

• 基础与实验研究 •

Preparation and imaging in vitro for perfluorohexane-encapsulated superparamagnetic poly (lactic-co-glycolic acid)-iron oxide multifunctional ultrasound contrast agents

WANG Min^{1,2}, RAN Hai-tao^{1,2*}, WANG Zhi-gang^{1,2}, WU Wei¹, WANG Qi¹, SUN Yang^{1,2}

(1. Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Department of Ultrasonography, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To prepare multi-mode contrast agent, and to investigate its effect for ultrasound and MR imaging in vitro. **Methods** Double emulsion method was used to prepare perfluorohexane-encapsulated superparamagnetic poly [lactic-co-glycolic acid, PLGA]-iron oxide (s-PFH/PLGA), and its morphology, size, Fe₃O₄ loading capacity and photoacoustic detection were assessed. Then, the prepared s-PFH/PLGA microcapsules were applied with different concentrations to perform ultrasound imaging, and the echogenicity was assessed post irradiation using JC200 focused ultrasound tumor therapy system. Then s-PFH/PLGA microcapsules were also applied to perform MR imaging in vitro, and the signal intensity was calculated. **Results** The s-PFH/PLGA microcapsules were observed with regular spherical morphology, the average size was (738.9±158.4)nm, average electric potential was (-15.9±6.9)mV, and photoacoustic signal could be detected. In vitro, s-PFH/PLGA microcapsules showed hyper echogenicity in US imaging which increased after HIFU irradiation. In MRI, s-PFH/PLGA negatively enhanced on T2WI, and the signal intensity decreased with the increase of iron content. **Conclusion** The prepared s-PFH/PLGA microcapsules can successfully act as contrast agent of ultrasound and MR imaging in vitro.

[Key words] Ultrasonography; Contrast media; Magnetic resonance imaging

载超顺磁性氧化铁高分子液态氟碳纳米粒的制备及体外显像

王敏^{1,2}, 冉海涛^{1,2*}, 王志刚^{1,2}, 吴伟¹, 王琦¹, 孙阳^{1,2}

(1. 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学附属第二医院超声科, 重庆 400010)

[摘要] **目的** 制备一种能同时用于超声造影及 MR 成像的多模态造影剂, 观察其体外成像效果。 **方法** 采用双乳化法合成载超顺磁性氧化铁 (SPIO) 纳米颗粒及全氟己烷 (PFH) 的高分子微球 (s-PFH/PLGA), 检测其一般特性及光声信号。对不同浓度的 s-PFH/PLGA 水囊模型进行超声显影, 以 JC200 聚焦超声肿瘤治疗系统辐照后观察回声强度变化; 对不同铁含量的 s-PFH/PLGA 进行 MR 成像。 **结果** 透射电镜下 s-PFH/PLGA 呈球形, SPIO 颗粒均匀分布在外壳上, 平均粒径 (738.9±158.4)nm, 平均电位 (-15.9±6.9)mV, 并检测到明显光声信号。体外超声显像中 s-PFH/PLGA 呈点状高回声, HIFU 辐照后回声强度增强。s-PFH/PLGA 在 T2WI 中呈负增强显像; 随着铁含量增高, MRI 信号呈降低趋势。 **结论** 成功制备的载 SPIO 及 PFH 多模态造影剂具有体外超声、MR 显影功能。

[关键词] 超声检查; 造影剂; 磁共振成像

[中图分类号] R445 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-8475(2013)11-0674-05

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目 (81130025)、重庆市高校创新团队计划 (KJTD201303)。

[作者简介] 王敏 (1983—), 女, 四川资中人, 在读硕士。研究方向: 超声造影及其基础研究。E-mail: yaapg112@126.com

[通讯作者] 冉海涛, 重庆医科大学超声影像学研究所, 400010; 重庆医科大学附属第二医院超声科, 400010。E-mail: rht66@163.com

[收稿日期] 2013-07-31 **[修回日期]** 2013-09-04

超声造影剂不仅能提高 CEUS 对疾病的早期诊断能力,还具有实现靶向治疗、增加治疗效果的潜能。随着医学影像技术的不断发展,兼具多种成像模式及功能的多功能造影剂能更好地实现对疾病的早期诊断,并已成为目前的研究热点。本研究利用具有良好成膜及成囊特性高分子材料聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly (lactic-co-glycolic acid), PLGA] 携载超顺磁性氧化铁 (superparamagnetic iron oxide, SPIO) 纳米颗粒及包裹全氟己烷 (perfluorohexane, PFH), 构建一种集超声-磁共振显像于一体的新型多功能超声造影剂, 并通过体外实验初步探讨其多模态显影效果。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 PLGA (50 : 50, 分子质量 32 kD, 济南岱罡生物工程有限公司)、油酸修饰超顺磁性氧化铁纳米颗粒 (SPIO, 10 nm, 25 mg/ml, Ocean, 主要成分为 Fe₃O₄)、全氟己烷 (perfluorohexane, PFH, Alfa) 聚乙烯醇 (PVA, Sigma)、三氯甲烷、双蒸水。高速分散均质机 (FJ300-SH)、高速冷冻离心机 (Ependorf)、电子天平 (上海精天电子仪器有限公司)、超声振荡仪 (Sonics)、倒置荧光显微镜 (Olympus)、透射电镜、激光粒径仪 (Malvern)、激光共聚焦显微镜 (Zeiss)、三维光声显微成像系统 (中国科学院深圳先进技术研究院)、Philips iU22 超声诊断仪、Philips Achieva 3.0T MR 仪、JC200 聚焦超声肿瘤治疗系统 (重庆海扶医疗科技股份有限公司)。

1.2 多功能造影剂的制备 采用双乳化法, 将 100 mg PLGA 与 40 μl SPIO 加入 3 ml 三氯甲烷中, 充分搅拌完全溶解后加入 60 μl PFH, 冰浴环境下使用声振仪声振 45 s, 得到棕黄色初乳 (W/O 微球); 加入适量 4% PVA 溶液, 高速分散均质机均质 3 min, 得到复乳 (W/O/W 微球)。于室温下放置搅拌 3 h, 使三氯甲烷充分挥发, 再经双蒸水洗涤、离心 3 次后, 收集即得 s-PFH/PLGA 微球, 稀释至 10 ml 后置于 4℃ 冰箱中保存备用 (s-PFH/PLCA 组)。在声振之前的连续相中加入少量 DiI 制备带荧光的 s-PFH/PLGA 微球。用同样方法制备不含 SPIO 的微球 PFH/PLGA 作为对

照 (PFH/PLGA 组)。另取 PBS 溶液作为空白对照组 (PBS 组)。

1.3 s-PFH/PLGA 的一般特征检测 以光学显微镜、透射电镜观察其形态, Malvern 激光测径仪检测其粒径大小、分布及电位, 原子吸收光谱法检测铁含量。采用光声显微成像系统检测其光声信号。

1.4 体外显影实验

1.4.1 体外超声成像 按 PLGA 含量分别为 0、1、2、5、10 mg/ml 含量取 s-PFH/PLGA 乳液, 置于自制的水囊模型中。采用 Philips iU22 超声诊断仪、L12-5 探头、基波成像模式扫查, 声束与水囊垂直, 机械指数 (mechanical index, MI) 0.6, 采集水囊图像; 以 DFY 图像定量分析软件 (重庆医科大学超声影像学研究所研制) 分析回声强度, 绘制浓度-声强度曲线。

1.4.2 HIFU 辐照前后的超声成像 取 s-PFH/PLGA 乳液 3 ml 装入 10 ml 的 Eppendorf 管中, 置于 JC200 聚焦超声肿瘤治疗系统辐照区域, 将焦点调至微球乳液中心部位, 辐照参数 150 W、3 s。利用 HIFU 诊断系统监测辐照前后灰度变化。重复 5 次, 以 DFY 图像定量分析软件分析回声强度。

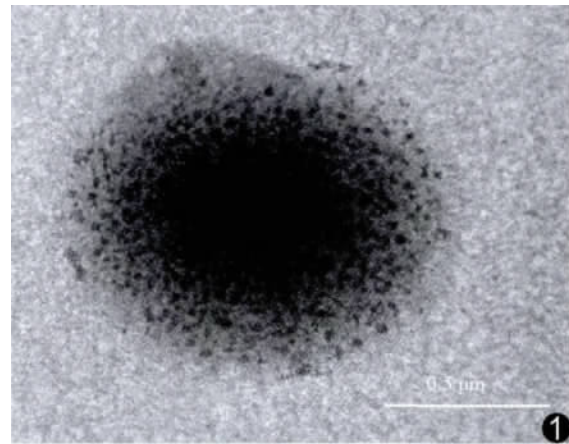


图 1 s-PFH-PLGA 透射电镜图 SPIO 颗粒均匀分布于微球外壳, 黑色颗粒状物质为 SPIO 颗粒 (×30 000)

1.4.3 体外 MRI 将 s-PFH/PLGA 按不同铁含量稀

表 1 HIFU 辐照后各组溶液回声强度比较 (dB, $\bar{x} \pm s$)

组别	实验次数				
	I	II	III	IV	V
PBS 组	16.59 ± 3.03	15.58 ± 3.02	16.33 ± 3.50	16.81 ± 3.26	14.97 ± 1.13
PFH/PLGA 组	66.07 ± 1.92	65.85 ± 2.96	65.02 ± 1.04	65.31 ± 0.96	65.33 ± 0.70
s-PFH/PLGA 组	144.58 ± 1.70*△	144.5 ± 1.87*△	143.7 ± 2.29*△	146.96 ± 1.32*△	146.28 ± 1.92*△

注: * : 与 PBS 组比较, P < 0.05; △ : 与 PFH/PLGA 组比较, P < 0.05

释成不同浓度,置于 15 ml 密封的 Eppendof 管内,固定于塑料板上,浸入水中。应用 Philips Achieva 3.0T MR 仪,采用 FFE 序列(TR 80 ms, TE 1.2 ms, FOV 220 mm, 翻转角 90°)进行扫描,以仪器自带程序测量各管内样品的信号强度(signal intensity, SI),绘制浓度-信号强度曲线。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件包,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用方差分析比较 s-PFH/PLGA、PFH/PLGA 及 PBS 组间均数, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多功能造影剂的一般特性 双蒸水稀释后, s-PFH/PLGA 外观呈棕黄色混悬液,普通光学显微镜

下其形态规则,呈球包球形,分散性较好,分布较均匀,微球间未见明显粘连、聚集现象,在 4℃ 冰箱内存存 2 个月后外观及粒径无明显变化。透射电镜见 SPIO 均匀分布在外层壳膜上(图 1),当其他条件固定时,粒径大小与 PFH 和 PLGA 的比例有关,随着比例增大,微球平均粒径有增大趋势。按上述比例及制备参数得到的微球平均粒径 (738.9 ± 158.4) nm,平均电位 (-15.9 ± 6.9) mV(图 2);原子吸收光谱法测得微球中铁含量为 $42.54 \mu\text{g/ml}$;激发波长为 532 nm 时有较强光声信号(图 3)。

2.2 体外超声-MR 双模态成像效果

2.2.1 水囊模型的超声体外成像 s-PFH-PLGA 微球水囊内呈点状、细小、均匀的高回声;随着浓度增大,回声强度呈增高趋势(图 4)。

2.2.2 HIFU 辐照后的超声成像 HIFU 辐照后, s-PFH/PLGA、PFH/PLGA 回声强度均前增加, PBS 回声强度增加不明显(图 5)。s-PFH/PLGA 与 PFH/PLGA 及 PBS 比较,经 HIFU 辐照后的回声强度的差异均有统计学意义(P 均 < 0.05 ,表 1)。

2.2.3 水囊模型的 MR 体外成像 s-PFH/PLGA 在 T2WI 中呈负增强显像;随含 Fe 量增高, MRI 信号强度降低(图 6)。

3 讨论

随着医学的发展及对分子显像技术的更高要求,既能用于多种影像学检查,又能通过携带药物、基因或其他机制而用于疾病治疗的多功能造影剂成为研究热点^[1]。此类造影剂能用于多种模式的显影,对合理利用医疗资源、减少医疗负担有重要意义。

本实验初步制备了能同时用于超声及 MR 的多模态造影剂。PLGA 是一种可降解的无毒的两亲性高分子有机化合物,具有良好的生物相容性、良

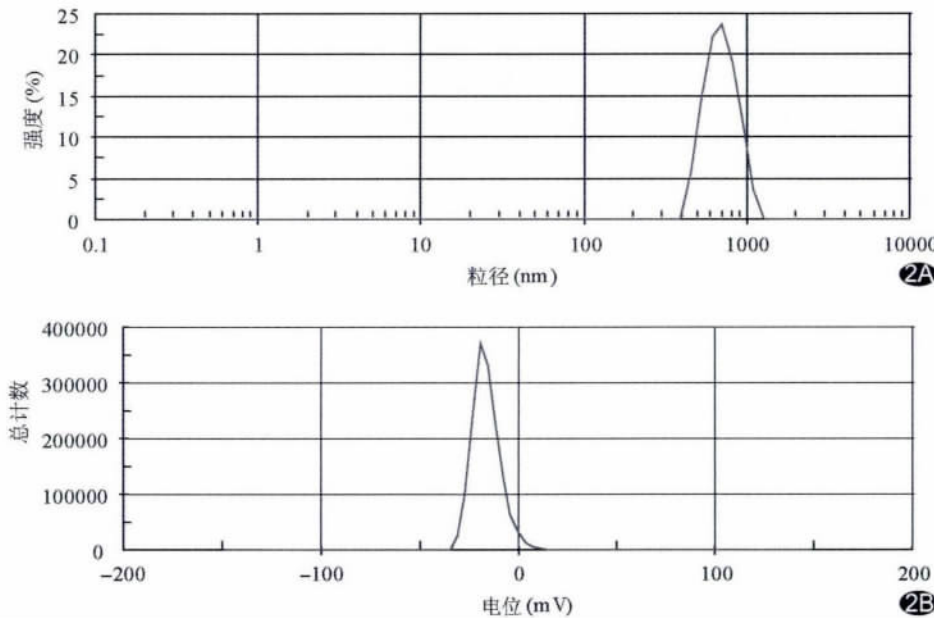


图 2 s-PFH-PLGA 的粒径(A)、电位(B)分布图 微球分散性较好,呈负电位

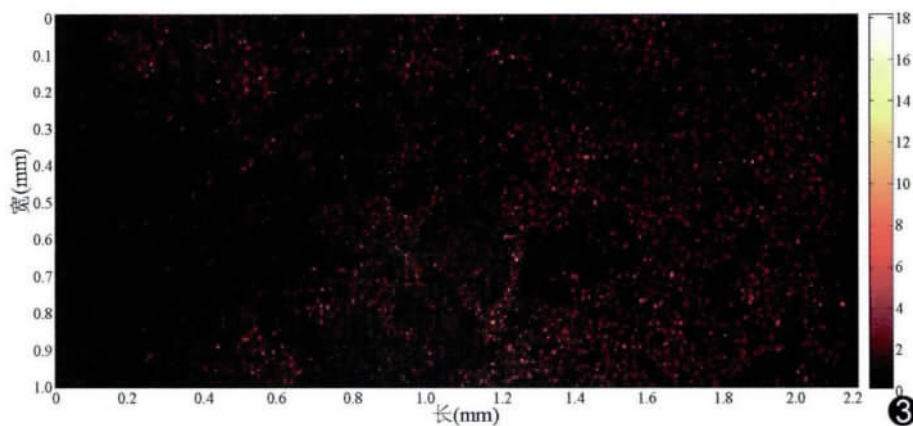


图 3 s-PFH-PLGA 的光声信号图 微球有较强的光声信号

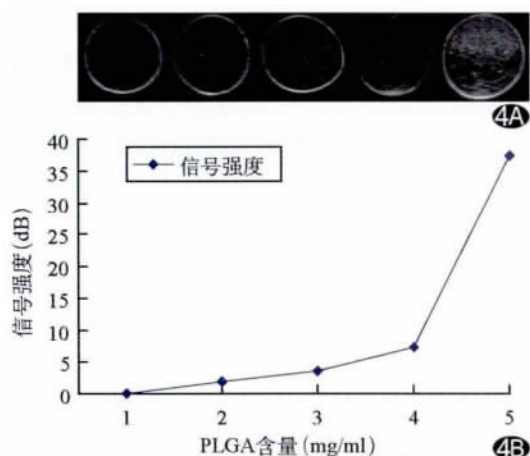


图 4 不同 PLCA 含量的 s-PFH-PLGA 的体外水囊模型成像(A)及其相应的信号强度(B)

好的成囊和成膜性能,在体内可降解,且能溶解于多种有机溶剂当中,目前广泛用于药物载体及造影剂的制备^[2];以其制成的造影剂外壳抗压性较强。液态氟碳具有表面张力低、不溶于水和油脂、性质稳定、毒性低及在一定条件(如温度、超声、激光)作用下能发生液气相转变等特性,广泛应用于造影剂的研究中^[3]。双乳化法主要用于制备高分子材料包裹水溶性药物的缓释系统^[4-5],是目前比较成熟的制备聚合物药物载体的方法。PLGA 及油酸修饰 SPIO 均可溶于有机溶剂,多用作造影剂的外壳层。作为造影剂核心的液态氟碳 PFH 在大气压下沸点为 56℃,在微球制备过程中不易挥发,制备条件易于控制。当其他条件一致时,随着 PFH 含量的不同,微球的粒径会出现变化,这可能是由于 PFH 与 PLGA 的配比需满足特定比例,才能使 PFH 全部被包裹入 PLGA 内;如果 PFH 过量,可能会以游离状态存在于乳液中,从而使微球的平均粒径测量值变大。

由于液态氟碳与水的声阻抗不匹配^[6],使制备的 s-PFH/PL-

GA 微球在常温下即能检测到点状高回声,有增强超声造影的作用;但气泡与周围环境声阻抗的差异明显比液体大,要达到更好地增强超声显影的效果,需使液态氟碳发生气化。本实验制备的含 PFH 的微球在 HIFU 辐照后显影增强,可能是由于其内部核心 PFH 发生了液气相转变,微球变成微泡,产生了更明显的回波信号,使得回声强度增加。SPIO 具备 MR 对比剂呈负增强的效果^[7]。随着铁含量增高,本实验制备的 s-PFH/PLGA 微球的 MR 信号强度呈降低趋势,表明 s-PFH/PLGA 作为 MR 对比剂也呈负增强显影,与李奥等^[8]的研究结果相似,不同的是本实验采用 PLGA 作为壳膜材料,使制备的造影剂更为稳定。

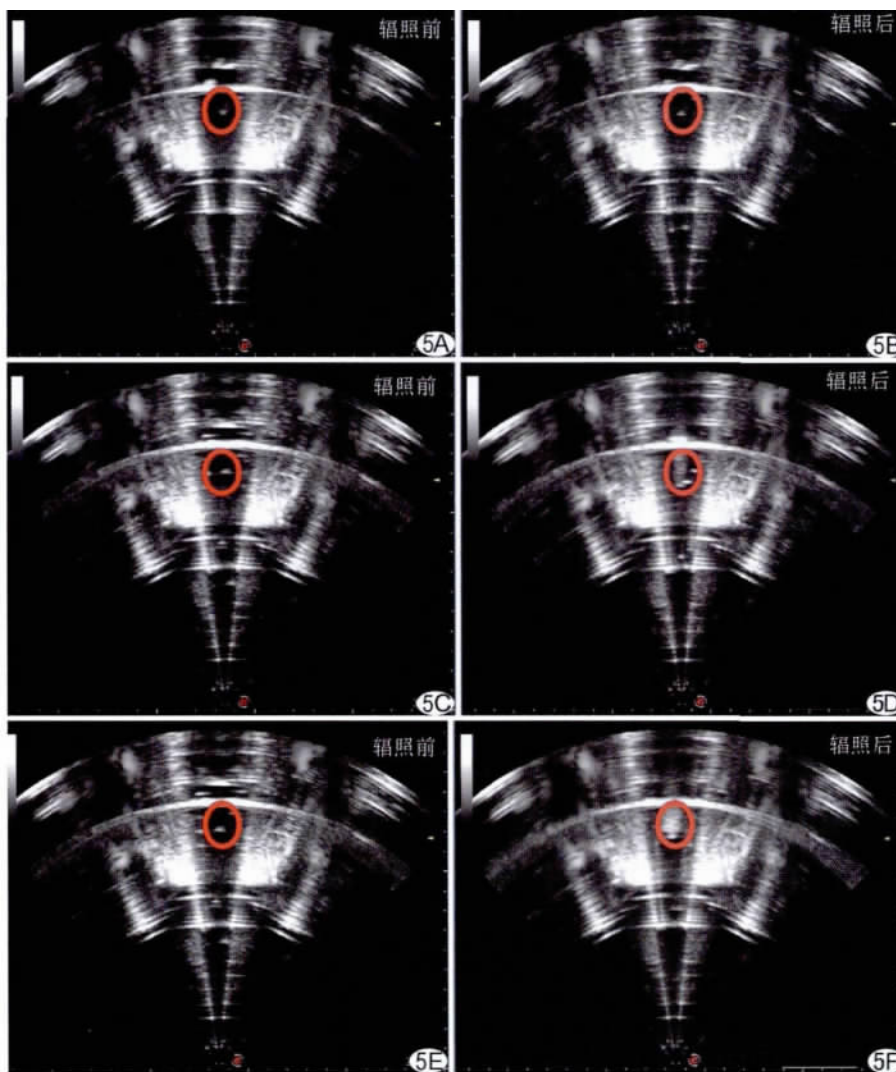


图 5 HIFU 作用后超声成像 经 HIFU 辐照后,PBS 组(A、B)、PFH/PLGA 组(C、D)及 s-PFH/PLGA 组(E、F)回声强度不同程度增加,s-PFH/PLGA 组(C)最为明显 (红色圆圈内为显像区域)

另有研究^[9]表明,铁氧体是一种吸波材料,在交流电磁场中能被加热^[10];SPIO 的存在也可能会增加造影剂对超声能量的吸收^[11]。同时,SPIO 以纳米颗粒形式存在,也能作为一种潜在的空化核,增加超声的空化效应。以上多种机制均可能对 SPIO 在 HIFU 致 PFH 的相变过程中起到一定促进作用。

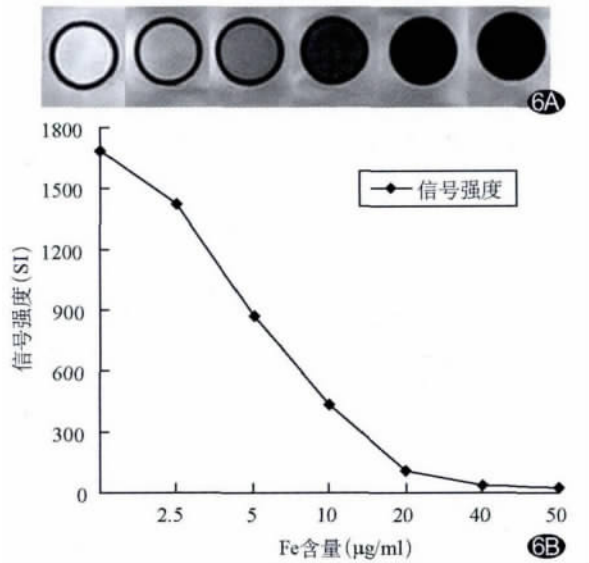


图 6 不同浓度 s-PFH/PLGA 的体外 MR 成像(A)及其相应的信号强度(B)

光声成像是近年来发展起来的一种无创、非电离、具有高穿透深度和高对比度的成像方式,主要根据生物组织对光的吸收分布来反映组织的结构;利用激光对组织进行激发使组织膨胀、得到光声信号^[12]。研究^[13]表明,在组织血管中注入纳米颗粒,通过血液循环,能增加成像的深度和对比度。本研究自制的 s-PFH/PLGA 在激光作用后能检测到明显的光声信号,可能在光声成像方面具有一定应用潜能,其机制及应用尚需进一步研究。

s-PFH/PLGA 微球分别利用了 SPIO 和 PFH 的优点,在常温下呈液态,通过聚集显影;HIFU 辐照后发生气化,进一步增加超声显影。SPIO 既能作为超声波吸收材料进一步吸收超声能量,又能作为空化核增加超声的空化效应促进 PFH 的液气相变,同时还是一种 MR 阴性对比剂,达到了多模态造影剂的要求。当然,由于体外环境与体内环境存在诸多差异,对于微球的制备参数及其体内运用尚需进一步探索。本实验结果表明,HIFU 能促进微球乳液的液气相变,显示出其作为 HIFU 增效剂的潜能,今后可进一步优化工

艺,并对其作为 HIFU 增效剂的作用进行研究。

综上,本实验初步证实了自制的载 SPIO 的高分子液态氟碳纳米粒能同时实现体外超声及 MR 双模态显像,并且具有增强光声显影的潜能,能在 HIFU 辐照下发生液气相变,为进一步作为 HIFU 增效剂提供了实验依据。

[参考文献]

[1] Lin Y, Chen ZY, Yang F. Ultrasound-based multimodal molecular imaging and functional ultrasound contrast agents. *Curr Pharm Des*, 2013,19(18):3342-3351.

[2] Lü JM, Wang X, Marin-Muller C, et al, Current advances in research and clinical applications of PLGA based nanotechnology. *Expert Rev Mol Diagn*, 2009,9(4):325-341.

[3] 沈红霞,郑元义,王志刚,等.包裹液态氟碳的高分子超声造影剂的研究进展. *中国介入影像与治疗学*,2010,7(6):63-65.

[4] Piñón-Segundo E, Nava-Arzaluz MG, Lechuga-Ballesteros D. Pharmaceutical polymeric nanoparticles prepared by the double emulsion-solvent evaporation technique. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2012,6(3):224-235.

[5] 冉海涛,任红,王志刚,等.一种新型高分子聚合材料微泡超声造影剂的制备与体外显影实验. *中华超声影像学杂志*, 2005, 14(10):774-776.

[6] Kripfgans OD, Fowlkes JB, Miller DL, et al. Acoustic droplet vaporization for therapeutic and diagnostic applications. *Ultrasound Med Biol*, 2000,26(7):1177-1189.

[7] Jun YW, Lee JH, Cheon J. Chemical design of nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance imaging. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008,47(28):5122-5135.

[8] 李奥,王志刚,吴伟,等.载 Fe₃O₄ 液态氟碳纳米粒增强磁共振成像的实验研究. *中国医学影像技术*,2011,27(3):453-456.

[9] 王公正,莫润阳,刘亚红.微米磁性复合材料超声波吸收检测研究. *西北大学学报*,2007,37(1):67-72.

[10] Matsuoka F, Shinkai M, Honda H, et al. Hyperthermia using magnetite cationic liposomes for hamster osteosarcoma. *Bio-Magn Res Technol*, 2004,2(1):3-8.

[11] Sun Y, Zheng Y, Ran H, et al. Superparamagnetic PLGA-iron oxide microcapsules for dual-modality US/MR imaging and high intensity focused US breast cancer ablation. *Biomaterials*, 2012, 33(24):5854-5864.

[12] 何军锋,谭毅.光声成像技术在生物医学中的研究进展. *激光技术*,2007,31(5):530-533.

[13] Wang YW, Xie XY, Wang LH, et al. Photoacoustic tomography of a nanoshell contrast agent in the in vivo rat brain. *Nano Letters*, 2004,4(9):1689-1692.