

Progress of encapsulated microbubbles ultrasound contrast agent

ZHANG Xue-jiao¹, CHENG Yong-qing^{1*}, LI Li-jun², WANG Xiao-rong¹

(1. Department of Applied Chemistry, Northwestern Polytechnical University, Xian 710072, China.

2. The Second Affiliated Hospital of Xian Jiaotong University, Xian 710003, China)

[Abstract] Previous studies indicated that encapsulated microbubbles ultrasound contrast agent has become mainstream in U A's development because of excellent echocontrast and carrying function and so on. According to different membrane materials, Encapsulated microbubbles ultrasound contrast agent can be divided into several categories such as albumin, liposome, polymer. The research status and advantage and disadvantage of each U A were introduced in this paper. Our conclusion is that polymer is the most promising one nowadays and in the future.

[Key words] Encapsulated microbubbles; Ultrasound contrast media; Harmonic; Albumins, surface-active agents

包膜微泡超声造影剂的研究进展

张雪娇¹, 程永清^{1*}, 李丽君², 王小荣¹

(1. 西北工业大学理学院应用化学系, 陕西 西安 710072; 2. 西安交通大学第二附属医院, 陕西 西安 710003)

[摘要] 越来越多的研究表明, 包膜微泡造影剂以其优越的显影和携载等功能而逐渐成为造影剂发展的主流。按膜材料的不同, 包膜微泡造影剂可分为白蛋白类、非离子表面活性剂类、脂质体类和多聚体类。本文主要对各类造影剂的研究状况及优缺点进行了介绍, 并经过比较得出结论: 多聚体是目前乃至将来造影剂研制中最有前途的包膜材料。

[关键词] 包膜微泡; 超声造影剂; 白蛋白类; 表面活性剂

[中图分类号] R318.08; R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2005)05-0819-03

超声造影剂(ultrasound contrast agent, U A)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具有其他检测方法(如 T、MRI 等)无法比拟的优点。微泡因其较强的回波反射性能而被认为是目前最好的人体微血管内的造影材料。理想的 U A 能作为一种血球示踪剂随血流分布到全身; 反映器官的血流灌注情况, 而又不干扰血流动力学。这种血球示踪技术在心肌、肝及肾的超声诊断方面有广阔的应用前景。近年的研究资料表明, 包膜气泡正逐渐地在许

多方面显示其优越性, 成为造影剂发展的主流。包膜微泡 U A 最基本性质是能增强组织的回波能力, 可在 B 型超声成像中提高图像的清晰度和对比度。其非线性效应能产生一定能量的谐波分量, 该谐波分量可能携带着关于血液的物理和其他特征的更丰富的信息。按膜材料的不同, 包膜微泡造影剂可分为白蛋白类、非离子表面活性剂类、脂质体类和多聚体类。不同类型成膜材料的微泡造影剂具有不同的特性和应用价值。

1 白蛋白类包膜 U A

以人血白蛋白作为微泡的外壳最早是在上个世纪 80 年代由 Feinstein 采用超声振荡的方法发明的, 该微泡能成功通过肺并可使左心显影, 但不能随血流分布至全身, 因而使用范围受到限制。之后此专利被转让给 Molecular Biosystems 公司, 该公司以微泡中的填充气体为研究重点, 相继推出了对 U A 发展影响较大的 Alunex 和 Optison。其中 Alunex 是世界上第一个能通过肺使左心显影的 U A^[1]; Option 采用分子量较大

的全氟丙烷为内包裹气体, 其在微泡中的不扩散性及生物惰性决定了它可以作为血球示踪剂随血流分布到全身致使超声显影, 静脉注射微量该产品即可高效显影, 且对血流动力学无明显干扰^[2]。国内对 U A 的制备研究基本以声空化人血白蛋白为主。南方医院从 1992 年便开始了对声振白蛋白微泡造影剂的研究, 目前已经完成所有临床前的工作, 并向卫生部申请了 II 期临床试验^[3]。

声振法制备白蛋白微泡造影剂的化学原理至今还不太清楚。有报道曾指出声振过程中所释放出的大量 H· 和 ·OH 自由基, 可以被电子自旋共振所捕获, 这些自由基可以进一步反应生成 H₂O₂ 或 O₂⁻^[4]。侯连兵等^[5]为进一步了解声振制备白蛋白微泡的化学原理, 通过用化学发光技术监测声振过程中产生的氧自由基, 并用激光时间飞行质谱测定声振前后白蛋白分子量的变化。结果表明: 声振白蛋白溶液所产生大量氧自由基使白蛋白分子的空间结构发生可逆性的变化。该项研究对完善白蛋白造

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30370579)。

[作者简介] 张雪娇(1978-), 女, 新疆人, 硕士。研究方向: 医学材料方面的研究。

E-mail: xuejiao_zhang@163.com

[通讯作者] 程永清, 西北工业大学理学院应用化学系, 710072。

E-mail: cangyongqing@nwpu.edu.cn

[收稿日期] 2004-11-10

[修回日期] 2005-02-17

影剂的制备工艺及成膜原理具有一定的指导意义。

从国内外的研究现状来看,以白蛋白作为微泡膜材料具有无毒、易制备等优点,但存在稳定性差、价格昂贵、在一些人体中会产生异体蛋白的免疫反应及产量较少等缺点。然而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,已有研究表明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⁶。南方医院以研究声振白蛋白 U A 为基础,向制备液中加入糖类(包括果糖和葡萄糖)成分,使微泡产率大大提高,同时微泡的平均粒径有所减小,均一性也有较大提高。起到了提高造影剂品质的同时降低生产成本的双重效果,其中果糖比葡萄糖效果更好⁷。杜永峰等⁸人在这方面也进行了较为深入的研究,他们通过声空化法制备出的含蔗糖白蛋白微泡,96%的微泡粒径分布区间为2~5 μm,4℃下保存半年微泡无明显变化。二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,适合于人体微血管的超声显影。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和运输。

2 非离子表面活性剂类包膜 U A

表面活性剂由于本身的易起泡性而被广泛用于微泡的制备研究中。目前所制备出的超声造影剂中或多或少都含有一些表面活性剂成分。典型的形成微泡膜的物质是表面活性剂或表面活性剂与辅助表面活性剂形成的发泡剂。表面活性剂只要满足对人体无毒副作用,在体内易降解,不影响血流动力学、形成的微泡膜具有一定的稳定性,均可用来制备微泡造影剂。从表面活性剂本身的特性来说,阴离子表面活性剂和阳离子表面活性剂混合形成的液膜由于阴离子和阳离子间的引力会使液膜更稳定一些,但目前的研究中还未见有应用阴阳离子表面活性剂混合物制备微泡 U A 的研究。常见的表面活性剂类微泡 U A 主要是非离子表面活性剂,如 ST 44 和 ST 68 等,这里的 S 表示 Span 类活性剂, T 表示 Tween 类活性剂。

国内外学者在这方面已有研究, Barsude 等⁹采用 Span 60 和 Tween 80 研制的新型造影剂具有显著的多普勒增强效果。罗渝昆等¹⁰将 Tween 80 和 Span 80 溶于右旋糖酐葡萄糖溶液后,进行声振处理,在振荡的同时注入全氟丙烷气体,所产生的微气泡粒径小于 4.5 μm 的达到 90%,浓度超过 1×10^9 /ml,注射此造影剂后的大白兔肾脏彩色多普勒信号明显增多、增强约 2 min。杜永峰等¹¹以 Span 60、Tween 80 和蔗糖酯为膜材料、六氟化硫为气体材料,采用声空化法制备的 U A,微泡平均粒径为 3.95 μm,浓度为 3.6×10^9 /ml,同时稳定性也有所提高,其动物实验显示对实验犬左右心室、肝脏和肾脏的造影灌注效果显著。

3 脂质体类包膜 U A

与白蛋白类和非离子表面活性剂类造影剂相比,脂类造影剂具有更多的优势,原因在于脂类造影剂具有以下特性:①靶向性:脂质体进入人体后,易先被富含网状内皮细胞的组织如肝、脾及骨髓所摄取;②稳定性好:一方面脂类造影剂化学性质稳定,常温下可保存数月不变化,易于商品化;另一方面在血液循环中更能耐压,造影持续时间长;③使用安全:构成脂质体的磷脂膜可生物降解,对人体无害。

形成膜的类脂类在水介质中具有形成液晶双层的这一特点已被大家所公认。其分子几何形状中亲水和疏水部分一般是大小相近的。研究发现含有这种类脂类的造影剂能显著增加造影效果。优选的成膜类脂类包括磷脂如 DPP、DAP、DSP、DSPE、DPPE、DSPG 等¹²。从目前国内外相关文献报道来看,脂类 U A 存在有效增强显影时间较短的问题。我国曾公开报道过一种以磷脂为包裹材料的造影剂,内包裹有生物活性的气体,其在应用中组织增强显影有效时间只有 5~20 min,不能完全满足临床检查的需要。且脂类造影剂成本较高,市售价格昂贵,如脂质体造影剂 SonoVue 每只售价为 110 美金。

由于成膜类脂类分子结构中两亲基团的存在,使得将其他组分如表面活性剂或辅助表面活性剂加到稳定交联的或聚合的成膜的类脂物质中成为可能。甚至在某种程度上,这种交联的或聚合的

成膜类脂即使仅占包封用物质的很小部分,也能保持足够的产物稳定性。基于此理论,有研究者对脂质体造影剂进行改进,改进后的脂质体造影剂中的成膜材料包括脂质体、起泡剂、聚合物成分、高渗糖类或醇类;并且采用冷冻干燥与声振处理相结合的新型制备工艺。该法所制备出的微泡浓度和粒径都很理想,并且有效增强显影时间超过 30 min,实现了提高微气泡产率、延长有效增强显影时间和降低产品成本的目标¹³。

4 多聚体类包膜 U A

随着高分子化学的发展,医用高分子材料被开发用作药物基因传递和控释的载体。这些高分子载体材料以合成的可生物降解的聚合物体系和天然的大分子体系为主。受上述应用的启发,国外有学者用可生物降解高分子材料与空气或其他难溶性气体采用先进的声振交联技术制备出新型储存稳定性强、可经静脉输注、体内稳定、显影效果好的超声造影剂。

Scneider 等¹⁴制备了叔丁基甲基碳酰多聚谷氨酸包裹的空气微泡,通过测试其物理和超声特性并与白蛋白空气微泡进行对比分析,总结出多聚体微泡具有粒径分布集中、体内稳定性好、共振频率较高和在较高的发射频率时可获得理想的散射强度等特点。Bispre 是 POINT biomedical 公司设计的一种独特的微泡,双层多聚体外壳包裹空气,外层为生物多聚体,无活性,内层是结构多聚体。微泡的外壳可因特殊的诊断和治疗需要而加以修饰,比如药物输送或携带配基。因为是双层外壳,该造影剂能够抵抗超声束对微泡的破坏,因此可以产生延长的对比显影效果。是评价左心室显像和增强心内膜轮廓的理想造影剂,目前正在进行早期的临床试验¹⁵。德国 Scering 公司研制的 SHU 563A 是另外一种特殊的多聚体声学造影剂,外壳由多聚丁基氰基丙烯酸酯组成,内含空气。微泡外壳厚度仅为 100 nm,且弹性大,在声场中具备较强的反声源性,是理想的灌注示踪剂¹⁶。

多聚体造影剂由于外壳较白蛋白、脂质硬,因此抗压性好,持续时间比较长。同时也因此而存在它本身的一些局限性,如需要较高的声学输出才能引起

微泡的非线性振动或微泡的破裂,产生增强的对比成像;而在较高的声学输出时,微泡破裂的同时容易产生生物学效应(如引起细胞溶解和毛细血管破裂等)造成局部渗出、出血或黏膜淤血。

5 超声造影剂的发展前景

就目前的情况来看,UA 的制备方面主要包括以下两个研究方向:①微泡的外包裹材料的选择;②微泡内气体成分的选择。对气体成分而言,氟碳类气体因其较低的扩散性和生物惰性而被广泛使用,并且可以获得理想的显影效果。但氟碳类气体的生物降解性及环境相容性一直没有得到公众的认可,所以那些易扩散,但人体完全能够接受的分子量较小的空气、氧气、氮气等仍是气体材料的发展方向。从而,外包裹材料(即包膜材料)方面的研究也就显得尤其重要。作为造影剂,要求包膜材料在包裹气体材料的同时还必须要有一定的韧性和强度,使其在体内体外都能保持一定的稳定性,特别是能克服体内动脉压力的影响。综合考虑二者可以得出:多聚体是目前乃至将来造影剂研制中最具有前途的包膜材料。已有一些研究者在聚合物中引入疏水基和亲水基,从而制得特定的高分子表面活性剂。这种表面活性剂分子间的相互作用力较强,具有高分子和表面活性剂的双重功能,较容易形成稳定的微泡^[17]。

国外近几年已开始靶向超声造影的相关研究,通过被动靶向和主动靶向作用,可使超声造影剂以更高的浓度聚集在靶组织,达到定向增强显影的目的。同时,可将超声造影剂作为一种载体,利用超声波与微泡造影剂的相互作用及所产生的生物学效应,实现携带药物、基因等靶向组织的转移释放,起到靶向治疗的作用。可以预见,随着微泡超声造影剂成膜材料的日趋多样化和制备工艺的不断完善,微泡超声造影剂在诊断和治疗方面一定会有更广阔的发展前景。

[参考文献]

- [1] Housse L J, Cirif J, Hanly DE, et al. Opacification and border delineation improvement in patients with suboptimal endocardial definition in routine echocardiography: Results of the phase III Albuves multicenter trial [J]. *JAMA*, 1993, 22(3): 1494.
- [2] Skyba DM, Amaranzo G, Goodman N, et al. Hemodynamic characteristics, myocardial kinetics and microvascular reology of FS-069, a second-generation from a venous injection [J]. *JAMA*, 1996, 28(5): 1292.
- [3] Zhang DG, Liu YL, Hou YQ, et al. Clinical study of intravenous contrast echocardiography by sonicated albumin [J]. *Chinese J Ultrasonogr*, 1996, 5(3): 117. 查道刚,刘伊丽,侯玉清,等.经静脉途径左心声学造影的临床研究[J]. *中华超声影像学杂志*, 1996, 5(3): 117.
- [4] Makino K, Mossobo MM, Reiz P, et al. Chemical effects of ultrasound on aqueous solution. Formation of hydroxyl radicals and hydrogen atoms [J]. *J Phys Chem*, 1983, 87(2): 1369-1377.
- [5] Hou LB, Chen SY, Jin WJ, et al. Study on air-filled albumin microspheres: an echocardiographic contrast agent for heart targeting (2), chemical mechanism of the preparation [J]. *Chinese Journal of Biomedical Pharmaceutics*, 1999, 20(2): 65-67. 侯连兵,陈树元,金伟军,等.心脏靶向超声造影剂空气白蛋白微球的研究(2)制备化学原理研究[J]. *中国生化药物杂志*, 1999, 20(2): 65-67.
- [6] Qu H, Jiao KF. Interactions between protein and sugar [J]. *Foreign Med Sci Sect Pharm*, 1999, 26(2): 95-98.
- [7] Department of Medicine, Nanfang Hospital. Solution used to prepare ultrasound contrast agents and the preparing method [P]. *Chinese Patent*: 981051200, 1998. 9. 30. 南方医院药学部.用于制造超声诊断造影剂的制备液及用其制备造影剂方法[P]. *中国专利*: 981051200, 1998. 9. 30.
- [8] Du YF, Wan MX, Zhao WM. Study on the preparation of a new sugar albumin microbubble ultrasound contrast agent [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2001, 36(11): 859-862. 杜永峰,万明习,赵文明.含蔗糖白蛋白包膜微泡超声造影剂制备研究[J]. *药学报*, 2001, 36(11): 859-862.
- [9] Basude R, Duckworth JW, Wheatley MA. Influence of environmental conditions on a new surfactant-based contrast agent: ST68 [J]. *Ultrasound in Med & Biol*, 2000, 26: 621.
- [10] Luo YK, Tang J, Zhang Y, et al. Preparation of a surfactant kind of ultrasound contrast agent [J]. *J Med Imaging Technol*, 2002, 10(5): 380-382. 罗永昆,唐杰,张彦,等.表面活性剂类造影剂制备的实验研究[J]. *中国医学影像学杂志*, 2002, 10(5): 380-382.
- [11] Du YF, Wan MX, Wang SP, et al. Surfactant-based nano-sized microbubble ultrasound contrast agent [J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)*, 2003, 54(6): 807-812. 杜永峰,万明习,王素品,等.基于表面活性剂的纳米包膜微泡超声造影剂[J]. *化工学报*, 2003, 54(6): 807-812.
- [12] Bernstein, Howard, Straub, et al. Polymer-lipid microencapsulated gases for use as imaging agents [P]. *United States Patent*: 5837221, 1998. 11. 17.
- [13] Third Military Medical University of the Chinese People's Liberation Army. Novel lipid ultrasound contrast agents and the preparing method [P]. *Chinese Patent*, 021337209, 2003. 3. 26. 中国人民解放军第三军医大学.新型脂质体超声造影剂及其制备方法[P]. *中国专利*: 021337209, 2003. 3. 26.
- [14] Schneider M, Bussat P, Barrau MB, et al. Polymeric microballons as ultrasound contrast agents: physical and ultrasonic properties compared with sonicated albumin [J]. *Investigative Radiology*, 1992, 27(6): 134-139.
- [15] Bommer WJ, Tickner G, Short R. Combined harmonic myocardial perfusion and real-time wall motion imaging with a new high-frequency low-attenuation contrast agent [J]. *Circulation*, 2001, 104(17): II-495.
- [16] Teupe, Yao J, Takeuchi M. Myocardial contrast echocardiography with harmonic power Doppler and lung traversing SHU 563A ultrasound contrast medium for imaging myocardial perfusion disorders [J]. *Z Kardiol*, 2000, 89(10): 914-920.
- [17] Dugstad H, Foss PA, Klaveness J, et al. Polymeric surfactant-encapsulated microbubbles and their use in ultrasound imaging [P]. *United States Patent*: 5919434, 1999. 7. 6.
- [18] Dugstad H, Rongved P, Skurtveit R. Contrast agents [P]. *United States Patent*: 5990263, 1999. 11. 23.