

一种载磁微泡的超声/磁共振成像研究

钟庆芳 祝新 郭各朴 章东

摘要 **目的** 制备一种超声/MRI双模态载磁微泡,并通过超声成像和MRI成像探讨载磁量对成像效果的影响。**方法** 利用声振法将超顺磁纳米颗粒(SPIO)装载在微泡包膜上,制备超声/MRI双模态造影剂,并根据SPIO的浓度将样品分成I~IV组(分别为0、19.6 $\mu\text{g/ml}$ 、114.7 $\mu\text{g/ml}$ 、292.0 $\mu\text{g/ml}$),通过透射电子显微镜和紫外可见分光光度仪测量微泡基本特征和磁浓度,应用体外超声和体外MRI检测成像效果。**结果** 透射电镜技术证实SPIO粒子成功附着,有较好的分散性,粒径呈正态分布,中心粒径约12 nm。体外超声成像显示除气水的声像图表现为无光团,未检测到回声信号;I~IV组随着微泡浓度的增加,回声显著增强,超声图像表现为光团强度增加。I~IV组微泡的组织对比度分别为(5.89 \pm 0.70)dB、(8.97 \pm 0.80)dB、(11.04 \pm 0.72)dB及(12.84 \pm 0.56)dB。体外MRI成像显示,T1模式下,随着微泡中磁性粒子浓度增加,其亮度增加;而在T2模式下,随着微泡中磁性粒子浓度增加,T2弛豫时间减小,亮度变弱;双模态微泡溶液和SPIO纳米粒子水溶液的纵向弛豫率分别为7.23 $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ 和5.43 $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$,横向弛豫率分别为193.62 $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ 和101.55 $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ 。**结论** 载磁造影剂可以增强超声/MRI成像,可为优化多模态微泡造影剂的制备提供实验指导。

关键词 造影剂;多功能;微泡;超顺磁纳米颗粒;超声成像;磁共振成像

[中图分类号]R445.1

[文献标识码]A

Research on a dual-mode contrast agent with magnetic microbubbles by ultrasound and MRI

ZHONG Qingfang, ZHU Xin, GUO Gepu, ZHANG Dong

Department of Radiology, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

ABSTRACT Objective To prepare an ultrasound/MRI dual-mode magnetic microbubble, and to evaluate the effect of image function of this super paramagnetic iron oxide nanoparticles (SPIO) with different magnetic concentration by ultrasound and MRI. **Methods** SPIO were loaded on the microbubble capsule by acoustic vibration method to prepare ultrasound/MRI bimodal contrast agent. According to different SPIO concentration, the samples were grouped as I~IV group (corresponding to 0, 19.6 $\mu\text{g/ml}$, 114.7 $\mu\text{g/ml}$, 292.0 $\mu\text{g/ml}$, respectively), the physical characterizations were examined by transmission electron microscopy and UV-visible light absorption spectrum. The effect of image function with different SPIO concentration was further investigated by US/MRI. **Results** The SPIOs were successfully loaded on the albumin microbubbles, and had good dispersibility with a central particle size of 12 nm, confirmed with transmission electron microscopy technology. No hyperechoic region was observed with the degassed water in ultrasound imaging. While hyperechoic regions can be clearly observed in the testing chamber with microbubble, and the higher concentration of SPIO, the higher intensity of echo were observed in I~IV groups. The contrast-to-tissue ratio were (5.89 \pm 0.70) dB, (8.97 \pm 0.80) dB, (11.04 \pm 0.72) dB and (12.84 \pm 0.56) dB in group I~IV, respectively. MRI showed that in T1 mode, the brightness of microbubbles increased with the concentration of magnetic particles in microbubbles increased. In T2 mode, with the concentration of magnetic particles in microbubbles increased, T2 relaxation time decreased, and brightness decreased. The longitudinal relaxation rates of bimodal microbubble solution and SPIO nanoparticle solution were 7.23 $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ and 5.43 $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$, and the transverse relaxation rates were 193.62 $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ and 101.55 $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$, respectively. **Conclusion** Magnetic contrast agent can enhance ultrasound/MRI imaging and provide experimental guidance for optimizing the preparation of multi-mode microbubble contrast agent.

KEY WORDS Contrast agent; Multifunction, microbubble; Super paramagnetic iron oxide nanoparticles; Ultrasonic imaging; MRI

基金项目:国家自然科学基金项目(11874216、11674173)

作者单位:210029 南京市,江苏省中医院放射科(钟庆芳、祝新);南京大学声学研究所(郭各朴、章东)

通讯作者:章东, Email: dzhang@nju.edu.cn

新型医学影像技术的研发是当前精准医疗研究的热点,其通过多种成像技术形成多模态成像系统^[1]。目前临床工作中发现单一模式的成像技术虽各有优势但也存在缺点,如超声成像实时性好但分辨率较低,MRI成像分辨率高但实时性差,CT成像分辨率好但有明显伪迹。多模态成像技术结合多种成像模式的优势,提高了诊断的精准性和安全性。在多模态成像技术研究中,超声与MRI的组合尤为重要^[2-3]。本实验将超声造影剂白蛋白包膜微泡与MRI造影剂SPIO纳米颗粒组合制备一种双模态造影剂,并通过体外超声成像和MRI成像定量分析研究SPIO的嵌入浓度对微泡造影剂功能的影响,为优化双模态微泡造影剂的制备方法提供实验指导。

材料与方 法

一、实验试剂

六水氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、七水硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、氨水、油酸、磷酸缓冲液、75%乙醇、丙酮、己烷、四甲基氢氧化铵、盐酸、蔗糖和牛血清白蛋白、丙烯酰胺、过硫酸铵、甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺、二巯基丁二酸(上述制剂均为国药集团化学试剂有限公司生产);二巯基琥珀酸(上海谱振生物科技有限公司);全氟丙烷气体(南京特种气体有限公司提供)。本实验所用的水均为由EASYpure RoDi超纯水纯化系统制得的电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 的去离子水。

二、实验仪器

双模态造影剂微泡的制备及其特性检测使用的仪器:微量注射泵(KDS270, KD Scientific, 美国),超声波细胞粉碎仪(VCX750, Sonics, 美国),离心机(Biofuge Primo R, Thermo Scientific, 美国),透射电子显微镜(JEM-2100F, JEOL, 日本),紫外可见分光光度计(UV3600, Tokyo, 日本)。体外超声成像使用Terason T 3000便携式彩色多普勒超声诊断仪(Teratech Corporation, 美国),5C2A探头,频率2~5 MHz。体外MRI成像使用3 T磁共振成像仪(Magnetom Trio, Siemens, 德国)。

三、实验方法

1. 磁性纳米粒子的制备:①制备油酸修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子。在水浴(70°C)中,将含有 0.5 mol/L 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 1.0 mol/L 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 100 ml 在氮气环境中以 1800 r/min 的速度搅拌,其间添加氨水使其pH值为 11.0 后反应 5 min ;然后加入 10 ml 油酸溶液搅拌 30 min ,在 85°C 的温度下反应 60 min 后冷却

至 30°C ;通过磁铁采集油酸修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子后洗涤4~5次。②制备单分散水溶性的SPIO溶液。将油酸修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子 240 mg 和二巯基丁二酸试剂 120 mg 溶解于体积比为1:1的己烷/丙酮的混合溶液 120 ml 中,通过表面交换反应,在 60°C 下机械搅拌 240 min 。③制备SPIO:在磁分离过程中收集SPIO,用去离子水洗涤4~5次后真空干燥;对浓度为 4 mg/ml 的SPIO溶液声震振 60 min ,使其均匀分散;调整pH值为 7.4 ,用薄膜(厚度 $0.22 \mu\text{m}$)过滤过量的离子和杂质。

2. 双模态造影剂微泡的制备:本实验采用声振法制备载磁的白蛋白包膜包裹全氟化碳气体的微泡^[4]。先将质量比为60%的蔗糖溶液和质量比为10%的牛血清白蛋白溶液按体积比1:1混合搅拌,添加SPIO溶液,并在全氟化碳环境下搅拌 30 min ,静置 12 h 。然后使用微量注射泵以 7.5 ml/min 的速度向上述混合溶液(10 ml)通入全氟丙烷气体约 2 min 。再利用 20 kHz 的超声粉碎仪(300 W ,开关比为3:1)作用 120 s ,并在声振过程中通过微量注射泵以 7.5 ml/min 的速度向溶液连续充气,最后离心洗涤2~3次,去除游离的SPIO,静置 2 h 后取分界面处试样备用。制备流程见图1。

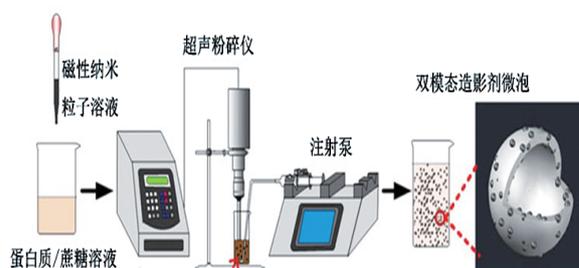


图1 双模态造影剂微泡的制备流程图

3. 检测双模态造影剂微泡的基本特征:取稀释500倍的样品 $10 \mu\text{l}$ 置于碳膜覆盖的铜网上,在 4°C 下用2.5%的戊二醛溶液固定 120 min ,然后用磷酸缓冲液清洗2~3次;采用浓度为100%、90%、80%、60%、50%和33%的乙醇进行梯度脱水,每种浓度下脱水2次,每次 20 min ,自然晾干后观察微泡的基本特征(加速电压为 200 kV)。

4. 检测SPIO的有效浓度:将不同含量SPIO与 10 ml 蔗糖蛋白溶液混合,采用超声波细胞粉碎仪制备4组不同载磁浓度的造影剂微泡样品, I~IV组SPIO浓度分别为 0 、 $19.6 \mu\text{g/ml}$ 、 $114.7 \mu\text{g/ml}$ 、 $292.0 \mu\text{g/ml}$ 。将过量浓盐酸加入 1 ml 双模态微泡造影剂样品中,使 Fe_3O_4 粒子转化为 Fe^{3+} ,再用波长为 510 nm 的紫外可见光光度计检测铁含量,对比含有不同浓度铁元素的标准曲线,即得到SPIO含量。

5. 体外超声成像: 本实验采用的成像模式为B型超声诊断模式, 机械指数0.7。制备聚丙烯酰胺生物凝胶模拟人体组织, 过程如下: 配制基础溶液(0.3 g 甲叉双丙烯酰胺、0.05 g 过硫酸铵、10 g 丙烯酰胺和 100 ml 除气水), 加入四甲基乙二胺 0.2 ml^[5]。为了进行成像观察, 本实验在 10 cm×10 cm×10 cm 的模具中心处设置了一大小为 3 cm×3 cm×3 cm 的用于检测样品成像的样品腔。将稀释 30 倍的微泡造影剂注入样品腔, 计算感兴趣区域平均灰度值, 得到微泡样品与生物凝胶的成像对比度。

6. 体外 MRI 成像: 将 1 ml 造影剂样品稀释 15 倍后置于 5 ml 的离心管内进行 MRI 成像; 为了进行对比, 本实验使用相同浓度的纯净 SPIO 溶液同时进行 MRI 成像, 分别在 T1 和 T2 模式下得到纵向弛豫率(r1)和横向弛豫率(r2)。

四、统计学处理

应用 Origin V 9.0 软件对弛豫率与 SPIO 纳米粒子浓度的关系进行线性拟合, 分析其斜率与误差。

结 果

一、双模态造影剂微泡的基本特征和 SPIO 的有效浓度

SPIO 粒子有较好的分散性, 无明显的六角结构, 粒径呈正态分布, 中心直径约 12 nm(图2)。透射电镜显示微泡包膜平滑, 可见纳米级的黑色小点, 其大小与 SPIO 粒子相当(图3)。I ~IV 组微泡样品中 SPIO 纳米粒子的有效含量和有效浓度见表 1; 粒径分布情况见图 4。

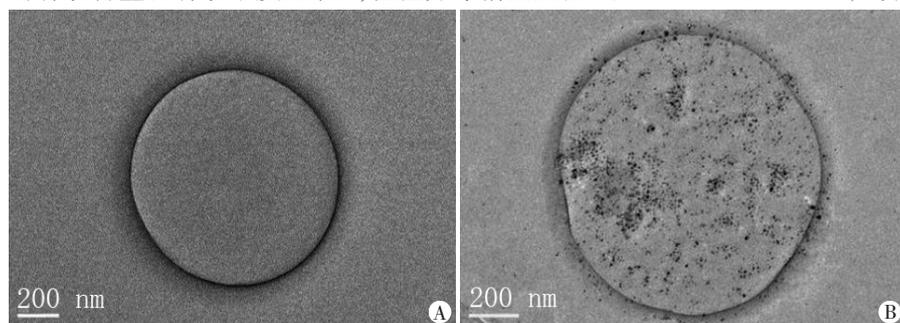


图3 功能性包膜造影剂微泡的透射电镜图

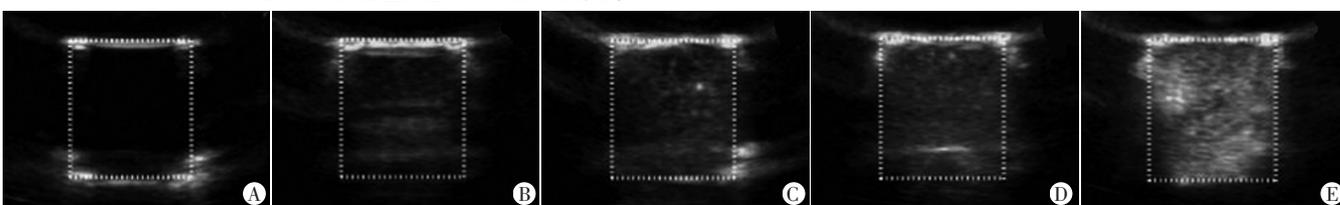


图5 除气水和不同粒子浓度双模态造影剂的超声成像图

二、体外超声成像

除气水的超声图像表现为无光团, 未检测到回声信号; I ~IV 组随着微泡浓度的增加, 回声显著增强, 超声图像表现为光团强度增加(图5)。进一步对图像的灰度值进行定量分析, 结果显示 I ~IV 组造影剂微泡的组织对比度分别为 (5.89±0.70)dB、(8.97±0.80)dB、(11.04±0.72)dB 及 (12.84±0.56)dB。

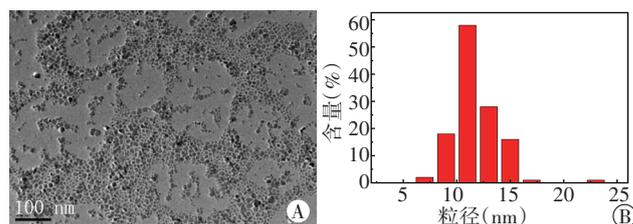


图2 SPIO 粒子的透射电镜图(A)和粒径分布图(B)

表1 造影剂微泡中 SPIO 粒子的有效含量和有效浓度

| 组别 | 有效含量(mg) | 有效浓度(μg/ml) |
|-------|----------|-------------|
| I 组 | 0 | 0 |
| II 组 | 0.2 | 19.6 |
| III 组 | 1.2 | 114.7 |
| IV 组 | 3.2 | 292.0 |

三、体外 MRI 成像

MRI 成像显示, T1 模式下, 随着造影剂微泡中磁性粒子浓度增加, 其亮度增加; 而在 T2 模式下, 随着造影剂微泡中磁性粒子浓度增加, T2 弛豫时间减小, 样品亮度变弱(图6)。进一步计算双模态微泡与 SPIO 粒子水溶液的 r1、r2 与磁性浓度的关系(图7), 可见双模态微泡溶液和 SPIO 纳米粒子水溶液的 r1 分别为 7.23 s⁻¹·mM⁻¹ 和 5.43 s⁻¹·mM⁻¹, r2 分别为 193.62 s⁻¹·mM⁻¹ 和 101.55 s⁻¹·mM⁻¹。

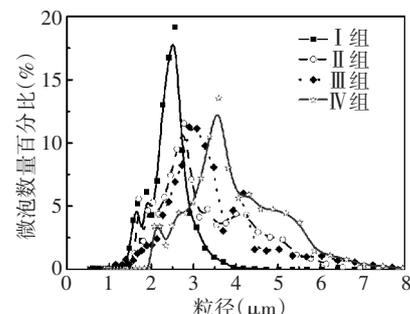
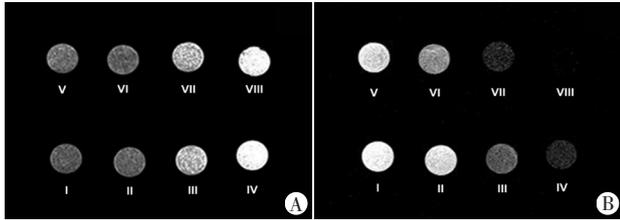


图4 载有不同浓度 SPIO 粒子的造影剂微泡粒径分布图



A: T1模式; B: T2模式; I~IV分别为包含浓度0、19.6 μg/ml、114.7 μg/ml、292.0 μg/ml的SPIO纳米颗粒的水溶液, V~VIII分别为对应浓度的载有SPIO纳米颗粒的功能性包膜造影剂微泡

图6 双模态造影剂微泡与SPIO纳米粒子水溶液的MRI成像图

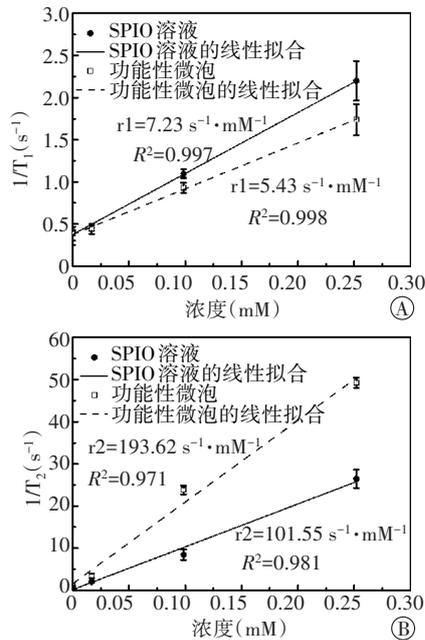


图7 双模态微泡与SPIO水溶液r1(A)和r2(B)与磁性浓度的关系

讨 论

本实验结果显示SPIO粒子粒径无明显的六角结构,其原因主要是SPIO溶液在进行透射电镜成像定征时,不容易在水挥发过程中形成六角结构。随着SPIO粒子的增加,SPIO和蔗糖蛋白溶液混合液的表面张力增大,导致微泡直径变大,与Xu等^[6]研究结论一致。

造影剂微泡在超声成像中的应用主要取决于其回声特性。本实验在样品腔中注入微泡后,回声显著增强,且回声亮度与SPIO粒子浓度呈正相关,表明SPIO粒子可增强超声成像,且组织对比度也逐渐增大。另外,多模态造影剂微泡的声散射特性与微泡包膜的粘弹系数有直接关系。Gorce和Schneider^[7]利用等厚度CT模型分析声诺维微泡的弹性特征,其弹性不随微泡大小变化。Doinikov等^[8]基于零厚度包膜气泡模型证明了白蛋白微泡造影剂的粘弹系数随气泡粒径的增大而增加,但该变化与多个未知参数的不确定

性相关。Chen等^[9]利用原子力显微镜测量脂膜微气泡的弹性,发现其弹性随粒径增大按指数规律减小。因此,随着磁性浓度的增大,微泡粒径增大,散射增强,有利于其在超声诊断中的应用。

利用磁性纳米粒子提高MRI图像质量主要是通过SPIO纳米粒子改善弛豫特征,以达到增强对比度的目的。本实验结果显示双模态造影剂微泡与SPIO粒子水溶液在T1模式时无明显差别,而在T2模式时,该双模态造影剂具有较好的MRI成像结果。另外,由于SPIO粒子汇聚会增强磁反应,因此双模态造影剂微泡的r2约为SPIO粒子水溶液的2倍,其r2/r1是SPIO粒子水溶液的2.5倍,说明该双模态造影剂更适合T2模式成像。

综上所述,本实验将SPIO装载在微泡包膜上来制备一种超声/MRI双模态造影剂,应用体外超声成像和MRI成像验证了该造影剂的双模态成像功能,且SPIO嵌入浓度的增加可以增强超声/MRI成像,对于恶性肿瘤的诊疗具有重要意义。但本实验使用的白蛋白微泡在循环中持续时间较短,今后的研究可尝试使用其他材质的膜材料以进一步优化多模态微泡造影剂的制备。

参考文献

- [1] Chang SF, Si T, Zhang SW, et al. Ultrasound mediated destruction of multifunctional microbubbles for image guided delivery of oxygen and drugs[J]. Ultrason Sonochem, 2016, 28(1): 31-38.
- [2] Sun Y, Zhu YK, Huang C, et al. Magnetite loaded Polypeptide-PLGA multifunctional microbubbles for dual-mode US / MR imaging [J]. 2016, 11(2): 146-153.
- [3] Tang K, Niu CC, Xu Y, et al. Phase-shifted paclitaxel-loaded multifunctional contrast agent for US/MR imaging and synergistic hyperthermal/chemotherapy of metastasis in lymph nodes [J]. RSC Adv, 2018, 8(10): 5407-5419.
- [4] Liu YL, Ai KL, Liu JH, et al. A high-performance ytterbium-based nanoparticulate contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging [J]. Angew Chem Int Ed, 2012, 51(6): 1437-1442.
- [5] Chitnis P, Koppolu S, Mamou J, et al. Influence of shell properties on high-frequency ultrasound imaging and drug delivery using polymer-shelled microbubbles [J]. IEEE Trans Ultra Ferroelec Freq Control, 2013, 60(1): 53-64.
- [6] Xu Q, Nakajima M, Ichikawa S, et al. Effects of surfactant and electrolyte concentrations on bubble formation and stabilization [J]. J Colloid Interface Sci, 2009, 332(1): 208-214.
- [7] Gorce JM, Schneider M. Influence of bubble size distribution on the echogenicity of ultrasound contrast agents: a study of SonoVue (TM) [J]. Invest Radiol, 2000, 35(11): 661-671.
- [8] Doinikov AA, Haac JF, Dayton PA. Modeling of nonlinear viscous stress in encapsulating shells of lipid-coated contrast agent

microbubbles[J].Ultrasonics, 2009, 49(2): 269-275.

IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 2013, 60 (3) : 524-534.

[9] Chen CC, Wu SY, Finan JD, et al. An experimental study on the stiffness of size-isolated microbubbles using atomic force microscopy [J].

(收稿日期:2019-06-30)

· 病例报道 ·

Ultrasonic manifestations of solid pseudopapillary tumor of pancreas in child: a case report

小儿胰腺实性假乳头状瘤超声表现 1 例

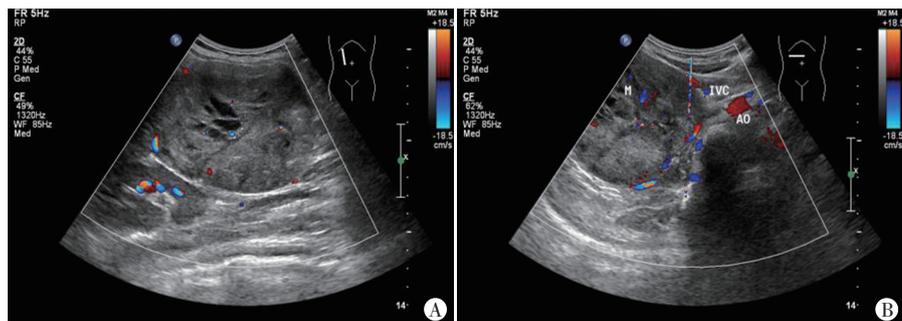
伏晨卉 张彤迪 王 一 王乐乐 王文刚

[中图法分类号]R445.1

[文献标识码]B

患儿男,10岁,发现腹部包块半年入院。体格检查:右上腹饱满,未见胃肠型及蠕动波;腹软,无压痛、反跳痛、肌紧张,墨菲征阴性。右上腹可触及一包块,大小约10.0 cm×8.0 cm×7.0 cm,边界清晰,表面光滑,可推动,肝、脾肋下未触及;腹部叩诊呈鼓音,移动浊音阴性;可闻及肠鸣音。实验室检查:血常规、生化全项、肿瘤四项均未见明显异常。超声检查:胰头区显示不清,胰体、胰尾回声均匀,主胰管无扩张;右中上腹探及一大约10.7 cm×8.5 cm×7.4 cm不均质低回声肿块,边界尚清,内可探及小片状液性无回声区,该肿块与右肾中下极相邻,对肾有轻度压迫(图1A),肿块左侧紧邻下腔静脉,距腹主动脉约1.4 cm(图1B),左后方紧邻椎体,右上方紧邻肝脏;CDFI示实性回声

内可探及点线状血流信号;脉冲多普勒:内可探及动脉血流频谱;腹腔未探及液性无回声区。超声提示:右中上腹实性占位性病变。CT检查:腹主动脉右旁、肝脏下方、右肾上方见一肿块状混杂密度影,右肾动脉、门静脉及下腔静脉受压,病变与胰头及十二指肠关系密切,考虑恶性病变。行剖腹探查术,术中见:胰头巨大肿物,大小约10.0 cm×15.0 cm×16.0 cm,呈圆形,有包膜,肿物内为烂鱼肉样组织,压迫十二指肠、门静脉及肠系膜上静脉,同时向上顶起横结肠并与其系膜压迫粘连。胆总管未受侵,无扩张,未见明显浸润生长及转移征象,但腹部见大量多发肿大淋巴结。病理诊断:胰腺实性假乳头瘤(胰头部),送检淋巴结均未见肿瘤累及(图2)。



A: 右中上腹纵切面; B: 右中上腹横切面。M: 肿块; IVC: 下腔静脉; AO: 腹主动脉

图1 胰腺实性假乳头状瘤超声图像

讨论:胰腺实性假乳头状瘤是一种少见的胰腺肿瘤,发病率仅占胰腺肿瘤的1.3%~2.7%,好发于年轻女性^[1]。该肿瘤可发生于胰腺各部位,胰头部位、尾部较多见,多向胰腺外生长,绝大多数有包膜,肿瘤体积较小者以实性多见,较大者多为囊实性,可伴周围血管移位,一般不引起胰管、胆管扩张。CDFI可探及瘤内少量血流信号,少数可探及丰富血流信号。本例患儿年龄小且为男性,较为罕见,肿瘤体积大,且胰头区组织结构复杂,超声不易定位,但可通过其与周围脏器关系做出准确判断,对临床手术治疗有明确的指导作用。建议超声检查时若发

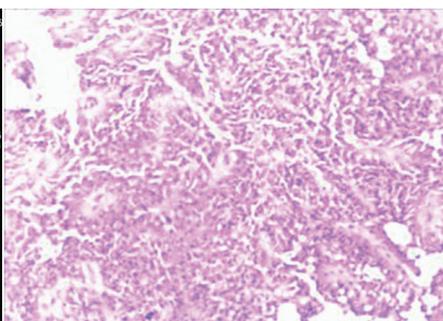


图2 胰腺实性假乳头状瘤病理图(HE染色, ×100)

现患儿胰头区边界清晰的囊实性外生性肿块,且肿块内血流信号不丰富,应考虑本病。该病需与胰腺囊腺瘤、胰母细胞瘤、胰腺假性囊肿及腹膜后肿瘤等鉴别诊断。

参考文献

[1] Xu Y, Zhao G, Pu N, et al. One hundred twenty-one resected solid pseudopapillary tumors of the pancreas: an 8-year single-institution experience at Zhongshan Hospital, Shanghai, China [J]. Pancreas, 2017, 46(8): 1023-1028.

(收稿日期:2018-11-17)