

• 论 著 •

阳离子脂质纳米微泡超声造影剂的制备及特性研究*

袁 晨^{1,2}, 吴治胜^{1,2}, 穆玉明^{1,2,△}

(1. 新疆医科大学第一附属医院心脏超声诊断科, 新疆 乌鲁木齐 830011;

2. 新疆超声医学重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的** 通过自制阳离子脂质纳米微泡超声造影剂, 探讨一种更稳定、高效的基因载体工具, 并比较自制阳离子脂质纳米微泡和普通脂质微泡的制备效果。**方法** 使用二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)/二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-PEG2000)/DC-胆固醇(DC-Chol)按摩比为 9:0.5:1 制备阳离子脂质纳米微泡, 以单纯微泡——核心纳米微泡为对照, 测定各组微泡的一般理化性质指标及其稳定性, 包括粒径、表面电位、分散性指数(PDI)等, 利用倒置显微镜、电镜观察各组微泡形态, 并通过体外琼脂糖模型观察其体外造影效果。**结果** 构建的阳离子脂质纳米微泡平均粒径为(564.35±25.93)nm, 平均表面电荷为(17.6±2.1)mV, PDI为0.30±0.16, 浓度为(4.27±0.31)×10⁸; 核心纳米微泡平均粒径为(582.55±16.30)nm, 平均表面电荷为(-7.9±1.6)mV, PDI为0.37±0.15, 浓度为(4.24±0.30)×10⁸; 2组表面电荷比较, 差异有统计学意义($P<0.05$), 在连续测定 2 h 内均保持了较好的稳定性, 体外造影效果良好。**结论** 自制的阳离子脂质纳米微泡具有较高的正电荷, 同时保持较好的稳定性及体外造影效果, 该方法有望推广应用并为搭载配体提供参考, 成为高效的新型造影剂。

[关键词] 超声微泡; 造影剂; 阳离子; 纳米; 制备; 特性研究

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2024.24.002 中图法分类号:R445.1

文章编号:1009-5519(2024)24-4145-05

文献标识码:A

Preparation and characterization of cationic lipid nanobubbles as ultrasound contrast agents*

YUAN Chen^{1,2}, WU Zhisheng^{1,2}, MU Yuming^{1,2,△}

(1. Department of Cardiac Ultrasound Diagnosis, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China; 2. Xinjiang Key Laboratory of

Ultrasound in Medicine, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

[Abstract] **Objective** To explore a more stable and efficient gene carrier tool by preparing cationic lipid nanobubbles as ultrasound contrast agents and to compare the preparation effects of homemade cationic lipid nanobubbles with those of ordinary lipid microbubbles. **Methods** Cationic lipid nanobubbles were prepared using distearoylphosphatidylcholine (DSPC)/distearoylphosphatidylethanolamine-polyethylene glycol (DSPE-PEG2000)/DC-cholesterol (DC-Chol) at a molar ratio of 9:0.5:1. Simple microbubbles, namely, core nanobubbles, were used as controls. The general physicochemical properties and stability of the nanobubbles in each group were measured, including particle size, surface potential, polydispersity index (PDI), etc. The morphology of the nanobubbles in each group was observed using an inverted microscope and an electron microscope, and their contrast effects in vitro were observed using an agarose gel model. **Results** The prepared cationic lipid nanobubbles had an average particle size of (564.35±25.93) nm, an average surface charge of (17.6±2.1) mV, a PDI of 0.30±0.16, and a concentration of (4.27±0.31)×10⁸. The core nanobubbles had an average particle size of (582.55±16.30) nm, an average surface charge of (-7.9±1.6) mV, a PDI of 0.37±0.15, and a concentration of (4.24±0.30)×10⁸. There was a statistically significant difference in surface charge between the two groups ($P<0.05$). Both groups maintained good stability within 2 hours of continuous measurement and showed good contrast effects in vitro. **Conclusion** The homemade cationic lipid

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(82060321); 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2024D01C314); 新疆维吾尔自治区“天池英才”引进计划项目。

作者简介: 袁晨(1993—), 博士研究生, 住院医师, 主要从事超声分子影像学及其在心血管疾病的应用研究。△ 通信作者, E-mail: mym1234@126.com。

nanobubbles have high positive charges while maintaining good stability and contrast effects in vitro. This method is expected to be promoted and applied and provides a reference for ligand loading, potentially becoming an efficient and novel contrast agent.

[Key words] Ultrasound microbubbles; Contrast agents; Cationic; Nanoscale; Preparation; Characterization study

超声分子影像学随着分子生物学和超声微泡造影剂研究的不断进步,以携带治疗基因等优点,实现了对分子标记物的非侵入性检测,达到了靶向显影和疾病治疗的目的。以上新出现的以防病治病为宗旨,主要由于其独特的非侵入性、无毒性和高敏感性等特点,使得靶向超声微泡成为目前医学影像学研究的热门话题^[1-2]。正因为靶向超声微泡能将配体有效地连接起来,使其逐渐成为展现广阔前景和潜力的超声分子成像技术研究的热点^[3]。其中,阳离子脂质微泡成为研究重点,因为其可以有效增强 DNA 的负荷能力。

有研究结果显示,超声微泡作为靶向载体在临床和实验研究中被广泛应用时,主要存在以下 2 个问题:(1)造影剂微泡的粒径大小目前大多为微米级,由于粒径过大,无法有效地穿透毛细血管内皮屏障进入组织内部,从而无法实现精确的靶向输送。(2)当微泡表面带有强烈的负电荷时,就会造成微泡在血管内皮上的非特异性附着与聚集,同时也可以活化补体系统,使得微泡更容易被白细胞从血管内皮表面摄取^[4-5]。同时,大量的研究表明,在携带治疗基因方面,阳离子脂质纳米微泡表现出很强的可能性,同时也表现出有可能将目标对准细胞膜^[6-7]。根据过去对阳离子脂质微泡可介导基因转染的研究,为了加强 DNA 的负载能力^[8],有效提高转染效率,可以开发出阳离子脂质微泡以强化其作用。

因此,提高细胞药物摄取效率的有效方法可能是制备药物载体阳离子纳米微泡。本研究成功制备了阳离子脂质纳米微泡,使其表面电位提升,并通过调节各成分配比,使各因子间达到最佳平衡。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC, Avanti 公司,美国);二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-PEG2000, Avanti 公司,美国);DC-胆固醇(DC-Chol, Avanti 公司,美国);八氟丙烷(武汉纽瑞德特种气体有限公司);光学显微镜(LEICA, 德国);Zeta 粒度和电位分析仪(Malvern, 英国)。

1.2 方法

1.2.1 纳米载体的制作

1.2.1.1 普通脂质微泡——核心纳米微泡的制备 将 DSPC、DSPE-PEG2000 按摩尔比 9 : 1 溶于三氯甲烷制成母液;将试管置于 Vortex 上方,冲入氮

气,将试管气体抽除后加入 TRIS 缓冲液,在溶化管壁上脂膜的过程中,可以看到一层白色的膜在试管壁上形成。65 °C 水浴 5 min 后,将水化液分装至西林瓶。在八氟丙烷气体灌注前,西林瓶放入真空泵内,抽 45 min 以上真空。最后将西林瓶固定在银汞调和器皿上 30 s 后,即可获得微泡溶液,放置于冰箱 4 °C 冷藏室中,待用。

1.2.1.2 阳离子脂质纳米微泡的制备 将 DSPC、DSPE-PEG2000、DC-Chol 的摩尔比例统一为 9 : 0.5 : 1,与一般脂质微泡的制备方法相同,使用薄膜水化法制备阳离子脂质纳米微泡,混合后使用,将得到的微泡通过 120 r/min 离心 3 min,弃下清液,用 PBS 溶液清洗上层微泡 3 次,除去未结合的 DC-Chol,即可得到阳离子脂质纳米微泡,4 °C 保存待用,使用前银汞调和器高速振荡,可将得到的微泡离心 3 min,振荡耗时 45 s。

1.2.2 理化性质检测 (1)利用光学显微镜透射电镜观察每组核心纳米微泡的形状和大小。(2)使用自动稀释颗粒计数仪(AccuSizer 780)联合纳米粒径电位分析仪(Malvern Zetasizer Nano)对待测样品的粒径、浓度、分布及表面 Zeta 电位进行统计分析。(3)将待测样品置于 4 °C、室温及 37 °C 条件下,在 120 min 内,每隔 10 min 对载体的粒径大小、浓度进行评价。

1.2.3 体外造影效果评价 (1)按照团队之前的步骤,具体的操作顺序如下:首先准备 2% 的琼脂凝胶,称取 0.6 g 的琼脂糖粉,溶解在 30 mL 0.5% 的 TBS 溶液中,然后倒入合适的圆锥瓶中,把溶液转到微波炉里,加热到沸腾,拿出来搅拌均匀,重复以上步骤 2 次,最后在 100 mm² 培养皿中倒入澄清的溶液,在溶液中固定 200 μL EP 管,0.5 h 后慢慢把 EP 管取出,体外琼脂仿制模型即完成。(2)体外超声成像:在使用 VEVO₂100[®] 小动物超声成像仪检测时,需要将制备好的 200 μL 微泡混悬液分别加入不同组,分别观察早期制备的琼脂仿体,以二维和造影方式,在每个时间段分别获取 60 min 以内的造影图像,记录超声图像,并采用 QVEVO 分析软件进行图片量化评测。

1.3 统计学处理 应用 SPSS24.0 软件进行统计学处理,当计量资料符合正态分布时,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,当计量资料不符合正态分布时,采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示。统计学分析主要采用单因素方差分析(ANOVA)和两独立样本的 t 检验,两两比较(多重比较)使用

LSD-*t* 法,当数据不符合正态分布时使用非参数秩和检验;重复测量数据的分析使用重复测量的方差分析。设检验水准 $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

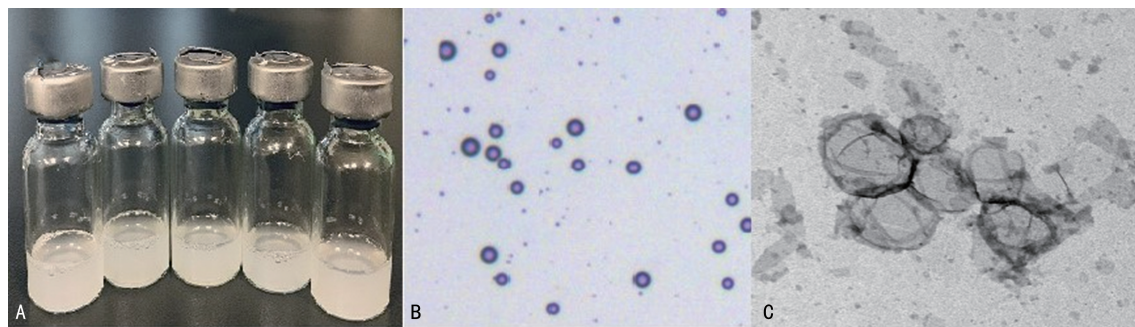
2 结果

2.1 一般特性检测 2 组纳米微粒外观形成均匀的胶状悬浮体(structure);光镜及电镜下可见微泡分布较均匀,呈圆形,表面光滑,见图 1。激光纳米粒度电位分析仪测得构建的阳离子脂质纳米微泡平均表面电荷为 (17.6 ± 2.1) mV;核心纳米微泡平均表面电荷为 (-7.9 ± 1.6) mV,2 组平均粒径、分散性指数(PDI)、电位、浓度见表 1。2 组微泡大小较均匀一致,PDI <0.5 ,表明纳米泡分布较均匀,2 组微泡均具有较好的分散性,同时浓度均可维持在 1×10^8 。阳离子脂质纳米微泡表面电荷较核心纳米微泡明显增大,平均粒径小于核心纳米微泡,差异均有统计学意义($P<0.05$),但 2 组微泡平均粒径均维持在纳米级别,并在 600 nm 以下。2 组微泡 PDI 及浓度比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

整体分析结果显示,粒径的时间比较,差异有统

计学意义($P<0.05$),组间及组间 * 时间交互比较,差异无统计学意义($P>0.05$);造影强度的时间、组间及组间 * 时间交互比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 2,进一步对粒径进行 2 组间各个时间点差异性分析,结果显示,核心纳米微泡仅 30、45 min 组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$),而阳离子脂质纳米微泡 0 min 和 5、15、30、45 min;15 min 和 60 min;30 min 和 60 min 组间比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

2.2 稳定性分析 60 min 内阳离子脂质纳米微泡的粒径从 0 min 的 (527.67 ± 37.72) nm 增加到 60 min 的 (553.84 ± 62.40) nm,造影强度从 0 min 的 (33.52 ± 1.93) a. u. 到 60 min 的 (34.49 ± 2.13) a. u.,结果所示均未见明显变化;60 min 内核心纳米微泡的粒径从 0 min 的 (588.61 ± 30.63) nm 到 60 min 的 (601.69 ± 112.58) nm,造影强度从 0 min 的 (33.17 ± 1.29) a. u. 到 60 min 的 (35.10 ± 2.52) a. u.,见表 2。虽阳离子脂质纳米微泡添加了配体,表征会发生部分变化,但造影强度时间、组间及组间 * 时间交互比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。



注:A. 磷脂悬浮液在机械振荡前;B. 阳离子脂质纳米微泡的显微镜图像;C. 阳离子脂质纳米微泡的电镜图像。

图 1 阳离子脂质纳米微泡的形态和结构

表 1 2 组微泡的粒径、PDI 及电位、浓度比较 ($n=20$)

微泡	粒径($\bar{x} \pm s$, nm)	PDI($\bar{x} \pm s$)	电位 [$M(P_{25}, P_{75})$]	浓度($\bar{x} \pm s, \times 10^8$)
阳离子脂质纳米微泡	564.35 ± 25.93	0.30 ± 0.16	$18.56(16.81, 19.02)$	4.27 ± 0.31
核心纳米微泡	582.55 ± 16.30	0.37 ± 0.15	$-8.04(-8.96, -6.86)$	4.24 ± 0.30
<i>t/Z</i>	-2.658	-1.344	-5.410	0.317
<i>P</i>	0.011	0.187	<0.001	0.753

2.3 体外造影效果评价 超声造影结果显示,当不同浓度的核心纳米微泡和阳离子微泡注入琼脂糖凝胶的仿体小孔中 6 s 后开始增强造影强度,并持续 15 min,见图 2,阳离子脂质纳米微泡每组浓度(1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 组)的造影强度分别为 (22.32 ± 1.32) 、 (35.61 ± 1.66) 、 (38.19 ± 0.78) 、 (38.60 ± 0.95) 、 (43.55 ± 1.78) a. u., 1×10^4 组与其他浓度组造影强度比较,差异均有统计学意义($P<$

0.05); 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 组的造影强度均高于 1×10^5 组,差异均有统计学意义($P<0.05$); 1×10^8 组的造影强度分别与 1×10^6 、 1×10^7 组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);而 1×10^6 、 1×10^7 组间造影强度比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。核心纳米微泡每组浓度(1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 组)的造影强度分别为 (21.32 ± 1.23) 、 (32.56 ± 1.55) 、 (37.99 ± 0.81) 、 (38.72 ± 1.47) 、 $(44.01 \pm$

2.11)a. u., 1×10^4 组与其他浓度组造影强度比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 组的造影强度均高于 1×10^5 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 1×10^8 组的造影强度分别与其余各

组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果发现, 在体外造影效果方面, 加入 DC-Chol 后效果差异并不明显。

表 2 60 min 内 2 组微泡的粒径和造影信号的变化 ($n=20, \bar{x} \pm s$)

项目	组别	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
		粒径	阳离子脂质纳米微泡	527.67±37.72	611.74±45.08
	核心纳米微泡	588.61±30.63	599.53±41.02	562.39±34.26	638.84±82.76
造影强度(a. u.)	阳离子脂质纳米微泡	33.52±1.93	32.87±1.14	34.62±2.12	34.39±4.17
	核心纳米微泡	33.17±1.29	33.41±2.40	34.68±1.60	36.44±1.74

项目	组别	T ₄	T ₅	组间		时间		组间 * 时间	
				F	P	F	P	F	P
				粒径	阳离子脂质纳米微泡	611.90±87.43	553.84±62.40	0.304	0.605
	核心纳米微泡	543.98±52.90	601.69±112.58						
造影强度(a. u.)	阳离子脂质纳米微泡	34.63±1.73	34.49±2.13	0.298	0.609	1.850	0.140	0.597	0.702
	核心纳米微泡	34.01±2.18	35.10±2.52						

注: T₀ 为 0 min, T₁ 为 5 min, T₂ 为 15 min, T₃ 为 30 min, T₄ 为 45 min, T₅ 为 60 min。

表 3 60 min 内 2 组微泡的粒径时间点差异性分析 ($n=20, \bar{x} \pm s, P$)

项目	组别	T ₀ vs. T ₁	T ₀ vs. T ₂	T ₀ vs. T ₃	T ₀ vs. T ₄	T ₀ vs. T ₅	T ₁ vs. T ₂	T ₁ vs. T ₃	T ₁ vs. T ₄	T ₁ vs. T ₅	T ₂ vs. T ₃	T ₂ vs. T ₄	T ₂ vs. T ₅	T ₃ vs. T ₄	T ₃ vs. T ₅
		粒径	阳离子脂质纳米微泡	0.033	0.009	0.004	0.032	0.491	0.585	0.404	0.996	0.133	0.771	0.588	0.045
	核心纳米微泡	0.776	0.497	0.197	0.251	0.734	0.337	0.310	0.155	0.955	0.054	0.632	0.310	0.019	0.337

注: T₀ 为 0 min, T₁ 为 5 min, T₂ 为 15 min, T₃ 为 30 min, T₄ 为 45 min, T₅ 为 60 min。

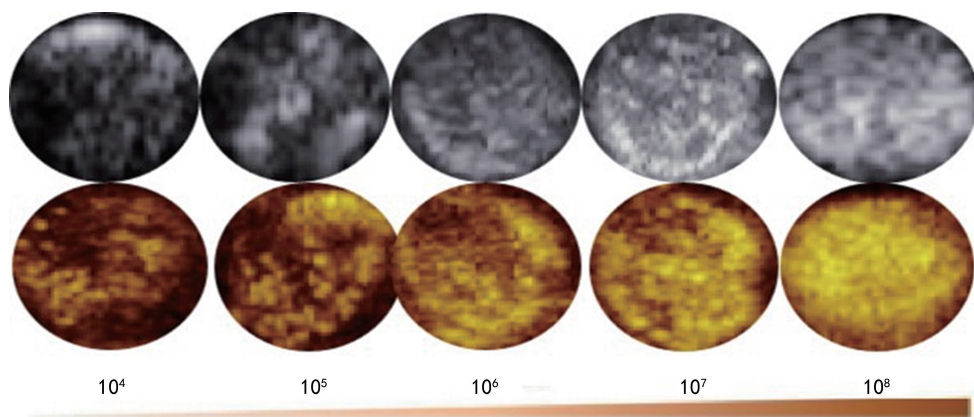


图 2 体外不同浓度阳离子脂质纳米微泡的二维和对比超声造影结果

3 讨论

与以往实验中的阳离子脂质纳米微泡相比, 本次实验介绍了利用 DPPC、DC-Chol、DSPE-PEG2000 合成阳离子脂质纳米微泡的过程。在本次实验中针对单一的靶点和单一的连接方式构建出来的阳离子脂质纳米微泡添加低细胞毒性阳离子脂质材料 DC-Chol^[9]。事实上, 这种脂类物质在基因转染和药物递送中已经被广泛使用, 是一种非常有效且常用的阳

子脂类物质之一, 同时赋予表面正电荷形成磷脂双层。

本实验结果显示, 制备的阳离子脂质纳米微泡电荷为 $(17.6 \pm 2.1) \text{ mV}$, 与普通的核壳纳米微泡电荷 $[(-7.9 \pm 1.6) \text{ mV}]$ 相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 这对微泡实现更多样的实验目的无疑是有益的。阳离子脂质纳米微泡对基因、抗体的搭载表现出明显的优势。孙素娟^[6]通过阳离子脂质纳米微泡实

现了对 HIF1 α -siRNA 搭载,并完成了三阴性乳腺癌病变组织的靶向并延缓了疾病的进展。伍巧玲等^[7]的研究结果也表明,阳离子脂质纳米微泡对 HVEGF₍₁₆₅₎表达载体的承载力明显高于阴离子微泡,并验证了该承载力表达的稳定效果,但目前多数研究者仍通过购买现成的阳离子脂质纳米微泡造影剂进行相关实验,不仅成本较高,而且对实验进度和效率也产生了一定的影响。本实验连续 2 h 测定粒径分布、浓度大小、造影强度等表征的同时,也发现了 120 min 内阳离子脂质纳米微泡粒径和造影强度结果所显示的不明显变化,对比核心纳米微泡的表现,也显示了验证这种自制阳离子脂质纳米微泡在常温下可以稳定表达 2 h 的特性——超声波成像中偶联纳米微泡的效能,以及在常温下稳定性更好的特性,因此,该脂质微泡各成分间的配比合理,使各因子间达到平衡,成功构造出稳定的阳离子脂质纳米微泡。

此外,作者将纳米气泡应用于体外超声造影成像,并将得到的图像与光学图像进行了比较。超声造影显示,核心纳米微泡浓度为 1×10^4 时,增强效果较其他浓度组别有明显差异。核心纳米微泡溶液的超声造影信号正如研究团队所预期的,随着浓度的升高而逐渐加强,不过需要强调的是,当浓度达到 1×10^8 时,并不是立即会出现超声成像信号的增强。在发现信号开始降低前,体外造影同样需要谨慎对待,这一过程必须连续采集图像。又由于加入 DC-Chol 后可能会影响核心纳米微泡的表征,本实验对阳离子脂质纳米微泡的体外造影效果进行了评价。研究结果与预期相符,阳离子脂质纳米微泡的造影效果不受 DC-Chol 的影响。

综上所述,本实验成功制备了阳离子脂质纳米微泡,并通过调整各成分间的配比实现了各因子间的平衡,为阳离子脂质纳米微泡的粒径及电位修饰提供了理论依据及技术支持,有望为该方法的推广应用提供参考,并使阳离子脂质纳米微泡成为高效的新型造影剂。

参考文献

[1] ULLAH M, KODAM S P, MU Q, et al. Microbubbles versus extracellular vesicles as thera-

peutic cargo for targeting drug delivery [J]. ACS Nano, 2021, 15(3):3612-3620.

- [2] UNGER E, PORTER T, LINDNER J, et al. Cardiovascular drug delivery with ultrasound and microbubbles [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2014, 72:110-126.
- [3] XIE F, LOF J, MATSUNAGA T, et al. Diagnostic ultrasound combined with glycoprotein II b/III a-targeted microbubbles improves microvascular recovery after acute coronary thrombotic occlusions [J]. Circulation, 2009, 119(10):1378-1385.
- [4] PRIOR S, GANDER B, BLARER N, et al. In vitro phagocytosis and monocyte-macrophage activation with poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres [J]. Europ J Pharmac Sci, 2002, 15(2):197-207.
- [5] BRANDHONNEUR N, CHEVANNE F, VIÉ V, et al. Specific and non-specific phagocytosis of ligand-grafted PLGA microspheres by macrophages [J]. Eur J Pharm Sci, 2009, 36(4/5):474-485.
- [6] 孙素娟. 超声介导携带 HIF1 α -siRNA 阳离子卟啉微泡用于三阴性乳腺癌的基因/光动力联合治疗 [D]. 呼和浩特:内蒙古医科大学, 2019.
- [7] 伍巧玲, 丁云川, 冉海涛, 等. 携 hVEGF₍₁₆₅₎ 表达载体阳离子脂质微泡的制备 [J]. 云南医药, 2020, 41(3):4.
- [8] ZHANG L, SUN Z X, REN P P, et al. Localized delivery of shRNA against PHD2 protects the heart from acute myocardial infarction through Ultrasound-Targeted cationic microbubble destruction [J]. Theranostics, 2017, 7(1):51-66.
- [9] 张清风, 王志刚, 冉海涛, 等. 一种载基因阳离子微泡超声造影剂的制备及特性研究 [J]. 中国超声医学杂志, 2012, 28(6):485-488.

(收稿日期:2024-03-04 修回日期:2024-10-24)