

Phase change of polymeric nanocapsules with liquid perfluorocarbons and in vitro ultrasound imaging

HE Kun-yan¹, RAN Hai-tao^{1,2*}, LI Mao-ping¹, ZHENG Yuan-yi¹, WANG Zhi-gang¹

(1. Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China;

2. Department of Ultrasonography, the Second Affiliated Hospital of Chongqing

Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To prepare a new ultrasound contrast agent polymeric nanocapsules of liquid perfluorocarbons (P-NP), and to observe its physical characteristics, phase change by heating or ultrasound and effect on ultrasound imaging in vitro. **Methods** P-NP was prepared by using emulsion solvent-evaporation process. The morphology and distribution were observed with optical microscope. The size and electric potential were obtained by using nano-zetasizer. The phase change of nanocapsules of liquid perfluorocarbons on heatingplate was observed by optical microscope instantaneously. After using low intensity focused ultrasound (LIFU), the effect on ultrasound imaging was observed in vitro. **Results** The prepared polymeric nanocapsules of PFP was opacified suspension in appearance, the distribution and size were uniformed with core-shell structure, with the average size and potential of (393.2 ± 40.7) nm and (-5.23 ± 8.69) mV, respectively. When heatingplate showed 42.6°C , the phase change of nanocapsules had just begun, and the higher the temperature was, the more bubbles formed. After LIFU ablation, P-NP of obvious enhancement of ultrasound imaging was observed under the model of fundamental and harmonic wave in vitro. **Conclusion** P-NP can be successfully prepared using the above method, and can enhance ultrasound imaging after LIFU ablation in vitro, which may become a new type of ultrasound contrast agent.

[Key words] Liquid perfluorocarbons; Nanocapsules; Phase-change; Contrast media

包裹液态氟碳高分子纳米球相变及体外超声显影

何坤燕¹, 冉海涛^{1,2*}, 李茂萍¹, 郑元义¹, 王志刚¹

(1. 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学附属第二医院超声科, 重庆 400010)

[摘要] **目的** 制备一种新型纳米级超声造影剂——液态氟碳(PFP)高分子纳米球, 观察其物理特性、体外热致相变、声致相变及体外超声显影效果。**方法** 采用乳化-蒸发法(单乳化法)制备包裹 PFP 的 MPEG-PLGA 纳米球(P-NP), 以光镜观察纳米球形态分布, 以纳米粒度及 Zeta 电位分析仪检测纳米球粒径和电位; 在显微镜上放置加热板实时观察 P-NP 的相变情况; 于体外应用低强度聚焦超声(LIFU)仪辐照后, 观察其超声显影效果。**结果** 所制备的包裹 PFP 的高分子纳米球外观为乳白色混悬液, 形态规则, 呈球包球形; 平均粒径为 (393.2 ± 40.7) nm, 平均电位为 (-5.23 ± 8.69) mV; 加热板显示的温度约为 42.6°C 时, 光镜下显示纳米球开始转变为微气泡, 且随着温度增高, 所产生的气泡逐渐增多; 体外行 LIFU 辐照后, 在超声基波和谐波模式下可观察到显影明显增强。**结论** 成功制备了 PFP 高分子纳米球, 其粒径小、稳定性好, 体外经 LIFU 仪辐照后可增强超声显影, 有望成为一种新型超声造影剂。

[关键词] 液态氟碳; 纳米球; 相变; 造影剂

[中图分类号] R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-8475(2013)11-0679-05

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071157)、重庆市高校创新团队计划(KJTD201303)。

[作者简介] 何坤燕(1987—), 女, 重庆人, 在读硕士。研究方向: 高分子相变超声造影剂的研究。E-mail: kyxb99@163.com

[通讯作者] 冉海涛, 重庆医科大学超声影像学研究所, 400010; 重庆医科大学附属第二医院超声科, 400010。E-mail: rht66@163.com

[收稿日期] 2013-07-02 **[修回日期]** 2013-08-05

随着超声医学、分子生物学等多学科的发展与结合应用,超声造影剂的研究与应用受到越来越多的关注。传统超声造影微泡粒径较大,多为 2~3 μm,无法透过血管内皮间隙,只能在血管内产生作用。目前纳米级的超声造影剂已成为研究热点。液态氟碳(PFP)属于含氟脂肪族化合物的一种,最初被用为血液替代品^[1]。长氟碳链的全氟碳化合物在常温下呈液态,无色透明,比重大于水,当外界压力减小至气化压力阈值或温度升高至沸点以上时,可发生液-气相转变。基于此,纳米级相变型造影剂(phase-change contrast agent, PCCA)的概念被提出,并期望通过注射 PFP 在体内相变来达到增强超声显影的目的,使其成为较理想的血管外显影剂^[1-2]。近年来有学者^[3-5]将 PFP 乳化剂用于分子显像和靶向治疗研究。此外,PFP 可通过热致相变、光致相变及声致相变^[6]。本研究尝试制备一种可通过血管内皮间隙的纳米级超声造影剂——包裹 PFP 的高分子纳米球(P-NP),联合低强度聚焦超声(low intensity focused ultrasound, LIFU)辐照使纳米球经液-气相转变,达到超声显影的目的。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 单甲氧基聚乙二醇-聚(乳酸-乙醇酸)共聚物[MPEG2000-PLGA50/50(38000), 济南岱罡生物工程有限公司]、液态全氟戊烷(perfluorocarbons, 分子式 C₅F₁₂)、胆酸钠[生工生物工程(上海)股份有限公司]、二氯甲烷(重庆川东化工有限公司)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)。Mettler Toledo XS 104 电子分析天平、Eppendorf 微量加样枪、超声波处理器(VCY-500, 20 Hz, 上海)、恒温磁力搅拌器、Olympus BX 54 倒置荧光显微镜、纳米粒度

及 Zeta 电位分析仪(Zetasizer Nano ZS90, Malvern); LIFU 仪(重庆医科大学超声影像学研究所研制), 频率 1 MHz, 焦距 160 mm, 强度可调(1.1~8.5 W), 占空比 50%; Philips iU22 彩色超声诊断仪, 探头频率 2~5 MHz。

1.2 制备包裹 PFP 的 P-NP 将 100 mg MPEG-PLGA 置入 50 ml 的离心管内, 加入 3 ml 二氯甲烷, 充分搅拌至完全溶解; 将离心管置于盛冰水的烧杯中, 向离心管内加入 200 μl 的 PFP, 再加入 20 ml 浓度为 1.5% 的 SC 溶液; 超声处理器乳化 30 s 后, 将烧杯移于磁力搅拌器上, 冰浴条件下搅拌 2~3 h, 使二氯甲烷尽量挥发, 再用双蒸水多次洗涤; 4℃ 离心收集 P-NP, 并于 4℃ 冰箱中保存、备用。光镜下观察 P-NP 纳米球形态及分布; 应用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪检测其粒径大小。

1.3 体外 P-NP 热相变实验 以 20 ml 一次性注射器抽取 6 ml 生理盐水, 采用 LIFU 仪器, 应用不同声功率密度(0.47、0.78、1.20 W/cm²)分别单次辐照 1、2、3、4、5 min, LIFU 辐照结束即刻用红外测温仪读出温度值。采用倒置显微镜, 加热板置于显微镜台上, 将血清和 P-NP 的混合液滴在载玻片上后置于加热板上, 加热板设定温度为 50℃。加热板在升温过程中是持续加热, 温度达到 50℃ 时保持不变。

1.4 体外超声致 P-NP 相变及超声显影实验 取相同浓度(0.2%)未加 PFP 的普通纳米球(NP)及 P-NP 溶液各 6 ml, 滴加少许血清后分别置入 20 ml 一次性注射器内, 采用 LIFU 仪辐照, 参数为声功率强度 8.5 W、时间 2 min, 分别在基波及谐波模式下采集 LIFU 仪辐照前后的声像图。



图 1 光镜观察包裹 PFP 的 P-NP(×400)

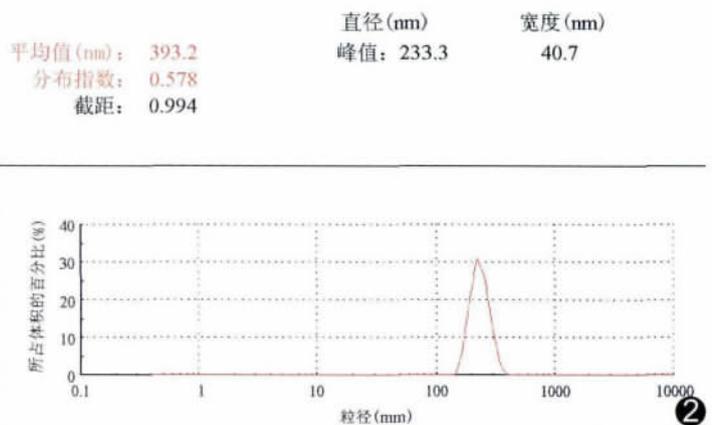


图 2 包裹 PFP 的 P-NP 粒径分布图

2 结果

2.1 P-NP 的制备及理化特性 本实验成功制备了包裹 PFP 的 P-NP, 肉眼观察外观为乳白色混悬液, P-NP 在 4℃ 冰箱中可稳定保存 2 周。普通光学显微镜观察显示其形态规则, 表面光滑, 分散度好, 呈球包球形, 纳米球间未见明显粘连、聚集现象(图 1)。当超声处理器声功率 75 W、时间 30 s 时, 纳米球粒径为 $(393.2 \pm 40.7) \text{ nm}$ (图 2)。纳米球表面平均电位为 $(-5.23 \pm 8.69) \text{ mV}$ 。

2.2 体外 P-NP 热相变 采用 LIFU 仪, 体外不同声功率及辐照时间下, 超声波产生热效应所达到的平均温度值见图 3。显微镜下观察到加热板上的 P-NP 相变情况见图 4, 加热板显示温度为 42.6℃ 时, 气泡开始产生。

2.3 体外 P-NP 超声显像 辐照前, 超声基波模式(机械指数 0.51)下, NP 溶液表现为无回声区中散在细小点状强回声, 后方回声无明显衰减; P-NP 溶液表现为中强回声; 在超声谐波模式(机械指数 0.07)下, NP 溶液表现为无回声; P-NP 溶液也表现为无回声。辐照后, 超声基波模式下, NP 溶液内的点状强回声较辐照前明显增多; P-NP 溶液较辐照前回声增强; 超声谐波模式下, NP 溶液仍表现为无回声; 而 P-NP 溶液表现为细小点状的均匀强回声(图 5)。

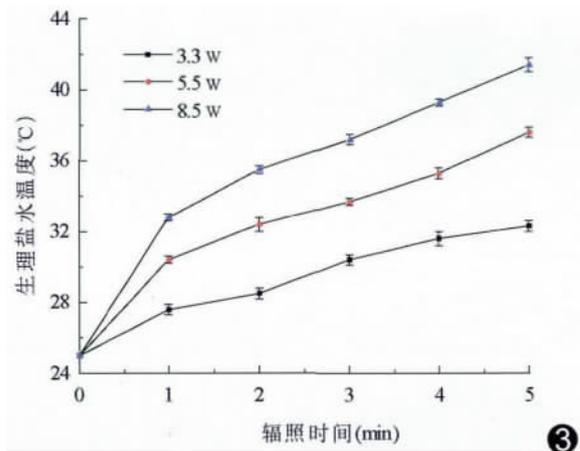


图 3 不同声功率及辐照时间下超声热效应所达到的温度监测

3 讨论

随着超声微泡造影剂临床应用渐趋广泛, 造影剂不断得到改进和优化。临床常用的超声造影剂采用脂质膜材料包裹气体的形式, 以增加背向散射来达到增强超声显影的目的, 然而微米级的直径使其仅可用于血管内的血池显影。全氟碳化合物在生物医学领域中用途广泛, 取代氢原子的氟具有特殊的理化性质, 如热学、化学及生物学惰性、良好的扩散性、低表面张力和低黏度等^[7], 为其用于超声造影剂提供了可能性。然

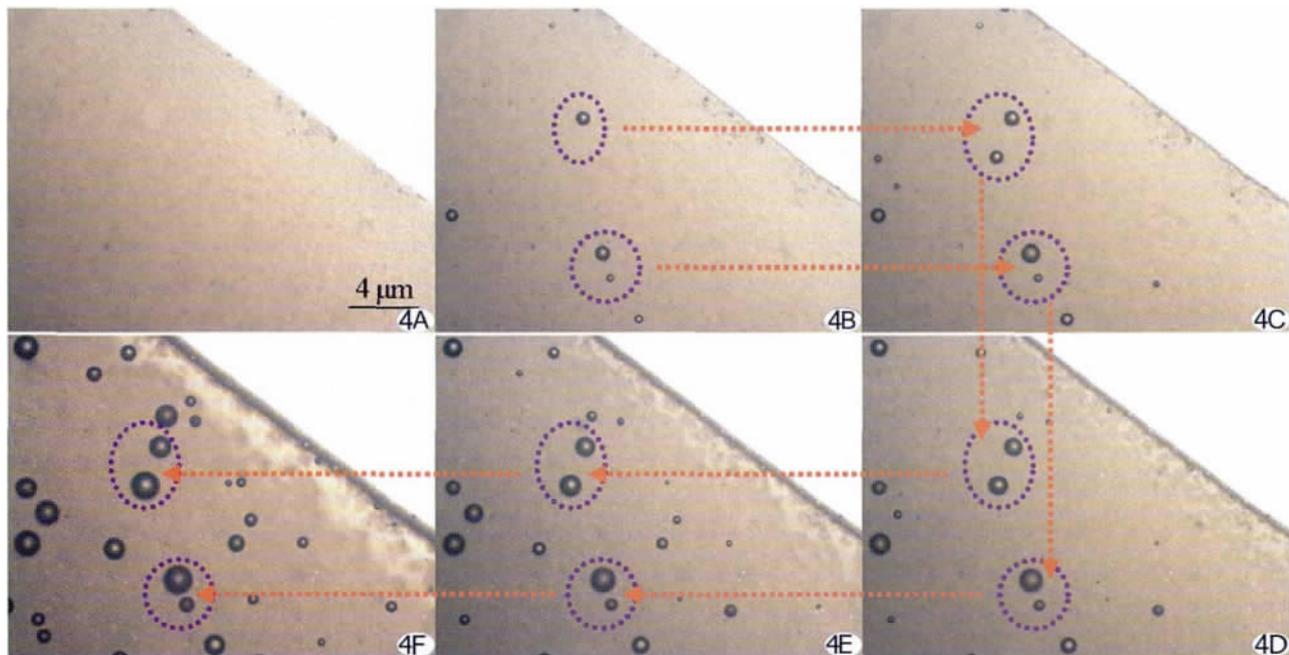


图 4 光镜观察 P-NP 热相变($\times 200$) A. 加热前; B. 42.6℃ 时气泡开始产生; C. 45℃ 时气泡增多; D. 47℃ 时之前产生的气泡直径变大并伴随产生新的气泡; E. 50℃ 时大量气泡产生; F. 50℃ 持续 1 min, 大量气泡变大, 伴随产生新气泡

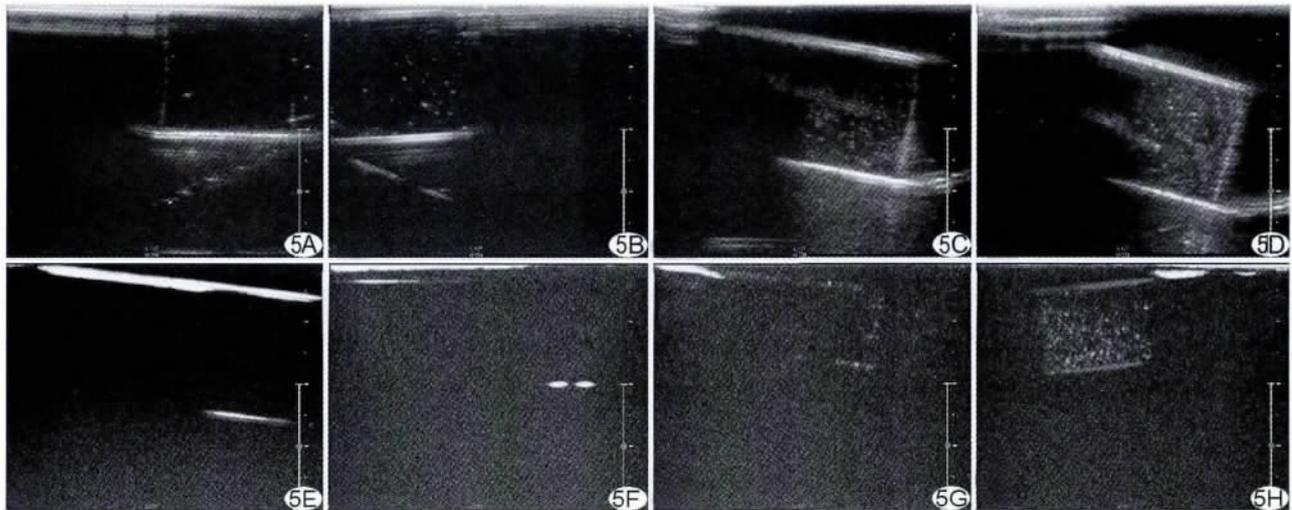


图 5 体外 NP 及 P-NP 声像图 A、B. 基波模式下, NP 经 LIFU 辐照前、后的声像图; C、D. 基波模式下, P-NP 经 LIFU 辐照前、后的声像图; E、F. 谐波模式下, NP 经 LIFU 辐照前、后的声像图; G、H. 谐波模式下, P-NP 经 LIFU 辐照前、后的声像图

而, PFP 具有声透过性, 体内单靠 PFP 乳化剂的聚集作用来增强超声显影效果并不理想。本研究探讨体外纳米级 PFP 高分子纳米乳剂的相变条件, 为下一步体内实验研究提供参考。

本研究所选用的全氟戊烷沸点为 29℃, 易于达到其相变条件。热致相变实验不仅证明了采用乳化-蒸发法可成功制备包裹 PFP 的高分子纳米球, 同时也佐证了自制的 P-NP 能在一定能量下发生液-气相转变。在热致相变实验过程中, 加热板温度约为 43℃ 时纳米球开始发生液-气相变, 且随着加热板温度升高, 产生的气泡逐渐增多。然而 PFP 的沸点仅为 29℃, 为何氟碳高分子乳化剂的相变温度会远远高于其沸点温度? 研究^[8-9]发现 PFP 被包裹形成乳剂之后相变阈值提高, 且此阈值与包裹材料、包裹 PFP 的量及乳剂的粒径大小等均有关, 其粒径大小与高分子、PFP 的量及制备过程中超声处理器的功率大小和声振时间等有关, 功率越大、持续时间越长, 粒径分布范围越窄, 纳米球粒径越小, 实验过程中可见发生相变的气泡数量逐渐增多, 而非所有纳米球突然同时相变。目前实验过程中制备乳剂的方法无法使所有纳米球粒径完全均匀一致, 也无法保证每个球内所包裹的 PFP 的量相等, 但如果外界给予足够高的能量, 也可使所有纳米球达到相变阈值。为进一步探索适宜的 PFP 量, 实验中维持 PEG-PLGA (100 mg) 和其他参数不变, 以每次 20 μl 逐渐递增 PFP 量, 达到 200 μl 时, 光镜下观察到明显较多的纳米球热相变, 故本实验最终选择 PEG-PLGA 100 mg 时加入有机相 PFP 200 μl。

本研究中体外声致相变实验所选用的 LIFU 仪的

辐照参数为强度 8.5 W、辐照时间 2 min, 而此声能量在本实验过程中产生热效应所达到的温度远远不足 43℃, 却也使纳米球发生了相变, 原因可能与以下因素有关: ①加热板的显示温度与载玻片上纳米球所达到的实际温度有一定误差, 涉及载玻片的热传导及聚集热量和散发热量差值的问题; ②有研究^[10-11]认为超声作用是促使液态氟碳相变 (acoustic droplet vaporization, ADV) 最有效的因素, 超声波可产生的空化效应、机械效应及热效应的共同作用使得 PFP 纳米球更易相变^[12-13]。

本研究不足之处: 未探讨超声致 PFP 高分子纳米球相变的最佳条件, 例如超声辐照能量、频率及时间等优化参数; 下一步实验将尽量弥补以上不足, 并深入探讨其在体内的显影效果及作为药物载体实现药物靶向治疗的相关研究。

综上所述, 自制 PFP 高分子纳米球粒径小, 在超声作用下可发生液气相转变, 有望成为一种新型超声造影剂。

[参考文献]

[1] 李奥, 王志刚. 液态氟碳纳米粒——一种多功能影像学造影剂. 临床超声医学杂志, 2008, 10(12): 830-832.
 [2] 周洋. 液态氟碳相变的研究进展. 临床超声医学杂志, 2012, 14(6): 402-405.
 [3] Kaneda MM, Caruthers S, Lanza GM, et al. Perfluorocarbon nanoemulsions for quantitative molecular imaging and targeted therapeutics. Ann Biomed Eng, 2009, 37(10): 1922-1933.
 [4] Kornmann LM, Curfs DM, Hermeling E, et al. Perfluorohexane-loaded macrophages as a novel ultrasound contrast agent: A feasibility study. Mol Imaging Biol, 2008, 10(5): 264-270.

- [5] Saha P, Modarai B, Humphries J, et al. The monocyte/macrophage as a therapeutic target in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol*, 2009,9(2):109-118.
- [6] Schad KC, Hynynen K. In vitro characterization of perfluorocarbon droplets for focused ultrasound therapy. *Phys Med Biol*, 2010,55(17):4933-4947.
- [7] 沈红霞,郑元义,周洋,等. 包裹液态氟碳的高分子超声造影剂的制备及体外显影实验. *中国介入影像与治疗学*, 2012,9(4):291-294.
- [8] Díaz-López R, Tsapis N, Fattal E. Liquid perfluorocarbons as contrast agents for ultrasonography and (19)F-MRI. *Pharm Res*, 2010,27(1):1-16.
- [9] Ragde H, Kenny GM, Murphy GP, et al. Transrectal ultrasound microbubble contrast angiography of the prostate. *Prostate*, 1997,32(4):279-283.
- [10] Rapoport NY, Efros AL, Christensen DA, et al. Microbubble Generation in Phase-Shift Nanoemulsions used as Anticancer Drug Carriers. *Bubble Sci Eng Technol*, 2009,1(1-2):31-39.
- [11] Pisani E, Tsapis N, Paris J, et al. Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: Physical characterization. *Langmuir*, 2006,22(9):4397-4402.
- [12] Kripfgans OD, Fowlkes JB, Miller DL, et al. Acoustic droplet vaporization for therapeutic and diagnostic applications. *Ultrasound Med Biol*, 2000,26(7):1177-1189.
- [13] Rapoport NY, Kennedy AM, Shea JE, et al. Controlled and targeted tumor chemotherapy by ultrasound-activated nanoemulsions/microbubbles. *J Control Release*, 2009,138(3):268-276.

“光子杯”CT 新技术征文通知

在过去的四十年中,随着 X 射线球管、探测器技术、CT 系统设计、图像重建算法以及计算机技术的不断发展,CT 图像质量得到了明显的提高。尤其是在最近十年里,随着从扫描环节到图像重建环节整个影像链的构建发生革命性的变化,CT 得到了迅猛的发展,CT 的扫描速度和诊断能力都发生了根本性的改进,大大拓展了 CT 在临床上的应用范围。现代高端 CT 在继承传统 CT 成像技术的同时,还不断创新推出 CT 先进的成像技术,如 Stellar 光子探测器、锐影成像技术、大螺距炫速扫描、原始数据迭代算法成像等均已应用于临床。

众所周知,随着我国影像事业的发展,我国医生已经可以与国际同行同时使用最先进的 CT 设备平台。如何在同样先进的设备平台上开展和总结我国医生自己的学术研究和成就,已成为我们和广大医生的迫切愿望。因此,《中国医学影像技术》期刊社与西门子(中国)有限公司联合举办“光子杯”CT 新技术征文活动,旨在推动放射科医师和技术人员对 CT 新技术的认识和应用水平,提高相关领域的临床与科研水平,更好地为患者服务。

1. 征文内容

高端 CT 成像的临床应用,特别是利用各种划时代新技术在临床应用中的新方法、新技术、新发现和新理论的临床研究、实验研究、病例总结等。

2. 征文要求

(1)未在国内外杂志上公开发表的论文均可。研究要具有科学性、实用性和创新性,保证研究的方法能在临床推广使用。

(2)参照《中国医学影像技术》杂志稿约要求,通过《中国医学影像技术》投稿系统网上投稿(www.cjmit.com)。网上投稿过程中,请在填写“中文题目”一栏时,在中文题目后面用括号标注“西门子征文大赛”字样,以免与其他稿件混淆。

3. 征文截止时间 2014 年 6 月。

4. 奖励方式

参与活动的优秀论文评审通过者优先在《中国医学影像技术》和《中国介入影像与治疗学》杂志上发表。并在发表的优秀论文中评选出 1~3 等奖共 10 名,颁发证书及奖品。

5. 联系方式

冯洁 电话:010-82547901/2-809;E-mail:fengjie@mail.ioa.ac.cn

主办单位保留对本次征文活动的最终解释权。

《中国医学影像技术》期刊社

2013 年 9 月 29 日