一类新型超声诊断显影剂
——生物降解性聚 L-乳酸微囊*

王身国** 崔文瑾 李光明 蔡 晴
(中国科学院化学研究所, 北京 100080)
智 光 赵玉英 杨 波 徐 勇
(中国人民解放军总医院, 北京 100853)

摘要 报道了一类新型超声诊断显影剂——聚 L-乳酸微囊的制备、结构测定, 以及在动物(犬)体内外的超声显影效果; 同时用 PLLA 荧光微囊检测了这类显影剂在动物体内微循环时栓塞发生的可能. 结果表明: 用(水/油/水)乳液-溶剂蒸发法制得的聚 L-乳酸微囊为中空结构, 它们不但能在用硅胶输液器制备的模拟血管中产生很强的体外超声显影效果, 而且在动物的血液循环中也能呈现很强的超声显影效果、显影时间可长达 3 h 之久, 超声显影效果优于临床应用的 Levovist 和 NF FC 类微泡型回波造影剂. 动物实验结果还表明: 粒径为 2~8 μm 的聚 L-乳酸微囊能很好地通过肺滤、可在毛细静脉和毛细动脉中很好地流动, 能够避免栓塞的生成, 因此是一类具有临床应用前景的新型超声诊断显影剂.

关键词 聚 L-乳酸 微囊 显影剂 超声诊断 生物降解性 栓塞

超声诊断技术是利用超声波在人体组织界面发生的反射和散射信号强弱差异来传递生物内部信息、从而达到诊断目的的技术. 由于超声诊断具有安全、适应面广、直观、可反复检查、对软组织鉴别力强、灵活性强及价廉等优点, 因此已成为当代医学图像诊断中的首选技术, 并已在现代诊断技术中占有极为重要的地位[1]. 例如常规 B 超检查对大多数占位性病变是一种有效的诊断手段. 然而由于有些病变组织的声学特性与正常组织并无明显的差异, 加上仪器灵敏度和医生判别能力的限制, 因此很容易发生误诊或漏诊. 在这样的情况下就十分必要向被测部位注入某种媒质、增强病变部位和正常组织超声图像间的对比度、从而提高诊断的正确性. 这种可以增强超声强度、以提高超声诊断正确性、精确度和灵敏度的媒质就称为造影剂或对比度增强剂.

回波型造影剂是造影剂中最为重要的一种, 其主要基本原理是利用造影剂的微泡结构在超声下产生谐波, 从而达到增强谐波强度的目的, 因此可应用于心血管及肝脏系统的超声诊断, 有时也用于子宫、输卵管、腮腺等部位的诊断. 由气泡产生的超声信号回波中, 不仅含有与探头发射相同的基频信号, 而且还有其谐波信号, 且以二次谐频最强. 采用谐频信号的好处

2002-11-25 收稿, 2003-01-27 收修改稿
* 国家"九七三"计划资助项目(G199054306)
** E-mail: wangsg@hotmail.com

是: (1) 由于软组织不产生谐频信号, 因此可以用此增大血流与周围组织间的对比度; (2) 用造影剂的谐频信号可以削弱由于检测部位周围组织的运动而产生的噪音干扰, 以确保在能量 Doppler 和常规 Doppler 两种成像方式中检出慢速血流. 因此在采用这样的造影剂后, 可以具有超灵敏度的能量 Doppler 成像法, 以显现出人体深部的非常小的血管[1~6].

理想的回波型超声造影剂的基本要求是:

(1) 本身含有或在进入人体后能产生具有足够存活时间和回波强度的微气泡.

(2) 对人体组织不产生刺激、损伤或毒副作用, 或虽有某种副作用, 但可借助药物或仪器配合予以消除或缓解. 最理想的是由可被吸收、或有益于健康的材料所制成.

(3) 能通过肺滤进人全身动脉系统而不造成栓塞.

目前临床采用的回波造影剂主要有以下几类: (1) 双氧水, 即过氧化氢: 在进入人体后, 可在过氧化氢酶作用下分解成水与氧气微泡[6]. (2) 二氧化碳微泡: 可使肝实质回声增强、而因肿瘤回声依旧而识别肿瘤病灶[6]. (3) Echovist 和 Levovist: 依靠半乳糖分子中夹入直径为 2~8 μm 之间的微气泡. (4) Echo Gen: 在室温下为液体、体温时为气体. 不仅能增强 Doppler 图像的颜色, 而且能增大 Doppler 信号的幅度, 因此可以在缺血时看到血流灌注和缺血区, 并可增强灰阶. (5) Albunex: 1994 年被 FDA 批准用于临床, 系白蛋白与气体微泡的结合物, 由外周静脉注入, 在进入心脏后可增强 Doppler 信号[4].

以上这些显影剂虽然各具特点, 但它们的共同缺点是形成气泡的存活时间短、谐波增强倍数小, 因此在临床诊断时常需多次使用显影剂并使用较多量的显影剂, 不仅给临床应用造成了麻烦, 而且增加了诊断的费用. 因此研究新的功效更好、存活期更长的显影剂, 成为超声显影研究的热点.

聚内酯类生物降解高分子具有可以调节的生物降解速度、可以在体内被代谢吸收, 且降解产物对机体没有副作用, 因此在医学领域已得到了广泛的临床应用[7]. 基于聚内酯材料可以通过(水/油/水)乳液-溶剂蒸发技术而制备具有中空结构的微囊[8], 因此探索聚内酯类生物降解高分子微囊作为超声显影的可能性是一项很具吸引力的研究工作. 此方面研究工作尚未见到报道. 本研究拟根据超声显影剂的工作原理, 利用聚内酯类材料良好的生物相容性和降解性, 设计制备了一种新型的微囊型超声显影剂, 研究了微囊的内部结构与超声显影效果的关系, 以及它们作为超声显影剂在临床应用的可能性.

1　实验部分

1.1　原料及试剂

L-乳酸: C P, 80%~90%水溶液, 上海益尔宝乳酸厂. 左旋纯度不低于 99%. 异辛酸亚锡($Sn(Oct)_2$): A R, Sigma 公司出品, 直接使用. 聚乙烯醇 (PVA): 北京化工厂, 聚合度 1750, 醇解度 88%. 甘油: 北京芳草医药化工研制公司, A R. 荧光剂: 由中国科学院化学研究所有机固体实验室提供 1). 乙酸乙酯: A R, 北京化工厂, 用 P_2O_5 干燥过夜, 然后蒸馏. 甲苯: A R, 北京化工厂, 用金属钠加热回流干燥. 其他试剂皆为分析纯.

1.2　L-丙交酯(L-Lactide)的合成

按文献[9]改进的方法, 在装有搅拌器、温度计、Ar 导气管和减压蒸馏装置的 1000 mL 三

1) 郑 敏. 中国科学院化学研究所 2000 年博士学位论文

口瓶中，加入 800 mL L-乳酸水溶液(80%~90%)，减压蒸出溶液中的水后，在氩气保护和强烈搅拌下，加入 18 g ZnO 粉末，使之分散均匀，且在 8 h 内从 120℃升温至 170℃，不断蒸出缩合水，随着水的不断蒸出，反应物变为不透明淡黄色黏稠态. 然后卸下水冷凝管，换一粗颈空气冷凝管，压力减至 20 Pa，并逐渐升温至 230℃蒸出丙交酯，得到白色固体，粗产率约为 80%.

丙交酯粗产物分别用甲苯及乙酸乙酯重结晶后，用无水乙醚淋洗干燥，最后真空干燥，得精制的 L-丙交酯白色针状晶体，熔程为 93~94℃.

1.3 聚 L-乳酸(poly(L-lactic acid), PLLA)的合成

按文献[9]方法将一定重量的 L-丙交酯(L-LA)装入聚合管中，加入 0.05%(质量分数)的催化剂 $Sn(Oct)_2$后，用氩气置换聚合管中的空气后，真空封管，并在 130℃反应 24 h. 得到的为白色固体聚合物用氯仿溶解，配成约 8%~10%(质量分数)的溶液，过滤后于搅拌下缓慢滴入乙醇中再沉淀以除去未反应的单体和催化剂. 最后得到的絮状聚合物收率>95%，在室温下减压干燥至恒重后，置于五氧化二磷干燥器中保存备用. 由黏度法测得的 PLLA 黏均分子量为 30000.

1.4 PLLA 微囊的制备

按参考文献方法[10]采用(水/油/水)乳液-溶剂蒸发法，先将 PLLA(0.5~1 g)溶于 10 mL 二氯甲烷中，加入 2 滴 Span80，取 1 mL 水注入其中，超声乳化 45 s 后. 在搅拌(500~800 转/min)条件下倾入含有 2 mL 吐温 60 的 200 mLPVA(1% w/v)水溶液中，在四氟乙烯烧杯中，持续搅拌 2 h，使溶剂完全蒸发，然后离心分离并用蒸馏水洗涤产物. 重复三次后，在圆底烧瓶内冷冻干燥得自由流动的粉末.

荧光微泡的制备条件同上，只是在 PLLA 溶液中加入少量荧光剂. 荧光剂与 PLLA 的比为 5∶100 (w/w).

1.5 PLLA 微囊的形态和内部结构的表征

将经冷冻干燥的 PLLA 微囊和在液氮中用研钵研碎的 PLLA 微囊分别喷金后用 HITACHI S-530 扫描电子显微镜(SEM)观察.

1.6 PLLA 微囊的体外显影方法

以硅胶输液器为模拟血管，用 Acuson Aspend 超声仪和 L7 探头(探头频率 4 MHz)测定. 方法为：用 1 mL 注射器抽取 0.5 mL PLLA 微囊、并以生理盐水稀释至 10 mL (0.25%)后，推入硅胶输液器. 观察将此液推入时的声学效果，并与推入蒸馏水和添加右旋糖酐蒸馏水时的声学效果作比较.

1.7 PLLA 微囊的体内显影方法

仪器设备: Acuson Aspend 彩色超声诊断仪, 4V2C 探头(探头频率 1.75/3.5 MHz)，总增益 58 dB，机械指数(MI)0.6，联机心电图，以心电图触发成像 6∶1 触发(6 个心动周期触发一次显像)，收缩末期成像.

研究方法：以重量为 20 kg 的雄性杂种犬为试验对象. 用 25 mg/kg 体重戊巴比妥钠静脉麻醉，闭胸行超声心动图检查. 由股静脉分别注入相同量(0.5 mL)的以氟碳(NF FC), Levovist 和 PLLA 微囊，然后在 B 超下观察狗心脏内的血流.

1.8 PLLA 微囊的肺滤试验

将 1 mL 含有三苯胺型荧光剂标定的 PLLA 微囊分别用水以及(甘油-水)为分散剂，配置浓度为 0.1 g/10 mL 的显影剂. 从 Wista 大鼠尾静脉注入体内，然后将大鼠开腹，取出肠系膜，置

于微循环观察盒内, 用荧光显微镜观察大鼠肠系膜微循环情况. 整个实验过程在大鼠存活状态下进行. 实验结束后, 取出大鼠心、肾、肝脏、肺、脑标本进行病理检查.

2　结果与讨论

2.1　PLLA 微囊的内部结构观察

将上述采用(水/油/水)乳液-溶剂蒸发法制得的 PLLA 微囊, 以及用液氮淬冷、尔后在碾钵中破碎的微囊用扫描电子显微镜进行观察, 结果如(图 1). 由图可见: 通过以蒸馏水为内水相、采用 W/O/W 的方法制备的微球为内部中空的微囊结构. 此与商品化的超声显影剂的结构相似, 都呈有外壳、内含有微气泡的结构.

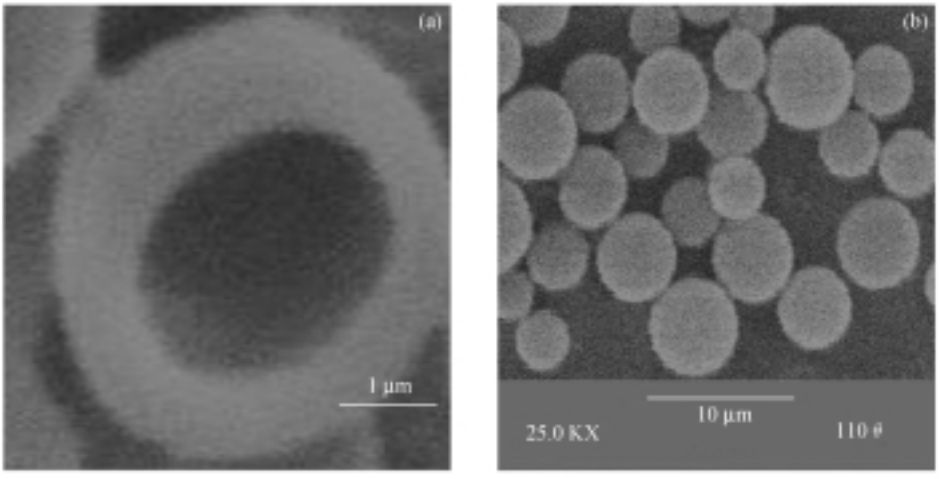

图 1　聚 L-乳酸微囊的扫描电子显微镜图像
(a) 内部; (b) 外形

我们认为这种微气泡结构的形成是由于在高分子微囊成型过程中, 随着油相中溶剂的挥发、PLLA 的成膜析出, 使原来乳化稳定的液滴变成内部含有蒸馏水的高分子微球之故. 当在冷冻干燥的环境下, 微球就在保持外形的情况下升华内部包含的水份, 使之成为内部中空的微囊. 由于气体分子可以通过分子扩散、渗透而进入微囊内部, 因此最终得到的是充满气体的中空微囊[8]. 由于微泡内部所包含的空气的声阻抗率远比固体和液体的声阻抗率低、且衰减系数又很高, 因而成为可在超声波下产生不同于均匀媒质的传输性质、从而可对超声探测信号产生很强的谐波信号的结构.

2.2　PLLA 微囊的体外超声显影效果

为考察 PLLA 中空微囊对超声波的显影效果,首先开展了体外的超声效应的测试. 采用硅胶输液器为模拟血管, 在管中分别注入蒸馏水、添加右旋糖酐的蒸馏水和含有 PLLA 微囊的生理盐水, 并用超声仪检测和比较三者的超声成像效果.

上述三者不同情况下的超声显像结果如图 2 所示. 由图可见: 由于水的均匀超声传播性能, 因此在超声下无法辨识管内只是单纯蒸馏水(a)的流体流动信号. 对于注入了右旋糖酐的蒸馏水溶液(b), 由于流体的高粘性、产生了很多超声空化现象, 因而在超声图像中可显现出较亮的图像, 但是由于其不能反映出有效的流体流动信号, 因此没有实用价值. 然而对添加了 PLLA

微囊生理盐水的管(c), 可以清晰地观察到反映管内流体流动情况的超声图像, 表明 PLLA 微囊对超声波具有较强的回波效应.

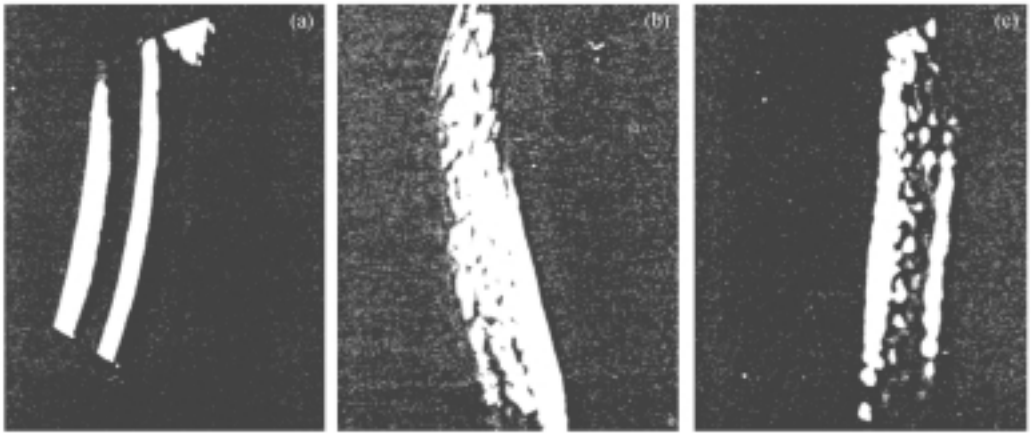

图 2 体外不同介质下的超声显像结果

(a) 水; (b) 添加右旋糖酐的蒸馏水; (c)含有 PLLA 微囊的生理盐水

2.3 PLLA 微囊的体内超声显影效果

PLLA 微囊在动物体内的超声显影效果, 是通过测定在犬心脏内的超声显影效果来实现的, 并且同市售的 NF FC 及 Levovist 的超声显影效果进行了比较. 此三种超声显影剂都采用静脉灌注方法进入体内, 超声显影结果示于图 3. 由图可见, 三种超声显影剂都具有不同程度的显影效果. 但相对而言, 以 PLLA 微囊为显影剂的显影效果(c)最为明显、且超声显影效果可持续 3 h 之久; 在实验过程中动物生命体征平稳、无心率失常和心功能不全的表现. 由此表明 PLLA 微囊具有最为优良的体内超声显影效果.

2.4 PLLA 微囊在体内微循环中栓塞的探查

由于一般超声显影剂都是通过静脉灌注进入体内、然后通过肺循环而进入体循环发挥显影效果的. 因此, 显影剂微泡的尺寸大小对栓塞的形成具有十分重要的影响. 为使微泡能够通过肺滤而不造成栓塞, 微泡的尺寸必须限制在一定的范围之内. 而对于如 PLLA 微囊那样的固相微粒, 为了不形成栓塞, 粒径尺寸的控制就更为重要. 根据文献报道, 当粒子的尺寸在 2~8 μm 时可以通过肺滤而不形成栓塞. 由此我们通过调节微囊的制备条件, 制备了粒径为 2~8 μm 范围的 PLLA 微囊(如 图 1 所示). 为追踪观察 PLLA 微囊在 Wista 大鼠肠系膜内的微循环效果, 我们在微囊制备时添加了荧光材料; 又为了保证高分子微囊在存储过程中的稳定、避免微囊发生沉积, 以水及水-甘油体系为微囊的分散稳定剂, 利用水及水-甘油体系具有较大的黏度, 可使微囊的悬浊液稳定地储存 10 d 而不发生明显的沉积.

将研制得到的 2~8 μm 粒径范围的 PLLA 微囊, 用生理盐水配成一定的浓度的悬浊液后经大鼠股静脉注入大鼠体内, 在进行大鼠肠系膜的毛细血管微循环后, 分别对大鼠的心、肾、肝脏、肺、脑进行石蜡切片. 观察结果表明: 在各组织中, 均未发生栓塞现象. 说明 PLLA 微囊仍然滞留在血液中. 它们将在血液中随着血液循环而不断降解、最终成为乳酸单体后通过三羧酸循环代谢成二氧化碳和水排出体外.

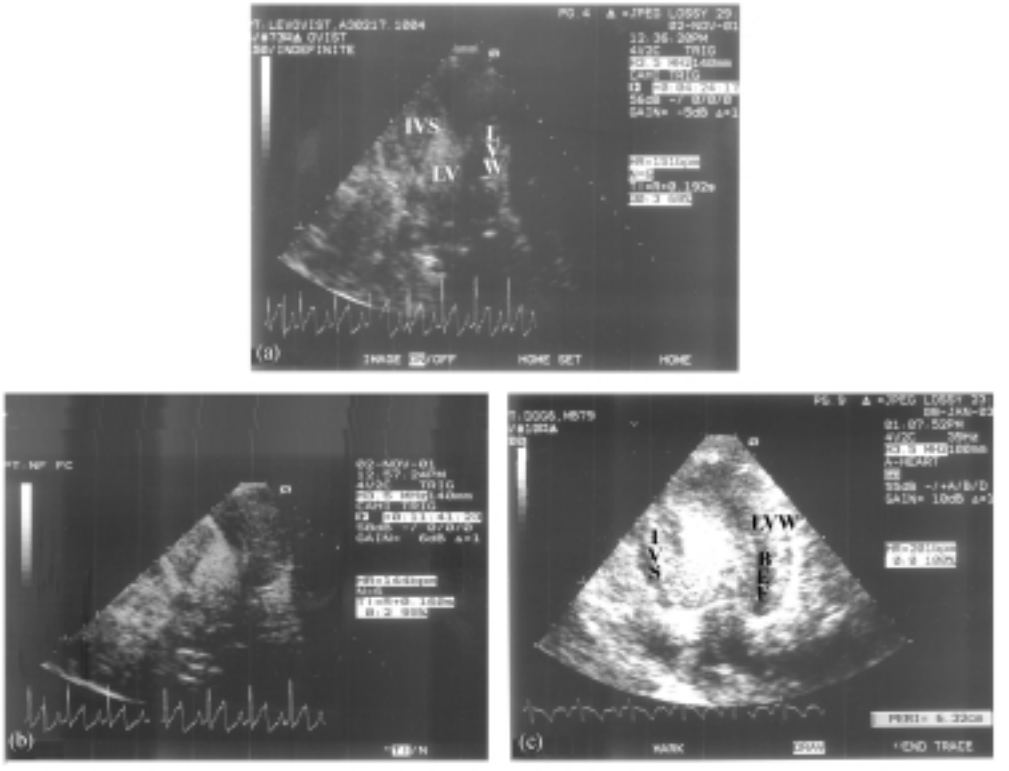

图 3　不同超声显影剂在静脉灌注时的超声显影效果
(a) Levovist; (b) NF FC; (c) PLLA 微囊

此外, 由大鼠肠系膜的毛细血管微循环观察还表明: PLLA 荧光微囊(图 4 中的亮点)能通过肺滤, 并在毛细静脉和毛细动脉中很好地流动. 使用水及水-甘油两种分散稳定剂的 PLLA 微囊都具有很好的肺滤通透能力, 且在大鼠的肠系膜微循环中也无明显的差别. 我们认为这是由于微囊进入体内与血液接触后, 由于血液的黏度, 使原来的分散剂不再具有稳定作用的缘故. 观察结果表明, 无论采用哪种分散稳定剂在毛细血管内均未发现明显的贴壁及栓塞现象.

以上研究结果有效地证明: 只要通过调节制备条件、制备粒径在 2 ~ 8 μm 范围的微囊, 就可以具有良好的通透肺滤能力, 而不会造成栓塞的生成.

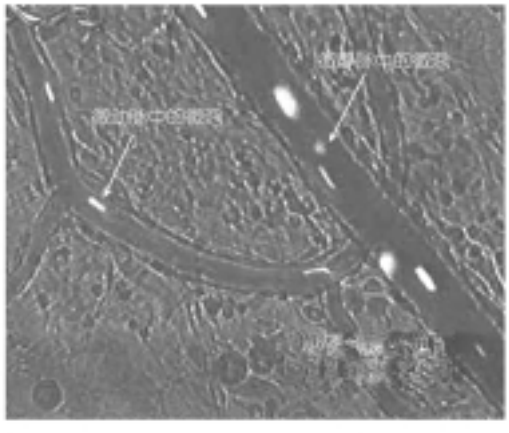

图 4　在毛细静脉和毛细动脉循环中的 PLLA 荧光微囊

3　结论

本研究结果表明: 以 PLLA 为囊材, 采用(水/油/水)乳液-溶剂蒸发法制备的粒径 2~8 μm 中

空结构聚内酯类高分子微囊不仅可以通过肺滤、并不在血循环中形成栓塞, 而且可以在体内产生十分良好的超声显影效果、其超声显影时间可长达 3 h 之久, 成为一类具有临床实际意义的新型固体微囊超声显影剂.

然而考虑到 PLLA 的生物降解速度还较慢, 微囊将会在体内滞留较长的时间; 以及 PLLA 的硬度较大, 影响到囊壁的弹性, 使之难以产生大的谐波. 因此为尽可能地缩短此类固体微囊型超声显影剂在体内的滞留时间, 从而避免显影剂固体微粒在体内滞留、成为异物形成血栓的可能; 以及为进一步增大微囊产生的谐波、以增强超声回波的强度, 就必须进一步地研究以具有高生物降解速度和高弹性的聚内酯材料为微囊材料的超声显影剂. 目前, 以内酯共聚物为微囊材料的微囊型超声显影剂正在进一步研究之中, 已取得了一些非常可喜的研究结果, 将在后文发表.

致谢 感谢杨俊林教授为本研究提供荧光剂以促进微循环栓塞的研究.

参 考 文 献

1. 冯 若. 超声手册. 南京: 南京大学出版社, 1999. 175~176
2. Ophir J. Contrast agents in diagnostic ultrasound. Ultrasound in Med Biol, 1989, 15: 319~333
3. Bleeker H. On the application of ultrasonic contrast agents for blood flowmetry and assessment of cardiac perfusion. J Ultrasound Med, 1990, 9: 461~471
4. Bleeker H. Ultrasonic characterization of Albunex, a new contrast Agent. J Acoust Soc Am, 1990, 87: 1792~1799
5. DeJong N. Principles and recent developments in Ultrasound contrast agents. Ultrasonics, 1991, 29: 324~330
6. 张青萍, 王新房. B 型超声诊断学. 上海: 上海科学技术出版社, 1993. 50~51
7. 王身国. 可生物降解的高分子类型、合成和应用. 化学通报, 1997, (2): 45~47
8. Ma X Y, Pan G M, Lu Z, et al. Preliminary study of oral polylactide microcapsulated insulin *in vitro* and *in vivo*. Diabetes Obesity and Metabolism, 2000, 2: 243~250
9. Lu Z, Bei J Z, Wang S G. A method for the preparation of polemeric nanocapsules without stabilizer. Journal of Controlled Release, 1999, 61: 107~112
10. 王身国, 吕 泽, 贝建中. 一种高分子包囊胰岛素微粒体及其制备方法和用途, 中国发明专利, ZL98100577.2