

· 实验研究 ·

载锰卟啉/紫杉醇的相变纳米粒多模态成像及靶向治疗肿瘤的体外实验研究

张奕 罗远利 刘当 曹阳 冉海涛 杨超

摘要 **目的** 制备载全氟戊烷/锰卟啉/紫杉醇的聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)纳米粒(FMP@P),评估其体外光声、超声、磁共振多模态成像及其与声动力治疗(SDT)联合化疗肿瘤的效果。**方法** 采用双乳化法制备FMP@P,应用透射电镜、扫描电镜观察纳米粒的形态,马尔文粒径电位分析仪检测其粒径及表面电位,紫外-可见分光光度计检测其吸光度并计算包封率;高效液相法测量并计算MnTTP-PTX和紫杉醇的包封率及超声辐照后的药物释放能力。采集不同浓度下纳米粒的体外光声、磁共振成像图像,定量对比分析其显像效果;使用低功率聚焦超声(3.0 W/cm²)辐照纳米粒,采集不同辐照时间的超声成像图像,定量对比分析其显像效果。使用单线态氧荧光探针检测纳米粒的活性氧产生能力。通过CCK-8法及流式细胞术验证FMP@P与SDT联合化疗杀伤肿瘤细胞的效果。**结果** FMP@P乳液为墨绿色,纳米粒为均一的球形,平均粒径为(323.1±68.3)nm,平均表面电位为(-14.5±8.3)mV,MnTTP-PTX和紫杉醇的包封率分别为(93.55±0.46)%和(81.23±6.93)%。药物释放实验结果显示FMP@P在超声辐照后24h PTX的累计释放率为31.57%。FMP@P可以增强超声B模式和造影模式的显像能力,回声强度随辐照时间的增加而增强;也可增强光声、磁共振显像能力,光声信号、磁共振信号强度随FMP@P浓度的增加而增强。超声辐照后乳腺癌4T1细胞内产生大量活性氧。FMP@P与SDT联合化疗可显著杀伤肿瘤细胞。**结论** 本实验成功制备了FMP@P,其不但可体外增强光声、超声、磁共振显像能力,还可介导SDT联合化疗有效治疗肿瘤。

关键词 纳米粒;光声成像;超声成像;磁共振成像;声动力治疗;化疗

[中图分类号]R445.1;R73-36

[文献标识码]A

In vitro experimental study of drug-MnTTP/paclitaxel nanoparticles with phase-changed capability for tumor multimodal imaging and sonodynamic therapy combined with chemotherapy

ZHANG Yi, LUO Yuanli, LIU Dang, CAO Yang, RAN Haitao, YANG Chao

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

ABSTRACT Objective To prepare polylactic-co-glycolic acid (PLGA) based multifunctional nanoparticles loading with perfluoropentane (PFP), MnTTP and paclitaxel (PTX), termed as FMP@P, and to investigate its ultrasound (US)/ photoacoustic (PA)/magnetic resonance (MR) imaging capability and chemo-/sonodynamic therapy (SDT) efficacy in vitro. **Methods** FMP@P was prepared by a double emulsification method. The morphology of nanoparticles was observed by transmission electron microscope and scanning electron microscope. The particle size and surface potential were detected by Malvern particle size potentiometer. The absorbance was detected by UV-visible spectrophotometer and the encapsulation efficiency was calculated. The encapsulation efficiency of PTX and the drug release ability after US irradiation were determined by high performance liquid chromatography method. In addition, the in vitro PA and MR images of nanoparticles at different concentrations were collected for quantitative comparison and analysis. The nanoparticles were irradiated by low intensity focused ultrasound (3.0 W/cm²), and the US images were collected at different times for quantitative comparison and analysis. The reactive oxygen production capacity of nanoparticles was detected by singlet oxygen fluorescence probe.

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82071926);国家自然科学基金重点项目(81630047);重庆市人民医院医学科技创新项目(2019ZDXM08)
作者单位:400010 重庆市,重庆医科大学附属第一医院超声科(张奕);重庆医科大学附属第二医院超声科(罗远利、曹阳、冉海涛);重庆医科大学生物医学工程学院(刘当);中国科学院大学重庆医院 重庆市人民医院放射科(杨超)

通讯作者:杨超, Email: ychaof737@163.com

Meanwhile, the chemo-/sonodynamic therapy effect on tumor cells was evaluated by the standard CCK-8 assay and flow cytometry. **Results** The FMP@P emulsion was dark green, the nanoparticles were uniformly spherical, the average diameter and Zeta potential of FMP@P were (323.1 ± 68.3) nm and (-14.5 ± 8.3) mV, respectively. The encapsulation efficiency of MnTTP-PTX and PTX were $(93.55 \pm 0.46)\%$ and $(81.23 \pm 6.93)\%$, respectively. FMP@P could enhance the capability of US/PA/MR imaging, and the intensity was increased with the concentration increased. After US irradiation, FMP@P could produce a large amount of reactive oxygen species in 4T1 cell. The combined of FMP@P with SDT and chemotherapy can significantly kill tumor cells. **Conclusion** This experiment successfully prepared FMP@P, which can not only enhance the capability of PA, US, and MRI in vitro, but also can mediate SDT combined with chemotherapy to effectively treat tumors.

KEY WORDS Nanoparticles; Photoacoustic imaging; Ultrasound imaging; MRI; Sonodynamic therapy; Chemotherapy

恶性肿瘤是世界范围内的主要公共卫生问题,也是我国人民最主要的死亡原因之一^[1]。传统的肿瘤治疗方式包括手术、化疗和放疗^[2]。紫杉醇(PTX)是一种微管稳定剂,作为一线化疗药物主要用于治疗乳腺癌等多种恶性肿瘤。近年来,光动力方法、光热疗法及声动力疗法(SDT)等非侵入性疗法得到了临床广泛关注。其中SDT可以突破光激活的深度限制,在临床应用上具有光动力疗法无法比拟的优势^[3],是一种可靠的治疗方式。本实验以聚乳酸-羟基乙醇酸(PLGA)为载体,制备包裹全氟戊烷(PFP)、四对氯代苯基卟啉锰(MnTTP)及PTX的纳米粒(PFP-MnTTP-PTX@PLGA,以下简称FMP@P),并评估其体外光声、超声、磁共振多模态成像能力及其与SDT联合化疗肿瘤的效果。

材料与方法

一、主要实验材料及仪器

1. 实验细胞:乳腺癌4T1细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司)。

2. 主要试剂:PLGA(PLGA-COOH 聚合比 50:50, 济南岱罡生物科技有限公司);聚乙二醇(PVA, 美国 Sigma 公司);PFP(百灵威科技有限公司);PTX(上海源叶生物科技有限公司);MnTTP(上海麦克林生化科技有限公司);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI, 上海碧云天生物技术有限公司);2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA, 美国 Sigma 公司);CCK-8 试剂盒、Annexin V FITC/PI(日本同仁化学研究所)。

3. 主要仪器:声振仪(VCX130, 美国 Sonic 公司);超声理疗仪(重庆海扶技术有限公司);纳米粒径电位分析仪(Zetasizer Nano ZS90, 英国 Malvern 仪器公司);透射电子显微镜(Hitachi-7500, 日本 Hitachi 公司);紫外-可见光分光光度计(UV2600 UV-VIS, 日本岛津公司);荧光分光光度计(RF-5301pc)和光声成像系统(Vevo LAZR)均购自加拿大 Visual Sonics 公司;核磁共振扫描仪(Magnetom Skyra 3.0 T, 德国 Siemens 公司);

彩色多普勒超声诊断仪(MyLab 90, 意大利百胜公司);激光扫描共聚焦显微镜(日本 Nikon 公司)。

二、FMP@P 纳米粒的制备

首先称取 10 mg PTX 溶解于 200 μ l 双蒸水,加入 200 μ l PFP,在冰浴下进行第一步乳化(功率 100 W,总时长 6 min,工作模式为开启 5 s,暂停 5 s)得到水相。然后称取 50 mg PLGA、2 mg MnTTP 溶于 3 ml 二氯甲烷得到油相,常温振荡使其完全溶解,将水相加入油相中,冰浴条件下使用声振仪声振 3 min(功率 65 W),再加入 8 ml 4% PVA 溶液声振 2 min(功率 33 W),最后加入 10 ml 2% 异丙醇溶液。避光冰浴条件下低速搅拌 3 h 使二氯甲烷完全挥发。最后双蒸水洗涤并低温离心(10 000 g, 4 $^{\circ}$ C, 5 min)2 次后获得 FMP@P,于 4 $^{\circ}$ C 条件下保存。其他纳米粒如载 PFP、MnTTP 的 PLGA 纳米粒(PFP-MnTTP-PLGA,以下简称 FM@P)、载 PFP、PTX 的 PLGA 纳米粒(PFP-PTX-PLGA,简称 FP@P)等在制备过程中仅加入纳米粒所含的药物,制备方法同 FMP@P。

三、FMP@P 基本性能检测

使用透射电镜、扫描电镜观察纳米粒的形态,纳米粒径电位分析仪检测纳米粒的粒径及表面电位。以 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)为溶剂配制不同浓度(1、2、3、4、5 μ g/ml)的 MnTTP-PTX 溶液,使用紫外-可见分光光度计检测吸光度并绘制标准曲线,通过标准曲线计算其包封率。采用高效液相法测定 PTX 的包封率及超声辐照后 FMP@P 的药物释放能力。使用单线态氧荧光探针(SOSG)检测低功率聚焦超声(3.0 W/cm²)辐照时间对 MnTTP-PTX-PLGA(以下简称 MP-PLGA)纳米粒(5 μ g/ml)单态氧产量的影响。

四、体外超声、光声、磁共振成像实验

1. 体外超声成像:以琼脂糖凝胶为原料制作带孔凝胶模型,将 FMP@P 溶液(2 mg/ml)置于 5 块琼脂凝胶模型中,使用低功率聚焦超声(3.0 W/cm²)分别辐照 1、2、3、4、5 min,然后使用超声诊断仪的 B 模式和造影模式观察并采集图像(LZ-250 探头,频率 21 MHz;二维

超声增益 18.0 dB, 超声造影增益 35.0 dB)。

2. 体外光声成像: 以琼脂糖凝胶为原料制作带孔凝胶模型, 配制浓度分别为 1、2、3、4、5 mg/ml 的 FMP@P 溶液, 各取 100 μ l 加入不同的凝胶孔内, 另取一孔加入 100 μ l 双蒸水作为对照。应用光声成像系统观察其成像情况。

3. 体外磁共振成像: 配制浓度分别为 1、2、3、4、5 mg/ml 的 FMP@P 溶液置于 EP 管中, 选用 T1_FLAR 序列 (TR=200, TE=2.5) 进行扫描, 观测其成像情况及信号强度。

五、体外活性氧检测

将体外培养的对数期乳腺癌 4T1 细胞, 以每孔 1×10^5 接种于激光共聚焦培养皿及 12 孔板中, 将细胞分为 7 组 (以共聚焦显微镜观察为例): ① FMP@P+US 组, 每孔加入 1 ml FMP@P 溶液 (2 mg/ml), 培养 4 h 后, PBS 洗涤 3 次, 加入 DCFH-DA 溶剂在培养箱内孵育 20 min, 再用 PBS 洗涤 3 次, 行低功率聚焦超声 (3.0 W/cm²) 辐照 1 min 后, 于共聚焦显微镜下观察活性氧生成情况; ② FM@P+US 组, 每孔加入 1 ml FM@P (2 mg/ml), 其余步骤同 FMP@P+US 组; ③ FP@P+US 组, 每孔加入 1 ml FP@P (2 mg/ml), 其余步骤同 FMP@P+US 组; ④ FP@P 组, 除不用超声辐照外, 其余步骤同 FP@P+US 组; ⑤ FM@P 组, 除不用超声辐照外, 其余步骤同 FM@P+US 组; ⑥ US 组, 除不加纳米粒进行孵育外, 其余步骤同 FMP@P+US 组; ⑦ 对照组 (control 组), 细胞孔板内不加任何纳米粒, 亦不进行超声辐照, DCFH-DA 染色后直接进行观察。在 12 孔板中重复上述操作, 并用胰酶消化细胞后离心, 300 μ l PBS 重悬细胞, 使用流式细胞仪检测各组产生活性氧水平。

六、体外联合化疗实验

取对数期乳腺癌 4T1 细胞, 以每孔 1×10^4 接种于 96 孔板内, 将细胞分为 7 组: ① FMP@P+US 组, 在 96 孔板内加入 100 μ l FMP@P (2 mg/ml) 孵育 3 h 后用 PBS 进行洗涤, 然后使用低功率聚焦超声 (3.0 W/cm²) 辐照 1 min, 30 min 后加入 CCK-8 试剂 (每孔 10 μ l), 孵育 1 h 后使用酶标仪检测吸光度; ② FM@P+US 组, 每孔加入 100 μ l FM@P, 其余步骤同 FMP@P+US 组; ③ FP@P+US 组, 每孔加入 100 μ l FP@P, 其余步骤同 FMP@P+US 组; ④ FP@P 组, 除不用超声辐照外, 其余步骤同 FP@P+US 组; ⑤ FM@P 组, 除不用超声辐照外, 其余步骤同 FM@P+US 组; ⑥ US 组, 除不加纳米粒进行孵育外, 其余步骤同 FMP@P+US 组; ⑦ 对照组 (control 组), 细胞孔板内不加任何纳米粒, 亦不用超声辐照, 其余步骤同 FMP@P+US 组。然后以每孔 1×10^5

接种于 12 孔板内, 将 CCK-8 试剂替换为 Annexin V FITC/PI (0.1%) 重复各组上述操作, 并用胰酶消化细胞后离心, 300 μ l PBS 重悬细胞, 使用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

七、统计学处理

应用 SPSS 26.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较行 *t* 检验。相关性分析采用 Origin 的线性回归分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、FMP@P 的基本表征

FMP@P 乳液呈墨绿色, 纳米粒为均一的球形 (图 1A、B); 平均粒径为 (323.1 \pm 68.3) nm, 平均表面电位为 (-14.5 \pm 8.3) mV。MnTTP-PTX 在 437 nm 最大吸收波长处 (图 1C), 浓度与吸光度具有良好的线性关系, 其包封率为 (93.55 \pm 0.46)%。荧光探针测得 FMP@P 随超声辐照时间延长其荧光强度增强, 单态氧产量增加。高效液相法测得 PTX 的包封率为 (81.23 \pm 6.93)%。药物释放实验结果显示 FMP@P 在超声辐照后 24 h PTX 的累计释放率为 31.57%。

二、体外光声、超声、磁共振多模态成像结果

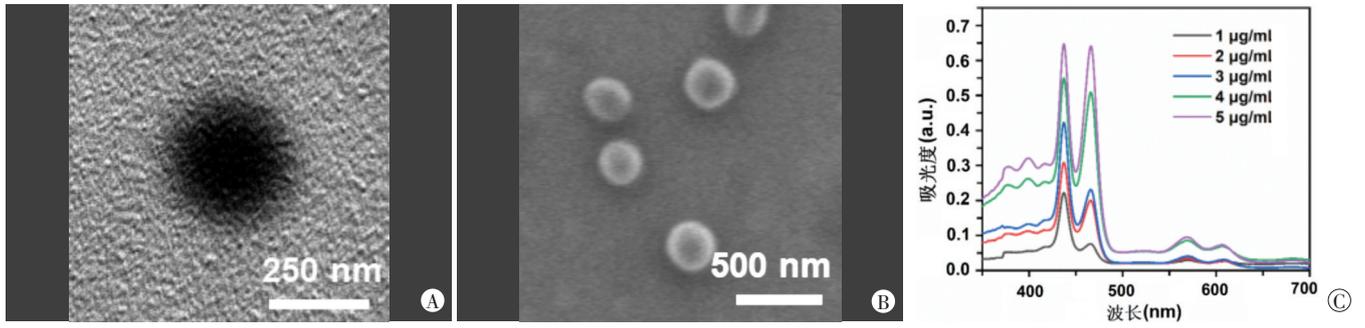
体外超声成像显示, B 模式及造影模式均可观察到 FMP@P 增强显像效果, 回声强度随辐照时间的增加逐渐增强, 分别为 17.32、36.73、69.52、86.43、131.25 a.u. 和 6.45、17.35、28.38、52.56、93.78 a.u.。体外光声成像显示, 光声信号强度随 FMP@P 浓度的增加而增强, 分别为 0.675、0.837、1.278、1.784、2.097 a.u., 两者在 690 nm 波长处存在良好的线性关系。体外磁共振成像显示, FMP@P 具有增强 T1-MR 成像的能力, 且磁共振信号强度与 FMP@P 浓度间存在良好的线性关系, 随着 FMP@P 浓度的增加, 磁共振信号强度分别为 371.91、422.59、452.02、553.50、787.55 a.u.。见图 2。

三、体外活性氧检测

FMP@P+US 组和 FM@P+US 组均有大量活性氧产生, 且产生的量相当, 其余各组无明显活性氧产生 (图 3)。

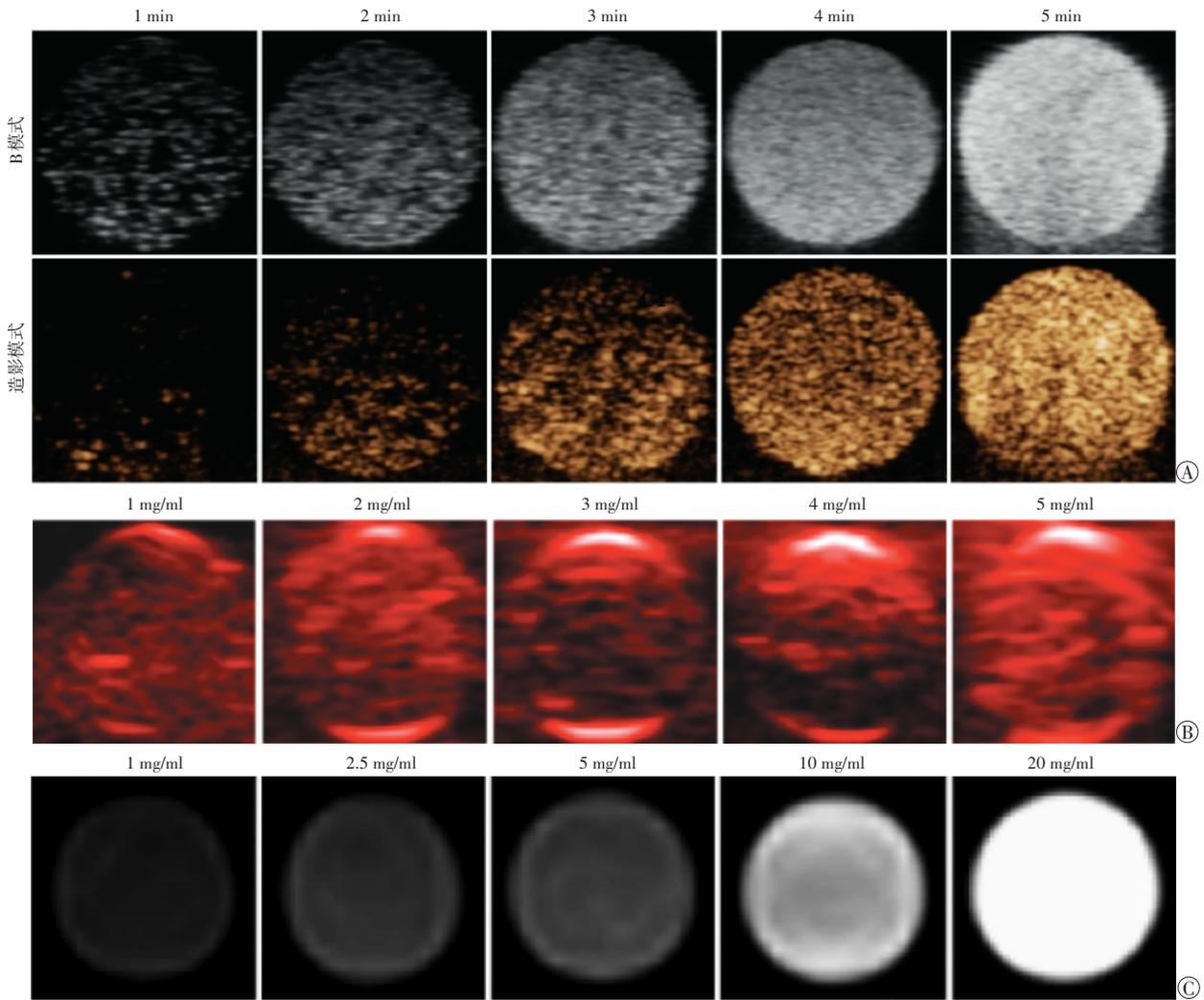
四、体外联合化疗效果

CCK-8 检查提示: US 组、FM@P 组、FP@P 组、FM@P+US 组、FP@P+US 组、FMP@P+US 组细胞存活率分别为 (95.62 \pm 11.13)%、(85.08 \pm 7.57)%、(65.40 \pm 14.67)%、(43.00 \pm 12.30)%、(61.04 \pm 9.52)%、(17.74 \pm 4.91)%; FMP@P+US 组存活率最低, 与其余各组比较差异均有统计学意义 (均 P<0.05)。流式细胞术检测结果与 CCK-8 相符。



A:透射电镜图;B:扫描电镜图;C:不同浓度 MnTTP溶液紫外可见吸收光谱图

图1 FMP@P的基本表征



A:不同辐照时间 FMP@P 体外超声 B 模式和造影模式成像图;B:不同浓度 FMP@P 体外光声成像图;C:不同浓度 FMP@P 体外 T1 加权磁共振成像图

图2 FMP@P 的体外超声、光声、磁共振多模态成像

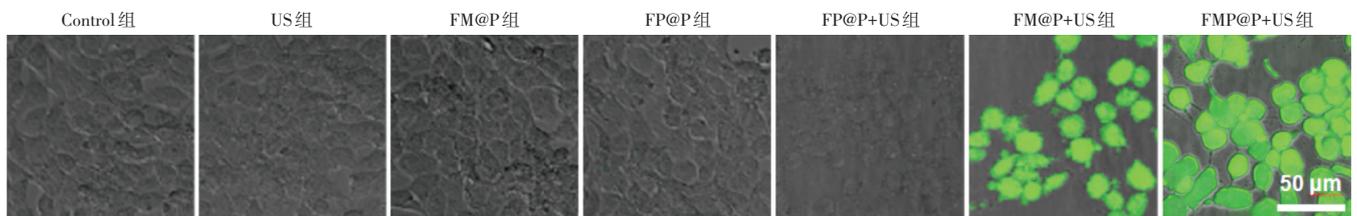


图3 各组 4T1 细胞内活性氧产量的共聚焦显微镜图

讨 论

化疗是恶性肿瘤传统治疗方法之一,但常伴随难以避免的毒副作用。化疗联合新型治疗方式有望提高肿瘤的治疗效率^[4]。SDT 是一种新型无创的肿瘤治疗方法,基于超声波组织穿透性强,可以有效作用于深部肿瘤,较光动力疗法、光热疗法等具有更广阔的应用前景^[5]。研究^[3]表明,微/纳米颗粒可以有效提高 SDT 效果,PLGA 是经美国食品药品监督管理局批准的可生物降解聚合物,能够形成稳定的纳米颗粒,在实验研究中广泛应用。光声成像、磁共振成像是高灵敏度的技术,可以提供高对比度、高空间分辨率的图像^[6];超声成像是一种可指导 SDT 的无创实时成像技术^[7-11]。本实验通过制备 FMP@P,旨在评估其体外光声、超声、磁共振多模态成像能力及其与 SDT 联合化疗肿瘤的效果。

本实验采用双乳化法成功制备 FMP@P,其纳米粒呈大小均一的球形。MnTTP 为非水溶性声敏剂,而制备成 FMP@P 后克服了其不溶于水的局限,并提高了生物相容性,可更好地递送药物。此外,本实验利用超声波辐照致使 FMP@P 纳米粒核心的 PFP 发生液气相变,纳米粒膨胀直至破裂进而释放内部的药物。体外药物释放实验发现,当纳米粒接受超声辐照后,PTX 的释放率明显增加,表明超声波能够激发 FMP@P 药物的释放。SOSG 对单态氧具有高选择性,与单态氧反应后由弱蓝色荧光变为绿色荧光(此特性为试剂本身具有的特征,绿色荧光仅能从波谱看出 530 nm 波长对应绿色荧光);其与 MP-PLGA 的混合溶液随着超声辐照时间的延长,在 530 nm 波长处的吸收强度增加,表明 MP-PLGA 具有良好的单态氧生成能力及在 SDT 中的抗肿瘤潜力。

在体外超声成像实验中,FMP@P 溶液随着超声辐照时间的增加,其回声强度逐渐加强。分析其原因,超声辐照后纳米粒核心的 PFP 发生了液气相转变,纳米微球变成了微米级的微气泡,故能够进行超声成像,而在进一步膨胀后发生爆破,释放药物。卟啉及其衍生物的大 π 共轭结构使得其具有特殊的光、电等性能,具有良好的光吸收性能,能进行光声成像^[12]。在体外光声成像实验中,光声信号强度随 FMP@P 浓度增加呈线性增强,说明 FMP@P 具有良好的光声成像性能。由于稳定的螯合作用,金属卟啉降低了可致纤维化或神经毒性的金属转移风险。Mn(II)携带 5 个未配对电子,Gd(III)携带 7 个未配对电子,通常用于 T1 加权 MR 造影成像^[13]。体外磁共振成像实验表明,FMP@P 溶液的 T1 信号随浓度的增加而增强,且呈良好的线性关系,证明了 FMP@P 作为磁共振造影剂的潜力。

DCFH-DA 是一种氧化应激指示剂,本身无荧光,在进入细胞后可以与活性氧反应生成强荧光的 2',7'-二

氯荧光素且荧光信号强度与活性氧水平成正比。本实验结果显示,PTX、PFP 或超声均只能导致少量的活性氧产生,而 MnTTP 经超声辐照后可以产生大量活性氧,表明其可作为声敏剂进行 SDT。为验证 SDT 效果,本研究采用 CCK-8 法检测 7 个分组乳腺癌细胞的存活率,结果显示 US 组、FM@P 组细胞存活率均在 85% 以上,表明单纯超声或 FM@P 对细胞基本无影响;FM@P+US 组、FP@P 组细胞存活率明显下降,表明单纯 SDT 或单纯化疗均有杀伤肿瘤细胞作用;FMP@P+US 组细胞存活率最低,与其余各组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。表明联合化疗对肿瘤细胞杀伤效果明显高于单一治疗,流式细胞术结果与 CCK-8 检测结果相符。

综上所述,本实验成功制备了载 MnTTP 及 PTX 的多功能纳米粒 FMP@P,可用于体外超声、光声、磁共振成像,并具有良好的 SDT 联合化疗效果,为后期的体内研究奠定的基础。但本实验仅探讨了 FMP@P 在体外的相变能力,以及在固定功率下辐照不同时间的相变能力,未探索大功率条件下的相变情况。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1):7-30.
- [2] Feng RM, Zong YN, Cao SM, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics?[J]. Cancer Commun(Lond), 2019, 39(1):22.
- [3] Qian X, Zheng Y, Chen Y. Micro/nanoparticle-augmented sonodynamic therapy (SDT): breaking the depth shallow of photoactivation[J]. Adv Mater, 2016, 28(37):8097-8129.
- [4] Iwamoto T. Clinical application of drug delivery systems in cancer chemotherapy: review of the efficacy and side effects of approved drugs[J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36(5):715-718.
- [5] Zhu P, Chen Y, Shi J. Nanoenzyme-augmented cancer sonodynamic therapy by catalytic tumor oxygenation[J]. ACS Nano, 2018, 12(4):3780-3795.
- [6] Huang J, Liu F, Han X, et al. Nanosonosensitizers for highly efficient sonodynamic cancer theranostics [J]. Theranostics, 2018, 8(22):6178-6194.
- [7] Fu Q, Zhu R, Song J, et al. Photoacoustic imaging: contrast agents and their biomedical applications [J]. Adv Mater, 2019, 31(6):e1805875.
- [8] Meng X, Zhang B, Yi Y, et al. Accurate and real-time temperature monitoring during MR imaging guided PTT [J]. Nano Lett, 2020, 20(4):2522-2529.
- [9] Shi X, Yang W, Ma Q, et al. Hemoglobin-mediated biomimetic synthesis of paramagnetic O₂-evolving theranostic nanoprobe for MR imaging-guided enhanced photodynamic therapy of tumor [J]. Theranostics, 2020, 10(25):11607-11621.
- [10] Min HS, Son S, You DG, et al. Chemical gas-generating nanoparticles for tumor-targeted ultrasound imaging and ultrasound-triggered drug delivery[J]. Biomaterials, 2016, 108(9):57-70.
- [11] Luke GP, Hannah AS, Emelianov SY. Super-resolution ultrasound

imaging in vivo with transient laser-activated nanodroplets [J]. Nano Lett, 2016, 16(4):2556-2559.

[12] Li M, Ishihara S, Ji Q, et al. Paradigm shift from self-assembly to commanded assembly of functional materials: recent examples in porphyrin/fullerene supramolecular systems [J]. Sci Technol Adv

Mater, 2012, 13(5):e053001.

[13] Shao S, Rajendiran V, Lovell JF. Metalloporphyrin nanoparticles: coordinating diverse theranostic functions [J]. Coord Chem Rev, 2019, 379(9):99-120.

(收稿日期:2021-06-10)

· 病例报道 ·

Prenatal ultrasonic diagnosis of fetal limb-body wall complex in embryo transfer: a case report

产前超声诊断胎儿肢体-体壁综合征 1 例

李 宁 阚艳敏 王艺桦 张树华

[中图法分类号]R445.1;R714.5

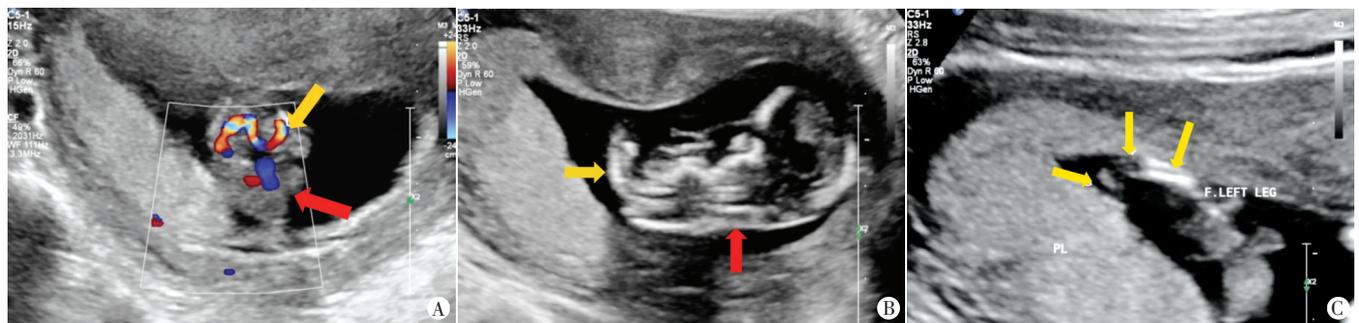
[文献标识码]B

孕妇女, 43 岁, 孕 3 产 0, 孕 13 周, 2 次生化妊娠史, 男女双方染色体正常, 胚胎移植后来我院行胎儿颈项透明层厚度 (NT) 筛查。超声检查: 双顶径 2.29 cm, NT 3.2 mm, 头颅光环可见, 胎盘后壁, 羊水最大深度 2.88 cm; 胎儿腹壁回声中断, 内脏器官外翻; 于膀胱一侧探及一动脉血流信号, 动态观察见脐带位置固定; 脊柱异常弯曲, 自腰骶部向左侧弯曲; 胎儿肢体发育异常, 未见明显右侧肋骨及下肢回声, 左足内翻; 胎儿整体位于羊膜腔内 (图 1)。超声提示: 宫内单活胎 (相当于孕 13⁺ 周); 胎儿多发畸形 (腹壁缺损、脊柱侧弯、单脐动脉、肢体异常、内脏外翻), 肢体-体壁综合征 (LBWC) 不排除。后引产一男婴, 羊膜完整, 头颅、颜面部及双上肢外观正常, 颈后软组织增厚水肿, 腹壁缺损位于脐右侧, 缺损处可见肝脏、胃泡、肠管等暴露于体外, 左足内翻, 右臀部发育不良, 右下肢缺失, 脊柱略向前凸出, 腰段略向右侧弯曲, 骶尾段指向左侧。

讨论: LBWC 是一种由多种畸形导致的胎儿致死性发育异常, 发病率极低, 超声是其最佳检查方法。该病发病机制尚未明确, 主要包括孕早期羊膜破裂、血管破裂及胚胎包卷异常等导致胸、腹部脏器外翻, 严重脊柱发育异常, 肢体旋转不良、畸

形足及颅、面部畸形等, 且多认为胎儿颅、面部畸形及羊膜腔的不完整是由羊膜破裂引起。本例超声表现为腹壁缺损、脊柱侧弯、肢体异常、内脏外翻等, 因此考虑 LBWC。由于本例为胚胎移植胎儿, 胚胎植入母体的时间不固定, 因此胎儿畸形的发生部位及严重程度与普通胎儿有所差异。本例胎儿未出现颅、面部畸形, 原因可能为羊膜表面虽无血管, 但有平滑肌纤维, 在卵子受精第 6 天后羊膜开始规律收缩, 会对胎儿产生影响, 而胚胎移植最佳时间为囊胚时期, 若胚胎移植时间晚于第 6 天, 羊膜早期受到的影响会减弱, 引起颅、面部畸形的几率减小或消失。本例胎儿整体位于羊膜腔内, 十分罕见, 原因可能为羊膜在卵子受精后 4~5 d 包围胚胎, 而胚胎移植发生在此之后, 故未发生羊膜破裂及羊膜腔不完整现象。

LBWC 需与腹壁缺损、内脏外翻等胎儿腹壁异常相鉴别, 其中脐膨出、腹裂畸形、泄殖腔外翻等均存在腹壁缺损和内脏外翻, 但脐带往往正常, 染色体多异常; 而 LBWC 多伴有脊柱侧弯、脐带异常, 染色体往往正常。总之, LBWC 的超声表现具有特征性, 可在孕早期及时发现胎儿畸形, 避免缺陷儿的出生, 对优生优育有重要帮助。



A: 腹壁裂, 脏器外翻 (红色箭头示), 单脐动脉 (黄色箭头示); B: 脊柱骶尾部指向左侧 (黄色箭头示), NT 增厚 (红色箭头示); C: 左足内翻 (箭头示)

图 1 胎儿肢体-体壁综合征超声图像

(收稿日期:2020-06-07)

基金项目: 2019 年河北省属高校基本科研业务费项目 (JQN2019014)
 作者单位: 063000 河北省唐山市, 华北理工大学附属医院超声科
 通讯作者: 张树华, Email: shuhuzhang333@163.com