用声振法制备白蛋白微泡造影剂后,研究者逐渐增多,声学造影剂发展突飞猛进,超声造影诊断水平有了质的飞跃,极大地拓宽了声学造影的应用范围[2,3]。乳酸羟基乙酸共聚物(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)是获得美国食品药品管理局

【通信作者】 李奇林,E-mail:chenhj_1999@163.com

(Food and Drug Admistraton,FDA)批准并应用于临床的生物医用材料,组织相容性好,可以在体内完全降解和代谢消失,无免疫原性及潜在的交叉感染危险。近年来国内外学者开始探索应用PLGA作为新型的微泡造影剂包膜材料。良好的声学造影剂不但需要具有优越的散射性能,还要求微泡可通过肺组织毛细血管网,并能在循环中保持一定的稳定性。本研究采用复乳法制备PLGA微泡,并考察其基本理化及声学特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

PLGA(50∶50,65∶35,90∶10,100∶0,相对分子质量15 000,山东医疗器械研究所),聚乙烯醇[PVA,相对分子质量(3~7)×$10^4$,美国Sigma公司],二氯甲烷、异丙醇、氯化钠等试剂均为市售分析纯。GE VIVI7超声诊断仪(美国GE公司),VC500超声波细胞粉碎机(美国Sonics公司),KUBOTA 6930高速冷冻离心机(日本KUBOTA公司),MS II型库尔特颗粒分析仪(美国Coulter Corp公司),HITACHI S-3000N扫描电镜(日本日立公司),Image-Pro Plus 6.0图像分析系统(美国Media Cybernetics公司),DFY- II型超声图像定量分析诊断仪(重庆医科大学超声影像研究所),LS230激光粒度分析仪(美国Beckman Coulter公司)。

### 1.2 主要液体配制

5% PVA溶液:精密称取25 g PVA颗粒置于烧杯中,加入超纯水500 ml,微波炉反复加热、冷却、搅拌直至完全溶解,冷却后纱布过滤装瓶备用,应用时根据实验需要进行稀释。

### 1.3 实验动物

新西兰大白兔4只,4月龄,雌雄不限,体质量2.5~3 kg,由重庆医科大学实验动物中心提供,速眠新肌注麻醉,剃须刀进行前胸部脱毛。

### 1.4 PLGA微泡的制备

在预实验中对乳液溶剂挥发法的工艺流程中的上述参数进行单因素考察,选择最适参数以调节微泡粒径在适宜范围。精密称取0.25 g PLGA置入的5 ml二氯甲烷溶液中,振荡使之充分溶解,加入适量蒸馏水,超声细胞破碎仪(功率160 W)冰浴下充分乳化(乳化时间90 s)制得初乳液,倒入3% PVA溶液中再次匀化后,加入到同浓度的PVA溶液中持续搅拌(转速600 r/min),并加入一定量2%异丙醇萃取有机溶剂,待二氯甲烷完全挥发,微球固化后,蒸馏水反复离心洗涤数次,收集沉淀加入适量蒸馏水真空冷冻干燥即得PLGA微泡冻干粉。

### 1.5 PLGA微泡基本特性的考察

将0.01 g微泡冻干粉溶于10 ml PBS中,测定PLGA微泡悬液的pH值。混合摇匀后毛细管精密移取30 μl稀释200倍,Coulter计数仪进行浓度测定。激光粒度仪测定微泡粒径大小及其分布。Leica光学显微镜及摄像系统观察所得的微泡的外观形态、大小分布及分散度等性质并应用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件进行分析。将冷冻干燥的PLGA微泡喷金,HITACHI S-3000N扫描电镜观察微泡的表面情况。

### 1.6 PLGA微泡初步稳定性测试

制作不同比例(50∶50,65∶35,90∶10,100∶0)PLGA微泡,将成品以冻干粉及混悬液(0.15 mol/L PBS配置)的形式分别贮存于常温及4 ℃下,于第12小时、24小时、48小时、96小时、1周、2周、6周、10周取样品,光学显微镜观察形态外观,并测定微泡的浓度、pH值、粒径及分布。

### 1.7 PLGA微泡体外显影

将一定量的PLGA冻干粉末溶于PBS(25 ℃,pH 7.4)溶液500 ml,配置3种不同剂量(1.2、0.6、0.3 mg/ml)的微泡混悬液并倒入水槽。将水槽放置在一磁振子搅拌器上,保持转速60 r/min以防止微泡沉降。采用GE VIVI7超声诊断仪,10 L线阵探头(频率4.9/9.9 MHz),调节超声输出强度MI为0.03~1.2,仪器其他参数设置在实验中保持不变。比较不同剂量的造影剂在不同MI条件下灰阶信号强度变化,检测造影前后微泡的浓度及粒径变化。各实验组取3批次不同样品平行进行3次($n$=9)。磁盘存图后转为jpg格式,录像转为AVI格式。采用DFY- II型超声图像定量仪图像分析系统进行定量分析,将感兴趣区设定为正方形,(400±10)像素,采样区域保持在同一深度。

### 1.8 心脏超声造影

称取PLGA微泡冻干粉0.2 g溶于10 ml生理盐水,配制成浓度为0.02 g/ml的微泡混悬液。新西兰大白兔4只,应用速眠新0.02 mg/kg肌注麻醉后,使其仰卧于检查床,充分暴露前胸部。采用GE VIVI7超声诊断仪进行体内显影效果的观察,比较不同MI(0.2、0.6、1.0、1.2)条件下的心脏造影成像效果。超声扫查选用M3S探头(发射频率1.7 MHz,接受频率3.4 MHz),采用连续成像方式,成像深度5 cm,取心尖四腔心切面,记录基础状态下图像,待图像满意后经耳缘静脉注射造影剂(0.05 ml/kg),随后推注10 ml生理盐水。观察造影剂充盈时段并存图,工作站转存图片为jpg格式,定量仪分析图片,指标分析时取样框置于同一深度,分别选取3个感兴趣区,取平均值进行统计分析。

### 1.9 统计学处理

数据用$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 12.0统计软件,进行直线相关分析。

## 2 结果

### 2.1 PLGA微泡的基本特性

微泡为白色粉末状,使用时用生理盐水或PBS稀释,溶解分散后为乳白色的混悬液。静置后分层,上层澄清透明,下层为细腻的白色粉末,轻摇能够重新混匀成白色乳液。新鲜微泡悬液的pH为6.5±0.3。Coulter计数仪测量微泡浓度,结果显示0.01 g微泡冻干粉溶于10 ml PBS中的浓度为(2~4)×$10^9$/ml。激光测径仪测得微泡平均粒径1.2 μm,跨距0.69 m。

### 2.2 光学显微镜及电镜观察

微泡混匀后吸取1滴滴于玻片,光学显微镜观察微泡大小均一,绝大多数分布集中在1~2 μm,分散程度较好。微泡外观为一圆整球状,中间透亮,形态规则。扫描电镜显示微泡呈

圆球形,表面光洁,无明显凹陷、黏连(图 1)。

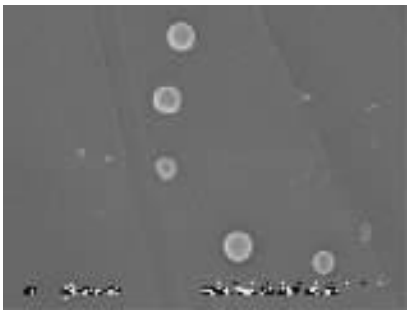


**图 1 电镜下观察 PLGA 微泡 (×5000)**

### 2.3 初步稳定性测试

于各个时间点取微泡样品再分散后检测,结果显示 4 ℃与常温干燥储存的 PLGA 微泡浓度、粒径、pH 值无明显差异。光学显微镜下观察微泡的形态外观良好,体外造影显像较 12 h 组无明显差别。4 ℃储存的微泡混悬液的 pH 值呈下降趋势,微泡的粒径及外观形态无显著变化,可见部分微泡黏集。常温储存的 PLGA 微泡悬液在 2 ~ 10 周逐步出现凹陷、变形、聚集成团,微泡悬液 pH 测值明显下降,以 PLGA(50∶50)微泡变化最明显。

### 2.4 体外显影回声强度定量分析

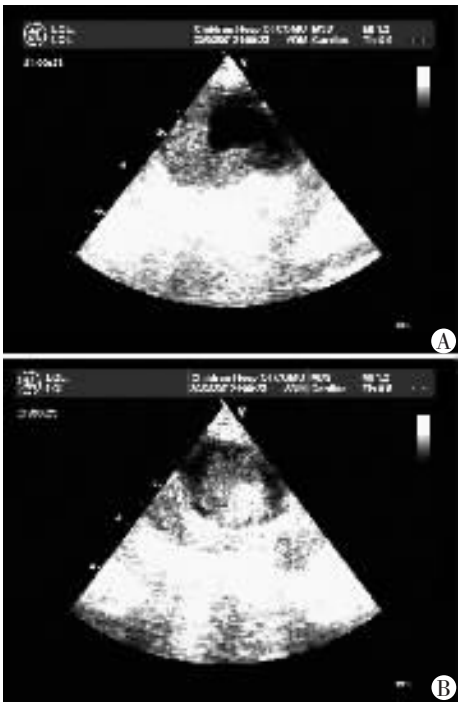
体外显影显示回声光点细腻、均匀,无明显后方声影。声学密度(acoustic density,AD)值随 PLGA 悬液浓度增大而增强。同浓度下 PLGA 微泡的 AD 值随 MI 的增大而升高,直线相关分析表明 MI 与 AD 呈正的直线相关关系。当 MI > 0.5,体外显影可获得较明显的灰阶图像;在 MI > 1.0 以后,PLGA 微泡 AD 值随 MI 增高的上升幅度减小(表 1)。定量分析微泡悬液随时间的 AD 值变化,结果显示浓度 0.6 mg/ml 的微泡悬液在 MI 0.6 的诊断超声照射 0、2、4、6 min 后 AD 值分别为(20.52 ± 0.34)(19.94 ± 0.52)(19.26 ± 0.81)(18.73 ± 1.07)。6 min 后,平均 AD 值下降 1.79 dB。超声照射前后微泡浓度及粒径无显著性差异($P > 0.05$)。

**表 1 不同剂量和机械指数条件下显影的 AD 值(dB, $\bar{x} \pm s$)**

| MI | 0.3 mg/ml | 0.6 mg/ml | 1.2 mg/ml |
|---|---|---|---|
| 0.03 | 0.68 ± 0.07 | 0.76 ± 0.08 | 1.15 ± 0.12 |
| 0.06 | 1.13 ± 0.10 | 1.26 ± 0.18 | 3.09 ± 0.37 |
| 0.12 | 2.37 ± 0.20 | 3.45 ± 0.22 | 4.51 ± 0.45 |
| 0.24 | 5.87 ± 0.77 | 6.46 ± 0.45 | 8.45 ± 0.49 |
| 0.3 | 7.92 ± 1.18 | 8.43 ± 0.64 | 11.27 ± 0.66 |
| 0.4 | 10.37 ± 1.52 | 11.65 ± 0.91 | 13.63 ± 0.86 |
| 0.5 | 12.70 ± 1.56 | 14.43 ± 1.11 | 17.35 ± 1.32 |
| 0.6 | 17.33 ± 1.72 | 20.56 ± 1.38 | 24.08 ± 1.42 |
| 0.8 | 20.39 ± 2.01 | 23.77 ± 1.83 | 28.01 ± 1.87 |
| 1 | 23.53 ± 2.07 | 27.23 ± 2.16 | 31.76 ± 2.08 |
| 1.1 | 24.55 ± 2.44 | 28.09 ± 3.26 | 32.56 ± 3.23 |
| 1.2 | 25.03 ± 2.71 | 28.75 ± 3.64 | 33.57 ± 3.78 |
| $r$ | 0.975 | 0.985 | 0.985 |

### 2.5 心脏造影

谐波状态下视觉观察,在较低机械指数(MI 0.2),心室显影浅淡,随着 MI 的增大,心室显影逐渐增强。造影剂推注后首先出现右房及右室显影(图 2A),左室显影出现在右室显影后 1 ~ 3 个心动周期(图 2B)。定量分析不同 MI 造影下左室心腔内 AD 值变化,结果显示当 MI 为 0.2 时,左室内 AD 值较其他 3 组(MI 为 0.6、1.0、1.2)均有非常显著性差异[AD 值分别为(16.8 ± 2.4)、(26.2 ± 3.7)、(28.3 ± 3.6)、(29.7 ± 3.2) dB]。



A:右房右室显影 B:左室基本充盈

**图 2 大白兔心脏造影成像 (MI 为 1.2)**

## 3 讨论

超声造影剂的种类繁多,制备方法也多种多样,常用的包括机械匀化法、声振空化法以及新型的喷射雾化法等[4,5]。乳化溶剂挥发法制备缓释微泡是一个已经成熟应用的实验方法,本实验中我们以去离子水为内水相,采用乳化溶剂挥发法制备 PLGA 微泡,基本原理是将聚合物溶于有机溶剂,与内水相混合振荡搅拌形成微球,随着初乳中溶剂的挥发,形成外部为 PLGA 固化膜,内部为气核的微泡[6,7]。由于微泡外壳与内核的声阻抗率差异明显,具有极高的衰减系数,因而成为可在超声波下产生不同于均匀媒质的传播性质,对超声探测信号产生很强的散射信号。

复乳法制备 PLGA 微泡受到多个环节因素的影响[6-10]。在预实验研究中我们考察了改变制备参数对微泡性质的影响,结果显示调节某些制备参数能够很好的控制粒径大小,较好地满足声学造影的要求。在影响因素中,超声乳化强度占主导地位,声振强度直接影响生成的初乳乳滴的粒径大小。增强超声乳化功率或延长乳化时间,可使初乳更均匀,微泡粒径减小,

同时分布更趋集中。功率过低或乳化时间过短会导致微泡形态不佳,但功率大于160 W后,微泡质量改善则不明显。乳化时间过长,可造成有机溶剂的过多挥发,影响初乳稳定性,因此乳化时间不宜过长。由于改变液滴粒径的大小,须克服液滴内外压差,提高复乳的搅拌速率可以提供更大的剪切力,故搅拌速率越高,所制得的微泡粒径越小。本研究发现通过控制制备过程中超声乳化的功率、时间及复乳的搅拌速度可以较好的调节微泡的粒径、分布及外壳厚度,可以达到改变微泡造影剂的声学特性的目的。

本实验对PLGA微泡进行了初步的体外稳定性研究,研究时间最长为10周,结果表明在4 ℃及常温干燥储存条件下PLGA微泡具有很好的稳定性,再分散后理化性质无明显变化,仍可很好的满足造影需求。微泡置于PBS或生理盐水中保存时,则很快会因聚合物的水解失重而改变理化特性,因此聚合物微泡在实际使用过程中应尽量干燥保存,以防止其降解。Straub等[5]应用喷雾干燥法制备了包裹氟碳气体的PLGA微泡,平均直径2.3 μm,研究显示在MI 1.6的高能超声照射20 min微泡仍能稳定存在,未观察到有明显的微泡崩解,照射前后微泡粒径及浓度无明显差异,研究结果与本实验相一致,提示PLGA作为组成微泡表面的包膜材料,分子间作用力较强,表面张力低,体外稳定性好,造影持续时间长,抗压性能优越,可较好的满足临床造影成像的要求。

本实验体外显影显示PLGA微泡在MI<0.5超声照射下声学信号较弱,声学强度随MI的增高而增高,呈直线相关关系;在MI 0.6~1.0范围内超声照射下微泡散射性能好,能显著增强图像的灰阶值;而MI>1.0时AD值随MI增大上升幅度逐渐降低。上述结果表明PLGA微泡不适宜低机械指数成像,而在MI 0.6~1.0范围内成像效果较为理想。心脏造影实验结果显示较低机械指数(MI 0.2)下心室显影浅淡,随着MI增加,多聚体造影剂造影增强效果逐渐升高,当MI 1.2时左心室腔可观察到明显的增强显像,推测可能是由于PLGA微泡外壳较硬,需要较高的声压作用才能得到微泡的非线性运动产生的背向散射信号。Wheatley等[11]制备并考察了PLGA微泡造影剂的声学特性,结果发现微泡的体外共振频率较同等直径的游离气泡低,提示微泡的外壳构成是影响其声学性质的重要因素。El-Sherif等[12]研究了超声频率(5~10 MHz)对PLGA微泡超声造影剂降解的影响,发现微泡降解的模式与微泡的形态结构密切相关。在微泡处于其共振频率时散射最强,声学效果最明显,微泡降解速率也最快,这对于今后指导超声触发的药物控释具有重要意义。

综上所述,PLGA微泡符合声学造影剂的基本要求,具有良好的开发前景,有望成为一种具有优越临床应用价值的超声微泡造影剂。随着技术的发展,高分子多聚体微泡外壳的设计将越来越趋于个性化,或许可以为某种病理状态所需的成像条件量身定做适合的造影剂。

## 参考文献:


[1] Feinstein S B, Shah P M, Bing R J, *et al*. Microbubble dynamics visualized in the intact capillary circulation[J]. J Am Coll Cardiol, 1984, 4(3):595-600.

[2] Hwang M, Lyshchik A, Fleischer A C. Molecular sonography with targeted microbubbles: current investigations and potential applications[J]. Ultrasound Q, 2010, 26(2):75-82.

[3] Stride E P, Coussios C C. Cavitation and contrast: the use of bubbles in ultrasound imaging and therapy[J]. Proc Inst Mech Eng H, 2010, 224(2):171-191.

[4] Lavisse S, Paci A, Rouffiac V, *et al*. *In vitro* echogenicity characterization of poly[lactide-coglycolide] (plga) microparticles and preliminary in vivo ultrasound enhancement study for ultrasound contrast agent application[J]. Invest Radiol, 2005, 40(8):536-544.

[5] Straub J A, Chickering D E, Church C C, *et al*. Porous PLGA microparticles: AI-700, an intravenously administered ultrasound contrast agent for use in echocardiography[J]. J Control Release, 2005, 108(1):21-32.

[6] 吴青, 朱照静. 10-羟基喜树碱乳酸-羟基乙酸共聚物超声微泡制备及工艺优化[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(14):1349-1352.

[7] Cui W, Bei J, Wang S, *et al*. Preparation and evaluation of poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA) microbubbles as a contrast agent for myocardial contrast echocardiography[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005, 73(1):171-178.

[8] Farook U, Zhang H B, Edirisinghe M J, *et al*. Preparation of microbubble suspensions by co-axial electrohydrodynamic atomization[J]. Med Eng Phys, 2007, 29(7):749-754.

[9] 靳巧锋, 钟跃, 罗祥林, 等. 共聚物微泡造影剂的制备与体外二次谐波特性研究[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(1):54-56.

[10] El-Sherif D M, Wheatley M A. Development of a novel method for synthesis of a polymeric ultrasound contrast agent[J]. J Biomed Mater Res A, 2003, 66(2):347-355.

[11] Wheatley M A, Forsberg F, Oum K, *et al*. Comparison of in vitro and *in vivo* acoustic response of a novel 50:50 PLGA contrast agent[J]. Ultrasonics, 2006, 44(4):360-367.

[12] El-Sherif D M, Lathia J D, Le N T, *et al*. Ultrasound degradation of novel polymer contrast agents[J]. J Biomed Mater Res A, 2004, 68(1):71-78.


(收稿:2010-08-15 修回:2010-09-16)

(编辑 龙 亮)