

## ❖ 实验研究

## Ultrasound imaging of novel microbubbles contrast media with a shell of N-palmitoyl chitosan

BIN Jian-guo<sup>1</sup>, WU Jue-fei<sup>1</sup>, HUANG Rui-zhu<sup>1</sup>, XIAO Yun-bin<sup>1</sup>, LI Mei-yu<sup>1</sup>,  
CHEN Dong-dong<sup>1</sup>, YANG Li<sup>2</sup>, JIANG Gang-biao<sup>3\*</sup>, BIN Jian-ping<sup>1\*</sup>  
(1. Department of Cardiology, 2. Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 3. Department of Pharmaceutical Engineering, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**[Abstract]** **Objective** To develop a novel microbubbles with N-palmitoyl chitosan (PCMB) contrast media, and to evaluate its effect on ultrasound contrast imaging. **Methods** N-palmitoyl chitosan solution was sonicated to create PCMB. Optical micrographs, Coulter counter and Zeta potential were used to determine the bubbles' size, morphology, concentration and electric potential. The contrast-enhanced images of left ventricle, liver and kidney were required during intravenous bolus-injections of 0.1 ml PCMB. "Quanfuxian" was serviced as the control. The peak intensity (PI), time to peak intensity (TTP), half peak intensity (HPT) and visual opacification-time were analyzed offline with PC software. **Results** PCMB was well-distributed with a mean concentration of  $(2.88 \pm 0.45) \times 10^9$ /ml, a mean diameter of  $(1.31 \pm 0.07) \mu\text{m}$  (99.98% of them were smaller than  $8 \mu\text{m}$ ) and a surface potential of  $(55.03 \pm 3.08)\text{mV}$ . Satisfactory ultrasound contrast images of the left ventricle, liver and kidney were got after PCMB. TP and TTP of PCMB was similar to Quanfuxian ( $P > 0.05$ ), while HPT and the visual opacification-time of PCMB were obviously longer than Quanfuxian ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** The novel microbubbles, with inexpensive and good-biocompatibility shell material N-palmitoyl chitosan, have excellent efficacy on ultrasound contrast imaging.

**[Key words]** Microbubbles; Contrast media; N-palmitoyl chitosan

## 以 N-软酯酰基壳聚糖为壳膜的新型 超声微泡造影剂的对比成像

宾建国<sup>1</sup>, 吴爵非<sup>1</sup>, 黄瑞珠<sup>1</sup>, 肖云彬<sup>1</sup>, 李美瑜<sup>1</sup>, 陈冬冬<sup>1</sup>, 杨莉<sup>2</sup>, 蒋刚彪<sup>3\*</sup>, 宾建平<sup>1\*</sup>  
(1. 南方医科大学南方医院心内科, 2. 药学部, 广东 广州 510515; 3. 华南农业大学制药工程系, 广东 广州 510642)

**[摘要]** **目的** 制备 N-软酯酰基壳聚糖微泡(PCMB)类超声造影剂, 评价其超声对比成像效果。 **方法** 以 N-软酯酰基壳聚糖为膜材料采用声振法制备 PCMB 造影剂, 用光学显微镜、库尔特计数器、Zeta 电位仪检测其大小、形态、浓度和表面电位。经大鼠尾静脉团注 0.1 ml 该造影剂观察大鼠左心室、肝脏、肾脏超声造影效果, 脱机分析峰值强度(PI)、达峰时间(TTP)、峰值减半时间(HPT)、廓清时间等参数, 并与全氟显进行造影性能比较。 **结果** PCMB 分布均匀, 浓度为  $(2.88 \pm 0.45) \times 10^9$ /ml, 直径为  $(1.31 \pm 0.07) \mu\text{m}$  (99.98% 微泡直径小于  $8 \mu\text{m}$ ), 表面电位为  $(55.03 \pm 3.08)\text{mV}$ ; 对大鼠左心室、肝脏、肾脏超声造影图像清晰, PI 和 TTP 与全氟显相近 ( $P > 0.05$ ), 但 HPT 及廓清时间明显延长 ( $P < 0.001$ )。 **结论** 以廉价和生物相容性好的 N-软酯酰基壳聚糖为壳膜材料制备新型超声造影剂具有良好的超声对比成像效果。

**[关键词]** 微泡; 造影剂; 软酯酰基壳聚糖

**[中图分类号]** R445.1; R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2010)07-1197-04

**[基金项目]** 国家 863 计划项目(2006AA02Z478)、国家自然科学基金(30870722)。

**[作者简介]** 宾建国(1976—), 男, 湖南衡阳人, 在读硕士, 主治医师。研究方向: 超声分子成像。E-mail: binjianguo120@163.com

**[通讯作者]** 宾建平, 南方医科大学南方医院心内科, 510515。E-mail: jianpingbin@126.com

蒋刚彪, 华南农业大学制药工程系, 510642。E-mail: gbjiang@scau.edu.com

**[收稿日期]** 2009-12-16 **[修回日期]** 2010-01-21

目前的微泡超声造影剂 (microbubble ultrasound contrast agents, mUCA) 产品存在价格昂贵、生物相容性不佳、不易化学修饰等不足, 研究者们一直在致力于研发更为理想的超声造影剂<sup>[1]</sup>。N-软脂酰基壳聚糖 (N-palmitoyl chitosan, PLCS) 集聚合物和多糖材料的优点于一身, 表面活性性能优良, 是一种优越的微泡膜材料。本实验采用 PLCS 制备 N-软脂酰基壳聚糖微泡 (N-palmitoyl chitosan microbubbles, PCMB), 观察其基本理化特征并评价其声学性能。

**1 材料与方 法**

**1.1 材料与仪器**

1.1.1 实验材料 N-软脂酰基壳聚糖及交联剂 (由华南农业大学资源环境学院提供); C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> 氟碳气体 (广东佛山); 全氟显超声造影剂 (由南方医院药学部提供, 实验前用 3 ml 生理盐水稀释备用)。

1.1.2 实验仪器 电子天平 (TB-215D 型, 北京赛多利斯仪器系统有限公司); 恒温水浴箱 (DK-S22 型, 上海精宏实验设备有限公司); IKA ULTRA-TURRAX 剪切仪; Olympus BX51 光学显微镜; Siemens Sequoia512 超声诊断仪; Multisizer III 库尔特计数仪; Malvern Zeta 粒径电位分析仪。

1.1.3 实验动物准备 Wistar 大鼠 10 只 (雄性, 体质量 200~230 g, 由南方医院动物实验中心提供)。超声造影前大鼠腹腔麻醉, 用脱毛膏脱去心前区、肝区、肾区体毛, 仰卧 (或俯卧) 位保定于蛙板上, 尾静脉插留置针。

**1.2 实验方法**

1.2.1 制备 PCMB 参照文献<sup>[2]</sup>步骤, 将适量 PLCS 等膜材料加入 20 ml 蒸馏水中, 在 50℃ 水浴条件下轻轻搅拌溶解 90 min, 置入 50 ml 注射器内, 注射器头端以三通管连通 C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> 氟碳气体。将声振仪置入注射器内至液面下 2.5 cm 处, 在通入氟碳气体的同时, 以声振仪第 5 档 (21 000 r/min) 剪切 40 s 后, 转第 6 档 (24 000 r/min) 剪切 80 s。微泡制备后分装入安培瓶中, 填充全氟丙烷气体并密封瓶口, 4℃ 保存备用。

1.2.2 PCMB 理化性质检测 取一小滴 PCMB 滴至血细胞计数板上, 用光学显微镜观察微泡的形态、大小、分布; 取 50 μl PCMB 稀释 2000 倍, 用库尔特计数仪测定微泡的浓度、大小; 100 μl 微泡用三蒸水稀释 50 倍后加入 Zeta 电位仪检测池中分析微泡表面电位值。于微泡制备后即刻、2 个月后、6 个月后 3 个时间段分别进行上述检测, 评价 PCMB 在体外

的稳定性。

1.2.3 超声造影剂分组 造影剂分为 PCMB 1 组 (制备后)、PCMB 2 组 (制备后 4℃ 保存 6 个月) 和全氟显组。每只大鼠经尾静脉依次团注上述 3 种造影剂 0.1 ml 后, 逐次行左心室、肝脏、肾脏超声造影检查。重复注射时, 间隔时间大于 15 min。

1.2.4 超声造影检查 使用 Sequoia 512 超声诊断仪, CPS 成像模式, 探头 17L5, 探头发射和接收频率分别为 7.0 和 14.0 MHz, 机械指数为 0.18, 触发间隔 125 ms。将超声探头分别置于大鼠左心室、肝脏、肾脏体表, 待二维图像调整满意后, 超声探头位置、仪器增益、扫描深度保持不变, 行超声造影, 并将全部造影结果存储于 DVD 盘中以供脱机分析。检查完成后将成像图像输入 Siemens Syngo ACQ 分析系统, 选择左心室腔、肝实质、肾脏适当大小和形状的兴趣区 (region of interest, ROI), 获取下列参数: 峰值强度 (peak intensity, PI)、达峰时间 (time to peak intensity, TTP)、峰值减半时间 (half peak time, HPT)、廓清时间 (从开始显像到声强度降至 5 dB 之间的时间)。同一脏器 ROI 均取同样大小和形状, 以减少取样误差。

1.3 统计学处理 数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组数据间比较采用独立样本的 *t* 检验, 多组间数据比较采用方差分析, 两两比较用 LSD 法。P < 0.05 (双侧) 为差异有统计学意义。

**2 结果**

2.1 微泡外观 PCMB 制备后呈白色凝乳状, 静置 24 h 后上层为约 2~3 mm 的白色微泡聚集层, 下层为透明溶液; 轻轻摇匀后造影剂呈均匀毛玻璃样混悬液。

2.2 微泡理化特征检测 光学显微镜观察, 微泡呈透亮球形, 分布均匀, 彼此无聚集现象; 保存 2 个月和 6 个月后微泡仍保持球形, 浓度和大小较前无明显差异 (图 1)。Zeta 电位仪测定表面电位为 (55.3 ± 2.1) mV。库尔特计数仪分析显示, PCMB 的浓度显著高于全氟显 [(2.88 ± 0.45) × 10<sup>9</sup>/ml vs (1.34 ± 0.34) × 10<sup>9</sup>/ml, P < 0.001], 平均直径则明显小于全氟显 [(1.31 ± 0.07) μm vs (2.87 ± 0.40) μm; P < 0.001]; 保存 2 个月及 6 个月后, 浓度及平均直径均与制备初期相近 (P > 0.05)。该微泡粒径分布较窄, 99.98% 微泡小于 8 μm, 而保存 2 个月及 6 个月后全部微泡均小于 8 μm (表 1)。

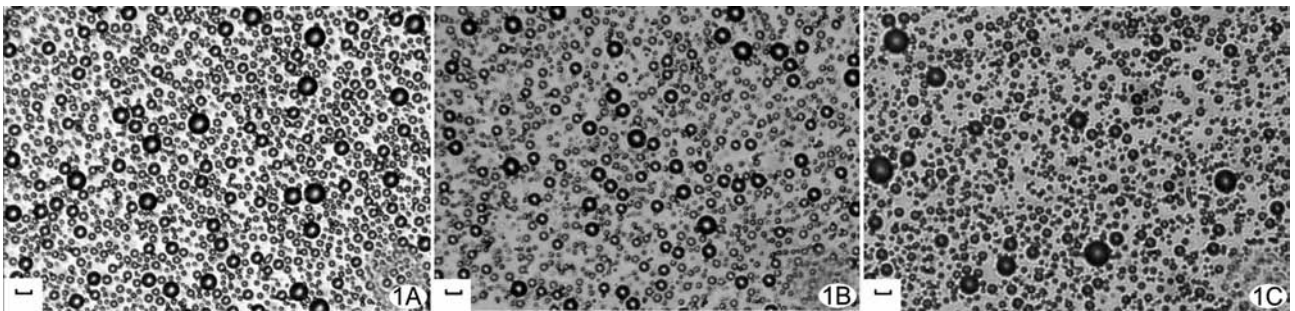


图 1 N-软脂酰基壳聚糖微泡的光学显微镜照片 (×200) 及马尔文粒径检测图 A. 制备 24 h; B. 制备 2 个月后; C. 制备 6 个月后 (图中标尺均为 5 μm)

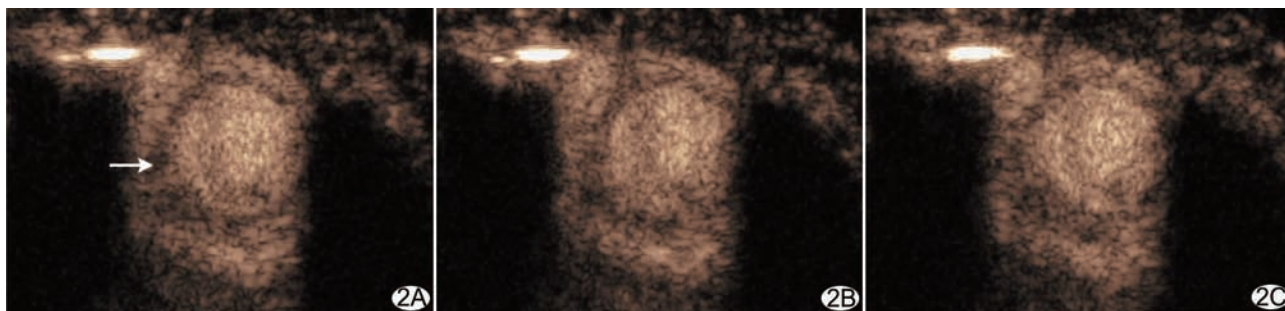


图 2 N-软酯酰基壳聚糖微泡和全氟显的左心室超声造影图像 A. PCMB 1 组(箭示心肌组织); B. PCMB 2 组; C. 全氟显组



图 3 N-软酯酰基壳聚糖微泡和全氟显的肝脏超声造影图像 A. PCMB 1 组; B. PCMB 2 组; C. 全氟显组

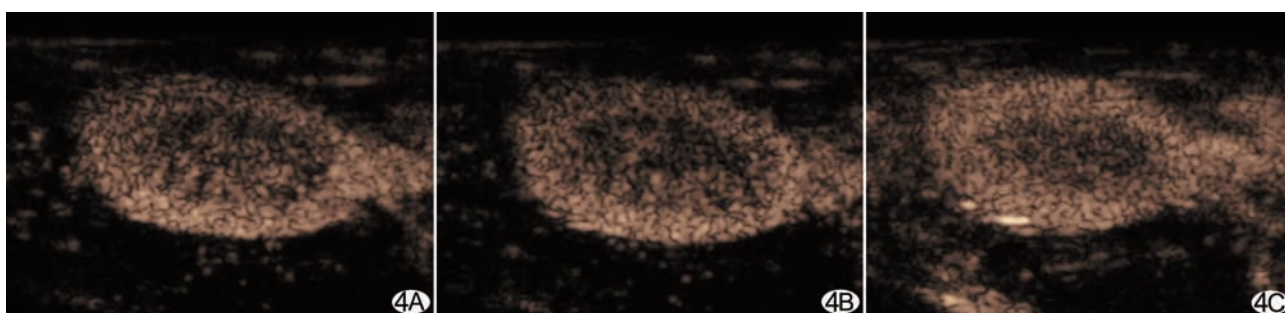


图 4 N-软酯酰基壳聚糖微泡和全氟显的肾脏超声造影图像 A. PCMB 1 组; B. PCMB 2 组; C. 全氟显组

表 1 PCMB 与全氟显的物理参数比较

造影剂	浓度( $10^9$ 个/ml)	直径( $\mu\text{m}$ )	直径 $<8 \mu\text{m}$ 比例(%)
制备后的 PCMB	$2.88 \pm 0.45^*$	$1.31 \pm 0.07^*$	99.98
保存 2 个月的 PCMB	$2.78 \pm 0.47^*$	$1.27 \pm 0.07^*$	100
保存 6 个月的 PCMB	$2.59 \pm 0.42^*$	$1.22 \pm 0.05^*$	100
全氟显	$1.34 \pm 0.34$	$2.87 \pm 0.40$	98.00

注: \* : 与全氟显相比较,  $P < 0.05$

2.3 超声造影效果 经大鼠尾静脉分别团注 PCMB 和全氟显后所有实验大鼠均获得满意的左心室(图 2)、肝脏(图 3)和肾脏(图 4)声学造影图像,造影剂充填均匀,与周围组织分界清晰。静脉注射 PCMB 后左室壁心肌组织获得了良好的声学增强效果(图 2A),增强强度弱于左心室腔,使左室内膜边界清晰显示,成像效果与全氟显相似(图 2C)。

2.3.1 PCMB 1 组与全氟显组超声造影比较 两者 PI 和 TTP 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ );PCMB 的 HPT 和廓清时间则明显长于全氟显(其中 HPT 约为  $4 \sim 5.5 \text{ min}$  vs  $2$

$\sim 3 \text{ min}$ ,廓清时间约为  $7 \sim 9 \text{ min}$  vs  $3 \sim 4.5 \text{ min}$ ,  $P < 0.001$ ,表 2)。

2.3.2 PCMB 2 组与 PCMB 1 组超声造影比较 两者 PI 和 TTP 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ );肾脏造影时两者 HPT 和廓清时间相近( $P > 0.05$ ),而心脏和肝脏造影时前者有明显缩短( $P < 0.001$ ),但仍显著长于全氟显组( $P < 0.001$ ,表 2)。

### 3 讨论

PLCS 作为微泡膜材料具有以下优势:①价格低廉:壳聚糖来源于虾蟹的外壳,市场售价仅需 80 元/千克,PLCS 是在壳聚糖的氨基端接枝软酯酰疏水基团制备而成,与白蛋白、脂质等材料相比具有明显的价格优势;②生物相容性好:壳聚糖及其衍生物具有无毒性、无刺激性、生物可降解性和生物相容性良好等优点,已被广泛应用于生物医药领域<sup>[3]</sup>;③易修饰性:PLCS 和壳聚糖一样含有丰富的自由氨基和羟基等活性基团<sup>[4]</sup>,可与药物<sup>[5]</sup>、基因<sup>[6]</sup>或配体<sup>[7]</sup>共价链接而无需额外添加锚点;更重要的是这种化学修饰所需的反应条件温和,有利

于保持链接物的生物活性<sup>[8]</sup>;④超声空化效应小: Fisher 等<sup>[9-10]</sup>研究发现,白蛋白、脂质等负电荷超声造影剂通过激活的 C3b 介导与内皮细胞结合而滞留微循环,易引起超声空化效应的损伤;而 PLCS 为正电荷聚合物,PCMB 的表面电位为(55.3±2.1)mV,不易在正常组织血管内滞留,却易在富含负电荷的肿瘤组织周围滞留。此外,PLCS 是一种高分子表面活性剂,具有良好的自聚集能力和形成囊泡能力<sup>[4]</sup>,成膜性好,是一种理想的微泡膜材料。

由于 PLCS 是一种性能优越的表面活性剂,所以本研究采用声振法制备 PCMB。与包裹空气的 N-羧甲基壳聚糖微泡<sup>[11]</sup>相比,这种方法所制备的包裹氟碳气体的微泡在理论上更加稳定<sup>[12-13]</sup>。而 PCMB 4℃ 保存 2 个月甚至 6 个月后仍然保持良好的形态、浓度及造影效果,在实验方面也证明其稳定性非常好。PCMB 粒径分布范围较窄,99.98% 的微泡直径 < 8 μm,平均直径小于白蛋白微泡和脂质微泡,减小了对血流动力学的影响。

本实验以全氟显作为对照来评价 PCMB 的声学性能。全氟显是南方医院自行研制的声学性能良好的白蛋白类微泡造影剂<sup>[14-15]</sup>,已获得国家药品和食品药品监督管理局 I 类临床新药证书(证书编号: S20060055)。超声造影实验显示,PCMB 对大鼠左心室、肝脏、肾脏实时灌注显像图像清晰,造影剂充填均匀,实验可重复性好。PCMB 的达峰时间与全氟显相近(P>0.05);虽然粒径明显小于全氟显,但浓度却显著高于后者,两因素的相互作用结果是其 PI 与全氟显相似;其 HPT 和廓清时间比全氟显明显延长,考虑有以下原因:①PLCS 在交联剂的作用下容易形成力学强度较高的体型(三维网状)结构,使 PCMB 能更好地抵抗左心室压、循环血压及超声所造成的破坏;②PCMB 平均直径较小,能快速通过微循环,从而避免被微循环尤其是肺循环的拦截和巨噬细胞的吞噬。考虑到保存 6 个月的 PCMB 在浓度、粒径、成像 PI、HPT 廓清时间较制备之初均有一定程度降低,下一步有必要将 PCMB 制备成冻干粉制剂,以利于该药剂的保存和实际应用。

总之,本实验初步证明 PCMB 是一种廉价、生物相容性及声学性能良好的超声造影剂,下一步将会对其安全性及可靠性进行更深入的研究。基于 PLCS 优越的理化性质,相信 PCMB 在超声触发药物和基因传递系统以及超声分子成像领域将有极大的发展前景。

[参考文献]

[1] 赵玉英,智光.多聚体超声造影剂的研究进展.中国超声医学杂志,2003,19(4):318-320.

表 2 3 组超声造影剂对大鼠左心室、肝脏、肾脏的超声造影参数比较(̄x±s)

部位	分组	PI(dB)	TTP(s)	HPT(s)	廓清时间(s)
左心室	PCMB1 组	33.43±3.59	23.8±5.1	316.0±23.9*	545.4±18.1*
	PCMB2 组	32.12±3.96	24.4±6.2	245.9±21.8*#	399.9±22.7*#
	全氟显组	33.79±3.54	24.9±6.3	201.3±22.6	280.3±23.3
肝脏	PCMB1 组	25.59±2.59	23.7±4.4	336.4±22.9*	489.9±29.4*
	PCMB2 组	24.57±3.17	22.7±4.9	233.6±17.5*#	394.6±23.0*#
	全氟显组	24.60±2.80	24.3±5.7	95.0±14.4	226.1±16.3
肾脏	PCMB1 组	25.42±2.12	23.2±4.9	263.9±21.4*	411.8±18.6*
	PCMB2 组	23.71±2.64	23.3±3.8	255.4±22.1*	395.9±26.0*
	全氟显组	25.13±3.20	22.8±4.7	122.7±17.4	246.7±22.2

注: \* : 与全氟显组相比, P<0.05; # : 与 PCMB1 组相比, P<0.05

[2] 区文超,鲁树坤,修建成,等.自制脂质微泡造影剂显影效果的研究.中国临床医学影像杂志,2005,16(12):672-674.

[3] Kim IY, Seo SJ, Moon HS, et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. Biotechnology Advances, 2008,26(1):1-21.

[4] Jiang GB, Quan D, Liao K, et al. Novel polymer micelles prepared from chitosan grafted hydrophobic palmitoyl groups for drug delivery. Mol Pharm, 2006,3(2):152-160.

[5] 王来友,蒋刚彪,方羽生,等.N-软脂酰基壳聚糖的制备及其改善毓玉红水溶性的药理学研究.广东药学院学报,2009,25(1):7-10.

[6] Liu WG, Yao KD. Chitosan and its derivatives—a promising non-viral vector for gene transfection. Journal of Controlled Release, 2002,83(1):1-11.

[7] Jean M, Smaoui F, Lavertu M, et al. Chitosan-plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies. Gene Ther. 2009,16(9):1097-1110.

[8] Krajewska B. Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials. Separation and Purification Technology, 2005,41(3):305-312.

[9] Fisher NG, Christiansen JP, Klivanov A, et al. Influence of microbubble surface charge on capillary transit and myocardial contrast enhancement. J Am Coll Cardiol, 2002,40(4):811-819.

[10] 敖梦,王志刚,冉海涛.高分子材料超声造影剂的研究进展.中国介入影像与治疗学,2009,6(3):293-295.

[11] 吕丰,陈素霞,刘天军,等.N-羧甲基壳聚糖微泡超声造影剂的制备与性能评价.中国医学科学院学报,2006,28(4):497-501.

[12] Porter TR, Xie F, Kilzer K. Intravenous perfluoropropane-exposed sonicated dextrose albumin produces myocardial ultrasound contrast that correlates with coronary blood flow. J Am Soc Echocardiogr, 1995,8(5 Pt 1):710-718.

[13] 张雪娇,程永清,李丽君,等.包膜微泡超声造影剂的研究进展.中国医学影像技术,2005,21(5):819-821.

[14] 查道刚,张稳柱,刘俭,等.全氟显声学显像效果的研究.中国超声医学杂志,2002,18(4):252-255.

[15] 吕清,郑智超,王新房,等.全氟显左心声学造影的临床应用.临床心血管病杂志,2005,21(11):674-676.