论著

文章编号:1000-5404(2013)09-0858-04

亚微米级荧光脂质微泡的制备及其肝脏成像的实验研究

乔 璐[1], 高文宏[1], 张 莉[1], 梁红敏[2], 李 露[1], 朱 梅[2], 李佩倞[1], 刘 政[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院超声科[1];650032 昆明,昆明医学院第一附属医院超声科[2])

[摘要] **目的** 制备荧光标记的脂质微泡,检测一般物理性质、荧光标记情况以及评价在兔肝脏的显影效果。**方法** 用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解细胞膜绿色荧光分子探针(3,3 dioetadeeyloxaearboeyanineperehlorate,DiO)后,抽取少量溶解液加至脂质冻干粉内与溶媒液相溶,全氟丙烷置换瓶内空气,最后机械振荡仪高速振荡制成带有荧光标记的脂质微泡,检测其微泡的一般物理性质、荧光标记情况;随机选取6只健康新西兰大白兔,雄性,体质量2.0~2.5 kg,经兔耳缘静脉团注荧光微泡后动态观察微泡在兔肝实质的显影效果,手术切取部分肝脏,冰冻切片后在荧光显微镜下观察荧光素在肝脏内的分布情况。**结果** 荧光标记的脂质微泡形态呈圆形,大小均一,微泡浓度范围(4~7)×10^9/mL,微泡粒径为(429±119)nm,激光共聚焦显微镜下微泡外壳被绿色光圈环绕。兔肝脏造影可见持续饱满的增强显影效果,荧光显微镜下肝脏内荧光素面积分布较少。**结论** 荧光标记的脂质微泡大小均一,粒径大小达到进入肺循环标准,在兔肝脏内显影效果显著。

[关键词] DiO标记物;脂质微泡;超声;肝脏

[中图法分类号] R445.1;R943;R981 [文献标志码] A

Preparation of DiO-labeled microbubbles and assessment of its liver enhancement

Qiao Lu[1], Gao Wenhong[1], Zhang Li[1], Liang Hongmin[2], Li Lu[1], Zhu Mei[2], Li Peijing[1], Liu Zheng[1] ([1]Department of Ultrasonography, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Ultrasonography, First Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming, Yunan Province, 650032, China)

[**Abstract**] **Objective** To prepare DiO-labeled microbubbles, and to investigate their physicochemical property, fluorescent labeling conditions and the enhance effects for liver contrast imaging. **Methods** The DiO-labeled microbubbles were prepared with a freeze-dried powder and mixed Dimethyl sulfoxide (DMSO) dissolved DiO. Then we replaced the air in the bottles with perfluoropropane. Finally the DiO-labeled microbubbles were made by high speed mechanical agitation. The physicochemical property and fluorescent labeling conditions of DiO-labled microbubbles were investigated. Six healthy male New Zealand white rabbits which weighted between 2.0 and 2.5 kg were injected through auricular vein with the DiO-labeled microbubbles. Then we dynamically observed the microbubbles enhanced ultrasound images of the rabbit liver parenchyma. Fluorescence microscopy was used to observe the deposition of green fluorescein in a small portion of frozen section liver tissues. **Results** DiO-labeled microbubbles were round in shape and uniform in size, with a concentration of (4−7)×10^9/mL and a size of 429±119 nm. The outer shell of DiO-labeled microbubbles was green under confocal laser scanning microscope. Liver imaging using DiO-labeled microbubbles showed significant and persistent enhancement. Little fluorescein was distributed in the liver under fluorescence microscope. **Conclusion** DiO-labeled microbubbles are uniform in size and can access the pulmonary circulation. They significantly enhance the liver images in contrast enhanced ultrasound.

[**Key words**] DiO; lipid microbubbles; ultrasound; liver

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30860269) and the General Program of Applied Basic Research of Yunnan Province (C0620056Q). Corresponding author: Liu Zheng, E-mail: liuzhengs@hotmail.com; Zhu Mei, E-mail: zhumeis@hotmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30860269);云南省应用基础研究计划面上项目(C0620056Q)

[通信作者] 刘 政,E-mail:liuzhengs@hotmail.com

朱 梅,E-mail:zhumeis@hotmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130131.1708.011.html(2013-01-31)

近年来,随着超声分子靶向造影、微泡介导的基因转染和药物释放等基础研究的深入开展[1-4],对微泡造影剂进行荧光标记成为研究的有力工具之一[5-8]。荧光标记微泡有利于在活体成像中追踪微泡的靶向结合情况,或者定量分析微泡的靶向释放药物能力[9]。荧光微泡的制备不仅要求携带足够的荧光物质产生荧光影像,而且具有超声造影显像能力。如此,当利用超声空化作用击破微泡时,荧光物质在组织中的分布具有一定代表药物释放分布的功能,如同药物在肿瘤周围聚集以便达到化疗作用[10]。因此,本研究的目的是研制出一种带有荧光标记的亚微米级脂质微泡,血球计数板测其浓度、粒度分析仪测其粒径大小、激光共聚焦显微镜观察荧光标记情况以及评估荧光微泡在兔肝实质的显影效果,为下一步的代表载药微泡的超声释放作用的研究提供前期研究基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(MPEG2000)、细胞膜绿色荧光分子探针 Dio-Cl8(3,3 dioetadeeyloxaearboeyanineperehlorate,以下简称 DiO)(碧云天生物技术研究所)、二甲基亚砜(DMSO)、全氟丙烷(核工业理化工程研究所)、激光共聚焦显微镜(德国,Leica)、荧光显微镜(德国,Leica)、德国西门子 Acuson S2000 彩色多普勒超声诊断仪,9L4 高频探头,频率 4 ~9 MHz。

1.2 实验动物

6 只健康新西兰大白兔,雄性,体质量 2.0 ~2.5 kg,由第三军医大学新桥医院实验动物中心提供。

1.3 实验方法

按一定比例将 DPPC、MPEG2000 等脂质成分充分混悬,制备成脂质冻干粉备用;常温下用二甲基亚砜溶解少许 DiO 制成溶解液,抽取少量加至脂质冻干粉内,溶媒液溶解后全氟丙烷置换瓶内空气,机械振荡仪高速振荡 60 s 即成功制备带有 DiO 标记的脂质微泡。肉眼观其外观并将瓶身静置 5 min 后从瓶底抽取少量混悬液滴于载玻片上,盖玻片封片后置于激光共聚焦显微镜下观察荧光脂质微泡的形态及荧光标记情况。生理盐水稀释荧光微泡 100 倍后,血球计数板计算荧光微泡浓度、激光粒度分析仪测定荧光脂质微泡的粒径大小及其粒度分布情况。

1.4 体内显影

随机抽取 6 只健康新西兰大白兔,2% 戊巴比妥钠(0.2 mL/kg)经耳缘静脉麻醉,随后建立静脉通道,仰卧位四肢固定,上腹部肝脏区域用 8% 硫化钠备皮。造影时,机械指数(mechanical index,MI)为 0.07,增益为 8 dB,显像深度固定为 4.5 cm,时间增益补偿(time gain compensation,TGC)、聚焦范围等参数固定不变。常规基波超声扫查获取肝右叶断面后,切换至 2 次谐波造影成像模式,将 0.02 mL/kg 的荧光脂质微泡团注入兔耳缘静脉,并尾追 3 mL 生理盐水,观察造影后肝脏的显影时间和显影效果。随后手术切取部分肝脏,锡箔纸包裹,放入 -20 ℃冰箱,第 2 天包埋剂包埋,冰冻切片厚约 5 μm,即刻在荧光显微镜下观察荧光素在肝脏内的分布情况。

2 结果

2.1 DiO 标记的脂质微泡的检测结果

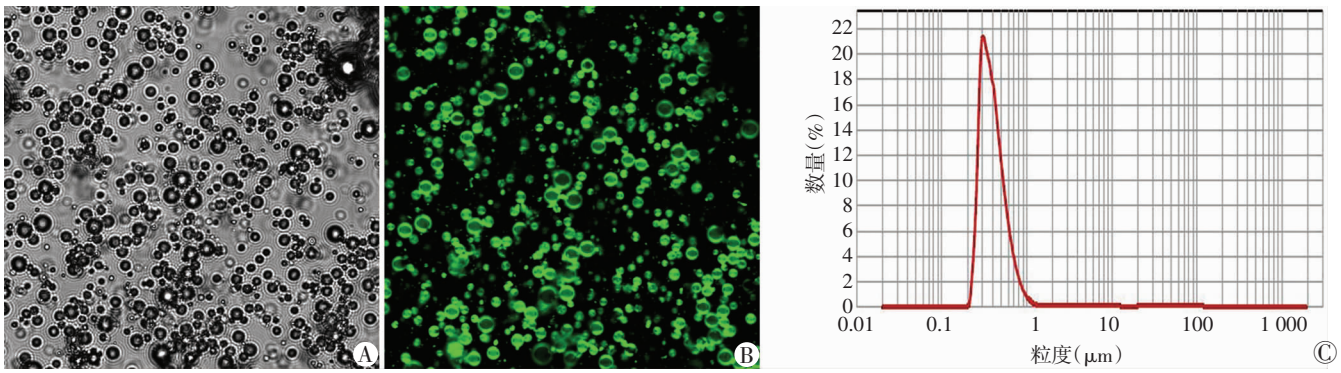
肉眼外观呈黄色凝乳状悬液,激光共聚焦显微镜下观察,微泡形态规则,呈圆形,大小均一,分散良好(图 1A),微泡外壳上被绿色光圈包绕(图 1B),微泡浓度范围(4 ~7) ×10^9/mL,马尔文激光粒度仪(Mastersizer 2000)测得微泡粒径为(429 ± 119)nm,其中 90% 粒径小于 1 μm,可进入肺循环(图 1C)。

2.2 体内显影

兔耳缘静脉注射荧光微泡造影剂后,常规基波超声扫查获取肝右叶断面,切换至 2 次谐波成像模式下观察,肝内血管于注射荧光微泡 7 s 后开始显影,10 s 后肝实质回声开始增强,23 s 后实质回声达到高峰,40 s 后仍持续增强(图 2)。

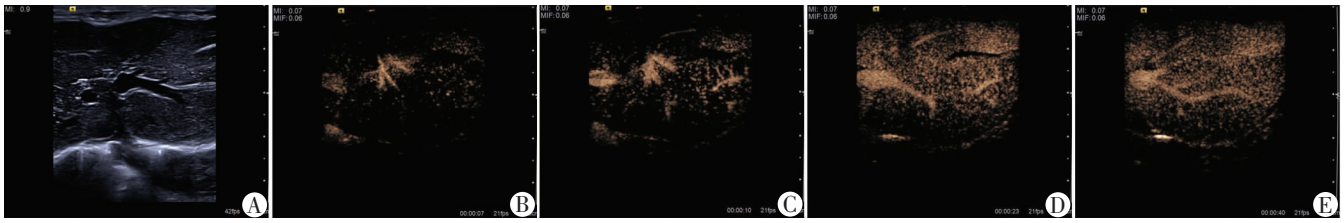
2.3 荧光显微镜下观察荧光素在肝脏内的分布

兔耳缘静脉注射荧光脂质微泡后,肝细胞肝小叶内可见绿色荧光分布,内部可见散在细小荧光颗粒,虽然强度较弱,但是还是能说明荧光脂质微泡具有示踪作用(图 3)。



A:白光图(激光共聚焦显微镜 ×800);B:激发荧光图(激光共聚焦显微镜 ×800);C:粒径分布图(Mastersizer 2000)

图 1 荧光微泡的激光共聚焦图与粒径分布图



A:造影前;B:注射造影剂7 s;C:注射造影剂10 s;D:注射造影剂23 s;E:注射造影剂40 s

图2 兔肝脏超声造影声像图

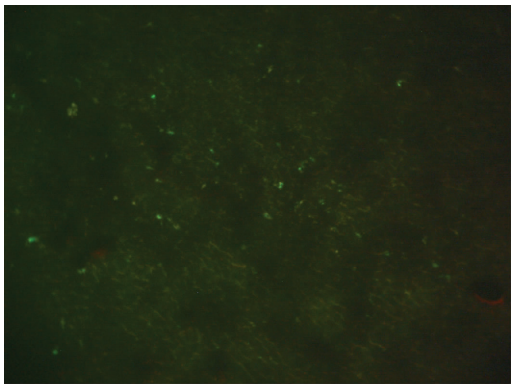


图3 兔耳缘静脉注射荧光微泡后荧光素在肝脏内的分布
(荧光显微镜 ×200)

3 讨论

荧光微泡的应用领域主要集中在:①示踪作用:荧光微泡在治疗超声连续爆破作用下可渗入到血栓内部,便于观察血栓内部荧光素的分布情况,这样更有助于观察超声空化的助溶效应[9]。此外,经股静脉注射DiI标记的两种不同的微泡造影剂,荧光显微镜下观察其在大鼠肠系膜静脉中的运动情况,发现其流速均基本与红细胞相似,因此可以作为红细胞的示踪剂[8]。②作为靶向微泡的荧光标记物:FITC及DiO两种荧光物质均可标记靶向微泡,如Otanik等[11]用FITC标记的靶向微泡荧光强度要高于非靶向微泡。Yang等[7]等用DiO标记一种脂多糖激活的血管内皮细胞黏附分子靶向微泡,此靶向微泡可以在体外与动脉粥样硬化斑块黏附,证实了特定的配体携带的微泡在超声分子成像或超声靶向给药方面具有很大的应用潜力。

目前,荧光微泡的制备方法有:①静电吸附法:采用静电吸附方法使FITC标记的抗体与微泡结合因此得到靶向荧光微泡。②超声振荡法或机械振荡法:将普通微泡脂质溶液与等体积适当浓度的DiO溶液混合,经机械振荡或者超声振荡充分混匀,得到荧光标记的脂质微泡。③直接标记法:将荧光染料DiI或DiO用有机溶液溶解后与造影剂脂质材料、糖液及表面活性剂按一定比例水合成溶液,混匀,即制备出荧光标记的脂质微泡[6]。

本研究中的DiO脂质微泡采用两种方法:①DiO是一种亲脂性成膜材料,可以直接与脂质相溶,加入到脂质冻干粉里,再予以溶媒液溶解,操作方便。②由于脂质材料携带负电荷,DiO携带正电荷,将两者结合起来属于静电吸附法;然而,在制备方法上,绝大部分用FITC标记携带抗体的靶向微泡因携带大分子抗体和荧光物质,微泡体积往往较普通微泡明显增大7倍,浓度降低了100倍[12],而且洗涤多次后荧光强度明显减弱[5],改变了微泡的理化性质。③由于FITC是亲水性荧光物质,不能单独与脂质微泡相连接,只能标记抗体或者蛋白才能与微泡相连接,具有一定的局限性。本实验采取在微泡成泡之前加入DiO,DiO与微泡膜上的脂质大分子充分结合,这样进入微泡膜后只是标记在微泡壳上,既未影响微泡体积、粒径,也未影响微泡浓度。作为一种长效示踪剂,荧光强度更强于FITC标记抗体的靶向微泡,性能更稳定,不容易淬灭,稀释过后荧光强度未见减少。在动物体内显影方面,注射标记DiO的脂质微泡后,与普通微泡相比,兔肝脏实质回声显著并且持续增强,证明加入荧光物质DiO后并不影响在动物体内的显影效果,也未发生肺栓塞现象。

研究报道直径大于700 nm的微泡就不能穿透血管内皮间隙,大大减弱了药物或者基因的运输能力[13]。本研究中的微泡粒径小于1 μm,属于亚微米级微泡,能够顺利通过血管内皮间隙,其表面效应比微米级微泡大,是一种非常好的载体,可以携带基因及药物,使其包裹在微泡壳的表面或者两层脂质膜之间,性能稳定,在激光共聚焦显微镜下可以观察到微泡外壳明亮的绿色光圈环绕。然而对于一些细小的管腔(诸如淋巴管),管壁薄,普通的微米级微泡不能完全通过,这就需要1 μm以下的亚微米级微泡来进行对淋巴管及淋巴结显影,经文献证实增强效果好并且时间持续长[14],为以后的载药微泡淋巴管超声释放奠定实验基础。

作为代表载药微泡药物分布的功能,在通过荧光显微镜的观察下可以直观地了解到荧光素在肝脏内的

分布情况,在肝细胞膜表面及肝小叶均可看到荧光素分布,不仅能证实肝脏 Kuffer 细胞对脂质微泡有吞噬作用[15],起到对肝脏的示踪效果,更能完全说明荧光微泡作为一种代表药物分布的功能是可以在肝脏内达到分布作用的。但是微泡随着血液循环代谢后,荧光素不能高浓度聚集在肝实质内,因而荧光强度较弱,分布较少,所以就需要超声激励释放实验来证实荧光物质是否能够在靶器官高浓度聚集,因此提出假设,那就是局部靶点注射 DiO 标记的脂质微泡,通过超声空化的激励作用局部释放使荧光物质聚积在靶器官,达到高浓度聚集,在激光共聚焦显微镜下较直观了解荧光物质在靶组织的分布情况,需要下一步的实验实施。

综上所述,荧光标记物在脂质微泡的研究领域中不仅起到了标记、示踪的作用,还可以模拟载药微泡来代表药物分布的作用。本实验的研究运用荧光物质的标记功能成功制备了荧光脂质微泡以便模拟载药微泡,但是考虑到各种药物的理化性质不同,因而在以后的载药微泡制备中需要完全了解药物的分子式和理化性质,以便提高与脂质微泡的相溶性,达到最佳药效。

参考文献:

[1] 张丽, 谢明星. 超声靶向微泡击破介导基因转染或药物传输的研究进展[J]. 中国医学影像技术, 2010, 26(7): 1366 – 1369.

[2] Klibanov A L, Shevchenko T I, Raju B I, *et al*. Ultrasound-triggered release of materials entrapped in microbubble-liposome constructs: a tool for targeted drug delivery[J]. J Control Release, 2010, 148(1): 13 – 17.

[3] Tinkov S, Winter G, Coester C, *et al*. New doxorubicin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy: Part I--Formulation development and *in vitro* characterization[J]. J Control Release, 2010, 143(1): 143 – 150.

[4] Rapoport N, Gao Z, Kennedy A. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy[J]. J Natl Cancer Inst, 2007, 99(14): 1095 – 1106.

[5] 郑道文, 杨莉, 宾建平, 等. 亲和素桥连构建携抗 P-选择素单抗靶向超声微泡及体外荧光鉴定[J]. 中国医学影像技术, 2008, 24(8): 1182 – 1185.

[6] 刘宏, 高云华, 夏红梅, 等. 携 GL-7 靶向微泡造影剂对高脂饮食兔腹主动脉内膜的靶向作用[J]. 中国医学影像技术, 2010, 26(7): 1205 – 1208.

[7] Yang H, Xiong X, Zhang L, *et al*. Adhesion of bio-functionalized ultrasound microbubbles to endothelial cells by targeting to vascular cell adhesion molecule-1 under shear flow[J]. Int J Nanomedicine, 2011, 6: 2043 – 2051.

[8] 张群霞, 骆杰, 冉海涛, 等. 比较脂质微泡与聚合物超声造影剂的微循环流变学[J]. 中国医学影像技术, 2011, 27(8): 1525 – 1527.

[9] 徐亚丽, 高云华, 刘政, 等. 微泡超声爆破助溶血栓机制的离体研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2006, 15(4): 309 – 311.

[10] 朱梅, 刘政, 何利平, 等. 紫杉醇微泡超声空化增强乳腺癌化疗的实验研究[J]. 中国医学影像技术, 2011, 27(2): 217 – 221.

[11] Otani K, Yamahara K. Development of antibody-carrying microbubbles based on clinically available ultrasound contrast agent for targeted molecular imaging: a preliminary chemical study[J]. Mol Imaging Biol, 2011, 13(2): 250 – 256.

[12] Liu J, Zhang P, Liu P, *et al*. Endothelial adhesion of targeted microbubbles in both small and great vessels using ultrasound radiation force[J]. Mol Imaging, 2012, 11(1): 58 – 66.

[13] 张波, 何剪太, 黄铁汉, 等. 亚微米级超声微泡造影剂的制备及体外基因转染效率的实验研究[J]. 中国超声医学杂志, 2009, 25(11): 1018 – 1020.

[14] 李露, 赵洋, 柳建华, 等. 经皮超声造影显示兔 VX2 肿瘤引流淋巴结[J]. 中国医学影像技术, 2010, 26(11): 2015 – 2018.

[15] Liu G J, Moriyasu F, Hirokawa T, *et al*. Optical microscopic findings of the behavior of perflubutane microbubbles outside and inside Kupffer cells during diagnostic ultrasound examination[J]. Invest Radiol, 2008, 43(12): 829 – 836.

(**收稿**:2012-12-12;**修回**:2013-01-30)

(编辑 栾 嘉)

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中,引用英文文献的比例很高,但有不少作者将英、美人的姓名搞错,以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是:名-名-姓,“名”可以有1个、2个或3个,但“姓”只有1个。因此,从书籍或期刊中的姓名转录到文献时,要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的;“名”可以缩写,用第一个字母大写,不用缩写点。数据库在著录作者姓名时,已经调整为姓-名-名,可照录。

例如:John Quincy Public 写为 Public J Q。

本刊编辑部