❖专论

Comparison of contrast imaging characteristic and acoustic pressure resistance between perfluorooctylbromide lipidic particles and C₃F₈ lipidic microbubbles in vitro

LIU Ying ying¹, XU Jinfeng^{1*}, XIE Ming xing², ZHANG Li², QIN Xiaoj uan²,

XIANG Feixiang², DING Nan³, YANG Chang³, XIANG Guang ya³

(1. Department of Ultrasonography, Shenzhen People's Hospital, Second Clinical Medical College of

Jinan University, Shenzhen Medical Ultrasound Engineering Center, Shenzhen 518020, China;

2. Department of Ultrasonography, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong

University of Science and Technology, Hubei Provincial Key Laboratory of

Molecular Imaging, Wuhan 430022, China; 3. College of Pharmacy,

Tongji Medical College, Huazhong University of Science and

Technology, Wuhan 430030, China)

[Abstract] Objective To analyze contrast imaging characteristic and resistance to acoustic pressure of perfluorooctylbromide (PFOB) lipidic microbubbles and compared with perfluoropropane ($C_3 F_8$) lipidic microbubbles in vitro. Methods PFOB lipidic particles with biotin and C₃ F₈ lipidic microbubbles with biotin were prepared, and the stability of them were evaluated. Then the agents were used for imaging before and after adding of avidin, and the signal intensity were compared. Both PFOB particles and C_3F_8 microbubbles were exposed in ultrasound field of low (MI=0.28) and high (MI=0.56) ultrasound pressure levels. Their signal intensity after different exposure time (10, 20, 30 s) were compared. Results Aggregation occurred in both two contrast agents after addition of avidin, and the particle sizes were significantly larger before (both $P \le 0.05$). The differences of particle size between the two contrast agents were significant before (t=16.225, P<0.001) and after addition of avidin (t=-5.046, P<0.001). The concentration of PFOB lipid particles did not change significantly during the observation period of stability evaluation, while $C_3 F_8$ microbubbles decreased with standing time. Addition of avidin produced significant imaging enhancement in PFOB particles. However, C_3F_8 microbubbles manifested ultrasonic backscatter before and after adding of avidin. The signal intensity of PFOB particles were stable under low (MI = 0.28) and high acoustic pressure (MI = 0.56). The signal intensity of $C_3 F_8$ microbubbles decreased with the prolongation of exposure time under low (MI=0.28) and high acoustic pressure (MI= 0.56). Conclusion Compared with $C_3 F_8$ microbubbles, PFOB particles with smaller particle size and better resistance to acoustic pressure, more suitable for targeted contrast ultrasound imaging.

[Keywords] perfluorooctylbromide; perfluoropropane; nano scale; acoustic pressure resistance **DOI**:10.13929/j.1003-3289.201905140

[[]基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81771841)、深圳市知识创新计划基础研究项目(JCYJ20160422162835246)、深圳市卫计委学科建设能力提 升项目(SZXJ2018014)。

[[]第一作者]刘莹莹(1981一),女,河南洛阳人,博士,副主任医师。研究方向:心血管超声与分子影像。E-mail: maggielyy21064@163.com

[[]通信作者] 徐金锋,暨南大学第二临床医学院 深圳市人民医院超声科 深圳市超声医学工程中心,518020。E-mail: xujinfeng@yahoo.com [收稿日期] 2019-05-16 [修回日期] 2019-09-27

对比液态氟碳脂质纳米粒与全氟丙烷脂质 微泡体外显影及耐声压性

刘莹莹1,徐金锋1*,谢明星2,张 丽2,覃小娟2,项飞翔2,

丁 楠³,杨 畅³,项光亚³

 (1.暨南大学第二临床医学院 深圳市人民医院超声科 深圳市超声医学工程中心,广东 深圳 518020;
2.华中科技大学同济医学院附属协和医院超声影像诊断科 湖北省分子影像重点实验室, 湖北 武汉 430022; 3.华中科技大学同济医学院药学院,湖北 武汉 430022)

[摘 要]目的 与全氟丙烷(C_3F_8)脂质微泡造影剂比较,分析自制液态氟碳(PFOB)脂质纳米粒体外显影及耐声压性的优劣。方法 分别制备生物素化 PFOB 脂质纳米粒及生物素化 C_3F_8 脂质微泡,评估其稳定性,并观察其加入亲和素前后的体外显影效果。对 2 种造影剂在低声压(MI=0.28)及高声压(MI=0.56)环境下进行超声辐照,于辐照前及辐照 10、20、30 s 后观察显影情况及其差异。结果 2 种造影剂加入亲和素后均发生聚集现象,粒径均较加入亲和素前明显增大(P均<0.05);且加入亲和素前(t=16.225,P<0.001)、后 2 种造影剂间粒径差异均有统计学意义(t=-5.046,P<0.001)。稳定性观察期间 PFOB 脂质微粒内浓度无明显改变,而 C_3F_8 脂质微泡随放置时间延长浓度呈减低趋势。加入亲和素后,PFOB 脂质纳米粒回声明显增强; C_3F_8 脂质微泡加入亲和素前后显影效果均较好。低声压(MI=0.28)及高声压(MI=0.56)环境下,PFOB 脂质纳米粒造影剂显影强度无明显改变,而 C_3F_8 脂质微泡显影强度随辐照时间延长呈减低趋势。结论 相较于 C_3F_8 脂质微泡,PFOB 纳米脂质纳米粒造影剂粒径小、耐声压性好,更符合靶向超声造影剂的要求。 [关键词] 液态氟碳;全氟丙烷;纳米级;耐声压性

[中图分类号] R-332; R445.1 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2019)11-1604-07

分子影像学的发展给包括超声在内的医学影像学 带来巨大变革,也对超声造影剂提出了更高要求。本 研究尝试制备一种脂质外膜包裹的以液态氟碳 (PFOB)为核心的全新微粒型超声造影剂,并制备同 等脂质膜成分的全氟丙烷(C₃F₈)内核的微泡型超声 造影剂,比较二者在粒径、电位,耐声压性及显影模式 等方面的异同。

1.1 制备生物素化 PFOB 脂质纳米粒造影剂 以拉 丁方设计进行优化,通过以下步骤完成造影剂制备:① 采用电子天平(Mettler-Toledo 公司)按摩尔质量 85:5 :5:5 比例称取二棕榈酰磷脂酰胆碱(dipalmitoyl phosphatidylcholine, DPPC)、生物素化磷脂酰乙醇胺 (biotinyl phosphatidyl ethanolamine, Biotinyl PE)、 二 棕 榈 酰 磷 脂 酰 甘 油 (dipalmitoyl phosphatidylglycerole, PPPG)及胆固醇(cholesterol, CH);DPPC 为脂质外膜基本成分,Biotinyl PE 为后续 进行亲和素桥连修饰提供连接位点,DPPG 带负电荷 可调节纳米粒表面电位,CH 用以调节脂质外膜流动 性;将试剂置于圆底烧瓶中,移至通风橱内,于烧瓶内 加入 15~20 ml 氯仿与甲醇混合溶液(体积比 3:1), 溶解直至澄清;②将烧瓶置于旋转蒸发仪上,抽真空蒸

发 2 h(调节水浴温度为 30℃,转速 40 rot/min),形成 均匀薄膜;③称取磷酸二氢钾(KH₂PO₄)、磷酸氢二钾 (K₂ HPO₄), 加入去离子水配成 0.1 g/mol 的磷酸缓 冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS),采用精密 pH 计(上海精科雷磁仪器厂)将 pH 值调节至 7.0;④ 称取 20 ml PBS 加入蒸干成膜的圆底烧瓶内,置于旋 转蒸发仪上,水化1h(调节水浴温度为55℃,转速 60 rot/min),得到乳白色母液;⑤将母液移至烧杯中, 以高速分散均质机(上海标本模型厂)搅拌,同时逐滴加 人 0.2 ml PFOB; ⑥将所得混悬液置于水浴超声仪(宁 波新芝生物科技股份有限公司)中,超声处理1 min;⑦ 将 200 nm 聚碳酸酯滤膜装入脂质体挤出器,置于配套 水浴锅中,调节水浴温度为55℃;将超声处理后的母液 加入脂质体挤出器内,连接氮气瓶,打开气压阀门,压力 范围稳定在 0.5~1.0 MPa,进行过膜处理,重复 3 次, 得到生物素化 PFOB 脂质纳米粒造影剂。

1.2 制备生物素化 C₃F₈脂质微泡造影剂 前6步制 备过程同前,步骤⑦时将超声处理后母液加入注射器 内,并将超声细胞破碎仪(Misonix 公司)探头(频率 20 kHz,功率150 W)置于液面下1.5 cm,同时抽取氟 碳气体50 ml;于声振过程中经三通管由注射器底部 缓慢推注气体。选择间断模式,输出功率为110 W,声振3s,停2s,重复3次,得到生物素化C₃F₈脂质微泡 造影剂。

1.3 基本理化性质测定及稳定性评估 取适量生物 素化 PFOB 脂质纳米粒、C₃F₈脂质微泡,稀释 10 倍后 [浓度分别为(2.07±0.56)×10⁹/ml 和(3.79±0.82) ×10⁸/ml]于光学显微镜(Olympus 公司)或透射电子 显微镜(FEI 公司)下观察其形态,以激光粒度分析仪 (Malvern 公司)测定其粒径及表面电位。加入亲和素 后再次观察 2 种造影剂形态改变并测定其粒径。

稳定性评估:分别于制备后即刻及常温下将 PFOB 脂质纳米粒及 C₃ F₈ 脂质微泡放置 1、3、6、12、 24、48 h 后抽取样品,以血细胞计数板计算其浓度。

1.4 造影剂体外显影效果观察 将适量生物素化 PFOB 脂质纳米粒、 C_3F_8 脂质微泡分别稀释 10 倍后 (浓度同前)置于 10 ml EP 管内备用。采用 Siemens Acuson Sequoia 512 彩色超声诊断仪,15L8w-s 高频 探头(频率 10~14 MHz),选择 Small Part 模式、基波 成像,观察 2 种造影剂样本显影情况并采集图像;加入 0.5 mg 亲和素后再次观察其显影效果并采集图像。

 1.5 测定造影剂耐声压性 取生物素化 PFOB 脂质 纳米粒、C₃F₈脂质微泡分别稀释 10 倍(浓度同前)后 置于 10 ml EP 管内,加入 0.5 mg 亲和素后备用。采 用 Siemens Acuson Sequoia 512 彩色超声诊断仪, 15L8w-s高频探头(频率 10~14 MHz),调节探头输 出功率,分别在机械指数(mechanical index, MI)0.28 和 0.56 水平进行超声辐照,于辐照前及辐照 10、20、 30 s后观察显影情况有无变化,采集图像;将原始图像 转化为 JPG 及 AVI 格式,刻录至光盘保存。

采用 Metlab 7.8 软件分析采集到的 JPG 图像,将 ROI 设定为 EP 管内造影剂所在区域,测算其平均灰 度值(gray scale, GS)。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 15.0 软件。计量资料 以 x±s表示,计数资料以百分率表示。采用独立样 本 t检验比较 2 种造影剂,以配对 t检验比较同一造影 剂加入亲和素前后差异;同一造影剂多个时间点间比 较采用重复测量方差分析,组内进一步两两比较采用 Bonferroni法。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本理化性质测定及加入亲和素前后比较 电 子显微镜下观察,加入亲和素前,生物素化 PFOB 脂 质纳米粒分散度良好(图 1A),表面电位为($-43.70\pm$ 7.17)mV,粒径(173.30 ± 48.81)nm(图 1B);加入亲 和素后纳米粒聚集成团(图 1C),粒径($1026.00\pm$ 142.7)nm(图 1D),较前明显增大(t=-9.243, P <0.001)。光学显微镜下观察,生物素化 C₃F₈脂质微泡



图1 生物素化 PFOB 脂质纳米粒、C₃F₈ 脂质微泡加入亲和素前后理化性质 A、B. 生物素化 PFOB 脂质纳米粒加入亲和素前电子显微镜下可见粒径均匀,分散度好(A),粒径分布图示平均粒径为 173. 30 nm(B); C、D. 生物素化 PFOB 脂质纳米粒加入亲和素后电子显微镜下可见纳 米粒聚集成团(C),粒径分布图示平均粒径为 1026. 00 nm(D); E、F. 生物素化 C₃F₈ 脂质微泡加入亲和素前光学显微镜下可见粒径均匀,分散 度好(E),粒径分布图示平均粒径为 868. 50 nm(F); G、H. 生物素化 C₃F₈ 脂质微泡加入亲和素后光学显微镜下可见微泡间出现聚集现象(G), 粒径分布图示平均粒径为 1446. 00 nm(H)

加入亲和素前分散度良好(图 1E),表面电位为(-13.00± 5.99)mV,粒径(868.50± 126.40)nm(图1F);加入亲和素 后微泡发生聚集(图1G),粒径 (1446.00±221.20)nm(图1H), 较前明显增大(t=-6.597, P=0.003)。加入亲和素前(t=16.225, P<0.001)、后(t=-5.046, P<0.001)2种造影剂间 粒径差异均有统计学意义。

2.2 造影剂稳定性比较 监测 结果显示, PFOB 脂质微粒在整 个观察期间内浓度无明显改变 (图 2A); $C_3 F_8$ 脂质微泡制备后 随放置时间延长浓度呈减低趋势 (P < 0.05),放置 6 h 及以内浓度 较尚未发生明显改变, 而放置 12、24、48 h 后浓度均较制备后 即刻明显减低(P均< 0.05, 图 2B)。

2.3 体外显影效果比较 生物 素化 PFOB 脂质纳米粒加入亲 和素前回声信号极低,接近无回 声(图 3A);加入亲和素后回声明 显增强,呈密集细小的点状强回 声(图 3B)。生物素化 C₃F₈脂质 微泡加入亲和素前即有较好显影 效果,表现为密集细小的点状强 回声(图 3C),加入亲和素后未见 明显变化(图 3D)。

2.4 造影剂耐声压性比较 PFOB脂质纳米粒造影剂在低声

5.0 3.0 4.5 2.5 4.0 (Im/01×)) (Im/01×)) (Im/01×) (Im/01×) (Im/01×) (Im/01×)) (Im/01×) (Im/01×)) (lm/) 2.0 01× 1.5 · 一般 1.0 1.5 1.0 0.5 0.5 0 h 0 L 3 h 12 h 24 h 48 h 1h6 h 24 h 48 h 12 h 1 h3 h 6 h 放置时间(C,F。脂质微泡) 放置时间(PFOB纳米粒) 2A 2B

图 2 PFOB 脂质纳米粒与 C₃F₈脂质微泡体外稳定性比较 A. PFOB 脂质纳米粒造影剂浓度随时间变化情况; B. C₃F₈脂质微泡造影剂浓度随时间变化情况(*表示与制备后即刻比较, P<0.05)



图 3 生物素化 PFOB 脂质纳米粒加入亲和素前后 CEUS 表现 A、B. 生物素化 PFOB 脂质纳米 粒加入亲和素前显示为无回声(A),加入亲和素后回声明显增强,显示为密集细小的点状强回声 (B); C、D. 生物素化 C₃F₈脂质微泡加入亲和素前显示为密集细小点状强回声(C),加入亲和素后 未见明显变化,仍显示为密集细小点状强回声(D)

压(MI=0.28)及高声压(MI=0.56)环境下,随辐照时间延长,显影强度均未见明显改变(图4、5,表1)。

在低声压(MI=0.28)环境下,随辐照时间延长, $C_{s}F_{s}脂质微泡显影信号强度有减低趋势(<math>P < 0.05$,图

	表 1	PFOB 脂质纳米粒/	C ₃ F ₈ 脂质微泡造影剂在低声压及高声压环境下不同辐照时间显影	/ 强度比车
--	-----	-------------	--	--------

光망 쾨	MI -	显影强度(GS)				下店	n 店
坦 影剂		辐照前	辐照 10 s	辐照 20 s	辐照 30 s	— r阻	Г Ш
PFOB 脂质纳米粒	0.28	98.25 \pm 18.88	100.12 ± 17.54	97.41±17.19	99.04±16.81	0.895	0.457
	0.56	84.39±16.40	85.32 ± 17.68	83.36±15.73	82.91±16.54	1.485	0.241
C ₃ F ₈ 脂质微泡	0.28	32.00 ± 7.65	$29.73~\pm~7.36$	19.14 \pm 6.35	10.02 ± 2.44	116.912	<0.001
	0.56	33.11± 8.01	16.09 ± 6.19	8.92 ± 2.30	$5.37\pm$ 1.81	99.474	<0.001

6、表 1),辐照 10 s 后显影强度尚 未见明显改变(P>0.05),而辐 照 20 s 后显影强度明显减低(P <0.05),辐照 30 s 后显影强度 进一步减低(P<0.05,图 7);高 声压(MI=0.56)环境下,随辐照 时间延长,其显影信号强度亦有 减低趋势(P<0.05;图 8,表 1), 辐照 10 s 后显影强度即明显减 低(P<0.05),辐照 20、30 s 后显 影强度均进一步减低(P 均< 0.05,图 9)。

3 讨论

分子影像技术需要能够特异 性反映靶组织在分子水平上病变 进程的示踪物,并能以信号增强 的形式反映在可视性图像上。在 超声分子影像领域,这种示踪物 就是靶向超声造影剂。靶向超声 造影剂粒径小,可穿过血管内皮 间隙到达靶组织,外膜可携载多 种功能性化学基团便于表面修 饰,在声场中稳定性更高、在循环 中的半衰期更长,背景信号更低, 且能与目前临床使用的超声成像 系统兼容^[1-2]。与传统微泡型造 影剂相比,本研究自制 PFOB 纳 米粒型造影剂在穿透力、显影模 式、SNR 及耐声压性方面均具明 显优势。

传统超声造影剂粒径约数微 米,临床多用以显示整个血池系 统的分布及完整性^[3],很难穿越 血管内皮屏障,不能直接进入靶 组织与靶细胞结合而反映病理进 程及分子参与情况。本研究制备 的 PFOB 脂质纳米粒和 C_3F_8 脂 质微泡的粒径分别为(173.30± 48.81) nm 和 (868.50 ± 126.40)nm, PFOB 纳米脂质纳 米粒造影剂的粒径更小,穿透力 更强,更易穿过血管内皮屏障进 入靶组织;且 PFOB 纳米粒内核



图 4 低声压(MI=0.28)环境下 PFOB 脂质纳米粒造影剂不同超声辐照时间显影情况 A~D. 分别为 PFOB 脂质纳米粒造影剂经超声辐照前(A)及辐照 10(B)、20(C)、30 s(D)后的显影情况



图 5 高声压(MI=0.56)环境下 PFOB 脂质纳米粒造影剂不同超声辐照时间显影情况 A~D. 分别为 PFOB 脂质纳米粒造影剂经超声辐照前(A)及辐照 10(B)、20(C)、30 s(D)后的显影情况







图 7 低声压(MI=0.28)环境下 C_3F_8 脂质微泡造影剂不同 辐照时间显影强度比较 (*表示与辐照前比较, P < 0.05; \triangle 表示与辐照 10 s 后比较, P < 0.05; §表示与辐照 20 s 后比 较, P < 0.05)

呈液态,抗剪切力能力更强。

本研究发现 C₃ F₈ 脂质微泡造影剂在游离状态即 能产生较强信号。加入亲和素后,虽然粒径测量结果 与显微镜下观察均证实微泡发生聚集,但与游离状态 时相比其显影信号强度并无明显增强,在靶向造影图 像中很难区分聚集至靶器官的微 泡与循环中游离的微泡。

PFOB 脂质纳米粒造影剂的 声学显影模式与传统微泡型造影 剂截然不同,其在游离状态下产 生的回声信号非常微弱;加入亲 和素后,生物素化的 PFOB 纳米 粒信号得到明显增强^[4-5]。靶向 造影时,PFOB 脂质纳米粒造影 剂在未靶向结合至靶组织前以游 离状态存在,只产生极微弱信号; 其靶向结合至靶组织并在其周围 聚集后,产生的信号明显增强,超 声诊断的敏感度及特异度也随之 提高。

靶向造影对造影剂在血液循 环中持续的时间和其在声场中的 显影时间均有较高要求。循环时 间较长是造影剂发挥靶向作用的 基础;而靶向造影过程中也需要 足够时间进行观察及重复探察。 因此,耐声压性是考验靶向超声 造影剂的重要指标之一。

本研究对比观察 2 种造影剂

耐声压性能,在低声压及高声压环境下,C₃F₈脂质微 泡接受一定时间超声辐照后显影强度即发生明显下 降,而 PFOB 脂质纳米粒造影剂无论是在低声压环境 还是高声压环境中的显影强度在观察时间内均保持稳 定。目前普遍认为 MI<0.3 的声压环境为低声压环 境,处在这种声场之中的微泡不易被声能破坏,从而能 够获得较为理想的显影效果;而当微泡处在高声压环 境之中,其中的气体就会在声压作用下被动的发生剧 烈的压缩与膨胀,导致微泡外壳破裂,气体逸出,丧失 显影能力[6-8]。因此,为尽可能保护微泡不受声压破 坏,获得较理想的显影效果,对微泡型造影剂一般选用 低能量超声显影模式且在长时间观察显影情况时需用 间断成像模式[9-10],这在一定程度上会影响显影过程 的时间分辨率。PFOB 脂质纳米粒造影剂则不受此局 限,其核心材料 PFOB 在常温下为液态,且密度较大 (1.93 g/ml),具有良好的抗压能力,即使在较高的声 压环境下也不会被破坏,从而使其显影效果得以维持。 既往研究^[5]报道,其在体内造影过程中显影时间可达 1~2天。



图 8 高声压(MI=0.56)环境下 C₃F₈脂质微泡造影剂不同超声辐照时间显影情况 A. 超声辐照前 C₃F₈脂质微泡声像图; B. 辐照 10s 后即可见明显微泡破坏; C. 辐照 20 s 后,可见大量微泡破坏; D. 辐照 30 s 后,可见大量微泡破坏



图 9 高声压(MI=0.56)环境下 C₃F₈脂质微泡造影剂不同辐照时间显影强度比较 (*表示与辐照前比较, P<0.05; △表示与辐照 10 s 后比较, P<0.05; §表示与辐照 20 s 后比较, P<0.05)

综上所述,较之 C₃ F₈ 脂质微泡造影剂,以 PFOB 为核心的纳米脂质纳米粒造影剂粒径更小,耐声压性

能更好,更符合靶向超声造影的 要求。

[参考文献]

- [1] Zha Z, Wang J, Zhang S, et al. Engineering of perfluorooctylbromide polypyrrole nano-/microcapsules for simultaneous contrast enhanced ultrasound imaging and photothermal treatment of cancer. Biomaterials, 2014, 35(1):287-293.
- [2] Wickline SA, Lanza GM. Nanotechnology for molecular imaging and targeted therapy. Circulation, 2003, 107 (8): 1092-1095.
- [3] Choudhury SA, Xie F, Dayton PA, et al. Acousticbehavior of a reactivated, commercially available ultrasound contrast agent. J Am Soc Echocardiogr, 2017, 30(2):189-197.
- [4] Chen J, Pan H, Lanza GM, et al. Perfluorocarbon nanoparticles for physiological and molecular imaging and therapy. Adv Chronic Kidney Dis, 2013, 20(6):466-478.
- [5] Li X, Sui Z, Li X, et al. Perfluorooctylbromide nanoparticles for ultrasound imaging and drug delivery. Int J Nanomedicine, 2018, 13:3053-3067.
- [6] MullickChowdhury S, Lee T, Willmann JK. Ultrasound-guided drug delivery in cancer. Ultrasonography, 2017, 36(3):171-184.
- [7] Cool SK, Geers B, Roels S, et al. Coupling of drug containing liposomes to microbubbles improves ultrasound triggered drug delivery in mice. J Control Release, 2013, 172(3):885-893.
- [8] Dewitte H, Vanderperren K, Haers H, et al. Theranostic mRNA-loaded microbubbles in the lymphatics of dogs: Implications for drug delivery. Theranostics, 2015,5(1):97-109.
- [9] Wang X, Liu B, Liu J, et al. Evaluation of cerebral perfusion by contrast-enhanced ultrasound at low mechanical index in cerebral ischemia rat model. Int Angiol, 2017, 36(6):545-552.
- [10] Kaufmann BA, Carr CL, Belcik T, et al. Effect of acoustic power on in vivo molecular imaging with targeted microbubbles: Implications for low-mechanical index real-time imaging. J Am Soc Echocardiogr, 2010,23(1):79-85.