

· 实验研究 ·

携 HMME-Gd 液态氟碳纳米粒造影剂的制备及体外双模态成像研究

罗远利 乔斌 曹进 袁勋 谢卓晏 杨安宇 胡兴华 周志益 王志刚 任建丽

摘要 **目的** 制备携血卟啉单甲醚-钆(HMME-Gd)的液态氟碳纳米粒(HMME-Gd-PFPNPs),观察其体外超声/MRI的成像效果。**方法** 以磷脂、胆固醇、HMME-Gd及全氟戊烷(PFP)为原料,采用薄膜水化法和乳化法制备HMME-Gd-PFPNPs。倒置光学显微镜和透射电子显微镜下观察其基本表征;粒径分析仪检测其粒径和表面电位;紫外分光光度计分析HMME-Gd的包封率;观察HMME-Gd-PFPNPs体外超声/MRI成像的效果。**结果** 成功制备HMME-Gd-PFPNPs,光镜和电镜下均表现为形态规则、大小均一的球形。HMME-Gd-PFPNPs平均粒径为 (250.27 ± 11.9) nm,平均电位为 (-26.17 ± 0.45) mV, HMME-Gd的包封率为 $(84.70 \pm 0.35)\%$ 。在低强度聚焦超声辐照下,随着激发强度增加,体外超声成像信号显著增强。同时纳米粒的体外MRI成像效果具有HMME-Gd-PFPNPs浓度依赖性。**结论** 成功制备了HMME-Gd-PFPNPs,其可用于体外超声/MRI双模态成像。

关键词 纳米粒;造影剂;超声成像;磁共振成像

[中图法分类号]R445.1;TB383

[文献标识码]A

Preparation of HMME-Gd liquid fluorocarbon nanoparticle contrast agent and study on dual-mode imaging in vitro

LUO Yuanli, QIAO Bin, CAO Jin, YUAN Xun, XIE Zhuoyan, YANG Anyu, HU Xinghua, ZHOU Zhiyi,

WANG Zhigang, REN Jianli

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

ABSTRACT **Objective** To prepare liquid fluorocarbon nanoparticles carrying HMME-Gd (HMME-Gd-PFPNPs), and to observe their ultrasound (US)/MRI imaging in vitro. **Methods** Lipids, cholesterol, HMME-Gd and perfluoropentane (PFP) were used as raw materials to prepare nanoparticles by membrane hydration and emulsification. The general physical properties were observed by optical microscope and transmission electron microscope. The size and surface potential were measured by particle size analyzer. The encapsulation efficiency of HMME-Gd was determined by UV-Vis. The effect of US/MRI in vitro of HMME-Gd-PFPNPs was observed. **Results** HMME-Gd-PFPNPs were successfully prepared. Under optical microscope and transmission electron microscope, it was spherical with regular shape and uniform size. The size of HMME-Gd-PFPNPs was (250.27 ± 11.9) nm, the surface potential was (-26.17 ± 0.45) mV, and the encapsulation efficiency of HMME-Gd was $(84.70 \pm 0.35)\%$. Under low intensity focused ultrasound (LIFU) irradiation, the US imaging signal was significantly enhanced in vitro with the intensity of LIFU increased. At the same time, the MRI effect of nanoparticles in vitro was concentration dependent on HMME-Gd-PFPNPs. **Conclusion** HMME-Gd-PFPNPs is successfully prepared, and it can be used for US/MRI dual-model imaging in vitro.

KEY WORDS Nanoparticle; Contrast agent; Ultrasound imaging; Magnetic resonance imaging

基金项目:国家自然科学基金项目(81873901);重庆市自然科学基金项目(cstc2019jcyj-zdxmX0020);宽仁骨干人才项目(KR2019G001);重庆市渝中区基础研究与前沿探索项目(20190112)

作者单位:400010 重庆市,重庆医科大学附属第二医院超声科(罗远利、乔斌、曹进、谢卓晏、杨安宇、任建丽),眼科(袁勋),神经外科(胡兴华);中国科学院大学重庆医院 重庆市人民医院全科医学科(周志益);重庆市超声影像学研究所(王志刚)

通讯作者:任建丽, Email: renjianli_1977@163.com

多模态分子成像是影像学发展的方向,是实现精准诊疗的必要手段。其可整合各种分子成像技术,弥补单一成像方式的局限性^[1-3]。超声分子成像是分子影像学的重要分支,因其有成本低、安全性好、可对病灶组织进行实时、便捷显影等优点备受临床医师青睐。传统的微米级超声造影剂虽然可有效增强超声信号,但由于其直径远大于血管内皮间隙,仅能达到血池显像。而液气相变型造影剂可穿过血管内皮间隙,可能成为理想的超声造影剂^[4]。由于超声成像受穿透深度影响较大,而 MRI 不受穿透深度限制,且对软组织有更好的成像效果,因此制备超声/MRI 双模态成像造影剂具有重要临床意义。钆剂是目前临床最常用的 MRI 造影剂之一,钆离子(Gd^{3+})的 4f 层有 7 个未成对电子,具有很强的顺磁特性,可极大地增强肿瘤组织的 T1 弛豫率^[5]。将 Gd^{3+} 整合到血卟啉单甲醚可减轻其毒性,增加其包封率,因此血卟啉单甲醚-钆(HMME-Gd)有成为 MRI 造影剂的潜力^[6-7]。研究^[8]证明,在低强度聚焦超声(LIFU)的触发或温度升高的情况下,全氟戊烷(PFP)可由液态变为氟碳气态,增强超声成像信号。本实验拟采用高生物安全性的脂质体包裹 HMME-Gd 和 PFP,构建一种超声/MRI 双模态成像的纳米级造影剂即携带 HMME-Gd 的液态氟碳纳米粒(HMME-Gd-PFPNPs),并观察其体外超声/MRI 双模态成像的效果,为肿瘤的精准治疗提供更多影像学依据,同时为新型超声造影剂的设计提供新思路。

材料与方法

一、主要实验材料

二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)、胆固醇(CH)均由西安瑞禧生物科技有限公司生产;HMME-Gd(麦迪鑫生物科技有限公司);PFP(Strem Chemicals 公司);琼脂糖(Life Technologies 公司);二甲亚砜(DMSO)、三氯甲烷均由重庆川东化工(集团)有限公司生产。

二、主要实验仪器

倒置光学显微镜(Olympus IX71,日本 Olympus 公司);粒径分析仪(Zeta-sizer 3000HS,英国 Malvern 有限公司);透射电子显微镜(Hitachi H-7600,日本 Hitachi 公司);紫外分光光度计(SHIMADZU UV-2550,苏州雨泽仪器有限公司);声振仪(Sonics & Materials,美国 Sonic 公司);彩色多普勒超声诊断仪

(MyLab 90,意大利百胜公司);3.0 T 磁共振成像仪(Verio-40690,西门子医疗系统有限公司);LIFU 超声仪(重庆医科大学超声影像学研究所);旋转蒸发仪(RE-52A,上海亚荣生化仪器厂)。

三、主要实验方法

1.HMME-Gd-PFPNPs 的制备:称取 10 mg DPPC、4 mg DSPE、3 mg DPPG、3 mg CH、2 mg HMME-Gd,充分溶解于 10 ml 三氯甲烷中,50℃水浴条件下,用旋转蒸发仪工作 1 h 使溶液形成脂质薄膜,并用 4 ml PBS 洗下脂质薄膜。冰浴条件下,加入 400 μ l PFP,采用功率 100 W 的声振仪声振 6 min。再用低温离心机洗涤 3 次(8000 r/min, 5 min, 4℃),最后用 4 ml PBS 重悬,获得 HMME-Gd-PFPNPs。制备过程全程避光。

2.HMME-Gd-PFPNPs 基本性质检测:采用倒置光学显微镜观察 HMME-Gd-PFPNPs 的大小及分散性;将 125.00 μ g/ml 的 HMME-Gd-PFPNPs 滴于铜网上,风干成膜,采用透射电子显微镜观察 HMME-Gd-PFPNPs 的表面形态;采用粒径分析仪测量 HMME-Gd-PFPNPs 的大小、分布及电位。

3.HMME-Gd 包封率检测:取 1 mg HMME-Gd 溶于 DMSO 中,并用 DMSO 将溶液稀释成不同浓度(60.00 μ g/ml、30.00 μ g/ml、15.00 μ g/ml、7.50 μ g/ml、3.75 μ g/ml)。采用紫外分光光度计检测各浓度溶液的紫外全波长,用吸光度($A_{411\text{nm}}$)绘制标准曲线;经低温离心机洗涤后保留上清液,采用紫外分光光度计检测上清液在 $A_{411\text{nm}}$ 的吸光度,根据标准曲线计算上清液中 HMME-Gd 的含量,计算包封率,包封率=[(HMME-Gd 投入量-上清液中 HMME-Gd 含量)/HMME-Gd 投入量] $\times$ 100%。

4.体外超声成像:将 250.00 μ g/ml 的 HMME-Gd-PFPNPs 通过不同功率[0 W/cm²(对照组)、0.8 W/cm²、1.6 W/cm²、2.4 W/cm²、3.2 W/cm²]LIFU 辐照 1 min 后,置于琼脂糖凝胶模型中,使用彩色多普勒超声诊断仪观察 B 模式(B-mode)及造影模式(CEUS-mode)超声图像。并采用 DFY 组织灰度定量软件检测 B-mode 及 CEUS-mode 超声信号的灰度值。

5.体外 MRI 成像:采用 PBS 将 HMME-Gd-PFPNPs 稀释为不同浓度(31.25 μ g/ml、62.50 μ g/ml、125.00 μ g/ml、250.00 μ g/ml、500.00 μ g/ml),以 PBS 为对照组,分别置于 2 ml EP 管内,使用 3.0 T 磁共振成像仪采集 T1 加权图像。

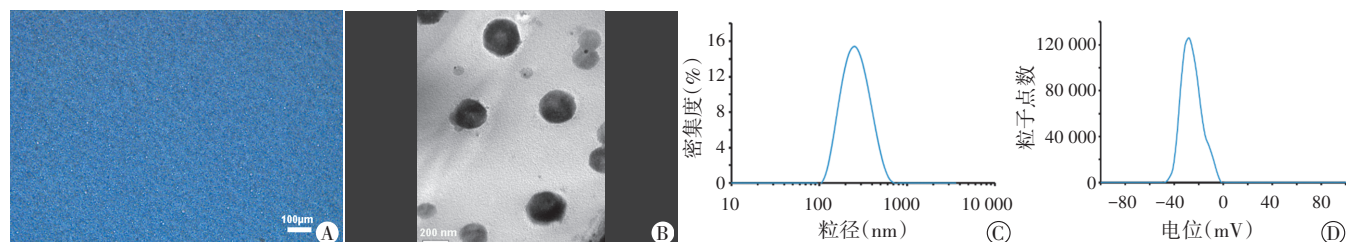
四、统计学处理

应用 GraphPad Prism 8.0.2 统计软件,计量资料以

$\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,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、HMME-Gd-PFPNPs 的基本性质



A:倒置光学显微镜下观($\times 100$);B:透射电子显微镜下观($\times 20\,000$);C:粒径分布图;D:电位分布图

图1 HMME-Gd-PFPNPs的基本性质

二、HMME-Gd 的包封率

HMME-Gd在波长为411 nm处出现最高峰(图2);将波长设定在411 nm,选择吸光度为0.2~0.8的数值绘制标准曲线(图3),计算出HMME-Gd的包封率为 $(84.70 \pm 0.35)\%$ 。

三、体外超声成像

随着LIFU功率增加,B-mode及CEUS-mode的回声均逐渐增强,且各实验组回声均高于对照组,见图4;B-mode及CEUS-mode超声图像的灰度值也逐渐增加,与对照组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见图5。

四、体外MRI成像

随着HMME-Gd-PFPNPs浓度增加, T_1 加权图像信号逐渐增强。见图6。

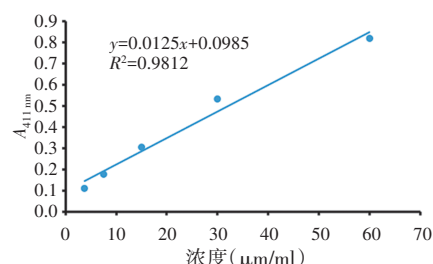


图2 不同浓度HMME-Gd的紫外吸收光谱

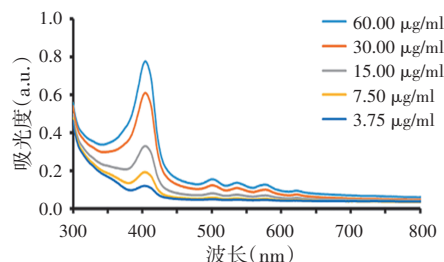
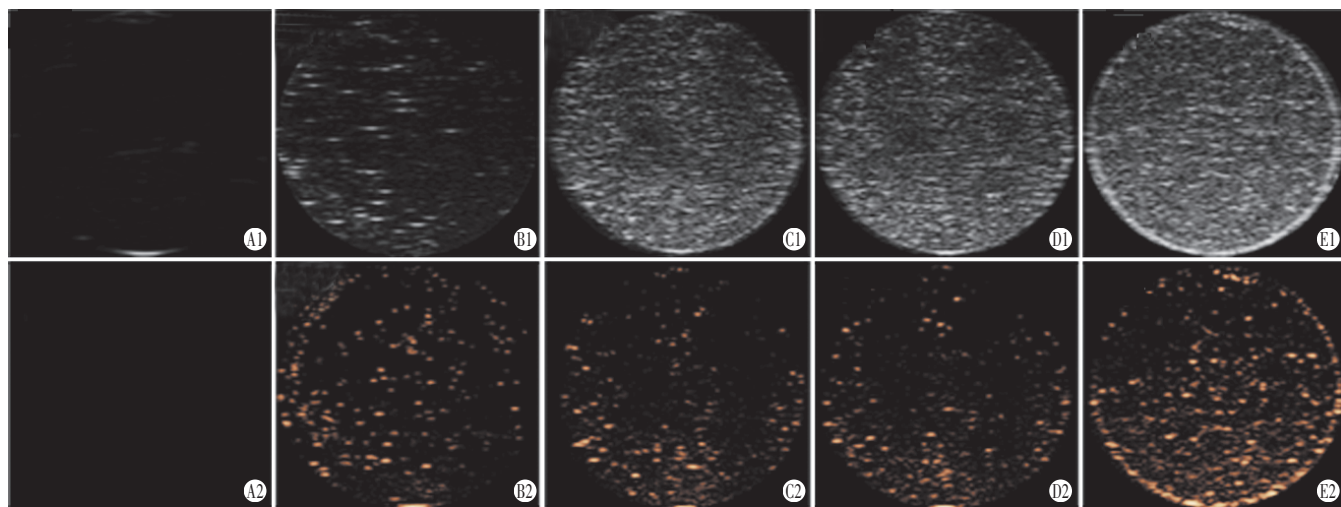


图3 不同浓度HMME-Gd的紫外吸收标准曲线图



A1~E1: B-mode 超声图像; A2~E2: CEUS-mode 超声图像; A1、A2: 0 W/cm²; B1、B2: 0.8 W/cm²; C1、C2: 1.6 W/cm²; D1、D2: 2.4 W/cm²; E1、E2: 3.2 W/cm²

图4 不同功率LIFU辐照后HMME-Gd-PFPNPs的体外超声成像

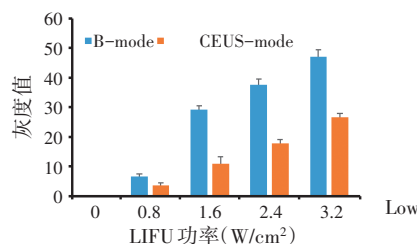
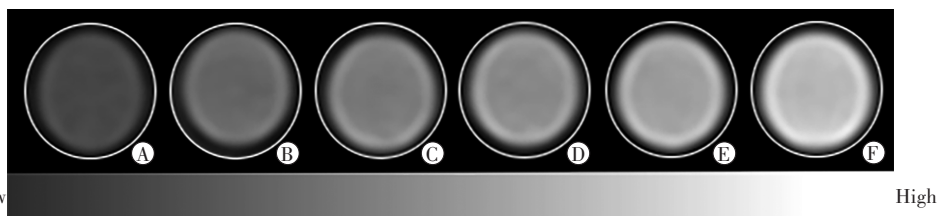


图5 不同功率LIFU辐照后B-mode及CEUS-mode超声图像的灰度值定量分析



A: PBS(对照组); B: 31.25 $\mu\text{g/ml}$; C: 62.50 $\mu\text{g/ml}$; D: 125.00 $\mu\text{g/ml}$; E: 250.00 $\mu\text{g/ml}$; F: 500.00 $\mu\text{g/ml}$

图6 对照组及不同浓度HMME-Gd-PFPNPs体外T1加权MRI成像图

讨论

本实验在现有分子影像探针的基础上应用生物相容性较好的脂质体^[9]作为壳膜材料,包裹PFP和HMME-Gd,利用薄膜水化法、乳化法制备了可进行超声/MRI双模态成像的纳米粒HMME-Gd-PFPNPs。脂质体^[10]的生物安全性良好,制备成纳米粒之后,由于粒径较小,表面积增大,可显著增加细胞对其的摄取,同时保证纳米粒在体内不会对正常组织造成损害。血卟啉单甲醚(HMME)作为光敏剂,具有成分明确、结构简单、光敏化作用强、在生物体清除速度快等特点^[11-12]。目前,卟啉已广泛应用于医疗行业各方面,金属离子的掺入使卟啉在医学影像学展现出了可观的发展前景^[13]。Mouraviev等^[14]成功研制了掺入锰离子的卟啉,发现其可有效增强前列腺肿瘤的MRI成像;Zheng等^[15]发现锰卟啉可通过MRI信号的变化来检测温度的细微变化。但过量的锰离子可对人体中枢神经系统产生一定的副作用,这也是临床上不采用锰离子作为MRI造影剂的原因之一。因此,本实验选用亲和性较强的HMME螯合Gd³⁺,将其包载在脂质体的磷脂双分子层之间,凭借脂质类物质对肿瘤细胞的亲和力,使HMME-Gd在肿瘤区域大量积聚,并实现T1加权MRI成像,在肿瘤的诊断方面有广泛的应用前景。而包载在HMME-Gd-PFPNPs内核的PFP在常温下为液态,可在LIFU辐照后转变为气态,促使纳米粒逐渐膨胀实现增强超声成像^[16],且脂质体碎片也无需生物降解。因此,将HMME-Gd和PFP包裹进脂质体内制备成的纳米探针生物安全性高,有望作为一种双模态造影剂应用于临床。

本实验对HMME-Gd-PFPNPs的物理性质进行检测,发现HMME-Gd-PFPNPs呈棕褐色,颜色均匀,未见游离相。HMME-Gd-PFPNPs在光镜下呈大小均一、形态规则及较好的分散性;电镜下呈250 nm左右的类圆形。粒径分析仪测定其平均粒径为(250.27±11.9) nm。体外超声成像显示,随LIFU功率的增加,B-mode及CEUS-mode超声图像的回声呈逐渐增强趋势,而对照组(0 W/cm²)未显影;定量分析显示,与对照

组(0 W/cm²)比较,随着LIFU功率的增加,B-mode及CEUS-mode超声图像的灰度值也逐渐增加,且各实验组与对照组比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),表明HMME-Gd-PFPNPs成功包载了PFP,且在LIFU辐照下,由于超声的机械效应和热效应使纳米粒内部包裹的PFP发生液-气相变,从而达到增强B-mode及CEUS-mode成像的效果。本实验后期还利用3.0 T磁共振成像仪评价HMME-Gd-PFPNPs体外MRI成像效果,发现随HMME-Gd-PFPNPs浓度增加T1加权图像信号逐渐增强,而对照组(PBS)未见明显显影,进一步证实了HMME-Gd被成功包裹进入HMME-Gd-PFPNPs。

综上所述,本实验通过薄膜水化法、乳化法成功制备了包载HMME-Gd和PFP的纳米粒HMME-Gd-PFPNPs,其形态较规则、大小较均一,在体外的超声/MRI双模态显影效果均比较明显,表明HMME-Gd-PFPNPs具有超声/MRI双模态成像的能力。本实验HMME-Gd-PFPNPs主要依赖被动靶向(增强渗透滞留效应)聚集于肿瘤部位,后期实验可连接特异性配体(如肿瘤归巢穿膜肽)或天然细胞膜结构提高纳米粒主动靶向的能力,为下一步体内外肿瘤的精准诊疗提供新方向。

参考文献

- [1] Schillaci O, Urbano N. Digital PET/CT: a new intriguing chance for clinical nuclear medicine and personalized molecular imaging [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2019, 46(6): 1222-1225.
- [2] Siddique S, Chow JCL. Application of nanomaterials in biomedical imaging and cancer therapy [J]. Nanomaterials, 2020, 10(9): 1700.
- [3] Yamoah GG, Cao L, Wu CW, et al. Data curation for preclinical and clinical multimodal imaging studies [J]. Mol Imaging Biol, 2019, 21(6): 1034-1043.
- [4] 刘明珠, 张萍, 王志刚, 等. 携IR780碘化物液态氟碳纳米粒造影剂的制备及体外双模态成像[J]. 中国医学影像技术, 2018, 34(12): 1767-1771.
- [5] 王凯丽, 田启威, 杨仕平. 基于Gd的造影剂在T₁加权MRI上的研究进展[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2018, 47(1): 78-89.
- [6] Luo Y, Li Y, Li J, et al. Hyaluronic acid-mediated multifunctional iron oxide-based MRI nanoprobes for dynamic monitoring of

- pancreatic cancer[J].RSC Adv, 2019, 9(19): 10486–10493.
- [7] Wei WH, Fountain M, Magda D, et al. Gadolinium texaphyrin-methotrexate conjugates. Towards improved cancer chemotherapeutic agents[J].Org Biomol Chem, 2005, 3(18): 3290–3296.
- [8] 宫玉萍, 陈澄, 孙阳, 等. 载吡啶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[J]. 临床超声医学杂志, 2016, 18(4): 217–220.
- [9] Kauscher U, Holme MN, Björnmalm M, et al. Physical stimuli-responsive vesicles in drug delivery: beyond liposomes and polymersomes[J].Adv Drug Deliv Rev, 2019, 138(1): 259–275.
- [10] Zhu LL, Zhao HY, Zhou ZY, et al. Peptide-functionalized phase-transformation nanoparticles for low intensity focused ultrasound-assisted tumor imaging and therapy [J]. Nano Lett, 2018, 18 (3) : 1831–1841.
- [11] Zhuang DS, Han JL, Bi LJ, et al. Sonodynamic effect of hematoporphyrin monomethyl ether on ligature-induced periodontitis in rats[J].Drug Des Devel Ther, 2015, 9(1): 2545–2551.
- [12] Chatterjee T, Shetti VS, Sharma R, et al. Heteroatom-containing porphyrin analogues[J].Chem Rev, 2017, 117(4): 3254–3328.
- [13] Qi ZL, Cheng YH, Zhou X, et al. Recent advances in porphyrin-based materials for metal ions detection [J].Int J Mol Sci, 2020, 21 (16): 5839.
- [14] Mouraviev V, Venkatraman TN, Tovmasyan A, et al. Mn porphyrin-based redox-active drugs: differential effects as cancer therapeutics and protectors of normal tissue against oxidative injury [J].Antioxid Redox Signal, 2018, 29(16): 1691–1724.
- [15] Zheng X, Qian J, Tang F, et al. Microgel-based thermosensitive MRI contrast agent[J].ACS Macro Lett, 2015, 4(4): 431–435.
- [16] Toccaceli G, Barbagallo G, Peschillo S. Low-intensity focused ultrasound for the treatment of brain diseases: safety and feasibility [J].Theranostics, 2019, 9(2): 537–539.

(收稿日期: 2020-04-20)

· 病例报道 ·

Ultrasonic manifestations of vascular tumor in the scrotum: a case report

阴囊脉管瘤超声表现 1 例

贵 珍

[中图分类号]R445.1

[文献标识码]B

患者男, 50 岁。4 年前发现右侧阴囊肿大, 平卧后不消失, 呈慢性、无痛性逐渐增大, 未见其他异常症状, 未经系统治疗。体格检查: 站立位时可触及右侧阴囊睾丸旁一大约 4 cm×2 cm 包块, 呈椭圆形, 压痛(-), 透光实验(+), 双侧睾丸可触及; 平卧位时囊性包块不消失。超声检查: 右侧阴囊内睾丸旁探及一大约 3.6 cm×2.1 cm 囊性包块, 包膜完整, 与右侧睾丸间界限清晰, 形态尚规则, 有分隔, 内透声尚可, 后方回声增强(图 1)。双侧睾丸及附睾大小、形态正常, 未见明显异常回声。超声提示: 右侧阴囊内囊性包块, 脉管瘤? 其他性质待定。于腰硬联合麻醉下行右侧阴囊包块切除术, 术后病理组织示脉管瘤由大小不等, 形状不规则的囊腔构成, 囊壁菲薄, 腔内壁被覆单层扁平细胞(图 2); 病理诊断: 脉管瘤。

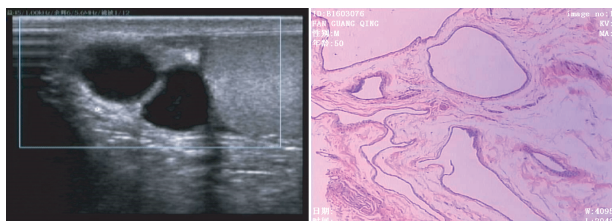


图 1 声像图示囊性包块内有分隔, 未探及明显血流信号

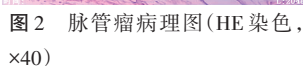


图 2 脉管瘤病理图(HE 染色, ×40)

讨论: 脉管瘤是血管瘤和淋巴管瘤的合称, 亦称血管淋巴管瘤, 系微静脉和微淋巴管混合形成的良性畸形病变, 并非真性肿瘤^[1]。临床上以单纯血管瘤或单纯淋巴管多见, 而混合性脉管瘤较少见。本病可发生于小肠、脾脏、胰腺、十二指肠、膀胱等^[2], 发生于阴囊处报道甚少。脉管瘤超声表现多为多腔或有分隔的囊性肿块, 当存在内部出血或蛋白样内容物时, 内部回声不均, 也可表现为低回声^[3]。本例患者超声表现典型, 临床需注意与阴囊内附睾囊肿、精液囊肿等相鉴别。最终确诊仍需依靠组织病理学检查。

参考文献

- [1] 张江华, 尚培中, 王金, 等. 腹腔镜手术治疗小网膜及肝十二指肠韧带弥漫性脉管瘤一例[J]. 中华普外科手术学杂志, 2018, 12(1): 89–90.
- [2] 石昌龙, 宋永胜. 膀胱脉管瘤 1 例报告[J]. 现代泌尿外科杂志, 2018, 23(10): 802–803.
- [3] 吴迪, 闫旭, 杨霞, 等. 右侧腋窝脉管瘤一例[J]. 中国外科杂志, 2018, 56(10): 795–796.

(收稿日期: 2019-09-07)