

载吲哚菁绿和液态氟碳的光致相变型纳米粒的制备及增强体内成像的实验研究

宫玉萍 陈 澄 孙 阳 王志刚

摘 要 目的 制备一种光致相变型液态氟碳纳米粒,研究其体外相变及体内增强光声、超声成像能力。方法 采用三步乳化技术制备出以聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为载体,液态氟碳(PFH)和吲哚菁绿(ICG)为内核的纳米粒,检测该纳米粒的粒径和电位,然后体外激光辐照激发纳米粒相变,体内观察该纳米粒增强超声及光声成像的能力。结果 成功制备出包裹 PFH 和 ICG 的光致相变型纳米粒,该纳米粒平均粒径 $(599.2\pm 134.3)\text{nm}$,平均电位 $(-24.10\pm 4.09)\text{mV}$ 。激光辐照后,纳米粒可发生相变转变成微米级的微泡,体内增强了裸鼠移植瘤的光声及超声信号。结论 制备的光致相变型纳米粒在激光作用下发生相变,并可增强体内超声、光声成像,为临床疾病的诊断提供了新的思路。

关键词 吲哚菁绿;液态氟碳;光致相变;超声成像;光声成像

[中图法分类号] R445.1

[文献标识码] A

Laser-induced phase-shift nanoparticles with ICG and PFH for photoacoustic and ultrasound imaging of tumor

GONG Yuping, CHEN Cheng, SUN Yang, WANG Zhigang

Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

ABSTRACT Objective To prepare a laser-induced phase-change liquid fluorocarbon nanoparticle and explore the phase-change in vitro and the ability to enhance photoacoustic and ultrasound imaging capability in vivo. **Methods** The nanoparticles with PLGA shell, PFH and ICG kernel were prepared using a three-step emulsification technique. The particle size and the potential charge of nanoparticles were detected. The capability of enhancing photoacoustic and ultrasound imaging using nanoparticles in vivo were evaluated. **Results** The laser-induced phase-change liquid fluorocarbon nanoparticles were successfully prepared. The average particle size was $(599.2\pm 134.3)\text{nm}$ and the mean surface charge was $(-24.10\pm 4.09)\text{mV}$. The nanoparticles phase transformed into microbubbles when induced by laser, meanwhile, the photoacoustic and ultrasound imaging capability of tumor were enhanced. **Conclusion** The prepared laser-induced phase-shift nanoparticles could enhance the ability of ultrasound and photoacoustic imaging, which potentially provides a new idea in clinical diagnosis.

KEY WORDS ICG; PFH; Laser-induced phase-shift; Ultrasound imaging; Photoacoustic imaging

集分子和功能成像于一体的光声成像技术是一种新兴的生物医学成像模式。光声成像的原理是基于体内或外来的光吸收子吸收激光能量使组织产生热膨胀,热膨胀过程中产生的超声压力波可被超声探头测及^[1]。微泡的诸多不利因素如粒径大、不能穿过血管内皮间隙、体内清除率过快等限制了超声分子成像技术

的发展^[2]。双模态及多模态分子显像剂可为疾病的诊断提供多种成像模式,提高了诊断疾病的能力,是当前分子成像的研究热点^[3]。本研究旨在以低沸点的液态氟碳(PFH)和光吸收子吲哚菁绿(ICG)作为内核,体内可降解材料聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为外壳,制备一种新型的双模态分子显像剂,在激光触发

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81401423,81501484)

作者单位:400010 重庆市,重庆医科大学附属第二医院超声科(宫玉萍、孙阳);重庆医科大学超声影像学研究所(陈澄、王志刚)

通信作者:王志刚,Email:wzg62942443@163.com

下可发生相变,既增强超声分子显像又增强光声成像,为分子影像学的发展提供新型的多功能分子探针。

材料与方法

一、实验动物

BALB/c 裸鼠 14 只,3~6 周龄,体质量(20.0±1.2)g,由重庆医科大学动物中心提供。

二、主要试剂及设备

PLGA(聚合比 50:50,济南岱罡生物有限公司),ICG(美国 Sigma 公司),PFH(美国 Sigma 公司),聚乙烯醇(PVA,美国 Sigma 公司),VCX130 声振仪,磁力搅拌器(德国 IKA 公司),FJ-200 高速分散均质机(上海标本模型厂),高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),Malvern 粒径仪,LAZR 光声成像仪。

三、光致相变型纳米粒的制备及一般性质检测

采用三步乳化技术制备光致相变型纳米粒,将 50 mg PLGA 溶于二氯甲烷,3 mg ICG 溶于 300 μ l 水待用,将 PFH 加入到 ICG 溶液中,声振 30 s 后加入到 PLGA 的二氯甲烷溶液中再声振 2 min,再加入 4% 的 PVA 溶液用高速分散均质机分散 2 min,磁力搅拌 2~4 h,使二氯甲烷充分挥发,多次洗涤离心后得到光致相变型纳米粒。将纳米粒稀释到一定浓度后,光学显微镜下观察纳米粒的形态及分布;扫描电镜观察纳米粒的外部形态;Malvern 粒径仪检测纳米粒的粒径和电位。将制备好的纳米粒置入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

四、光致相变型纳米粒体外相变及体内光声与超声成像研究

1.光镜下直接观察纳米粒的相变:取稀释后的纳米粒滴于载玻片上,调整视野后,启动光声成像仪分别辐照 5 s、10 s、20 s 及 30 s,显微镜下观察纳米粒的相变情况。

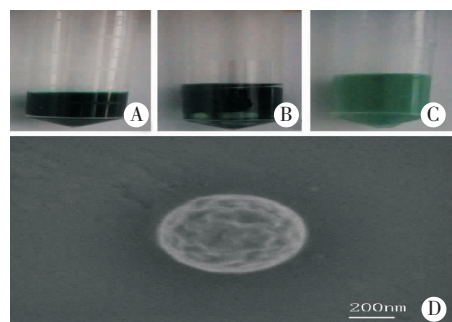


图 1 光致相变型纳米粒的乳化过程及其扫描电镜图

A: ICG 溶液; B: 加入 PFH 的 ICG 溶液; C: 三步乳化后的光致相变型纳米粒; D: 光致相变型纳米粒的扫描电镜图像。

2.光致相变型纳米粒体内增强肿瘤的光声及超声成像:①裸鼠移植瘤的建立:消化对数生长的细胞,离心后用 1640 培养液稀释,血球计数器计算细胞浓度。将裸鼠背部皮肤消毒后,用镊子轻轻提起裸鼠背部皮肤,用注射器在裸鼠皮下种植肝癌 7721 细胞约每只 1×10^6 个,裸鼠背部形成皮丘,交于动物中心继续饲养。2~3 周后超声观察肿瘤生长情况,选取成功种植的荷瘤裸鼠备用。②体内光声及超声成像:取 14 只裸鼠移植瘤模型,随机分为空白对照组和光致相变型纳米粒组,将稀释后的纳米粒瘤内注射(对照组注射生理盐水),用激光辐照肿瘤部位,然后使用超声诊断仪的基波和谐波模式采集肿瘤部位的超声图像,使用光声成像仪采集肿瘤部位的光声图像。

结 果

一、光致相变型纳米粒一般性质检测

制备相变型纳米粒过程中可见离心管中的 ICG 在加入 PFH 后,由于 PFH 的不溶性,在 ICG 溶液中 PFH 沉入离心管的底部,而在制备出的纳米粒中却未见该现象(图 1A~C)。该纳米粒呈均一的浅蓝色,扫描电镜下该纳米粒为球形(图 1D),粒径均匀,分散度好;激光粒径仪测得平均粒径为(599.2±134.3)nm,平均电位为(-24.10±4.09)mV。

二、光致相变型纳米粒体外相变及体内光声与超声成像研究

1.光镜下观察激光辐照纳米粒后的相变情况:激光辐照前纳米粒粒径较小,激光辐照 5 s、10 s、20 s 后纳米粒均未发生变化;而辐照时间达 30 s 时,纳米粒逐渐变大形成微气泡,部分甚至膨胀爆破,未爆破的微泡可持续存在达 60 s 以上(图 2)。

2.纳米粒体内增强肿瘤的光声及超声成像:激光

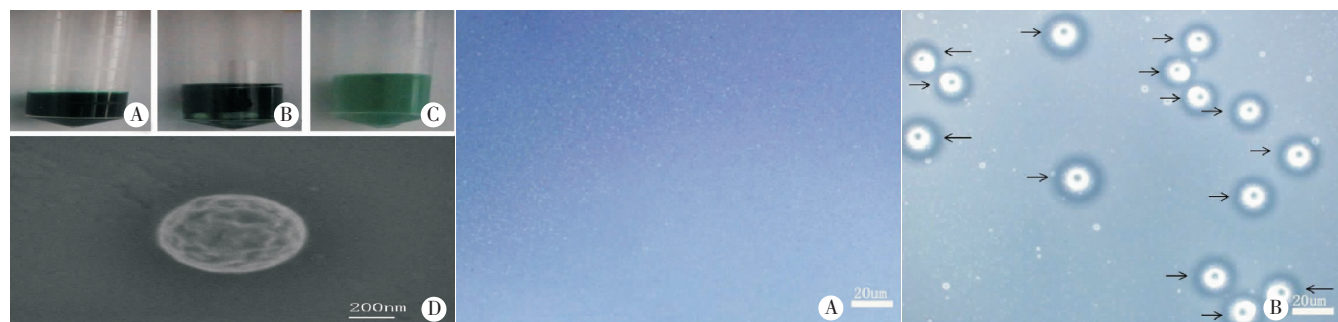


图 2 激光触发前后纳米粒的光镜图($\times 800$)

A: 激光触发前; B: 激光触发后。

作用肿瘤区域后,在基波和谐波成像模式下,空白对照组的肿瘤超声图像均为低回声,肿瘤区域未见光声信号的产生;而相变型纳米粒组的肿瘤超声图像均可

见气泡产生所导致的强回声,肿瘤区域产生明显的光声信号(图 3)。

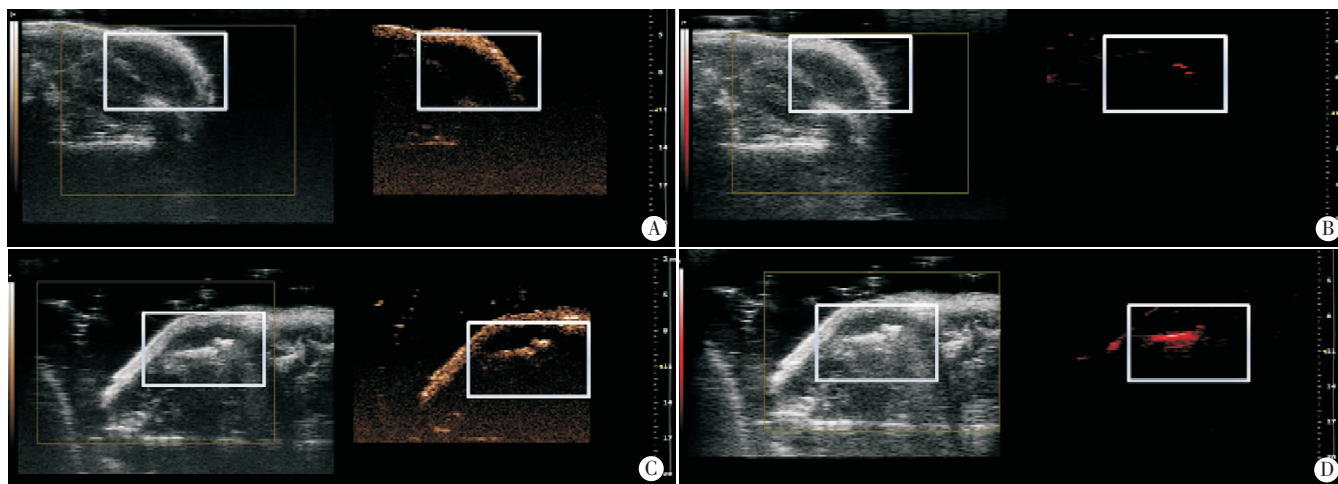


图 3 激光作用后,光致相变型纳米粒组和空白对照组的超声及光声图像

讨 论

随着医学科学的需求和分子成像技术的发展,双模态或多模态造影剂因可为疾病诊断提供两种以上的成像方式成为医学科学研究的热点。越来越多的研究者致力于双模态或多模态甚至集诊断、治疗于一体的多功能造影剂的研究。作为超声分子探针的超声微泡造影剂,由于其粒径大、不能穿过血管内皮细胞及体内清除率过快等因素限制了超声分子成像技术的发展。解决以上难题迫切需要一种新型的超声分子探针。光声成像技术由于其无创、非电离及其高穿透力和高分辨力得到广泛的研究。

PFH 沸点低(56 ℃),不溶于水和酯类,在表面压力降低和温度升高的条件下,会由液态转变成气态发生相变。如果用成膜材料包裹 PFH 制成纳米粒后,一定条件下在靶向部位激发其发生相变变成微气泡,可解决微泡粒径大等难题。

ICG 是唯一被 FDA 批准应用于医学诊断研究的水溶性三碳菁染料^[3],其在近红外区域具有较强的光吸收和发射能力^[4],是一种理想的体外光吸收子。但 ICG 体内清除率快,在光、热作用下极易被分解,靶向性差,因此,临床应用受到限制。PLGA 高分子聚合物材料具有较好的生物相容性和体内可降解性,容易成膜、成囊,因此被广泛用作药物载体。Zheng 等^[5]将 ICG 包裹于 PLGA 高分子材料内,发现 ICG 的稳定性显著增强。

本研究考虑到常用超声分子探针——微泡的缺陷和 ICG 的临床应用局限性,应用 PLGA 作为壳膜材料(油相),包裹 PFH(非水、非油相)和 ICG(水相)的乳液为内核,通过三步乳化技术制备了既可用于光声成像,又可用于超声成像的光致相变型纳米粒。在制备过程中,PFH 加入到 ICG 溶液后,因其不溶于水,比高于水,故沉于离心管的底部,而经过三步乳化步骤后形成的相变型纳米粒分散均匀,未见游离相的存在,可证实三步乳化技术可将非水、非油相的 PFH 和水相 ICG 包裹于 PLGA 材料内。研究^[2,6-7]表明,超声、温度、激光等因素均可引起 PFH 纳米粒的相变。本研究中的光致相变型纳米粒利用光吸收子 ICG 吸收激光能量,当内核温度和压力达到 PFH 的相变条件时,纳米粒就可转变成内核为气体的微泡。本研究通过对荷瘤裸鼠肿瘤成像发现,在有相变纳米粒存在的前提下,激光触发后肿瘤超声成像能力增强,提示相变型纳米粒变成了含气的微泡,微泡可产生非常高的超声散射信号,从而增强超声成像能力,激光触发后光声成像能力增强,可能是纳米粒蒸发和 ICG 吸收激光热膨胀共同作用的结果。

综上所述,本研究成功制备的光致相变型纳米粒能够在激光作用下发生相变,增强体内超声及光声成像,此外,还可对 PLGA 进行表面修饰,构建靶向分子探针,提高靶向部位的成像能力,实现靶向部位组织和分子水平的双模态成像,为疾病诊断提供一种新型的多功能分子探针。

参考文献

- [1] 龚小竞,孟静,陈健桦,等.生物医学光声成像技术及其临床应用进展[J].集成技术,2013,2(5): 53-59.
- [2] Wilson K,Homan K,Emelianov S.Biomedical photoacoustics beyond thermal expansion using triggered nanodroplet vaporization for contrast-enhanced imaging[J].Nature communications,2012,10(1): 618.
- [3] Malicka J,Gryczynski I,Geddes CD,et al.Metal-enhanced emission from indocyanine green:a new approach to in vivo imaging[J].J Biomed Opt,2003,8(3):472-478.
- [4] Yu J,Yaseen MA,Anvari B,et al.Synthesis of near-infrared-absorbing nanoparticle-assembled capsules[J].Chem Mater,2007,19(5):1277-1284.
- [5] Zheng C,Zheng M,Gong P,et al.Indocyanine green-loaded biodegradable tumor targeting nanoprobes for in vitro and in vivo imaging[J].Biomaterials,2012,33(22):5603-5609.
- [6] 周洋,周鸿,叶鸣,等.相变型液态氟碳纳米粒造影剂的制备及相变超声显影研究[J].临床超声医学杂志,2014,16(10):649-652.
- [7] Huang J,Xu JS,Xu RX.Heat-sensitive microbubbles for intraoperative assessment of cancer ablation margins[J].Biomaterials,2010,31(6):1278-1286.

(修回日期:2016-03-16)

·病例报道·

Fetal malformation of siren-limb prenatal diagnosed by ultrasound: a case report 超声诊断胎儿并腿畸形综合征 1 例

陈 谊 程雪冰 王孝君

[中图法分类号] R714.5;R445.1

[文献标识码] B

孕妇,27岁,孕2产0。于孕前3个月行人绝经期促性腺激素联合人绒毛膜促性腺激素促排卵治疗,并予以黄体酮口服黄体功能支持;无化学毒物、放射性接触史,无家族遗传病史和病毒感染史。孕12⁺周行超声检查:胎盘位于子宫后壁,厚度1.1cm,钙化0级,羊水最大无回声区3.3cm,顶臀径5.19cm,超声孕周11⁺6周,颈项透明层厚度1.5mm,胎儿仅见单一下肢(图1)。2周后要求终止妊娠,复查超声示:胎盘位于子宫后壁,厚度2.0cm,钙化0级,羊水最大无回声区3.7cm,顶臀径7.27cm,颈项透明层厚度2.3mm,超声孕周13⁺3周;胎儿下肢呈融合状,小腿可见两支长骨并列,双足呈“Y”状固定,大腿部仅可见一长骨结构;右上颚见一约1.5mm连续性中断。超声提示:①中孕,宫内单活胎;②胎儿下肢结构异常,考虑并肢畸形(人鱼序列征)。后予以药物引产,胎儿外观见双下肢并肢,呈鱼尾状,与停经时间相符。双上肢未见明显畸形,脐以下双下肢融合,卷曲似鱼尾状,与躯干呈约60°,长约2cm(图2)。尸检:自髋部以下融合成鱼尾状,长约2cm,可见股骨部分融合,双胫骨、腓骨缺如,可见踝关节及双足;心脏右位,主动脉骑跨;食道部分缺如,双肾、膀胱缺失,肠管细短,肛门闭锁,未见外生殖器。1条脐动脉由腹主动脉发出,未见卵黄囊。

讨论:并腿畸形综合征又称人体鱼序列综合征,是一种罕见的先天性胎儿畸形,以同卵孪生胎儿多见。该病多在中孕期,甚至晚孕期确诊,但肾脏发育不良等因素可导致中晚期妊娠羊水过少,使下肢观察效果不佳,增加了产前诊断的难度。相反,早孕期羊水由羊膜产生,一般不减少,故此时胎儿形态较易观察。笔者认为根据娩出胎儿外形容易诊断,但产前宫内诊断困难,尤其是早孕期超声观察胎儿腹部结构畸形较难,但膀胱畸形大多在孕12周即可诊断,若在早孕期膀胱不显影,则应进一步观察是否有其他异常。另外,使用经阴道超声可更加清晰地



图1 超声图像示胎儿仅见单一下肢(箭头示)

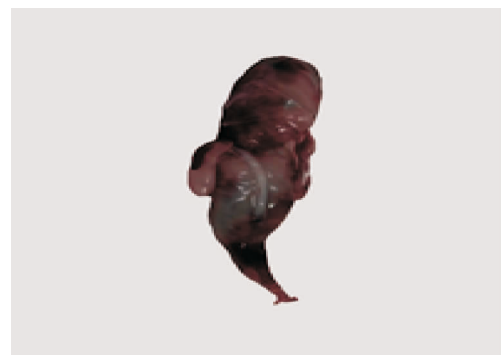


图2 并腿畸形综合征胎儿引产大体图

观察胎儿发育情况。总之,早孕期超声可实现胎儿并腿畸形综合征的诊断,熟练掌握胎儿脏器发育的最早检查时间,掌握规范、标准的筛查方法对早期诊断并腿畸形综合征十分重要。

(修回日期:2016-03-03)