技术与方法 文章编号:0253-3626(2009)11-1538-04

# 载卡莫司汀脂质超声造影剂制备及特性的研究

张雪华[1],李映良[1],全学模[1],王志刚[2],李 攀[2],唐 毅[1]
(1. 重庆医科大学附属儿童医院超声科,重庆 400014;2. 重庆医科大学超声影像研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:制备载卡莫司汀脂质超声造影剂,检测其物理性状与造影增强效果。方法:采用机械振荡法制备载卡莫司汀脂质超声造影剂,显微镜下观察并计算其浓度、马尔文测量粒径大小、分布、电位,高效液相色谱法测量药物的包封率。微泡经冷冻干燥与 $^{60}Co$ 辐照消毒后,经兔耳缘静脉注射,观察其在兔肝内显像效果。结果:载药脂质造影剂的浓度为(2.6 ~ 3.1) × $10^9$ /ml,平均粒径为(1.05 ± 0.20) μm;卡莫司汀包封率为 42.6% ± 0.11%;电位为 -(12.93 ± 1.84)mV;经兔耳缘静脉注射后,兔肝内可见持续的增强显像效果。结论:成功制备的卡莫司汀脂质超声造影剂,有望为肿瘤的靶向治疗提供新方向。

【关键词】超声造影剂;卡莫司汀;兔;微泡
【中国图书分类法分类号】R814.43 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-18

# Preparation and characteristics of BCUN- loaded lipid ultrasound contrast agent

*ZHANG Xue-hua, et al*
(*Department of Ultrasound, the Children's Hosiptal, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To preparate BCUN-loaded lipid ultrasound contrast agent and detect its physical properties and contrast-enhancing effects. *Methods*: Mechanical oscillation was used to prepare BCUN-loaded lipid contrast agent. Density was detected and analyzed with microscope. Malvern determined intensity, disposition and Zeta potential. RP-HPLC detected envelopment rate. Cryodesiccated-microbubbles were sterilized by $^{60}Co$ irradiation. Following injected it through rabbit ear vein, effects of ultrasounic enhanced imaging in rabbit liver was observed. *Results*: The density of microbubble was (2.6~3.1) × $10^9$/ml. The mean intensity was(1.05 ± 0.20) μm. The mean Zeta potential was (12.93 ± 1.84) mV. The mean nvelopment rate was (42.6 ± 0.11)%. After injecting this microbubble, good and sustained ultrasounic enhanced images in rabbit liver were seen. *Conclusions*: BCUN- loaded lipid contrast agents were successfully prepared, which hopefully provide a new option of targeting treatment for the tumor.

【Key words】Ultrasound constrast agent; Cammustine; Rabbit; Microbubble

卡莫司汀(Carmustine,BCUN)是治疗恶性肿瘤的最常用的药物之一,该药分子量小、脂溶性,故有50%左右能透过血脑屏障,达到治疗脑肿瘤的目的。静脉注射卡莫司汀,其毒副性作用大[1],体内血浆半衰期不足 15 min,常温下易分解,限制了其临床疗效[1]。有学者研究表明[2],缓释卡莫司汀聚乳酸微球可有效延长荷瘤大鼠的生存时间,对恶性脑胶质瘤具有抑制作用。Xiuling xu 等[3]成功制备键合卡莫司汀聚乳酸-聚乙二醇嵌段共聚纳米胶束,并经体外实验证明对 C6 细胞有很好的抑制作用。各种用于改变卡莫司汀剂型的方法,旨在其减轻化疗中的毒副作用,使其作用更稳定有效,但上述方法获得的卡莫司汀剂型缺少靶向性。近年来的研究表明,超声微泡造影剂不仅能增强超声显影,还可作为一种体内靶向药物传递载体。本实验拟制备新型载卡莫司汀的脂质超声造影剂,若能结合超声辐照,使包载的药物定点释放,达到靶向治疗的目的。

作者介绍:张雪华(1980- ),女,硕士,
研究方向:先天性胃肠道疾病、肿瘤、骨关节超声及造影。
通讯作者:李映良,男,副教授,E-mail:liyingliang3170@sina.com。
基金项目:重庆市卫生局资助项目(06-2-006)。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 药品、试剂 二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)(美国 Sigma 公司),全氟丙烷(天津核工业理化工程研究所),卡莫司汀标准品(北京世纪博康医药

科技有限公司),甲醇、乙腈(色谱纯,美国天地公司),磷酸缓冲液(PBS),甘油等。

1.1.2 实验动物 新西兰大白兔 6 只,雄性,体重 2～2.5 kg。由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.3 仪器 安捷伦 1100 型全自动高效液相色谱仪; 安捷伦 Zorbax SB-C18 型色谱柱(5 μm,250 mm×4.6 mm);电子天秤(上海精天电子仪器公司);YJT- 银汞胶囊调合器(上海医疗器械公司);马尔文激光粒径测量仪(3000SSA 型)及 Malvern 表面电位检测仪 (重庆科美纳米生物技术有限公司);血球计数仪(延陵医疗器械厂);DFY-II 型超声图像定量分析诊断仪(重庆医科大学超声影像学研究所研制);冷冻干燥仪(美国 Thermo 电子公司);Acuson Sequia512 彩色超声诊断仪(德国西门子公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 空白脂质微泡的制备 将 5 mg DSPC、2 mg DPPE、50 μl 甘油及 0.5 ml PBS 按比例混合后置于 1.5ml 的管形瓶中,37℃水浴 30 min,向管中充满全氟丙烷气体,震荡 45 s,静置 5 min,加入 0.5 ml PBS 稀释,即可获得空白脂质超声微泡。

1.2.2 载药脂质体微泡的制作 将 5 mg DSPC、2 mg DPPE、50 μl 甘油、2 mg 卡莫司汀标准品及 0.5 ml PBS 按比例混合后置于 1.5 ml 的管形瓶中, 余步骤同与空白微泡的制备相同,PBS 洗涤 3 次,去除未结合的卡莫司汀,即可制成载卡莫司汀脂质超声微泡。

1.2.3 超声微泡物理性质测定 将制备好的微泡用光学显微镜观察其大小及分部,应用马尔文测量仪器检侧粒径分布及表面电位。超声微泡稀释后应用血球计数仪在光镜下观察,计算四大格子微泡总数,根据以下公式算出浓度:微泡数/ml=(4 大格子细胞数 /4)×$10^4$。

1.2.4 反相高效液相色谱法(Reversed phase high-performance liquid chromatography,RP-HPLC)测包封率的测定 ①色谱条件:色谱柱(250mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇:乙腈:水 =50:20:30,流速 1 ml/min,检测波长 226 nm,柱温 30℃,进样量 10 μl。在此条件下检测出;②将制备好的微泡悬液移入离心管内,低速离心获得位于上层的乳白色微泡,适量的甲醇溶解后,取液体成分测其药物浓度,用上述条件检测出 12 支微泡的药物浓度;③计算包封率:将所得药物浓度按以下公式计算出药物的包封率,公式:(药物浓度×微泡体积 / 标准品的重量)×100%。

1.2.5 微泡冷冻干燥并消毒 部分微泡通过真空冷冻干燥使微球内的水分升华,形成空隙,然后在冷冻干燥室内缓慢冲入全氟丙烷气体,从而制备内含氟烷气体脂质微泡。冻干粉用 $^{60}Co$ 辐照消毒。

1.2.6 兔肝显影实验 实验前用速眠新 -Ⅱ,0.4 ml/kg 肌肉注射麻醉新西兰大白兔,8%的硫化钠脱去右胁肋部体毛,将兔左侧卧位固定于实验台上。采用 Acuson Sequia512 彩色超声诊断仪,15 L 8 W 的线阵探头,频率为 10～14 MHz。运用低机械指数灰阶超声造影技术对比脉冲系列成像 (CPS),造影时探头频率为 8 MHz,机械指数(MI)0.23 ,增益为 -20dB。仪器所有条件设置为同一标准。经兔耳缘静脉团注 0.5 ml 载卡莫司汀脂质微泡,用超声仪内部工作站存储造影前后动、静态造影资料。图像采用 DFY-II 型超声图像定量分析诊断仪分析造影前后回声强度的灰阶值。

1.3 统计学分析

采用 Microsoft Excel 处理数据, SPSS13.0 统计分析软件分析,所得计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对造影前、后回声强度的灰阶值进行配对 $t$ 检验以 $P \leqslant 0.05$ 为差异有统计学意义,空白脂质微与载药脂质微泡粒径、电位及浓度进行独立样本的 $t$ 检验,以 $P \leqslant 0.01$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 超声微泡的物理性质

所制备的超声微泡的粒径分布及表面电位及浓度(见表 1),空白脂质微泡与载药脂质微泡比较差异无统计学意义($P>0.01$)。脂质超声微气泡的粒径小,分布均匀,分散度好(图 1),符合超声微泡的要求。

### 2.2 载卡莫司汀脂质超声微泡的包封率

获得的校准曲线如图 2 所示,超声微泡中卡莫司汀含量的直线方程为:

y=3.207E-0.8X+1.325E-0.4,R=9.994E-0.1,12 支微泡的平均包封率为(42.6±0.11)%。

### 2.3 冻干脂质微泡的特点

消毒的微泡冻干粉复溶后分散度好,光镜下呈球形,激光测径仪检测其粒径分布范围窄,平均粒径大小与冻干前相似(图 2)。

### 2.4 兔肝脏显像实验

在 CPS 下观测,注射载药脂质微泡 10 s 后肝实质回声出现增强,1 min 后肝实质回声明显回声增强,5 min 中后回声开始逐渐衰减,30 min 后回声仍可见增强(图 3)。

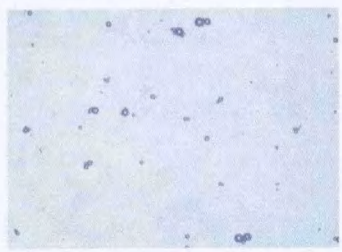
造影前门静脉及肝实质最大回声强度灰阶值分别为 56.75±0.29,37.46±0.33;造影后门静脉及肝实质最大回声强度灰阶值为 154.5±0.15,134.41±0.17。两者比较差异具有统计学意义($P \leqslant 0.05$)。

## 3 讨 论

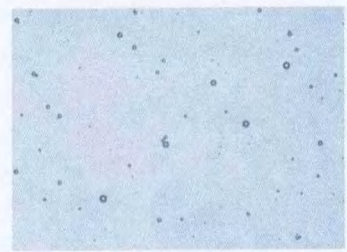
研究表明,超声微泡能增强组织对比,有利于提高某些疾病的诊断, 亦是新型的靶向治疗载体。载药脂质微泡进入血液循环,超声局部照射使微泡破裂,靶向释放所携带的药物或基因的目的,使局部药物浓度增加;微泡破裂产生空化效应和声化学反应,使≤7 μm 的微血管破裂及内皮细胞间隙增宽,破裂后释放的药物到达组织细胞内,迅速提高组织内的药物浓度[4];同时药物被微泡包裹后避免了肝、肾的代谢,也可能减少化疗药物骨髓抑制等

表 1 脂质超声微泡物理性质的比较($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

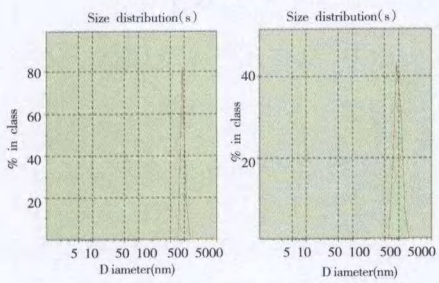
| 组别 | 粒径 | 电位 | 浓度 |
|---|---|---|---|
| 空白脂质微泡 | 0.93 ± 0.28 | 13.78 ± 0.97 | 3.31 ± 0.20 |
| 载药脂质微泡 | 1.15 ± 0.20 | 12.93 ± 1.84 | 2.89 ± 0.16 |
| $P$ | 0.186 | 0.34 | 0.03 |



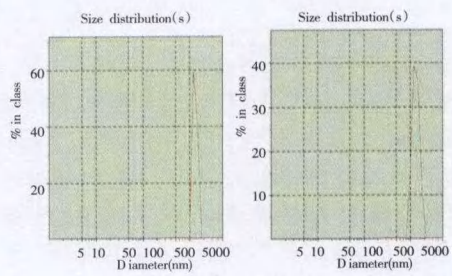
a. 脂质空白微泡（×400）



b. 载卡莫司汀脂质微泡（×400）




c. 脂质空白微泡粒径分布图




d. 载卡莫司汀脂质微泡粒径分布图

图 1 脂质空白微泡与载卡莫司汀脂微泡对比

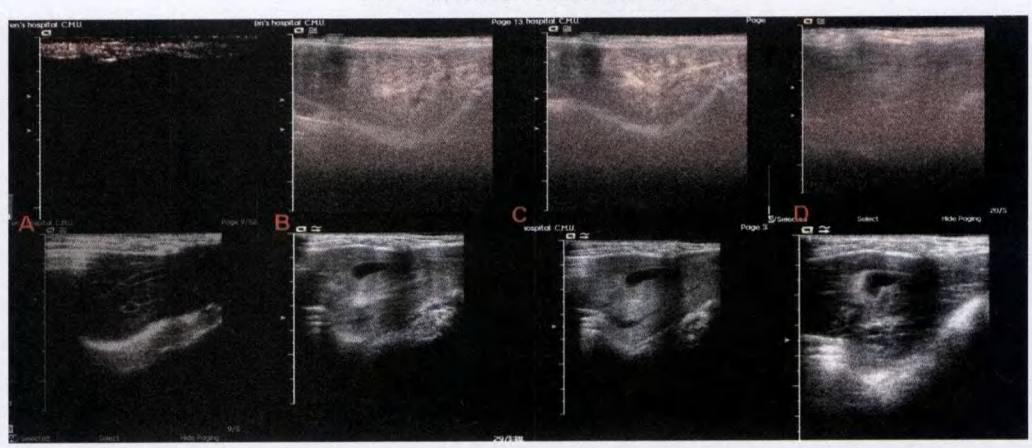


a. 冻干载药微泡与乳液状微泡图



b. 冻干粉剂消毒后复溶后光镜图（×400）

图 2 载药脂质微泡消毒前后对比




A 组 造影前；B 组 造影后 10 s，可见血管显影；C 组 造影后 1min，肝实质回声均匀增强；D 组 造影后 30 min，肝实质回声略增强

图 3 兔肝造影对比组图（上图为 CPS 模式，下图为灰阶模式）

毒性作用。冉海涛等[5]成功制备了包裹阿霉素的高分子微气泡造影剂,杨春江[6]成功制备了载紫杉醇脂质超声微泡。

进入血液循环的微小质粒大多会被网状内皮系统(Reticuloendothelial system,RES)清除,微泡的外壳却在某种程度上能避免这种吞噬功能[7,8],本研究选用超声造影剂磷脂作为材料,使造影剂在血流中不易被清除、性质更稳定,且可以利用超声联合微泡开放血脑屏障的作用[9],使微泡携载的卡莫司汀更多的进入靶组织中,提高对颅内肿瘤的治疗效果。同样,有文献报道微泡的脂质表面为配体、药物、基因及其他化合物提供刷状缘,脂质的外壳在声学作用中容易膨胀、开裂、回缩及弯曲,中心气体为携载治疗物质提供了空间[10],脂质的外壳包被惰性全氟碳气体使微泡更具稳定性,能吸收超声能量及降低空化阈值等特点,是脂质微泡能成为新型治疗技术载体的重要方面[11]。因此,自制的超声微泡符合理想超声造影剂的基本要求。

机械震荡法制备超声造影剂过程中产生热量少,尤其适用于制备载药物或基因的靶向载体超声造影剂。本研究采用机械震荡法制备的载卡莫司汀脂质超声造影剂浓度较高,大小均匀,分散较好,浓度为$(2.89\pm0.16)\times10^9$个/ml,平均粒径为$(1.05\pm0.20)$ μm,与空白脂质造影剂比较差异无统计学意义。最小的粒径还不到 1 μm,实验证明,造影剂的粒径越小所需要的共振频率越大[12,13],亦不易在血液循环中破裂,只有在超声辐照的靶向区域破裂释放所携带的药物,这才能使靶向治疗成为可能。且造影剂比红细胞还要微小的粒径使其随血流运动不粘附于动脉及毛细血管壁,不易导致栓塞,故能能经血液循环顺利到达病变部位[14]。

本研究中将脂质微泡用甲醇溶解后,用高效液相直接检测微泡的所包载的药物浓度,与通过检测游离药物浓度间接计算包封率的方法相比更加精确。由此计算的微泡的平均包封率为 42.6%±0.11%,最高达 60%,说明脂质微气泡能较好地携载卡莫司汀,也是靶向治疗的物质基础。本研究中将部分微泡用冷冻干燥,使其能在常温下保存并能放置更长地时间。冷冻干燥后用射线辐照灭菌后对超声造影剂的粒径分布及药物的浓度等影响极小。

超声微泡作为有效释放治疗药物的载体,除了能携载足量的药物外,必须具备足够的血浆半衰期,能经血液循环到达靶组织。而体内显影实验表明自制卡莫司汀脂质造影剂可明显增强兔肝血管和实质的显影,且造影时间长,可持续 30 min 以上,说明其血中存留时间长,结合超声辐照为定点破坏微泡、靶向治疗提供了基础。

总之自制的载卡莫司汀脂质超声造影剂符合脂质造影剂的特点,粒径小,分布均匀,在体内的显影效果好。结合超声辐照,可为肿瘤的靶向治疗的研究新开辟一条无创的道路。

## 参 考 文 献


[1] Wang C C, Li J, Teo C S, et al.The delivery of BCNU to brain tumors[J].J Control Release, 1999, 61(1-2): 21-41.

[2] 康春生,原续波,浦佩玉,等.立体定向注射靶向性缓释 BCNU 聚乳酸微球治疗 C6 胶质瘤的研究[J].中华神经外科杂志,2007,23(2):103-106.

[3] Xu X L, Chen X S, Xu X Y, et al.BCNU-loaded PEG PLLA ultrafine fibers and their in vitro antitumor activity against Glioma C6 cells[J]. Journal of Controlled Release, 2006, 114(3): 307-316.

[4] Sayba D M, Price R J, Linka A Z, et al.Therapeutic efffects of paclitaxel-containing utrasound contrast agents[J]. Ultrasound Med biol, 2006, 32(11): 1771-1780.

[5] 冉海涛,任 红,王志刚, 等.包裹阿霉素的高分子材料微泡声学造影刺制备及显影效果实验研究[J].临床超声医学杂志, 2005, 7: 217-220.

[6] 杨春江,王志刚,李兴升,等.载药脂质微气泡的制备及其应用[J].中华超声影像学杂志,2006,15(7):535-538.

[7] Awasthi V D, Garcia D, Goins B A, et al. Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG liposomes of various sizes in rabbits[J]. Int. J Pharm., 2003, 253: 121-132.

[8] Gaur U, Sahoo S K, De T K, et al.Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticulo endothelial system[J]. Int. JPharm, 2000, 202(1-2): 1-10.

[9] Hynynen K, McDannold N, Nickolai A, et al. Vykhodtseva Local and reversible blood-brain barrier disruption by noninvasive focused ultrasound at frequencies suitable for trans-skull sonications[J]. NeuroImage, 2005, 24(1): 12-20.

[10] Ungera E C, Porter T, Culb W, et al.Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles[J].Advanced Drug Delivery Reviews, 2004, 56(9): 1291-1314.

[11] Ferrara K, Pollard R, Borden M.Ultrasound microbubble montrast agents: fundamentals and application to gene and drug delivery[J].Annu Rev Biomed Eng, 2007, 9: 415-417.

[12] Chin C T, Burns P N.Predicting the acoustic response of a microbubble population for contrast imaging in medical ultrasound[J].Ultrasound Med Biol, 2000, 26(8): 1293- 1300.

[13] Tiemann K, Lohmeier S, Kuntz S, et al.Real-time contrast echo assessment of myocardial perfusion at low emission power: first experimental and clinical result using power pulse inversion imaging[J]. Echocardiography, 1999, 16(8): 799-809.

[14] Lindner J R, Song J, Jayaweera A R, et al.Microvascular rheology of Definity microbubbles after intra-arterial and intravenous administration [J].J am Soc Echocardiography, 2002, 15(5): 396-403.


(责任编辑:冉明会)