

# 含蔗糖白蛋白包膜微泡超声造影剂制备研究

杜永峰\*, 万明习, 赵文明

(西安交通大学生物医学工程系, 陕西 西安 710049)

**摘要:** 目的 研制一种新型的直径在数微米范围内的含蔗糖白蛋白微泡超声造影剂。方法 以全氟化碳及少量氧气为微泡中的气体介质,用超声空化方法进行微泡制备。研究了蔗糖对白蛋白包膜微泡半衰期、微泡尺寸保持及热稳定性的影响,测定了含 40%蔗糖白蛋白包膜微泡的谐波特性等。结果 常温下(20℃),在一定范围内,随着糖的加入及浓度的增加,白蛋白微泡的稳定性不断加强;当糖质量浓度达到 40%,微泡半衰期可延长至 50 d 以上,96%微泡尺寸分布在 2 - 5 μm,常温下保存一月后微泡之间无明显合并现象,同时比未含蔗糖微泡耐热性明显加强,4℃下将制得的微泡保存半年,未观测到微泡数量及尺寸有明显变化,制备出的微泡有较强的非线性特征,在 2 次谐波上的反射幅度远高于背景散射源及对比金属板。结论 含 40%蔗糖的以全氟化碳及少量氧气为气体介质的白蛋白包膜微泡可以成为一种性能优良的超声造影剂。

**关键词:** 超声造影剂; 微泡; 蔗糖

中图分类号: R817.9; R943

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2001)11 - 0859 - 04

超声造影剂(ultrasound contrast agent, UCA)是一类能够显著增强医学超声检测信号的诊断药剂,在人体微小血管和组织灌注检测与成像方面,用 UCA 进行超声检测具有其他检测方法如 CT, MRI 等无法比拟的优点<sup>[1]</sup>。超声成像基于回波信号的反射强度,微泡有较强的回波反射性能,目前被认为是最好的人体微管内的造影材料。超声造影现象从发现至今已有 30 多年,目前的超声造影设备和造影剂仍在不断完善之中。从研究现状来看,以白蛋白作为液膜的微泡具有无毒、易制备等优点,缺点是稳定性较差。UCA 具有诱人的应用前景,且目前国外已有的 UCA 价格十分昂贵,因此,在我国研制开发 UCA 具有相当大的实用价值。

一些糖类物质与蛋白质之间可通过氢键、色散力和疏水作用与蛋白质发生相互作用,形成糖蛋白或蛋白聚糖,现已清楚地认识到糖蛋白或蛋白聚糖中的糖链有维持蛋白质结构和稳定作用<sup>[2,3]</sup>。在此理论上,本文尝试通过在白蛋白溶液中加入蔗糖,经超声空化的方法制得含 40%蔗糖的白蛋白包膜微泡,很好地解决了白蛋白微泡的稳定性问题。

## 材 料 和 方 法

**材料** 人血清白蛋白(进口分装),全氟丙烷(药用, F2 Chemicals Ltd),纯氧(西安化工厂),蔗糖(分析纯,西安化学试剂厂),食用奶粉,无菌水,金属板。

**仪器** 超声波发生器(上海声学所 UG-I 型);超声仪(美国 Panametrics 公司 5800 型);恒温水浴箱(渤海电器厂);显微镜(日本 Olympus 公司, BX40 型,带摄像头);P-III 450 计算机(内置美国 Snazzi-II 视频卡);细胞计数器(上海求精仪器公司);分析天平(上海精密仪器公司, FA 2004 型)。

**造影剂制备** 配制不同蔗糖浓度的 5% (g·mL<sup>-1</sup>)牛血清白蛋白溶液各 10 mL,置于 50 mL 聚四氟乙烯塑料杯中,溶液依次以氧气和全氟丙烷饱和后,再将 UG-I 型超声波发生器的探头略置入液面以下,在 150 W 下声处理 1 min(频率固定, 20 kHz),制备出的微泡密闭保存,以备测定。

**性能测定** 微泡制备 1 h 及 24 h 后,分别时行测定。耐热性能通过测定 5 个温度点下微气泡的存活率来实现,测量的时间间隔为 30 min,由恒温水浴箱实现恒温过程,微泡浓度由细胞计数器和显微镜测定,通过调节显微镜的比色片使微泡同周围环境区分开,以便于观测;微泡的大小通过显微镜上的标尺估算,视频图像由连接在显微镜上的摄像头动态输入计算机。微泡造影剂谐波性能通过超声仪测定,测定时用少量奶作为背景散射源,并以金属板和

收稿日期: 2001-01-03.

基金项目: 国家自然科学基金(39770217)资助; 国家杰出青年科学基金(69925101)资助.

作者简介: 杜永峰(1970 - ),男,博士研究生;

万明习(1962 - ),男,教授,博士生导师.

\* Tel/ Fax: (029) 2668668, E-mail: maildyf@263.net

造影剂的回波反射信号进行对比。

### 结 果

#### 1 实验制得的蔗糖白蛋白包膜微泡

图 1-A 为含蔗糖质量浓度 40 %、白蛋白质量浓度 5 % 的溶液饱和以氧气和全氟丙烷后,经声空化并在室温下(20 °C)静置 1 h 后的微泡(×200),微泡

质量浓度约  $2.499 \times 10^8$  个/mL。图 1-B 为不含蔗糖的 5 % 白蛋白溶液采取同样方法制备并静置 1 h 后的微泡放大图像。为检验蔗糖对白蛋白微泡稳定性的影响,将实验制得的微泡存放一月,观测其结果,图 1-C 为含蔗糖质量浓度 40 % 的白蛋白溶液制备出的微泡存放一月后的放大图像,图 1-D 为不含蔗糖的白蛋白溶液制备出的微泡存放一月后的放大图像。

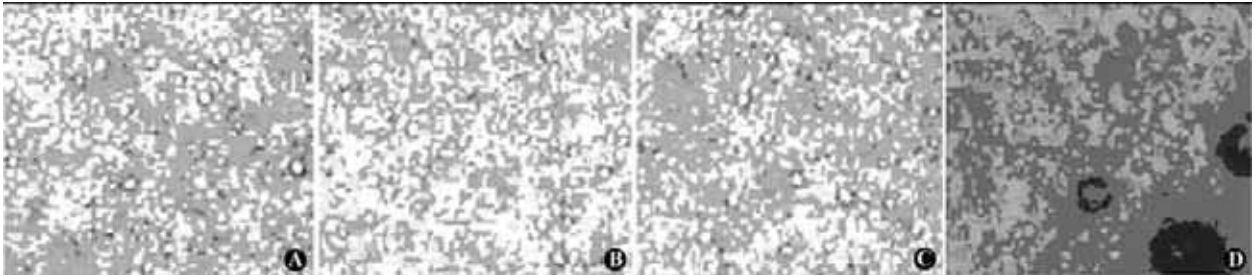


Figure 1 Microbubbles with perfluoropropane and a little oxygen as their inner gases, prepared by sonication for 1 minute with the frequency of 20 kHz and the power of 150 W under 20 °C (×200)  
A. Microbubbles preserved for 1 h after preparation, with 40 % sugar and 5 % albumin as their membrane components ; B. Microbubbles preserved for 1 h after preparation, no sugar in their membrane component ; C. Microbubbles preserved for 1 month, with 40 % sugar and 5 % albumin as their membrane components ; D. Microbubbles preserved for 1 month, no sugar in their membrane components

从图 1 可以看出,制备后存放 1 h 后,含蔗糖(图 1-A)与不含蔗糖(图 1-B)的微泡大小无明显差别;存放一月后,不含蔗糖的微泡出现明显的气泡合并现象,产生出较大的气泡(图 1-D),而含 40 %蔗糖制得的微泡尺寸无明显变化(图 1-C),微泡无明显合并现象。这一结果表明蔗糖对保持白蛋白微泡尺寸有很大影响。

目前用各种方法制备出的微泡均有一定的尺寸分布,微泡尺寸分布对于实现其造影功能来说是至关重要的。超声回波信号的反射强度与微泡直径的 1/6 成正比<sup>[4]</sup>,因此直径小于微米级的微泡也不适宜作为 UCA,此外直径超过 6 μm 的微泡由于不能通过微循环系统,也不能用于人体微管的造影。含蔗糖质量浓度为 40 %、白蛋白质量浓度为 5 % 的溶液制得的微泡尺寸分布如图 2 所示。

由图 2 知,89 %微泡的直径分布为 2 - 4 μm,96 %的直径分布为 2 - 5 μm,平均直径为 3.4 μm,可以满足人体微管造影的要求。

#### 2 蔗糖浓度对 5 %白蛋白微泡 UCA 存活半衰期的影响

微泡半衰期按下式计算<sup>[5]</sup> :

$$t_{1/2} = \frac{t \ln 2}{\ln(N_1/N_2)}$$

式中  $t$  表示检测间隔时间,实验中取  $t = 24 - 1 = 23$  h; $N_1$  及  $N_2$  分别为微泡制备后静置 1 h 及 24 h 后微泡的浓度。用不同蔗糖浓度,室温(20 °C)下进行实验,每组测定 5 次,取其平均值,测定和计算的结果如表 1 所示。

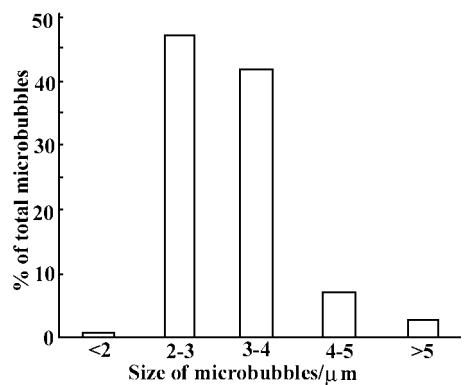


Figure 2 Size distribution of 40 % sugar containing albumin microbubbles

由表 1 可以看出,未加入蔗糖时的半衰期为 16.4 d,而加入 10 %蔗糖后即显著增加了白蛋白微气泡的半衰期,随蔗糖质量浓度的进一步增加,微气泡的半衰期不断延长,当糖质量浓度为 40 %时半衰期达到 51.5 d,继续加大蔗糖质量浓度至 50 %时,微

泡半衰期已无明显变化,表明蔗糖质量浓度为 40 % 左右时微泡半衰期的增加已达到极限。糖质量浓度从 40 % 变化到 50 % 时,气泡的半衰期虽无明显变化,但仍有微量的增加,其原因可能在于糖质量浓度的增加也使得溶液的粘弹性增加,从而阻止了微气泡之间的合并。

**Table 1 Microbubbles prepared under different sugar concentrations (20 °C)**

Sugar concentration/ %	N <sub>1</sub> ( number/ mL ) ( × 10 <sup>8</sup> )	N <sub>2</sub> ( number/ mL ) ( × 10 <sup>8</sup> )	t <sub>1/2</sub>	
			h	day
0	2.448	2.351	394.3	16.4
10	2.433	2.392	937.9	39.1
20	2.506	2.468	1043.2	43.5
30	2.485	2.452	1192.3	49.2
40	2.499	2.467	1236.8	51.5
50	2.506	2.474	1240.3	51.7

N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>: Concentration of the microbubbles prepared after 1 h and 24 h, respectively

**3 蔗糖对白蛋白微泡热稳定性的影响**

取制备后存放 1 h 的不含蔗糖及含 40 % 蔗糖的白蛋白微泡溶液,分别于 20, 25, 30, 35 和 40 °C 恒温保持 30 min, 然后测微泡的存活率(微泡的存活率是未破裂的微泡占原有微泡数量的百分率)。图 3 为微气泡的存活率与温度之间的关系曲线。

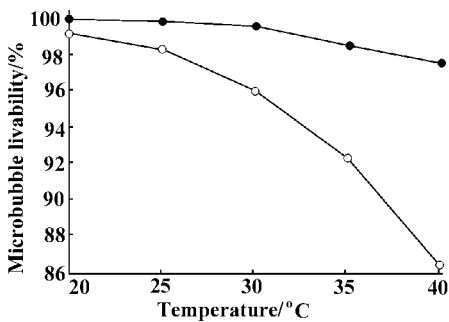


Figure 3 Curves about the relation between temperature and microbubble livability

•—• Containing 40 % sugar; ○—○ Without sugar

由图 3 可以看出,随着温度的上升,两种微气泡均呈现出一定程度的破裂,不含蔗糖的白蛋白微泡的耐热性能较差,存活率呈现明显的下降趋势,而含 40 % 蔗糖制得的微泡存活率变化不大,表现出较强的耐热性能。

在低温下保存,可以进一步延长微泡的寿命。我们将含蔗糖 40 % 的白蛋白微泡在 4 °C 密封保存半年,未观察到明显的微泡数量及尺寸变化(图 4)。

由此可见,含蔗糖 40 % 的白蛋白微泡是相当稳定的。

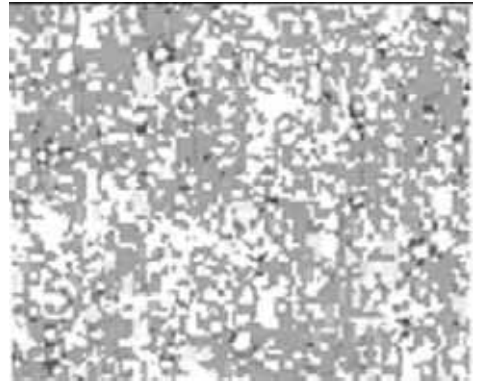


Figure 4 Optical microscope picture of the microbubbles containing 40 % sugar kept for half a year ( × 200 )

**4 含 40 % 蔗糖白蛋白微泡的谐波性能**

含 40 % 蔗糖白蛋白微泡超声造影剂、金属平板和奶粉散射源介质的 A 型超散射信号(图 5), 试验方法参考文献[6]。接收信号经中心频率为 1 MHz, 带宽 0.5 MHz 的高斯带通滤波后,提取出的基波信号如图 5-A 所示,可以看出金属板的基波反射信号非常明显,含有造影剂的部位回波幅度与来自奶粉的散射幅度相差不大。接收信号经中心频率为 2 MHz, 带宽为 0.5 MHz 的带通滤波器后的结果如图 5-B 所示,从图中也可看到蔗糖白蛋白包膜微泡造影剂在 2 次谐波上的响应幅度明显高于其他散射源,表现出较强的非线性。

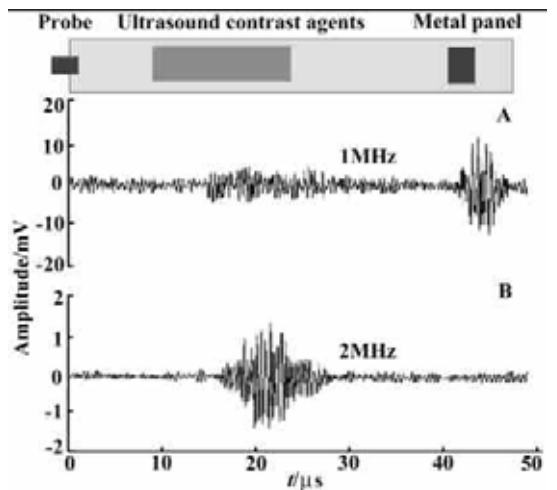


Figure 5 Fundamental wave and secondary harmonic wave detected by measuring probe

A. Fundamental ultrasound signal received by probe of 1 MHz; B. Secondary harmonic ultrasound signal received by probe of 2 MHz

## 讨 论

从本实验结果可以看出,通过声空化法制备出的含蔗糖白蛋白微泡,尺寸分布较为集中,96%的微泡直径分布区间为2 - 5  $\mu\text{m}$ ,平均直径为3.4  $\mu\text{m}$ ,4  $^{\circ}\text{C}$ 下保存半年微泡无明显变化,2次谐波上的反射幅度显著高于背景及对比散射源,性能明显优于不含蔗糖的白蛋白微泡,适合于人体微管的超声造影。此外,含蔗糖的微泡还具有极强的耐热性能,温度升高时的存活率明显高于不含蔗糖的微泡,因而有利于常温保存或运输。

除了液膜之外,微泡的稳定同时受泡内气体的影响。有研究者发现含全氟化碳的微泡如果同时含有少量氧气会进一步促进微泡在血液中的稳定性,从而取得更强的心肌显影效果<sup>[7]</sup>。基于这一结果,我们在实验中将蔗糖白蛋白溶液依次用氧气及全氟丙烷气体饱和,以增强微泡在体内的稳定性。全氟丙烷的化学及热力学性质稳定,不易燃烧,无毒性(致死量超过1 kg/70 kg 人体重量),适于临床应用。因此对微泡造影剂的制备来说,是一种性能优良的气体材料。

## STUDY ON THE PREPARATION OF A NEWSUGAR ALBUMIN MICROBUBBLE ULTRASOUND CONTRAST AGENT

DU Yong-feng, WAN Ming-xi, ZHAO Wen-ming

(Department of Biomedical Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To study a new sugar albumin microbubble ultrasound contrast agents with diameters ranging in several microns. **METHODS** Microbubbles were prepared by sonication in controlled power and frequency. Perfluoropropane and a little oxygen were adopted as the gas components in the microbubbles. The half life time and the change of microbubble size as well as heat resistance of the albumin microbubble ultrasound contrast agent when adding saccharose were investigated. The secondary harmonic ability of the produced sugar microbubble were evaluated. **RESULTS** With increasing sugar concentration in a certain range under normal temperature, the stability of albumin microbubble was constantly enhanced. When the sugar concentration reached 40%, microbubble half-life time was prolonged to more than 50 days, size of the 96% microbubbles remained 2 - 5 microns and no obvious incorporation occurred between microbubbles when kept 2 weeks under normal temperature (20  $^{\circ}\text{C}$ ). At the same time heat resistance was also enhanced. The prepared sugar albumin microbubbles (containing 40% sugar) showed no obvious change in quantity when kept half year under 4  $^{\circ}\text{C}$ . The sugar containing microbubbles also showed stronger nonlinear properties than the background scatter and compared metal panel. **CONCLUSION** It is possible to prepare excellent microbubble ultrasound contrast agent with 40% sugar and albumin as its membrane components, perfluoropropane and a little oxygen as its inner gases.

**KEY WORDS:** ultrasound contrast agent; microbubble; sugar

## REFERENCES:

- [1] Goldberg BB. *Ultrasound Contrast Agents* [M]. London: Martin Dunitz Ltd (United Kingdom), 1997. 1 - 7.
- [2] Qu H, Jiao KF. Interactions between protein and sugar [J]. *Foreign Med Sci Sect Pharm* (in Chinese), 1999, 26(2): 95 - 98.
- [3] Qiu ZB. *Drug Design* [M]. Beijing: Higher Education Publishing House, 1999. 58 - 59.
- [4] Alexander L, Klibanov. Targeted delivery of gas-filled microspheres, contrast agents for ultrasound imaging [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999, 37: 139 - 157.
- [5] Luo ZN, Huang XC, Chen YL, et al. Experiment study of left-side contrast echocardiography by peripheral venous injection of sonicated agents [J]. *Chin Ultrasound Med* (in Chinese), 1995, 11(5): 378 - 379.
- [6] Porter T, Kricsfeld D, Cheatham S, et al. Effect of blood and microbubble oxygen and nitrogen content on perfluorocarbon-filled dextrose albumin microbubble size and efficacy: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 1998, 11(5): 421 - 425.
- [7] De Jong N, Cornet R, Lancee CT. Higher harmonics of vibrating gas-filled microspheres. Part two: measurements [J]. *Ultrasonics*, 1994, 32(6): 455 - 459.