

## 聚合物微气泡的优化及其体内外超声成像研究

段磊<sup>1,2</sup>, 杨芳<sup>1</sup>, 何闻<sup>1</sup>, 徐璐<sup>2</sup>, 许宁<sup>2</sup>, 刘宾<sup>2</sup>, 顾宁<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>东南大学生物电子学国家重点实验室, 江苏省生物材料与器件重点实验室, 生物科学与医学工程学院, 江苏 南京 210009; <sup>2</sup>南京医科大学生物医学工程系, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:对以左旋聚乳酸(poly L-lactic acid, PLLA)及聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)为膜材的微气泡,在稳定性和粒径两个方面进行了优化,使其在保持超声成像增强能力的同时,更适于体内应用。方法:首先对 PVA 进行了羧基化修饰,使制备的微气泡表面含有羧基, Zeta 电位达到 $-38.87 \pm 2.19$  mV,从而由于静电斥力提高了微气泡的稳定性。其次,通过调节制备过程中的 PVA 浓度、水相油相比、乳化速度 3 种因素,实现了对微气泡粒径的控制。结果:对优化后平均粒径为 1.38  $\mu$ m、粒径分布均匀、性质稳定的微气泡进行了体内外超声成像实验,证实其在体外能够显著增强超声成像效果,在体内既可以通过瘤内注射迅速提高肿瘤部位超声显影质量,又可以通过静脉注射,经血液循环到达肿瘤部位,在一段时间的累积之后,增强超声成像效果。结论:本研究为微气泡的体内应用打下了良好基础。

**[关键词]** 微气泡;聚合物;优化;超声成像

**[中图分类号]** R312

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)12-1691-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20151204

### Optimized polymer microbubbles for ultrasound imaging *in vitro/vivo*

Duan Lei<sup>1,2</sup>, Yang Fang<sup>1</sup>, He Wen<sup>1</sup>, Xu Lu<sup>2</sup>, Xu Ning<sup>2</sup>, Liu Bing<sup>2</sup>, Gu Ning<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>State Key Laboratory of Bioelectronics, Jiangsu Key Laboratory for Biomaterials and Devices, School of Biological Science and Medical Engineering, Southeast University, Nanjing 210096; <sup>2</sup>Department of Biological Science and Medical Engineering, NJMU 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** This study focuses on the optimization on stability and size of MBs with poly-L-lactic acid (poly L-lactic acid, PLLA) and polyvinyl alcohol (polyvinyl alcohol, PVA) as shell materials, which made MBs more suitable to work *in vivo* at the same time keeping the ability of enhancing the ultrasound imaging. **Methods:** First, PVA was modified to obtain telechelic PVA with carboxylic groups at the chain ends. The modified PVA was used to fabricate MBs present carboxyl on their surface, whose Zeta potential was  $-38.87 \pm 2.19$  mV, thus improving the stability of MBs. Next, The particle size and stability of MBs were regulated through adjustments the three factors, i.e. the concentration of PVA aqueous solution, the water-oil ratio of the first emulsification and the rate of second emulsification during the preparation process. **Results:** *In vitro/vivo* US imaging experiment was performed on the optimized MBs, which had a average particle size of 1.38  $\mu$ m, uniform particle size distribution and good stability. *In vitro* experiments showed that the MBs exhibited significantly ultrasound (US) contrast enhancement. *In vivo* US imaging of tumors in nude mice showed that, by intratumoral injection, MBs can rapidly improve the ultrasound imaging of tumor; by intravenous injection, MBs can reach the tumor site through the blood circulation, accumulate in the tumor site after a period of time, and enhance ultrasound imaging. **Conclusion:** This study lays a good foundation for the application of MBs in vivo.

**[Key words]** microbubbles; polymer; optimization; ultrasound imaging

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(12): 1691-1696]

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金(61401217);江苏省自然科学基金青年基金(BK20140900)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: guning@seu.edu.cn

研究表明,微气泡不仅可用于超声成像增强,还可装载药物和基因,或偶联抗体,实现药物传输、靶向定位和疾病治疗,是一种集诊断、靶向及治疗为一体的多功能生物医用材料<sup>[1]</sup>,因此,越来越多的

研究开始侧重于微气泡的体内应用<sup>[2-3]</sup>,这就对其稳定性及粒径提出了更高要求。微气泡的稳定性有两方面涵义,其一是指微气泡在体内循环及体外贮存过程中,抵抗外界环境中各因素的破坏,稳定存在的能力。研究表明,聚合物类材料具有较强的分子间作用力,制备的微气泡具有较厚的膜壳,与其他膜材制备的微气泡相比,稳定性较高<sup>[4]</sup>。其二是指微气泡在体循环过程中,不易发生团聚、沉淀,在血液中均匀分散的能力。同时具备这两方面的稳定性是微气泡进行体内应用的基础。微气泡的粒径也是影响其超声显影强度和生物学应用的重要因素。在相同条件下,微气泡粒径越大,超声散射截面就越大,显影效果往往越强<sup>[5]</sup>。但粒径又不能太大,以确保其在体内的穿透能力。

本研究以微气泡的体内应用为目的,尝试通过对微气泡表面修饰羧基,改善其稳定性并拓展其应用空间(图 1);通过调节制备过程中各关键因素,实现对微气泡粒径的调控(图 1);并对优化后的微气泡进行体内外超声成像效果的考察。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

聚乙烯醇(PVA,分析纯,重均分子量 31 000,德国西格玛奥德里奇中国有限公司);左旋聚乳酸(PLLA,分析纯,重均分子量 30 000,济南健宝开元生物材料有限公司);高碘酸钠( $\text{NaIO}_4$ ,分析纯,广东省精细化学品工程技术研究开发中心);亚氯酸钠( $\text{NaClO}_2$ ,分析纯,上海晶纯试剂有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 PVA 羧基化

PVA 单体中的 1,2-乙二醇结构,可以被高碘酸或者高碘酸盐特异性断裂,进而氧化,在链的末端形成醛基,而当亚氯酸盐与醛基的摩尔比为 4:1 时,

有将其氧化成羧基的最高效率<sup>[6]</sup>,基于这个原理,可以对聚乙烯醇进行羧基化修饰。具体步骤如下:将 5 g PVA 粉末加入 100 mL 二次水,溶胀过夜,再放入 80℃ 水浴中加热,适当搅拌,至溶液完全澄清透明,配制出浓度为 5%(W/V)的 PVA 水溶液。将溶液冷却至室温,用 1 mol/L 的盐酸调节 pH 值约为 4,加入 0.55 g 高碘酸钠粉末,60℃ 水浴,搅拌反应约 7 h。高碘酸钠反应完全后,将溶液迅速冷却至室温,醋酸调节 pH 值至 3,再加入 3.7 g 亚氯酸钠粉末,静置 5 h 后,此时 pH 值约变为 6,溶液由无色变为橙黄色,表明反应进行。

#### 1.2.2 微气泡的制备

采用双重乳液/溶剂蒸发法制备微气泡<sup>[7-8]</sup>。对制备过程中 PVA 修饰与否、PVA 水溶液浓度、第 1 次乳化水油比、第 2 次乳化速度 4 个因素进行了调节,研究了它们对微气泡粒径和稳定性的影响(表 1)。

表 1 微气泡制备实验中参数的调节

Table 1 Adjustment of the parameters in the preparation of microbubbles

实验序号	PVA 类型	PVA 水溶液浓度	第 1 次乳化水油比	第 2 次乳化速度(r/min)
1	未修饰	5.0%	2:10	2 000
2	修饰羧基	5.0%	2:10	2 000
3	修饰羧基	2.5%	2:10	2 000
4	修饰羧基	1.0%	2:10	2 000
5	修饰羧基	5.0%	1:10	2 000
6	修饰羧基	5.0%	2:10	2 000
7	修饰羧基	5.0%	3:10	2 000
8	修饰羧基	5.0%	4:10	2 000
9	修饰羧基	5.0%	2:10	1 000
10	修饰羧基	5.0%	2:10	2 000
11	修饰羧基	5.0%	2:10	3 000
12	修饰羧基	5.0%	2:10	10 000

#### 1.2.3 表征

采用光学显微镜(BM1000,南京江南永新光学公司),扫描电镜(Ultra Plus,Carl Zeiss 公司,德国),透射电镜(JEM-2100JEOL 公司,日本)进行微气泡形貌的研究;选取 10 张扫描电镜照片,用粒度分析软件统计并分析微气泡样品的粒径分布情况;用 Zeta 电位检测仪(Brookhaven 公司,美国)进行微气泡表面电荷特性检测,用血细胞计数器进行微气泡浓度的检测。

#### 1.2.4 体外超声显影实验

体外超声显影实验系统由 B 型医用超声仪(Belson 3000A,无锡贝尔森影像技术有限公司)、自

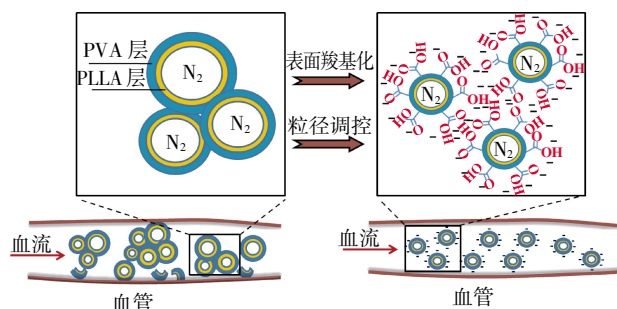


图 1 优化前后微气泡随血液体内输运示意图

Figure 1 Schematic showing microbubbles before and after optimization in blood vessel

制的模拟人体声学特性的体模组成。

体模是在体外模拟人体声学特性的模型,它和人体组织有着相似的声阻抗,因此常被用于体外超声实验,其制作方法是:将适量的琼脂和二次水混合均匀并加热至沸腾,再放入一定量的甘油,其中琼脂、甘油、二次水的比例大约为 3:4:90。经加热煮沸,悬浊液变为清澈透明的黏稠状液体,去除上层泡沫(避免气泡浮到液体表面影响后续实验),将高温液体倒入底部装有吸声海绵的模具中,在适当的地方插入硅胶管。室温下静置,直到琼脂完全凝固,抽去硅胶管,留下模拟人体血管的空隙。

将微气泡冻干粉样品重悬于二次水中,调节其浓度为  $1 \times 10^9$  个/mL,取 2 mL 置于体模管道中,用 B 型医用超声仪的 3.5 MHz 探头进行体外超声显影实验。当超声图片中的特定区域(region of interest, ROI)选定后,用 Image J 软件可自动计算出该区域的平均灰度值。

### 1.2.5 体内超声显影实验

Balb/C 裸鼠(南京医科大学实验动物中心)4 只,雌性,4~6 周,饲养 1 周后,皮下接种人结肠癌细胞株 COLO-205(上海中国科学院细胞库), $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  个/只,接种 10 d 后即肿瘤大小为  $50 \sim 100 \text{ mm}^3$  时进行实验。裸鼠腹腔注射 10% 水合氯醛进行麻醉,随机分为 2 组,每组 2 只,1 组进行瘤内注射,1 组进行尾静脉注射,每组均注射浓度为  $1 \times 10^9$  个/mL 的微气泡 200  $\mu\text{L}$ 。注射样品前后,分别用小动物超声成像

系统(Visualsonics Vevo2100,加拿大)观察裸鼠肿瘤部位超声成像情况,并实时记录所得的超声图像,超声探头中心频率 30 MHz,增益 20 dB。注射微气泡前后肿瘤部位超声图像的平均灰度值均由 Image J 软件定量测出,并进行归一化处理,以得出超声图像灰度值变化-时间曲线。

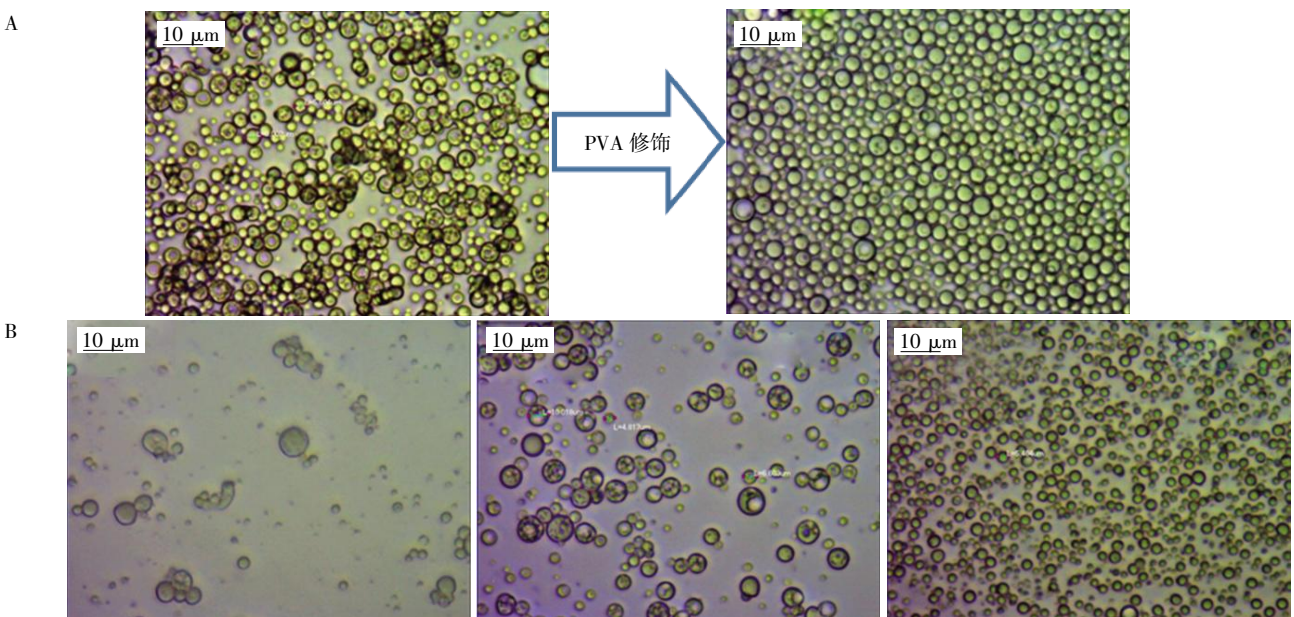
## 2 结 果

### 2.1 微气泡稳定性的改善

分别用修饰羧基前、后的 PVA 为原料,制备的微气泡形貌如图 2A 所示。可以看出 PVA 的修饰使得微气泡更加稳定,不易团聚。Zeta 电位的检测结果表明:修饰羧基后微气泡 Zeta 电位值为  $(-38.87 \pm 2.19) \text{ mV}$ ,而未修饰羧基的微气泡 zeta 电位为  $(-0.68 \pm 1.60) \text{ mV}$ ,基本呈电中性。羧基的修饰使得微气泡表面带上较多负电荷,同性电荷之间的斥力使得微气泡保持了良好分散性。同时,羧基还可与许多基团如羟基、氨基进行化学偶联,从而为微气泡结合其他活性物质提供了可能,大大拓展了微气泡的应用空间。

### 2.2 微气泡粒径的调控

分别用质量分数为 1.0%、2.5% 和 5.0% 的 PVA 水溶液为外水相,制备的微气泡形貌如图 2B 所示。可以看出随着外水相乳化剂浓度的增大,微气泡的粒径明显减小,且分散性及稳定性明显提高。这是因为随着乳化剂浓度增大,体系能提供更多的表面活性剂分子吸附在 O/W 界面,稳定油相液滴,阻止



A: PVA 修饰羧基前后制备的微气泡; B: 1.0%、2.5%、5.0% PVA 制备的微气泡。

图 2 PVA 对微气泡稳定性及粒径的影响

Figure 2 Effect of PVA on the stability and particle size of microbubbles



其团聚及增大,因而得到的微气泡尺寸减小,稳定性提高。

在用双重乳液/溶剂蒸发法制备微气泡时,第 1 次乳化是为了获得 W/O 型的初乳。在水相与油相之比分别为 1:10、2:10、3:10、4:10 的条件下制备出的微气泡如图 3A~D 所示。可以看出,随着水相体积的增大,微气泡的粒径逐渐增加,且内部出现了“多腔”的结构。这是因为第 1 次乳化时,随着水相比比例逐渐增大,油相液滴能捕获到更多的水相液滴,形成的 W/O 型初乳内部“水池”的体积也增大,使得最终制得的微气泡粒径增大,且第 2 次乳化形成 W/O/W 时,外水相能捕获到更多的 W/O 型初乳,从而形成“多腔”结构(图 3J)。

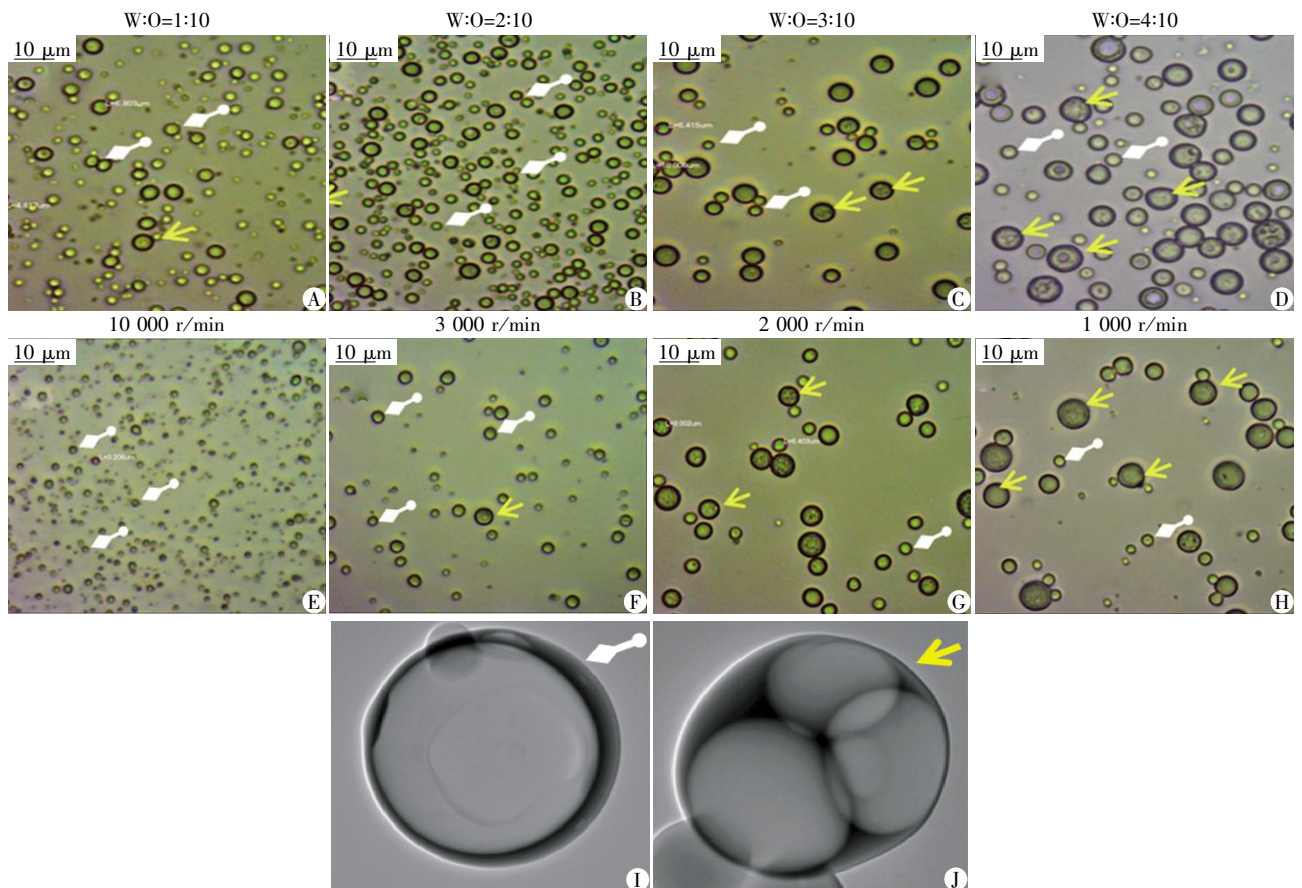
第 2 次乳化会形成 W/O/W 型乳液,在乳化速度分别为 10 000、3 000、2 000、1 000 r/min 时,制得的微气泡如图 3E~H 所示。可以看出随着乳化能量的减小,剪切分散力越弱,微气泡的粒径越大,且“多腔”结构出现的比例增加。这是因为乳化速度快时,W/O 型初乳中的液滴会被迅速均匀分散于水相之中,形成“单腔”结构的 W/O/W 乳

液(图 3I),而乳化速度慢时,W/O 型初乳中的液滴有机会多个聚在一起,再被外水相捕获,从而形成“多腔”结构(图 3J)。乳化速度越慢,形成“多腔”结构的概率越大,制得的微气泡粒径也就越大。

为使制备的微气泡既能可通过血液循环,又能有良好的显影效果,最终确定了以 5% 的羧基化 PVA 水溶液为乳化剂,水油比 2:10,乳化速度 3 000 r/min 的条件,制备出的空白微气泡如图 4 所示,其平均粒径为 1.38 μm,粒度均匀,稳定性良好。

### 2.3 体外超声显影

对优化后的微气泡进行体外超声显影实验。注入微气泡样品之前,体模管道中以去离子水作为对照,注入微气泡之后的 0、30、60、90、120 s 分别采集超声图像(图 5A);对所得图像的 ROI 区域进行平均灰度的定量计算,绘制出平均灰度值-时间曲线(图 5B)。可以看出随着微气泡悬浮液注入,体模管道部位的超声图像亮度立刻得到增强,此后在超声部位,由于超声场的作用,微气泡会逐渐发生团聚、破裂等现象,导致超声图像亮度逐渐减弱。实验结果表明,优化后的微气泡在体外可以增强并维



A~D:水油比对微气泡粒径的影响;E~H:乳化速度对微气泡粒径的影响;I:单腔结构微气泡的 TEM 图片;J:多腔结构微气泡的 TEM 图片。

图 3 微气泡粒径的调控

Figure 3 Regulation of the particle size of the microbubble

持约 2 min 时间的超声显影效果。

#### 2.4 体内超声显影

为了验证微气泡在动物体内的应用效果,进行了裸鼠肿瘤的超声显影实验。分别通过瘤内及尾静脉两种方式对微气泡的注射(图 6A),从图中可以看出,无论是通过瘤内还是尾静脉注入微气泡,均会使肿瘤部位超声图像亮度得到增强。

肿瘤部位超声图像灰度值变化-时间曲线。结

果可知(图 6B),瘤内注射可使肿瘤部位超声图像的灰阶迅速且明显增加,之后随着部分微气泡的扩散及破裂,图像灰阶逐渐降低;而尾静脉注射使得微气泡到达肿瘤部位需要一定时间,且有一个累积过程,因此,灰阶变化曲线呈缓慢小幅上升,之后逐渐降低。与瘤内注射曲线相比,尾静脉注射曲线时间上峰值滞后,幅值上灰阶变化程度低。

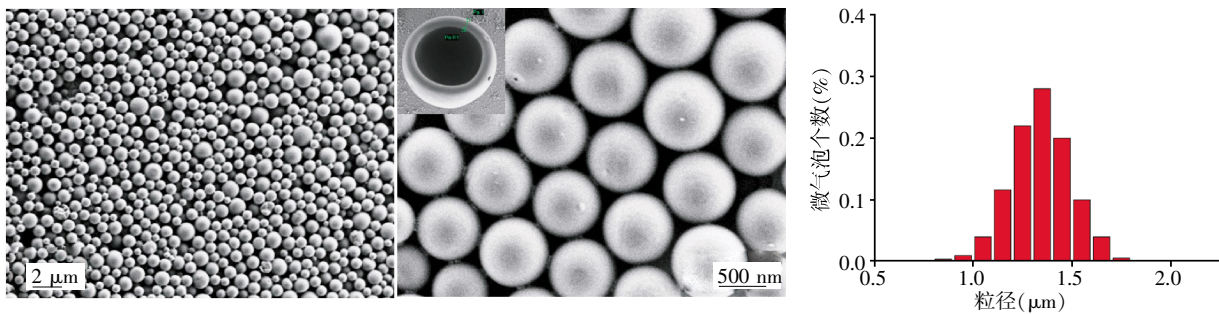


图 4 优化后微气泡 SEM 图片及平均粒径

Figure 4 SEM images and average particle size of microbubbles after optimization

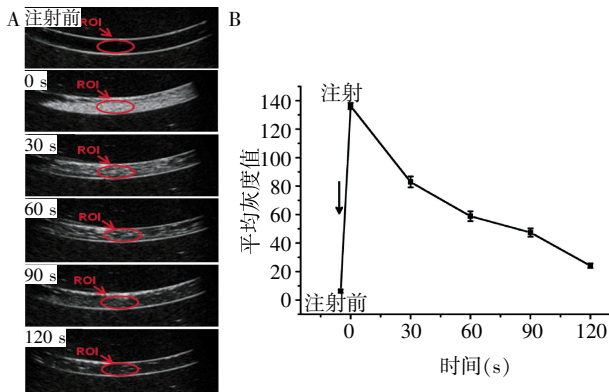


图 5 优化后微气泡体外超声成像情况

Figure 5 *In vitro* ultrasound imaging of microbubbles after optimization

### 3 讨论

对微气泡的稳定性及粒径进行调控和优化,会对其生物学应用产生积极影响。目前,这方面的系统研究报道并不多。Lu 等<sup>[9]</sup>研究了双重乳液蒸发法制备聚合物微气泡过程中,各因素对微气泡结构的影响,结果表明水相/油相比、乳化剂浓度、乳化强度等是微气泡结构和粒径的重要影响因素;Liu 等<sup>[10]</sup>用膜乳化-双重乳液蒸发法制备了多种聚合物微气泡,研究了制备过程中各因素对微气泡粒径及其分布的影响,并进行了体外超声显影,结果表明以 PLLA 为膜材制备的微气泡具有更强及更长效的显影效果。以上研究均未对微气泡稳定性进行讨论,也没

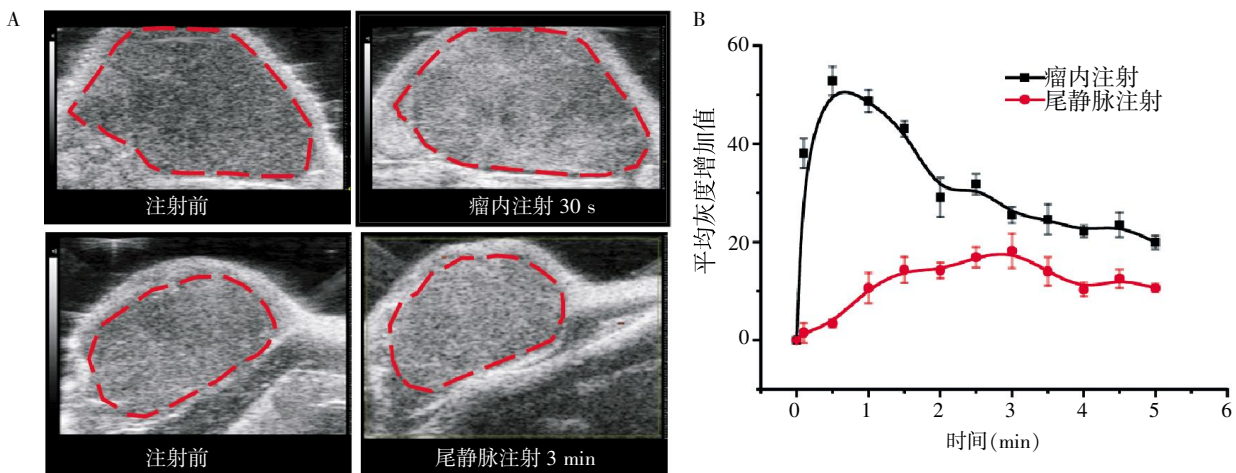


图 6 优化后微气泡体内超声显影情况(瘤内及尾静脉注射)

Figure 6 *In vivo* ultrasonic imaging of microbubbles after optimization (intra tumor and tail vein injection)

有涉及相关的体内成像研究。

本研究对 PLLA 为膜材的聚合物微气泡进行了优化,使其更适于体内应用。通过对微气泡表面 PVA 进行羧基修饰,可有效提高微气泡的稳定性及耦联其他活性物质的能力。通过调节 PVA 浓度、水相油相比、乳化速度 3 种因素,能够对微气泡的粒径进行调控。优化后粒径均匀合适、性质稳定的微气泡,在体内外均能增强超声成像效果。此外,若在此微气泡表面耦联磁性纳米颗粒或特异性抗体,使其具有主动靶向性,则可进一步提高其体内超声成像增强能力,显示出良好的体内应用潜力。可以进行多模式成像和分子成像,若结合药物和基因,可以进行超声场调控下靶向释放,以及多模式图像监控下的治疗效果评估等相关诊疗一体化生物医学应用研究<sup>[11-12]</sup>。

#### [参考文献]

- [1] Kooiman K, Vos HJ, Versluis M, et al. Acoustic behavior of microbubbles and implications for drug delivery [J], *Adv Drug Delivery Rev*, 2014, 72(1):28-48
- [2] Fokong S, Theek B, Wu ZJ, et al. Image-guided, targeted and triggered drug delivery to tumors using polymer-based microbubbles[J]. *J Control Release*, 2012, 163(1): 75-81
- [3] Fan CH, Ting CY, Liu HL, et al. Antiangiogenic-targeting drug-loaded microbubbles combined with focused ultrasound for glioma treatment [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(8):2142-2155
- [4] Chlon C, Guedon C, Verhaagen B, et al. Effect of molecular weight, crystallinity, and hydrophobicity on the acoustic activation of polymer-shelled ultrasound contrast agents [J]. *Biomacromolecules*, 2009, 10(5): 1025-1031
- [5] Emmer M, Van Wamel A, Goertz DE, et al. The onset of microbubble vibration [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2007, 33(6):941-949
- [6] Hofreiter BT, Wolff IA, Mehlretter C L. Chlorous acid oxidation of periodate oxidized cornstarch [J]. *J Am Chem Soc*, 1957, 79(24):6457-6460
- [7] Stride E, Eirisinghe M. Novel microbubble preparation technologies [J], *Soft Matter*, 2008, 4(12):2350-2359
- [8] He W, Yang F, Wu Y H, et al. Microbubbles with surface coated by superparamagnetic iron oxide nanoparticles [J]. *Mater Lett*, 2012, 68(2):64-67
- [9] Lu R, Dou HJ, Qiu YY, et al. Polymeric microcapsules with internal cavities for ultrasonic imaging: efficient fabrication and physical characterization [J]. *Colloid Polym Sci*, 2009, 287(6):683-693
- [10] Liu BX, Zhou X, Yang F, et al. Fabrication of uniform sized polylactone microcapsules by premix membrane emulsification for ultrasound imaging [J]. *Polym Chem*, 2014, 5(5):1693-1701
- [11] Hussain T, Nguyen Q T. Molecular imaging for cancer diagnosis and surgery [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014, 66(1):90-100
- [12] Duan L, Yang F, Song L, et al. Controlled assembly of magnetic nanoparticles on microbubbles for multimodal imaging [J]. *Soft Matter*, 2015, 11(27):5492-5500

[收稿日期] 2015-06-13

本刊邮发代号 28-61

网址: <http://jnmu.njmu.edu.cn>