

产气脂质纳米粒的制备及其光声成像研究

夏纪筑 冯 罡 夏晓蓉 郝 兰 王志刚

摘 要 **目的** 研制一种可生物降解,其产物可完全排除机体的光声成像材料。**方法** 采用薄膜水化法加脂质体挤出法制备产气脂质纳米粒;应用肉眼、光镜、电镜、激光粒径仪检测纳米粒物理特性;光声成像仪、红外光谱仪探讨纳米粒光声成像机制;应用光声成像仪检测纳米粒体外、体内成像效果及安全性。**结果** 肉眼观察碳酸氢铵脂质纳米粒呈透明乳状,粒径 $(230.9\pm 54.58)\text{nm}$,电位 $(-22.8\pm 5.75)\text{mV}$,稳定性较好。纳米粒光声信号随浓度、温度、时间增加而增强;体外激光辐照对细胞无损伤作用。经鼠尾静脉注入纳米粒,各组正常裸鼠血氨浓度均较对照组升高(均 $P<0.05$),但精神体征与对照组无明显改变。荷瘤裸鼠肿瘤局部出现光声信号,于 4 h 达到高峰,随后逐渐消失;激光能量对皮肤及皮下组织均无损伤作用。**结论** 碳酸氢铵脂质纳米粒可用于光声成像,且安全、有效、价廉、无副作用。

关键词 光声成像;纳米粒,可降解;碳酸氢铵;裸鼠

[中图法分类号]R-33;R445.1

[文献标识码]A

A study of a novel gas-generating liposomal nanoparticle for photoacoustic imaging

XIA Jizhu, FENG Gang, XIA Xiaorong, HAO Lan, WANG Zhigang

Department of Ultrasound, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Sichuan 646000, China

ABSTRACT **Objective** To develop a biodegradable contrast agent for photoacoustic imaging. Its biodegradation products could be fully removed from a living organism. **Methods** The gas-generating liposomal nanoparticles were prepared by thin-film hydration and liposome extrusion methods. The general physical characteristics were detected by light microscope, electron microscope and laser particle size analyzer. The photoacoustic imaging mechanism was explored by photoacoustic imaging device and infrared spectrometer. The photoacoustic imaging quality and safety were evaluated by photoacoustic imaging device in vitro and in vivo. **Results** The nanoparticles were spherical with regular morphology and uniform size distribution, there was no obvious aggregation. The mean particle size of nanoparticles was $(230.9\pm 54.58)\text{nm}$ with uniform distribution and dispersion, Zeta potential was $(-22.8\pm 5.75)\text{mV}$. The intensity and the area of the photoacoustic signals were enhanced corresponding to the increase of concentration, temperature and time. There was no damage to cells by laser radiation. During in vivo test, serum ammonia concentrations for various treatment groups were higher than those in the control group (all $P<0.05$), but vital signs observation of nude mice showed that there had no significant changes in foraging and movement compared with the control group. Photoacoustic signals were detected from the tumor, reached the peak in 4 h and then disappeared gradually. There was no damage to the skin and subcutaneous tissue by laser radiation. **Conclusion** The gas-generating nanoparticles of liposome encapsulating ammonium bicarbonate solution can be used for photoacoustic imaging, and it is safe, effective, cheap and free of side effects.

KEY WORDS Photoacoustic imaging; Nanoparticle, biodegradable; Ammonium bicarbonate; Nude mouse

光声成像是具有纯光学成像的高对比度和纯超声的高穿透性的无创成像方法,能提供生物组织的结构、形态、代谢功能、生理和病理特征等^[1-2],是近期研究的热点。但是,组织对激光具有较强的散射效应,导致光

强和光声信噪比随组织深度的增加呈指数级衰减^[3-5]。目前用于研究的光声成像造影剂材料^[6-8]还存在安全性低、价格昂贵等问题,不能广泛应用于临床,因此,需要寻找一种安全、价廉、无副作用的物质作为增强对比

基金项目:国家自然科学基金项目(81501481)

作者单位:646000 四川省泸州市,西南医科大学附属医院超声医学科(夏纪筑、夏晓蓉);重庆医科大学超声影像学研究所 超声分子影像重庆市

重点实验室 重庆医科大学附属第二医院超声科(冯罡、郝兰、王志刚)

通讯作者:王志刚, Email: wzg62942443@163.com

剂材料用于光声成像。本课题组前期研究发现,碳酸氢铵溶液具有光声信号,其分解产物均为人体正常代谢物,可经机体完全排除,对人体无害。本实验旨在制备一种包裹碳酸氢铵饱和溶液的脂质纳米级造影剂,体外检测验证其可行性及有效性,并阐明其成像原理;体内实验测试其安全性及成像效果,为其用于光声成像奠定坚实基础。

材料与方法

一、仪器与材料

光声成像仪(VevoLAZR, VisualSonics 公司,加拿大);红外光谱仪(Spectrum 100, PerkinElmer 公司,美国);光学显微镜(Olympus BX54, 日本);扫描电子显微镜(Hitach S-3000N, 日本);分析纯碳酸氢铵(成都市科龙化工试剂厂,中国)。

二、纳米粒的制备及物理特性检测

1. 纳米粒的制备:采用薄膜水化法加脂质体挤出法制备。具体方法:①DPPC、DPPG 与胆固醇按质量比 6:2:2 加入三氯甲烷中溶解;②旋转蒸发仪将上述溶液在温度 50℃、转速 60 r/min 条件下旋转约 60 min;③旋转结束时加入碳酸氢铵饱和溶液,并置于超声波清洗机振荡数秒;④将上述溶液分别经过孔径为 800 nm、400 nm、200 nm 的挤出仪滤膜;⑤将挤出的溶液放入 5% 葡萄糖溶液中透析。

2. 物理特性检测:①肉眼观察溶液外观;②光镜和电镜下观察纳米粒形态、分布;③激光粒径仪检测纳米粒粒径大小及 Zeta 电位;④稳定性观察。

三、纳米粒光声成像的机制研究

采用光声成像仪辐照碳酸氢铵饱和溶液,确定最佳辐照波长。红外光谱仪/光声成像仪测定碳酸氢铵饱和溶液、CO₂、双蒸水、氨水、5%葡萄糖溶液及包裹双蒸水纳米粒吸收光谱及光声信号图。光声成像仪测定碳酸氢铵、碳酸铵、硫酸铵、氯化铵、碳酸氢钠、碳酸钠、硫酸钠等化合物光声信号和 pH 值。

四、光声成像体外实验

1. 以最佳触发波长辐照包裹碳酸氢铵纳米粒样品,观察光声成像效果随浓度(倍比稀释)、时间(0~100 s)、温度(25℃、37℃、42℃)的变化情况。

2. 将 MDA-MB-231 细胞随机分为 6 组:对照组(C)、单纯激光辐照组(P)、空白纳米粒组[N(H)]、包裹碳酸氢铵纳米粒组[N(N)]、激光辐照结合空白纳米粒组[P+N(H)]及激光辐射结合包裹碳酸氢铵纳米粒组[P+N(N)]。MTT 法检测各组细胞 OD 值和存活率。

五、光声成像体内实验

1. 动物及模型建立:雌性裸鼠 64 只,4~6 周龄,由重庆医科大学实验动物中心提供。MDA-MB-231 细胞为重庆医科大学超声影像学研究所传代肿瘤细胞株。细胞浓度约为 $6 \times 10^7/\text{ml}$ 时,在其中 16 只裸鼠右侧后腿部皮下注射细胞悬液 0.2 ml。3 周左右形成大小约 8~9 mm 皮下肿瘤。

2. 血氨检测及精神体征变化:将 48 只正常裸鼠随机分为 6 组,每组各 8 只;其中 A~D 组经鼠尾静脉分别注射包裹碳酸氢铵纳米粒 0.3 ml、0.5 ml、0.7 ml、0.9 ml;E 组注射包裹双蒸水纳米粒 0.9 ml;F 组注射双蒸水 0.9 ml。注射 1 d 后,取其血液,干化法检测血氨浓度;同时观察裸鼠精神、进食及排便等一般情况,时间为 1 个月。

3. 光声成像检测及病理检测:将 16 只荷瘤裸鼠随机分为两组,每组各 8 只;其中实验组经鼠尾静脉注射包裹碳酸氢铵纳米粒 0.7 ml;对照组则注射包裹双蒸水纳米粒 0.7 ml。采用光声成像仪辐照两组荷瘤裸鼠皮下肿瘤,观察两组注射前及注射后各时间点光声成像效果。肉眼观察光声成像仪照射前后皮肤完整及损伤情况;图像采集完后,断颈处死荷瘤裸鼠,取包括皮肤的肿瘤组织行 HE 染色,光镜下观察皮肤及肿瘤组织细胞结构的变化。

六、统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析;两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、包裹碳酸氢铵脂质纳米粒的一般物理特性检测

肉眼观察悬液为半透明乳状液体,未见分层,液面有少许气泡(图 1)。光镜下纳米粒呈圆球形,形态规则,大小分布均匀,无明显聚集。电镜下单个纳米粒外层双层磷脂膜,核心为充填的碳酸氢铵饱和溶液。纳米粒平均粒径为 $(230.9 \pm 54.58) \text{ nm}$, 分布及分散度均匀;Zeta 电位为 $(-22.8 \pm 5.75) \text{ mV}$ 。稳定性观察:纳米粒粒径在 4℃ 条件下随时间推移无明显变化(图 2)。

二、纳米粒光声成像的机制研究

1. 碳酸氢铵饱和溶液光声信号强度最佳触发波长约 700 nm,吸收峰值约 1300 nm(图 3);包裹双蒸水纳米粒、5%葡萄糖溶液及氨水约 1100 nm;双蒸水约 720 nm;CO₂ 约 700 nm(图 4)。各物质光声信号图见图 5;碳酸氢铵饱和溶液和 CO₂ 均有光声信号,而双蒸水、

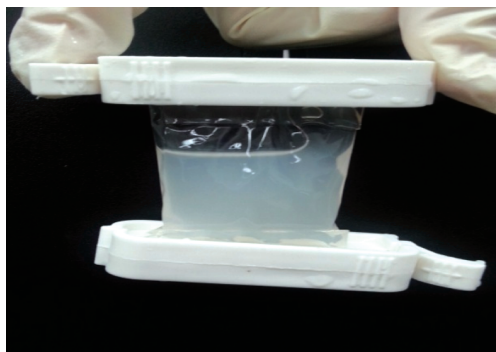


图 1 纳米粒乳液肉眼观

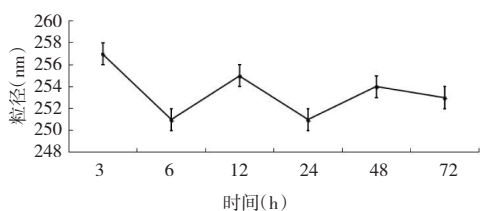


图 2 纳米粒粒径在 4°C 条件下随时间变化图

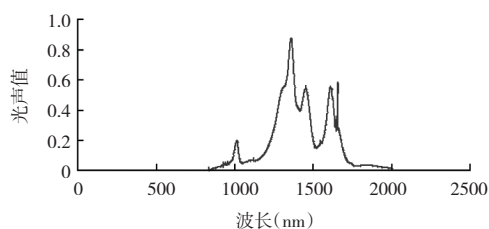


图 3 碳酸氢铵饱和溶液红外吸收光谱图

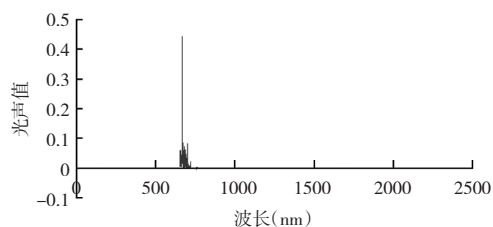
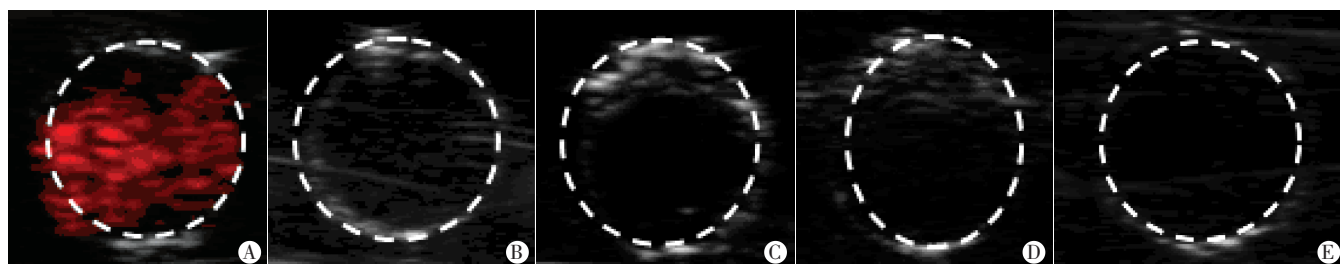


图 4 CO₂ 红外吸收光谱图



A: 碳酸氢铵饱和溶液; B: 包裹双蒸水纳米粒; C: 氨水; D: 5% 葡萄糖溶液; E: 双蒸水。

图 5 各物质光声信号图

氨水、包裹双蒸水纳米粒及 5% 葡萄糖溶液均无光声信号。

2. 碳酸氢铵饱和溶液光声信号强度、面积最大, 且出现信号时间快; 氯化铵、硫酸铵及碳酸氢钠饱和溶液均有光声信号, 但强度、面积明显均较碳酸氢铵溶液弱 (均 $P < 0.05$), 且出现信号时间慢; 而碳酸铵、碳酸钠及硫酸钠饱和溶液均无光声信号。见表 1。

三、纳米粒体外光声成像

1. 不同浓度纳米粒光声信号变化: 光声信号强度

表 1 各化合物光声信号及 pH 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

各化合物	面积(mm ²)	强度	pH 值	速度
碳酸氢铵	9.18±0.51	0.56±0.21	7.5	非常快
氯化铵	4.83±0.49*	0.25±0.15*	5.7	快
硫酸铵	3.24±0.44*	0.22±0.12*	6.7	慢
碳酸氢钠	2.53±0.57**	0.18±0.11*	7.5	慢
碳酸钠	—	—	10.0	—
碳酸铵	—	—	9.7	—
硫酸钠	—	—	7.0	—

与碳酸氢铵比较, * $P < 0.05$; 与氯化铵比较, ** $P < 0.05$ 。

随浓度梯度降低而减小 (图 6)。

2. 不同温度纳米粒光声信号变化: 与 37°C、42°C 时比较, 25°C 时光声信号强度最弱、面积最小; 与 42°C 时比较, 37°C 时面积较小, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 但二者光声信号强度比较差异无统计学意义。见图 7。

3. 不同时间纳米粒光声信号变化: 光声信号强度随时间由低逐步升高, 到达峰值后又逐步降低 (图 8)。

4. 各组 MDA-MB-231 细胞 OD 值和生存率均未见明显差异。见图 9, 10。

四、纳米粒体内光声成像

1. 正常裸鼠各组血氨浓度检测及精神体征变化: 与 E、F 组比较, A、B、C、D 均增高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); E 组与 F 组, 以及 A、B、C、D 四组之间比较差异均无统计学意义。各组正常裸鼠注射后 1 个月精神好, 行动灵敏, 大便成形, 觅食、活跃度与 E 组和 F 组无明显改变。

2. 荷瘤裸鼠瘤内光声成像效果及病理检测: 实验组在注射纳米粒前无光声信号, 注射纳米粒后 30 min

见少量光声信号,1 h 逐渐增多,且光声信号强度也逐渐增大,直到 4 h 达到高峰,然后逐渐减少,24 h 完全消

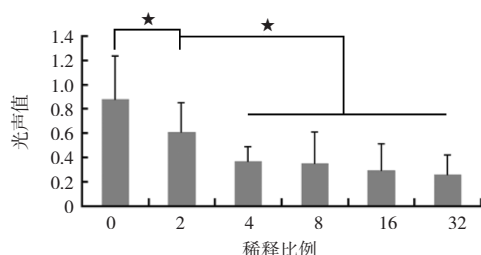


图 6 光声信号-浓度图(★示差异有统计学意义)

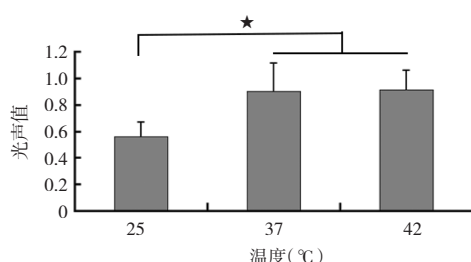


图 7 光声信号-温度图(★示差异有统计学意义)

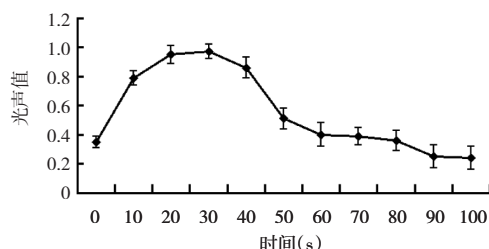


图 8 光声信号-时间图

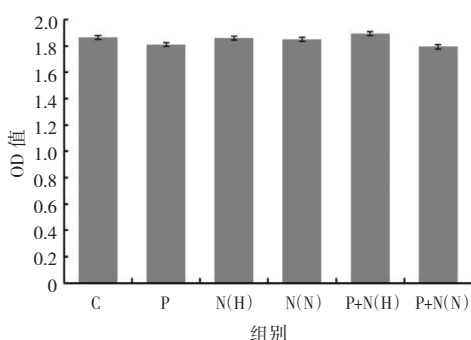


图 9 各组细胞 OD 值

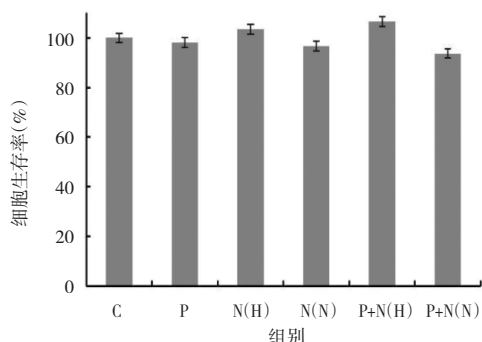
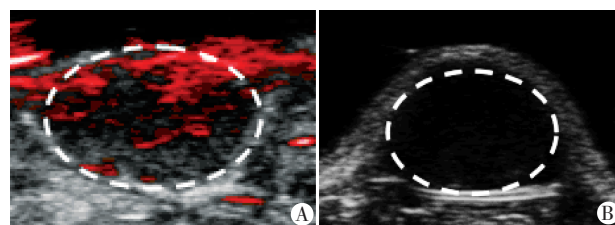


图 10 各组细胞生存率

失;对照组注射前后均未见光声信号。见图 11。激光辐照后实验组皮肤完整,无损伤;病理检测:皮肤及皮下肿瘤内未见明显坏死,肿瘤组织结构完整(图 12)。



A:实验组;B:对照组。

图 11 两组荷瘤裸鼠注射纳米粒后 4 h 皮下肿瘤光声成像图

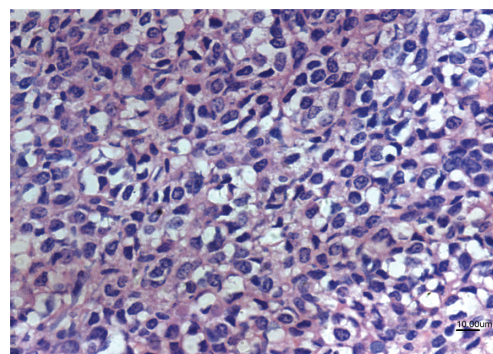


图 12 实验组肿瘤组织病理图(HE 染色,×400)

讨 论

光镜、电镜及激光粒径、Zeta 电位分析仪检测碳酸氢铵纳米粒结果显示,纳米粒呈球形,形态规则,大小均匀,稳定性较好,该纳米粒粒径较肿瘤新生血管内皮细胞间隙小,有利于穿过间隙进入肿瘤组织^[9]。

本实验前期研究发现碳酸氢铵具有光声信号。为了探明其产生光声信号原因,本实验采用红外光谱仪对各物质进行检测,结果显示仅双蒸水和 CO₂ 在光声成像仪激光触发波长范围内,提示两者在该范围内均可被触发。但由于水的比热容远比 CO₂ 高,即水需要较高能量才可出现对光的吸收,而 CO₂ 反之,因此考虑在光声成像仪激光范围内出现的光声信号为 CO₂ 所致。分析原因可能在光声成像仪辐照后,光能转化为热能,促使碳酸氢铵分解成 CO₂、氨气和水,氨气水溶性极高,易溶于水,而 CO₂ 水溶性低,大部分仍以气体形式存在。当 CO₂ 被特定波长的激光辐照后,对该特定的波长的光能产生较大的吸收,受热后膨胀产生热声波,这种热声波经声探测器接收再反应于显示屏,即光声信号。

光声信号的大小取决于光源强度及 CO₂ 对该波长处的吸收系数。为了不对机体产生损伤,本实验使用的光声成像仪光源强度满足美国国家标准学会对在

体激光应用要求,激光发射能量不高于 30 mJ,因此光源强度上限是固定的。采用光声成像仪波长在 680~970 nm 激光辐照碳酸氢铵溶液,发现在 700 nm 波长处具有最佳光声信号,与红外光谱仪检测到的 CO₂ 最强吸收峰所在波长一致,说明该触发波长为 CO₂ 的最佳波长;同时,本实验还发现 CO₂ 有光声信号,也进一步说明光声信号由 CO₂ 产生,因此选择 700 nm 作为触发波长。

本实验还采用光声成像仪检测相关化合物及 pH 值测定,结果显示碳酸氢铵饱和溶液光声信号强度、面积及密度最大,且出现时间快;氯化铵、硫酸铵及碳酸氢钠饱和溶液有光声信号,但强度、面积及密度均较碳酸氢铵溶液明显弱;而碳酸铵、碳酸钠及硫酸钠饱和溶液均无光声信号。根据溶液的酸碱性和稳定性,本实验推测可能是因为碳酸氢铵溶液最不稳定,容易在受热(激光辐照致热)后产生 CO₂,碳酸氢钠溶液也可以产生 CO₂,但其稳定性较碳酸氢铵溶液好,产生 CO₂ 也相应减少,而氯化铵溶液、硫酸铵溶液虽然不分解产生 CO₂,但因其 pH 为酸性,溶液中自然溶解的 CO₂ 因为溶解度减小而逸出,故也可产生光声信号。由于这种逸出的 CO₂ 远较碳酸氢铵溶液分解所产生的 CO₂ 少,因此其光声信号强度和面积均较碳酸氢铵溶液明显减弱。碳酸铵、碳酸钠及硫酸钠等溶液为碱性或中性溶液,CO₂ 溶解度较大,不易逸出,且比较稳定,不容易分解产生 CO₂,因此无光声信号。

本实验在激光辐照碳酸氢铵纳米粒时,发现随着辐照时间延长,光声信号强度先逐渐增强,然后逐渐降低,推测这一现象可能与碳酸氢铵分解成 CO₂ 的速度和数量有关;此外,还发现随着浓度的降低,光声信号强度降低,出现光声信号范围减小,可能与纳米粒量有关。进一步研究发现,纳米粒光声信号与温度有关,可能是温度升高,碳酸氢铵更容易分解,产生 CO₂ 更多,光声信号就越强。最后,本实验采用光声成像仪辐照了 MDA-MB-231 细胞,MTT 比色法检测结果显示,激光对各组细胞生存率均无明显改变,提示光声成像仪激光辐照对细胞是安全的。

在体内实验中,血氨检测发现 A~D 组均较 E 组和 F 组高,但对体征观察发现各组正常裸鼠注射纳米粒后 1 个月均精神好,行动灵敏,大便成形,觅食、活跃度与 E 组和 F 组无明显改变,提示虽然体内血氨升高,在肝脏、肾脏功能正常时血氨可在肝脏经鸟氨酸循环合成尿素,经肾脏排泄出机体,不会对机体产生影响,也说明小剂量及短期应用铵盐对机体不会造成严重影响^[10]。同时,实验组荷瘤裸鼠皮下肿瘤的光声信号在注

射纳米粒 30 min 时开始出现,然后逐渐增多,在 4 h 达最强,之后逐渐减少,24 h 完全消失,说明包裹碳酸氢铵纳米粒经静脉注入后能够到达肿瘤局部,并在脉冲激光的辐照下碳酸氢铵分解产生 CO₂,从而产生光声信号。肉眼观察激光辐照后肿瘤局部皮肤完整、无损伤;病理检查显示肿瘤处皮肤、组织细胞结构完整,未见明显组织或结构的破坏,说明激光能量是安全的,不会造成皮肤及皮下肿瘤组织和细胞的损伤。

但本实验也存在一些不足之处:①在安全性检测中未测定血氨在不同时间点的浓度;②未探究纳米粒包裹碳酸氢铵的量与光声成像效果的关系;③未探讨碳酸氢铵纳米粒对正常组织或细胞的毒性。

综上所述,本实验成功制备了可生物降解、代谢产物可完全排出机体,并可用于光声成像造影剂的材料;包裹碳酸氢铵溶液的脂质体有望用于临床医学领域光声成像。

参考文献

- [1] Yao J, Xia J, Wang LV. Multiscale functional and molecular photoacoustic tomography[J]. *Ultrason Imaging*, 2016, 38(1): 44-62.
- [2] Kim J, Lee D, Jung U, Kim C. Photoacoustic imaging platforms for multimodal imaging[J]. *Ultrasonography*, 2015, 34(2): 88-97.
- [3] Guttrath BS, Beckmann MF, Buchkruner A, et al. Size-dependent multispectral photoacoustic response of solid and hollow gold nanoparticles[J]. *Nanotechnology*, 2012, 23(22): 225707.
- [4] Ku G, Zhou M, Song S, et al. Copper sulfide nanoparticles as a new class of photoacoustic contrast agent for deep tissue imaging at 1064 nm[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(8): 7489-7496.
- [5] Wang C, Ma XX, Ye SQ, et al. Protamine functionalized single-walled carbon nanotubes for stem cell labeling and in vivo raman/magnetic resonance/photoacoustic triple-modal imaging[J]. *Adv Funct Mater*, 2012, 22(11): 2363-75.
- [6] Lu W, Huang Q, Ku G, et al. Photoacoustic imaging of living mouse brain vasculature using hollow gold nanospheres[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(9): 2617-2626.
- [7] Kanazaki K, Sano K, Makino A, et al. Development of human serum albumin conjugated with near-infrared dye for photoacoustic tumor imaging[J]. *J Biomed Opt*, 2014, 19(9): 96002.
- [8] Gong H, Peng R, Liu Z. Carbon nanotubes for biomedical imaging: the recent advances[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(15): 1951-1963.
- [9] Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(1): 71-79.
- [10] Ota Y, Hasumura M, Okamura M, et al. Chronic toxicity and carcinogenicity of dietary administered ammonium sulfate in F344 rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(1): 17-27.

(收稿日期:2018-05-15)