

# 纳米级液态氟碳靶向超声造影剂的制备及体外寻靶的实验研究

石红 杨彦辉 刘健 李杨 余进洪

**摘要** **目的** 制备一种新型的具备特异性肝细胞靶向性能的超声造影剂,即携半乳糖化多聚赖氨酸(Gal-PLL)的脂质包裹的纳米级液态氟碳微球超声造影剂,并研究其在体外肝细胞的寻靶能力。**方法** 应用还原胺化法优化制备肝脏去唾液酸糖蛋白受体的配体 Gal-PLL,将其磷脂膜洗脱下来并逐滴加入液态氟碳,通过超声波细胞粉碎机进行振荡获得目标造影剂,并观察其形态,检测其粒径和电位。将靶向造影剂和非靶向造影剂分别滴入贴壁生长的正常大鼠肝细胞及正常人肝细胞中,比较观察两组造影剂与肝细胞的靶向效果。**结果** 成功制备 Gal-PLL,并合成了靶向纳米级液态氟碳脂质微球超声造影剂,电镜下其形态圆整、大小均一,性质稳定,平均粒径 200 nm,平均电位 35 mV。制备的靶向纳米级液态氟碳脂质微球超声造影剂能靶向聚集于体外正常大鼠肝细胞和正常人肝细胞周围。**结论** 自制携 Gal-PLL 的脂质包裹的纳米级液态氟碳微球超声造影剂具有性质稳定、靶向性等优点,为今后实时在体监测并定量评估肝脏损伤程度的超声造影研究提供了前期基础。

**关键词** 超声检查;造影剂;纳米级;液态氟碳;靶向性;肝细胞;大鼠

[中图分类号]R445.1

[文献标识码] A

## The manufacture of a novel ultrasound contrast agent: hepatocyte targeted perfluorocarbon lipid nanoparticle, and its targeting study in vitro of liver

SHI Hong, YANG Yanhui, LIU Jian, LI Yang, YU Jinhong

Department of Function, the First People's Hospital of Neijiang, Sichuan 641000, China

**ABSTRACT** **Objective** To prepare a new type of ultrasound contrast agent, perfluorooctyl bromide lipid nanoparticle with Galactosylated Poly-L-Lysine (Gal-PLL), and study the ability of this contrast for hepatocyte targeting in vitro. **Methods** The preparation of high-efficiency Gal-PLL ligand of the asialoglycoprotein receptor in liver was optimized by chemical reactions of reductive amination. Lipid membrane prepared before was eluted with Gal-PLL, adding perfluorocarbon in it, then objective ultrasound contrast agent was prepared by means of ultrasonic cell disruptor agitation, its feature was observed, the grain diameter and electric potential were detected. Targeting contrast agent and non-targeting contrast agent were instilled into normal adherence growth rat hepatocyte BRL and human hepatocyte L02, respectively. The targeting effect of the contrast agent for both rat hepatocyte BRL and human hepatocyte L02 were observed and compared. **Results** High-efficiency Gal-PLL ligand of the asialoglycoprotein receptor for hepatocyte and novel ultrasound contrast agent-perfluorooctyl bromide lipid nanoparticle were successfully prepared. The contrast agent was round with size stability (the average diameter was 200 nm), under the electron microscope, meanwhile, with stable property. Its average electric potential was 35 mV. The contrast agent flocked together around the rat hepatocyte BRL and human hepatocyte L02 cells. **Conclusion** The self-prepared novel ultrasound contrast agent, perfluorooctyl bromide lipid nanoparticle, is stable in property with targeting function for hepatocyte. This novel contrast may be used for evaluation on liver damage degree quantitatively in real time in future.

**KEY WORDS** Ultrasonography; Contrast agent; Nanoparticle; Lipid perfluorocarbon; Targeted; Hepatocyte; Rat

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(31300688)

作者单位:641000 四川省内江市,内江市第一人民医院功能科(石红),胸外科(杨彦辉);川北医学院附属医院超声科(刘健、余进洪),放射科(李杨)

通信作者:余进洪,Email:525293623@qq.com

近年来, 超声造影已逐渐向分子成像技术研究领域开拓<sup>[1]</sup>, 靶向超声造影剂及其靶向显影技术已成为分子影像学的重要研究内容<sup>[2]</sup>, 随着生物纳米技术的迅猛发展, 新型纳米级造影剂也为分子影像学的发展提供了无限前景<sup>[3]</sup>。去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)也称半乳糖受体, 是哺乳动物肝实质细胞膜表面特有的内吞受体, 能高效、特异地识别血清中带有半乳糖残基末端的糖蛋白, 并与其结合<sup>[4]</sup>。这种受体-配体的特异亲和能力为本实验提供了生物分子基础。本实验制备出具有肝细胞靶向性能的纳米级液态氟碳脂质微球超声造影剂, 通过体外寻靶实验评价其靶向能力及靶向显影效果, 旨在为后续评估肝脏储备功能和肝脏受体表达量的实验提供依据。

## 材料与方 法

### 一、实验材料

1. 实验试剂: D-半乳糖、多聚赖氨酸(Poly-L-Lysine, PLL)、硼氢化钠、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC, 美国 Echelon 公司), 带有活化氨基的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-020PA, 美国 Avanti 公司), 胆固醇(北京 J&K 公司), 三氯甲烷(川北医学院医学影像研究所提供), 液态氟碳(上海笛柏化学品技术有限公司), Hoechst 33342 DNA 荧光染料、DiI 红色荧光探针(碧云天生物技术研究所)。

2. 实验细胞: 大鼠正常肝细胞(BRL), 人正常肝细胞(L02), 均由四川大学华西医学中心医学与分子实验室提供。

3. 仪器: 葡聚糖凝胶柱 G-25、磁力搅拌器(川北医学院医学影像研究所提供); 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); 超声波细胞粉碎机(宁波新艺超声设备有限公司); 激光粒度仪及电位仪(英国马尔文仪器有限公司); 光学显微镜(川北医学院医学影像研究所提供); 激光共聚焦显微镜(川北医学院风湿免疫研究所提供)。

### 二、实验方法

1. ASGPR 配体即半乳糖化多聚赖氨酸(Gal-PLL)的优化配制: 采用还原胺化法<sup>[5]</sup>, 将 D-半乳糖和 PLL 按照 6:1 的摩尔比溶于 6 ml PBS 缓冲溶液中, 均匀振荡 10 min 后, 加入与 D-半乳糖摩尔数等量的硼氢化钠, 室温下避光反应 24 h。最后用葡聚糖凝胶柱 G25 对其进行分离纯化, 检测 Gal-PLL 的合成情况。

2. 靶向纳米液态氟碳脂质微球超声造影剂的制备: 将 DPPC、DSPE-020PA、胆固醇按照 5:2:1 的质

量比称取至小烧杯中, 加入 5 ml 三氯甲烷, 用透明膜封紧杯口, 置于磁力搅拌器进行振荡, 待磷脂粉末完全溶于三氯甲烷后, 再将溶液转移至圆底烧瓶, 连接旋转蒸发仪, 50 °C 恒温旋转蒸发成膜。吸取已制备成功的 Gal-PLL 溶液 6 ml 加入圆底烧瓶内, 置于 45 °C 水箱内振荡, 待磷脂膜完全洗脱溶解下, DSPE-020PA 的氨基末端与 Gal-PLL 的羧基末端发生缩合反应而连接在一起, 转移至离心管内。向离心管内逐滴加入 1 ml 液态氟碳, 同时超声波细胞粉碎机振荡 4 min(每次 8 s, 间隔 2 s, 循环振荡 24 次, 功率 30%), 振荡同时摇匀离心管。将制备成功的造影剂置于 4 °C 冰箱内保存, 吸取少量造影剂置于显微镜下观察其形态是否发生改变。

3. 靶向纳米液态氟碳脂质微球超声造影剂理化性质检测: 吸取少量制备成功的靶向造影剂, 用 PBS 缓冲液稀释后置于电子显微镜下观察其形貌、密度及大小, 并采用马尔文激光粒度仪检测其粒径及电位。

4. 靶向纳米液态氟碳脂质微球超声造影剂与正常肝细胞的靶向实验

(1) 细胞培养与处理: 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 孵箱内培养 BRL 细胞, 含 10% 胎牛血清的 1640 培养液 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 孵箱内培养 L02 细胞, 分别接种于激光共聚焦专用玻底培养皿各两瓶, 培养 24~36 h。对以上细胞进行 Hoechst 33342 DNA 蓝色荧光染色 10 min, PBS 溶液清洗 3 遍。

(2) 靶向纳米液态氟碳脂质微球超声造影剂的处理: 静置已制备好的靶向造影剂 30 min, 吸取上清液 500 μl 加入离心管内, 进行 DiI 磷脂膜红色荧光染色 10 min, 离心 3 min(3000 转/min)。再吸出上清液, 加入 2 ml PBS 溶液洗涤造影剂, 反复洗涤、离心 3 次。

(3) 体外寻靶实验: ①实验组分别吸取 0.5 ml 已染色成功的靶向造影剂加入已完成 DNA 染色的 BRL 细胞和 L02 细胞培养皿中; ②对照组分别吸 0.5 ml 取非靶向造影剂(未连接 Gal-PLL)加入 BRL 细胞和 L02 细胞培养皿中。然后置于孵箱内, 30 min 后取出所有培养皿, PBS 溶液冲洗 3 遍, 置于普通电子显微镜和激光共聚焦显微镜下观察造影剂与细胞的结合情况。

## 结 果

### 一、Gal-PLL 的配制

经还原胺化法反应样本分离纯化出大量大分子复合物, 仅有微量游离物未被结合(图 1), 当 D-半乳糖与还原剂摩尔比为 1:1 时, 反应合成的 Gal-PLL 与游离组分的曲线分离明显, D-半乳糖与多聚赖氨酸偶联

效果较好,反应合成的化合物量大,成功提取出适用的目标配体 Gal-PLL。

### 二、靶向纳米液态氟碳脂质微球超声造影剂的理化性质

普通光学显微镜下观察自制的新型携 Gal-PLL 的肝靶向纳米液态氟碳脂质微球超声造影剂,大小均一、形态圆整(图 2)。马尔文激光粒度仪测得其粒径 140~260 nm,平均 200 nm(图 3);电位 20~45 mV,平均 35 mV(图 4)。

### 三、靶向纳米液态氟碳脂质微球超声造影剂与正常肝细胞的靶向实验结果

普通光学显微镜下,实验组靶向纳米液态氟碳脂质微球超声造影剂充分聚集在 BRL 及 L02 细胞的细

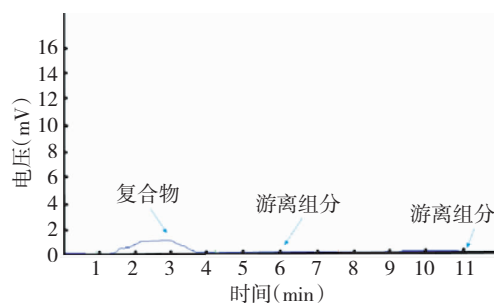


图 1 Gal-PLL 分离纯化结果

胞膜周围,而对照组非靶向液态氟碳造影剂则均未与 BRL 及 L02 细胞结合(图 5,6)。激光共聚焦显微镜下,两组均可见红色荧光靶向造影剂围绕蓝色荧光 BRL、L02 细胞的细胞核周围(图 7)。



图 2 光镜下靶向纳米 PFOB 脂质微球超声造影剂的形态( $\times 400$ )

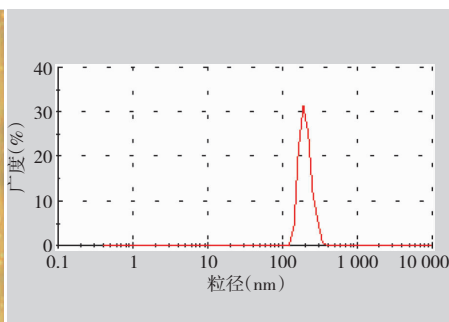


图 3 靶向纳米液态氟碳脂质微球超声造影剂平均粒径为 200 nm

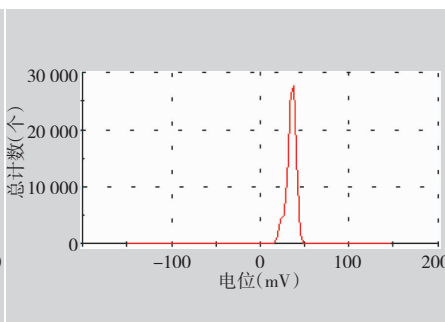
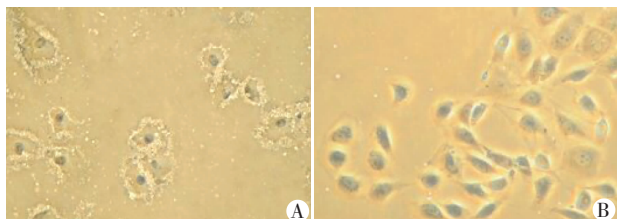
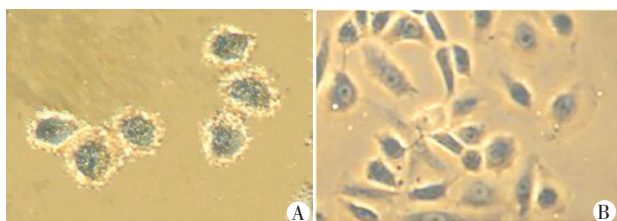


图 4 靶向纳米液态氟碳脂质微球超声造影剂平均电位为 35 mV



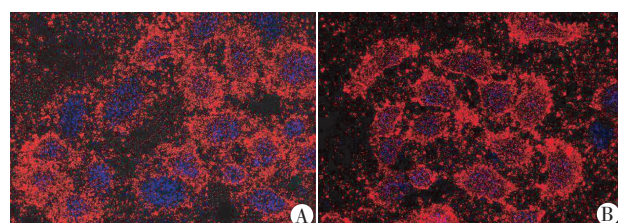
A:实验组靶向造影剂充分聚集在 BRL 细胞周围;B:对照组非靶向造影剂未聚集在 BRL 细胞周围。

图 5 两组造影剂在光镜下 BRL 细胞膜周围的聚集情况( $\times 200$ )



A:实验组靶向造影剂充分聚集在 L02 细胞周围;B:对照组非靶向造影剂未聚集在 L02 细胞周围。

图 6 两组造影剂在光镜下 L02 细胞膜周围的聚集情况( $\times 200$ )



A:红色荧光靶向造影剂围绕 BRL 蓝色荧光细胞核周围;B:红色荧光靶向造影剂围绕 L02 蓝色荧光细胞核周围。

图 7 激光共聚焦显微镜下靶向造影剂在 BRL 和 L02 细胞核周围的聚集情况( $\times 630$ )

## 讨 论

目前超声造影对肝脏肿瘤等占位性病变的诊断

价值已达成共识<sup>[6-7]</sup>,但其在慢性肝病的分级及肝功能的定量评估中缺乏确切的标准和依据。随着影像技术在分子生物和细胞水平的实验研究不断深入,期望通过制备纳米级肝靶向性超声造影剂,实时、无创地对肝脏储备功能进行在体监测,对慢性肝病做出定性、定量评估。ASGPR 显像剂对肝脏疾病的早期诊断、指导治疗及评价预后具有重要临床意义<sup>[8]</sup>,成为了靶向肝细胞的首选媒介<sup>[9]</sup>。当肝细胞受损时,ASGPR 数量随之减少,结合半乳糖基糖蛋白的能力也随之下降,由此可对不同程度肝损伤的超声造影结果进行定量分析和评估,这将是今后实时在体监测并定量评估肝脏损伤程

度的超声显影研究方向。本实验成功制备了具有肝细胞靶向功能的超声造影剂,并通过体外寻靶实验评价其靶向能力及靶向显影效果,为后续评估肝脏储备功能和肝脏受体表达量的实验提供依据,这是解决特异性配体的优化制备、造影剂原料的选择问题的关键。

李崇辉等<sup>[10]</sup>深入研究了 Gal-PLL 的肝靶向特征,以还原胺化法合成了 Gal-PLL,并首次利用放射性追踪实验测定了 Gal-PLL 在小鼠体内的肝靶向特征,认为 Gal-PLL 不仅具有较高的肝靶向性能,且在合成和应用方面,较 ASGPR 的天然配体更具优势。根据这一特点,本实验探索了底物与还原剂的优化配比及实验反应条件,成功合成出高效 ASGPR 人工配体 Gal-PLL。

本实验中,在造影剂原料上,根据周洋等<sup>[11]</sup>报道的方法成功制备了脂质包裹的纳米液态氟碳微球造影剂,其具有直径小、数量多且大小均匀等特点。该造影剂是将液态氟碳与脂质通过微液化技术所得,液态氟碳在室温下呈液态的特性使其对空气暴露、热和剪切应力、压力等相对稳定,应用较为便捷。其脂质被膜的 DSPE-020PA 成分末端经过氨基修饰后可与 Gal-PLL 中的羧基发生缩合反应,成为靶向肝细胞的载体<sup>[12]</sup>。

本实验体外细胞寻靶结果证实,自制的靶向纳米级液态氟碳脂质微球对肝细胞具有靶向功能,且靶向效果较为理想。但对于肝脏超声显影效果力求明确、精准,才能为后期肝脏储备功能的评估提供更为确切、定性、定量的信息,故今后在靶向造影剂的制备上需做进一步优化,以增加造影剂的靶向性能。且本实验自制配体 Gal-PLL 的化学键尚未得到证实,其稳定性也有待考究,其在靶向过程中化学性质是否改变及其对肝靶向作用是否存在影响等均是本实验存在的问题,在今后的实验中将会针对配体的性质及其肝靶向条件做进

一步研究,以取得最佳靶向环境和效果。

综上所述,自制携 Gal-PLL 的脂质包裹的纳米级液态氟碳微球超声造影剂具有性质稳定、靶向性等优点,为今后实时在体监测并定量评估肝脏损伤程度的超声显影研究提供了前期基础。

#### 参考文献

- [1] 赵玉珍.超声造影及其临床应用[J].中国医疗设备,2008,23(9):146-151.
- [2] 吕毕,冉海涛.靶向超声造影的研究进展[J].临床超声医学杂志,2010,12(7):477-479.
- [3] 王志刚.超声分子影像学研究进展[J].中国医学影像技术,2009,25(6):921-924.
- [4] 石红,刘健,余进洪.肝脏去唾液酸糖蛋白受体的研究进展[J].中华临床医师杂志,2014,8(23):4282-4286.
- [5] 沈宏武,郑土才,聂孝文,等.Leuckart 还原胺化法的应用进展[J].化工生产与技术,2013,20(6):42-49.
- [6] 岳湘竹,李亚珂,王玲.超声造影对肝脏局灶性病灶的诊断价值[J].中华全科医学,2012,10(11):1781-1783.
- [7] 卢晓潇,黄雪兰,邹晓婷.超声造影在肝脏局灶性病变鉴别诊断中的应用[J].中国老年学杂志,2013,33(21):5318-5319.
- [8] 杨文江,张现忠.肝 ASGPR 受体显像剂的研究进展[J].同位素,2009,22(3):177-186.
- [9] Zhao X, Yu Z, Dai W, et al. Construction and characterization of an anti-asialglycoprotein receptor single-chain variable-fragment-targeted melittin[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2011, 58(6):405-411.
- [10] 李崇辉,温守明,池木根,等.半乳糖多聚赖氨酸的肝靶向特征[J].中国药理学与毒理学杂志,1999,13(2):110-114.
- [11] 周洋,郑元义,冉海涛,等.叶酸受体靶向液态氟碳纳米粒造影剂的制备及体外寻靶[J].中国医学影像技术,2012,28(1):52-54.
- [12] 余进洪,王志刚,汪朝霞,等.脂质超声造影剂携半乳糖化多聚赖氨酸靶向结合 HepG2 细胞的实验研究[J].中华超声影像学杂志,2010,19(3):255-257.

(收稿日期:2016-11-01)

## 《临床超声医学杂志》征订启事

《临床超声医学杂志》是经国家科委批准,集超声影像诊断、治疗、工程及基础研究为一体的科技刊物。国内外公开发刊,月刊。为“中国科技论文统计源期刊”、“中国科技核心期刊”。设有临床研究、实验研究、综述、经验交流、临床报道、病例报道、述评、专家讲座、工程技术及译文等栏目。以各级超声医学工作者、相关临床专业医师及医学院校师生为主要读者对象。

本刊刊号:ISSN 1008-6978;CN 50-1116/R;邮发代号 78-116。

每期定价:16 元,全年 192 元(含邮寄费)。请到全国各地邮局订阅,也可直接向本刊编辑部订阅。

地址:重庆市渝中区临江路 74 号,重庆医科大学附属第二医院内,临床超声医学杂志编辑部。邮编:400010

电话:023-63811304 023-63693117 Email:lccscq@vip.163.com