

· 实验研究 ·

光热型纳米金-共聚物超声造影剂的制备及其在体外和大鼠乳腺癌模型显像的实验研究

许 丽 杜 晶 万财凤 张 雨 张晓芬 李凤华

摘 要 **目的** 制备外包纳米金壳内载全氟丙烷(C_3F_8)的聚乳酸羟基乙酸(PLGA)光热型超声造影剂,观察其在体内外的超声显像效果及体外的光热效能。**方法** 通过改进的乳化溶剂挥发法制备 PLGA 纳米粒子,包载 C_3F_8 气体后,再用种子生长法在 PLGA 表面形成纳米金壳,制备 $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子;检测其一般特性,采用近红外激光评估其体外光热效能;超声成像仪观察体外及大鼠乳腺癌模型成像效果。**结果** 成功制备 $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子,该粒子的平均直径为 $(268.2 \pm 80.5) \text{ nm}$,多分散指数为 0.196, Zeta 电位为 $(-22.5 \pm 5.2) \text{ mV}$,无明显细胞毒性;在 808 nm 激光辐照下,粒子有很好的溶液光热效果;体外及大鼠乳腺癌模型超声成像实验中均有增强显像。**结论** 成功制备了光热型纳米超声造影剂,其有良好的体外光热性能和体内外超声显像效果,可为乳腺癌诊治提供新思路。

关键词 超声检查;造影剂;纳米;光热治疗;纳米金;聚乳酸羟基乙酸;大鼠

[中图分类号] R445.1

[文献标识码] A

A photothermal ultrasound contrast agent: preparation, in vitro and in vivo investigation of gold nanoshelled poly(lactide-co-glycolic acid) nanoparticles

XU Li, DU Jing, WAN Caifeng, ZHANG Yu, ZHANG Xiaofen, LI Fenghua

Department of Medical Ultrasound, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

ABSTRACT **Objective** To prepare a photothermal ultrasound contrast agent with C_3F_8 filled -gold nanoshelled poly(lactide-co-glycolic acid) nanoparticles($C_3F_8@PLGA@Au$ NPs) and to investigate its photothermal effect and contrast enhanced ultrasound imaging capability. **Methods** The nanoscale agent was fabricated with modified emulsion-solvent evaporation method through filling C_3F_8 into PLGA, followed by the formation of gold nanoshell on the surface. The physicochemical properties of $C_3F_8@PLGA@Au$ NPs were characterized by electronic microscopy and dynamic laser scattering. And its photothermal effect was assessed via monitoring temperature increase under the laser irradiation in vitro. The ultrasonic diagnostic instrument was used to evaluate the ultrasound contrast behavior of $C_3F_8@PLGA@Au$ NPs. **Results** The $C_3F_8@PLGA@Au$ NPs were observed with spherical morphology, good dispersion(0.196), and uniform size with average diameter of $(268.2 \pm 80.5) \text{ nm}$ and electric potential of $(-22.5 \pm 5.2) \text{ mV}$. The MTT assay indicated the good biocompatibility of our NPs. The NPs showed good photothermal effect under laser irradiation(808 nm). And the imaging results in vitro and in vivo demonstrated that $C_3F_8@PLGA@Au$ NPs provided excellent contrast enhancement for ultrasound imaging. **Conclusion** The photothermal ultrasound contrast agent has been designed and fabricated. The preliminary studies demonstrate that $C_3F_8@PLGA@Au$ NPs have excellent photothermal effect in vitro and ultrasound imaging capability in vitro and in vivo, which provides new thought for diagnosis and treatment of breast cancer.

KEY WORDS Ultrasonography; Contrast agent, nanoscale; Photothermal therapy; Au nanoparticles; Poly(lactic-co-glycolic acid); Rats

基金项目:国家自然科学基金项目(81571678);上海市科委项目(15ZR1425600,14411968200);上海交通大学医学院附属仁济医院横向课题(RJKY14-07)
作者单位:200127 上海市,上海交通大学医学院附属仁济医院超声医学科(许丽、杜晶、万财凤、张雨、李凤华);上海师范大学生命与环境科学学院(张晓芬)

通信作者:李凤华, Email: proflihf@sina.com

分子影像学是借助分子探针,应用现代医学影像技术观察活体组织在分子或细胞水平的特异性显像的一门学科。超声分子影像是分子影像学的重要组成部分,良好的超声分子探针是实现超声分子显像的关键。随着超声成像技术和生物纳米技术的发展,多种纳米超声造影剂应运而生,使血管外显像成为可能。同时,借助近红外激光和光热剂的光热疗法是近期发展起来治疗肿瘤的方法,因其操作简便,具有非侵入性及治疗选择性等优点而广受关注^[1]。如何将超声分子影像技术和光热治疗结合起来构建乳腺癌早期的诊疗一体化平台,值得深入研究。因此,本实验采用 FDA 批准的聚乳酸羟基乙酸(PLGA)高分子聚合物为核,以有良好光热性能及生物相容性的纳米金为壳,樟脑为致孔剂,内填充全氟丙烷(C_3F_8)气体,制备集超声成像和光热治疗于一体的光热型纳米级超声造影剂,并评估其体外光热性能及体内外的超声显影能力。

材料与方法

一、主要试剂及设备

聚烯丙胺盐酸盐(PAH)及 PLGA(50:50, 美国 Sigma 公司),氯金酸三水化合物(美国 Acros 公司),全氟丙烷气体(C_3F_8 , 天津晶明公司),聚乙烯醇(PVA, 阿拉丁试剂);百胜 MyLab Twice 彩色多普勒超声诊断仪,LA 522 探头,频率为 3~9 MHz,机械指数 0.1;超声波细胞粉碎机(JY92-II 型,宁波新芝公司);透射电子显微镜(JEOL LEM 2010);场发射扫描电镜(日本 Hitachi S 4800);马尔文纳米粒度电位分析仪(英国 Malvern Zetasizer Nano ZS90);紫外-可见分光光度计(美国 Beckman Coulter DU 730)。

二、实验细胞及动物

人乳腺癌 MCF-7 细胞,由上海中科院提供;雌性 SD 大鼠 10 只,28 日龄,体质量 100~220 g,由上海斯莱克公司提供。

三、 C_3F_8 @PLGA@Au 纳米超声造影剂的制备及其性质检测

1.制备:参照文献[2-3],称取 PLGA 100 mg 和樟脑 10 mg 分散在二氯甲烷 3.5 ml 中充分溶解,随后逐滴加入至预冷的 2% PVA 水溶液 20.0 ml 中,冰水浴条件下应用超声波细胞粉碎机乳化 2 min,将乳化液在通风橱中挥发 5 h 后离心洗涤,真空干燥后充入 C_3F_8 气体;取适量 PLGA 粉末溶于 PAH 溶液,磁力搅拌后离心洗涤,沉淀中加入经硼氢化钠还原法制备的柠檬酸盐稳定的纳米金溶液,分散搅拌 30 min,离心洗涤后

重新分散于氯金酸溶液 2.0 ml 中,磁力搅拌 30 min 后滴加新鲜制备的盐酸羟胺溶液(0.5 mol/L)0.3 ml,继续搅拌 30 min 后离心洗涤,即得 C_3F_8 @PLGA@Au 纳米粒子。

2.性质检测:①一般性质检测:利用场发射扫描电镜及透射电镜观察 C_3F_8 @PLGA@Au 纳米粒子的大小、分散性、形态及结构;使用马尔文纳米粒度电位分析仪测量纳米粒子的平均粒径、Zeta 电位及多分散指数;通过紫外-可见分光光度计观察合成各阶段材料的紫外-可见-近红外吸收光谱;②体外光热实验:将 C_3F_8 @PLGA@Au 纳米粒子配制成不同浓度(50、100、150、200 μ g/ml)溶液,取 1 ml 溶液移入石英皿中,采用波长 808 nm、功率强度 1.0 W 的激光照射 15 min,以相同体积的去离子水作为对照,通过红外热像仪记录溶液温度。

四、细胞培养及细胞毒性实验

DMEM 培养基培养人乳腺癌 MCF-7 细胞,消化对数生长的细胞制成悬液;取 96 孔板,周边孔培养液隔离,在中间每孔加入 100 μ l 细胞悬液孵育 24 h;加入终浓度为 0~200 μ g/ml 的 C_3F_8 @PLGA@Au 纳米材料,每个浓度设置 6 个平行样,分别孵育 12、24 h;孵育结束后,每孔加入 100 μ l 0.5 mg/ml 的 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐继续孵育 4 h 后轻轻吸出,每孔加入 150 μ l 二甲亚砜,通过酶联免疫检测仪测量各孔 492 nm 处的吸光值。

五、体内外超声显像实验

1.体外超声显像:将 C_3F_8 @PLGA@Au 纳米粒子分散于去离子水中(1 mg/ml),注满 2 ml 透明塑料样品管,封口;另取脱气水注满同样样品管作为空白对照组,以脱气水为透声窗进行实时灰阶成像和超声造影成像。

2.乳腺癌大鼠体内超声显像:取甲基亚硝脲诱导的乳腺癌动物模型大鼠 6 只,随机分为纳米材料组和生理盐水组,麻醉并固定动物,先以二维超声检查肿瘤,选择最大切面后转入超声造影模式,单帧留取造影剂注入前图像,然后两组大鼠分别经尾静脉注入 200 μ l 5 mg/ml 的 C_3F_8 @PLGA@Au 纳米材料和等体积的生理盐水,从注入造影剂起全程记录动态影像,直至造影剂廓清为止。

所有声学造影图像自动保存,以备分析。

六、统计学处理

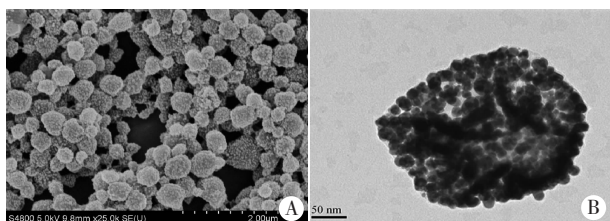
应用 SPSS 17.0 统计软件,定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较行独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、 $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子一般性质检测

成功制备 $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子,如场发射扫描电镜(图 1A)和透射电镜(图 1B)所示,粒子成球形,纳米金呈颗粒状均匀包被于 PLGA 表面,形态较规则,分散性较好;纳米粒度电位分析仪测得粒子的平均粒径为 $(268.2 \pm 80.5)nm$,多分散指数为 0.196,Zeta 电位为 $(-22.5 \pm 5.2)mV$,其材料粒径符合纳米级要求,粒径分布均匀,溶液稳定性尚好。

与单纯的 PLGA 纳米粒子和纳米金颗粒比较,纳米金包裹 PLGA 形成的纳米金/共聚物材料,在近红外区出现明显的吸收峰。见图 2。



A:场发射扫描电镜图;B:透射电子显微镜图。

图 1 电镜下观察 $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子

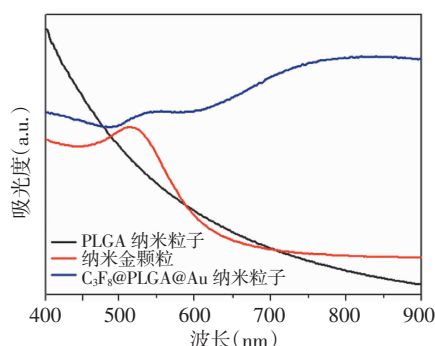


图 2 PLGA 纳米粒子、纳米金颗粒及 $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子的吸收光谱图

二、 $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子体外光热实验

在 808 nm 激光辐照 15 min 后,浓度为 50、100、150 及 200 $\mu g/ml$ 的不同 $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子溶液均迅速升温,200 $\mu g/ml$ 者温度较去离子水温度升高 11 $^{\circ}C$ 。见图 3。

三、 $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子细胞毒性实验

人乳腺癌 MCF-7 细胞经不同浓度 $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子孵育后存活率均在 85% 以上,且不同浓度 $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子孵育人乳腺癌 MCF-7 细胞存活率比较差异无统计学意义。见图 4。

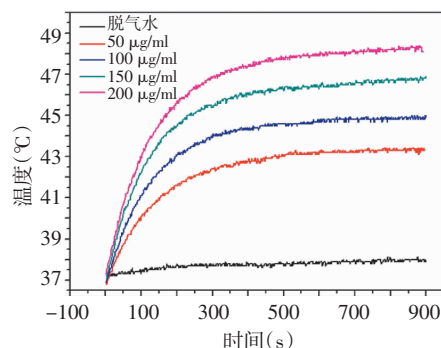


图 3 近红外激光辐照下,不同浓度 $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子的升温曲线图

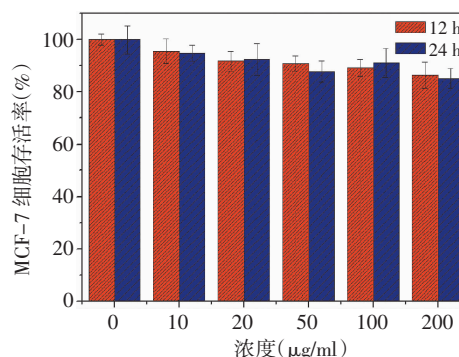


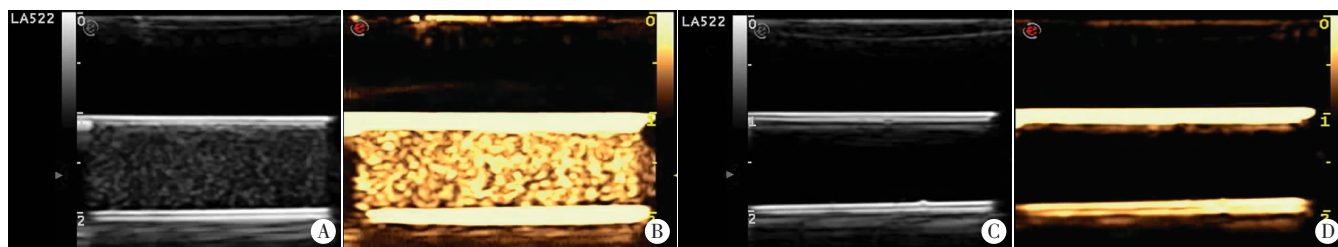
图 4 不同浓度 $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子的细胞毒性实验结果

四、体外超声显像实验

$C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子在二维和超声造影模式下均有显像,表现为点状高回声,细密均匀(图 5A、B);空白对照组两种模式均表现为无回声(图 5C、D)。

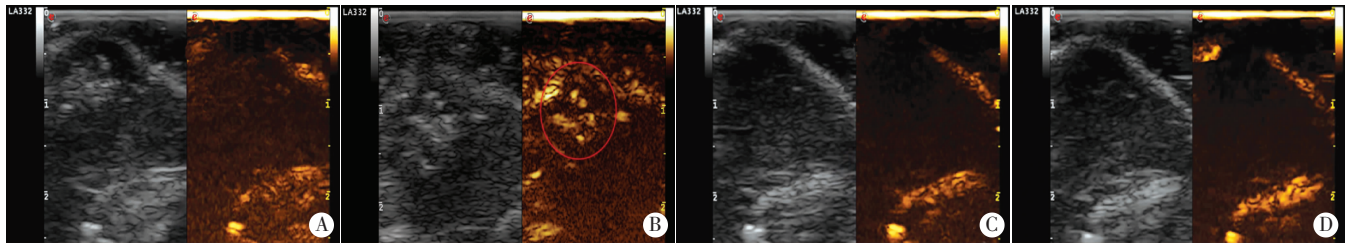
五、乳腺癌大鼠体内超声显像

$C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子经静脉注入大鼠体内后 7 s 时肿瘤区开始出现点状增强(红色圆区),约 19 s 达到峰值,峰值强度约为 $(8.6 \pm 1.7)dB$,较注入前明显增强(图 6A、B);生理盐水组注射后无明显增强(图 6C、D)。



A、B: $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子溶液二维和造影显像图,造影模式下可见细密均匀的点状高回声;C、D:空白对照组在二维超声和造影显像图,均表现为无回声。

图 5 $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子溶液与空白对照组体外超声显像图



A、B: 纳米材料组 $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子溶液静脉注入体内前后二维和造影图, 造影模式下肿瘤区出现点状增强 (红色圆区); C、D: 生理盐水组同体积生理盐水注入体内前后二维和造影显像图, 未见明显增强。

图6 两组乳腺癌大鼠体内超声显像图

讨 论

乳腺癌的病死率与癌症的分期息息相关, 早期诊断及有效的治疗极为重要。诊疗一体化是将诊断和治疗整合为一体的策略, 功能化的纳米材料由于其特定的化学和物理特性, 能融诊断与治疗为一体, 且可以实现分子显像, 为乳腺癌的早期诊疗一体化带来了新的希望^[4]。高分子聚合物 PLGA 具有良好的亲水特性, 表面可修饰, 有很好生物相容性和可降解性, 容跃和冉海涛^[5]研究表明 PLGA 作为超声造影剂具有广阔的应用前景; 纳米金材料因其良好的生物相容性及在近红外光区 (具有最小的人体组织吸收率, 穿透力强) 可调的表面等离子体共振性质, 不仅可用于生物成像, 还可通过光热效应在激光照射时成为局域化热源, 用于光热治疗^[6]。本实验制备的 $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子, 直径为 $(268.2 \pm 80.5) \text{ nm}$, 达纳米级别, 理论上可穿过肿瘤病变状态下的血管内皮间隙, 突破临床上微米级超声造影剂的局限, 实现血管外肿瘤细胞的显像。材料整个制备过程简便, PLGA 纳米粒子作为 $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子的核, 是以樟脑作为致孔剂, 采用单乳化溶剂挥发法制备所得, 粒径均一, 带有负电荷, 易于表面修饰; 采用静电吸附法及种子生长法形成的纳米金壳, 纳米金颗粒均匀吸附于 PLGA 表面, 厚度均匀 (图 1)。与文献^[7]中直接将纳米金颗粒作为初始材料进行单/双乳化方法所得的 $Au-PLGA$ 杂化物比较, 本方法 PLGA 表面金颗粒的负载量更多, 保证了材料在近红外区的有效吸收, 与单纯的 PLGA 相比, 可以很好地将光能转化为热能, 有望应用于近红外光热治疗。

超声造影剂稳定性好、抗压性强及成像维持时间长等特点是其有望应用于临床的必备要素。本实验制备的纳米材料在超声造影模式下表现为细密均匀的点状强回声, 成像持续 8 min 时仍有较明显的点状回声。材料经尾静脉注入乳腺癌大鼠体内后, 纳米粒子顺利地进入动物血液循环并在肿瘤区出现增强显像, 19 s 时

达到峰值, 符合肿瘤增强灌注显像特点, 结合纳米粒子良好的光热性能, 有望将超声显像和光热治疗集于一个平台, 改善乳腺癌诊断和治疗脱节问题。此外, 纳米金和 PLGA 形成的纳米金-共聚物壳核结构, 具有空腔和纳米金可修饰化表面, 也有研究^[8]表明 $Au-PLGA$ 壳核材料可作为药物、基因等的载体用于肿瘤的光化学治疗, 因此本实验制备的 $C_3F_8@PLGA@Au$ 纳米粒子为进一步开发纳米靶向载药造影剂打下良好的基础。

本实验制备过程中充填 C_3F_8 气体可增强纳米粒子的回声散射, 但是后续实验步骤中可能存在损失, 对终材料气体的实际填充量未进行定量评估, 纳米金-共聚物材料的体外光热性能良好, 但体内的光热效果尚需要进一步验证和探讨。

综上所述, 本实验采用乳化溶剂挥发法、种子生长法及静电吸附法成功制备了光热型纳米金-共聚物超声造影剂 $C_3F_8@PLGA@Au$, 其体外光热性能及体内外显像能力均良好, 有望作为一种纳米诊疗剂为乳腺癌的诊治提供新思路。

参考文献

- [1] Abou-Elkacem L, Bachawal SV, Wilmann JK. Ultrasound molecular imaging: moving toward clinical translation [J]. Eur J Radiol, 2015, 84(9): 1685-1693.
- [2] Cui W, Bei J, Wang S, et al. Preparation and evaluation of poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA) microbubbles as a contrast agent for myocardial contrast echocardiography [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005, 73(1): 171-178.
- [3] Ke H, Wang J, Dai Z, et al. Gold-nanosheled microcapsules: a theranostic agent for ultrasound contrast imaging and photothermal therapy [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2011, 50(13): 3017-3021.
- [4] 姚元志, 王志刚. 多模态多功能超声造影剂的应用进展 [J]. 临床超声医学杂志, 2016, 18(7): 474-476.
- [5] 容跃, 冉海涛. 聚乳酸/羟基乙酸纳米粒的应用进展 [J]. 临床超声医学杂志, 2011, 13(2): 109-111.
- [6] Ahmad R, Fu J, He N, et al. Advanced gold nanomaterials for photothermal therapy of cancer [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2016, 16(1): 67-80.

- [7] Luque-Michel E, Larrea A, Lahuerta C, et al. A simple approach to obtain hybrid Au-loaded polymeric nanoparticles with a tunable metal load [J]. *Nanoscale*, 2016, 8(12):6495–6506.
- [8] Park H, Yang J, Lee J, et al. Multifunctional nanoparticles for

combined doxorubicin and photothermal treatments[J]. ACS Nano, 2009, 3(10):2919-2926.

(收稿日期:2016-11-29)

·病例报道·

Ultrasonic manifestations of eyelid rhabdomyosarcoma: a case report

眼睑胚胎性横纹肌肉瘤超声表现 1 例

张 阳 阮骊韬 赵巧玲

[中图法分类号] R738.7:R445.1

[文献标识码] B

患者男, 2 岁, 因 1 个月前发现右眼下眼睑肿块, 并逐渐长大来我院就诊。体格检查: 基本情况良好, 无既往史、家族史等。眼科专科检查: 右眼下眼睑可触及一大小约 25 mm×22 mm 肿块, 质硬, 边界不清, 活动度差, 上缘达睑缘, 压迫眼球, 睁眼困难; 双侧睑结膜、球结膜正常, 双眼角膜透明, 前房中等深度, 虹膜色泽正常、纹理清晰, 瞳孔对光反射阳性, 晶状体、玻璃体、眼底、眼球运动情况均正常。超声检查: 右眼睑软组织内可探及一大小约 31 mm×18 mm 实性团块, 形态尚规, 后壁部分边界模糊与周围组织境界不清, 团块内回声不均匀, 可见多个带状强回声及密集小光点反射, 后方可见回声增强; CDFI 探及其内丰富血流信号, 收缩期峰值流速 21.2 cm/s, 舒张期峰值流速 8.7 cm/s, 阻力指数 0.59, 搏动指数 1.24。团块周围软组织增厚, 回声略增强(图 1)。超声诊断: 右眼下眼睑实性包块, 考虑横纹肌肉瘤可能。术中所见: 患者全身麻醉后, 沿下眼睑外缘切开皮肤, 钝性分离皮下组织, 逐渐暴露包块, 其与睑板粘连, 境界不清, 浸润明显, 充分切除肿物后送冰冻及病理检查。免疫组化检查: Vim(+)、Des(+)、MyoD1(+)、Myosin(+)、S-100(-)、CK(-)、Myoglobin(+). 病理诊断: 眼睑胚胎性横纹肌肉瘤(图 2)。

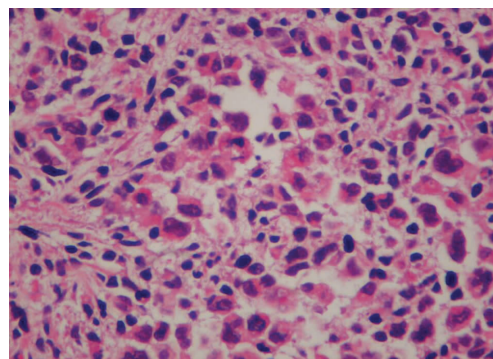


图2 胚胎性横纹肌肉瘤病理图(HE染色,×200)

内为著。横纹肌肉瘤病程短,主要症状为痛性或无痛性肿块,皮肤表面红肿,皮温高。肿瘤大小不等,质硬,就诊时多数肿块固定。手术完整切除困难,故复发率和转移较多。超声检查能确定病变部位、侵犯程度,为定性诊断提供依据。通常横纹肌肉瘤的超声图像具有以下特点^[1]:①多呈椭圆形,体积较大;②边界回声较清晰(可伴随局部边界模糊不清),无明显包膜回声;③内部呈实性不均匀低回声或伴有斑块状强回声,较大肿瘤因结构变异性大其内可见不规则液性无回声区;④肿块后方回声无明显衰减;⑤CDFI:肿瘤周边及肿瘤内部有较丰富的血流信号。本病例不仅具有上述特点,而且通过CDFI可以清晰追踪包块内血管的走行及来源,提示肿瘤滋养血管可能,可与眶内囊性占位性病变、炎性假瘤及血管瘤等相鉴别^[2]。可见,结合病史及彩色多普勒能为诊断横纹肌肉瘤提供帮助,并且能有效地预测术中出血情况,对临床具有很大的指导意义。目前,免疫组织化学染色方法是确诊本病的可靠方法。

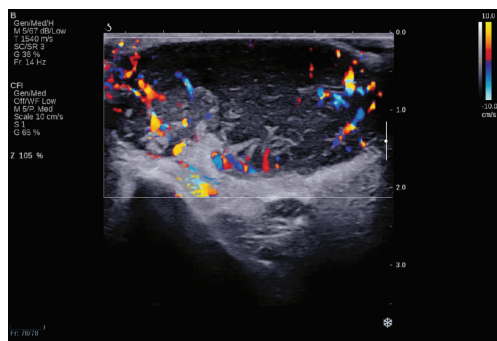


图 1 胚胎性横纹肌肉瘤 CDFI 图

讨论:横纹肌肉瘤是由不同分化阶段的横纹肌细胞构成,起源于横纹肌母细胞或是未分化的间叶组织。组织学分为腺泡状、胚胎性及多形性三型。胚胎性好发于小于5岁的儿童,多见于头颈部和泌尿系统;腺泡状多见于青少年好发于下肢,其次为躯干和头颈部;多形性以成年人和老年人多见,尤以下肢大腿肌肉

参考文献

- [1] 向双,陈继,吴海燕,等.胚胎性横纹肌肉瘤超声表现 1 例[J].临床超声医学杂志,2015,17(9):634
- [2] 陈晓宇,魏锐利,刘新华,等.眼眶内肿瘤超声诊断及临床意义[J].中国超声医学杂志,2003,19(9):651-655.

(收稿日期:2016-06-25)

作者单位:710100 陕西省西安市长安区医院超声科(张阳);西安交通大学第一附属医院超声科(阮骊韬、赵巧玲)

通信作者:赵巧玲,Email:imagingzhaoql@126.com