

❖ 实验研究

Influence of superparamagnetic iron oxide loaded polymerspheres on enhanced MRI for liver cancer of rabbits

SUN Yang^{1,2}, ZHENG Yuan-yi^{1,2}, WU Wei³, NIU Cheng-cheng^{1,2}, WANG Zhi-gang^{1,2*}

(1. Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China;

2. Department of Ultrasonography, 3. Department of Radiology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of self-made superparamagnetic iron oxide (SPIO) loaded polymer microspheres (s-PLGA) on MR imaging for liver tumor in rabbits. **Methods** Double emulsion method was utilized to prepare the s-PLGA. Twenty-one days after implantation of VX2 tumor in liver, 12 rabbits were randomly and equally divided into three groups with the injection of s-PLGA (s-PLGA group), saline (saline group), and PLGA 1 ml/kg (PLGA group) via ear vein respectively. MR imaging was performed before and after injection of the above three agents, the signal intensity (SI) of liver parenchyma and liver tumor were measured, then the signal ratio of liver tumor to liver parenchyma was calculated before and after enhancement. After MR scanning, the rabbits were sacrificed, and Prussian blue and HE staining of the livers were done. **Results** The s-PLGA microcapsules were observed with regular spherical morphology, and the average size of s-PLGA was about 800 nm. After injection of s-PLGA, SI of liver parenchyma reduced markedly, while no significant changes of SI were found in liver tumors, and the signal ratio of liver tumor to liver parenchyma increased significantly compared with the other two groups ($P < 0.05$). Accumulation of blue particles within liver parenchyma was observed in s-PLGA group. **Conclusion** The self-made s-PLGA microspheres can effectively enhance SI contrast between the tumor and normal liver tissue in rabbits, which may having potential application value in the detection of liver cancer.

[Key words] Superparamagnetic iron oxide; Polymer; Magnetic resonance imaging; Contrast agent; Liver neoplasms

载超顺磁性氧化铁高分子微球对兔肝癌 MR 成像效果的影响

孙 阳^{1,2}, 郑元义^{1,2}, 吴 伟³, 牛诚诚^{1,2}, 王志刚^{1,2*}

(1. 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学附属第二医院超声科, 3. 放射科, 重庆 400010)

[摘 要] **目的** 观察自制载超顺磁性氧化铁(SPIO)高分子微球(s-PLGA)对兔肝癌 MR 成像效果的影响。 **方法** 双乳剂法制备载 SPIO 的高分子微球。建立兔 VX2 肝癌模型 12 只, 于肿瘤种植后 21 天将随机分为 3 组, 分别经耳缘静脉注入 s-PLGA(s-PLGA 组)、生理盐水(生理盐水组)以及 PLGA 1 ml/kg 体质量(PLGA 组)。注射前、后行 MR 平扫及增强扫描, 分别测量肝实质和肿瘤的信号强度, 计算肿瘤/肝实质信号强度比。扫描结束后处死动物, 取肝癌标本行 HE 及普鲁士蓝染色, 于显微镜下观察。 **结果** 制备的 s-PLGA 呈规则球形, 直径约 800 nm。MR 成像显示, 注射 s-PLGA 后, 肝实质信号强度显著下降, 肿瘤信号无明显变化, 肿瘤/肝实质信号强度比相对高, 明显高于生理盐水及 PLGA 组($P < 0.05$)。普鲁士蓝染色显示, s-PLGA 组兔肝实质内有较多蓝染颗粒分布。 **结论** 自制 s-PLGA 能有效增强兔肝脏肿瘤与正常组

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81130025)、国际(中加)合作项目(81161120548)、青年科学基金项目(30900371)。

[作者简介] 孙阳(1985—), 女(满族), 辽宁铁岭人, 在读博士。研究方向: 多功能超声造影剂的制备及应用。E-mail: sy19850905@126.com

[通讯作者] 王志刚, 重庆医科大学超声影像学研究所, 400010; 重庆医科大学附属第二医院超声科, 400010。E-mail: wzg62942443@163.com

[收稿日期] 2012-03-26 **[修回日期]** 2012-05-01

织间的信号强度对比,对诊断肝癌可能具有一定应用价值。

[关键词] 超顺磁性氧化铁;高分子材料;磁共振成像;对比剂;肝肿瘤

[中图分类号] R445.2; R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2012)08-1445-04

超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)是一种新型的、组织特异性 MRI 阴性对比剂^[1]。SPIO 粒径小,毒性低,血浆半衰期长,易被网状内皮系统特异性吞噬,使组织 T₂ 明显缩短,引起相应区域的信号减低,有助于提高肿瘤与正常组织的 MRI 信号对比度,提高肿瘤的检出率^[2-5]。作为以网状内皮系统为靶器官的 MRI 对比剂, SPIO 在肝脏肿瘤成像方面有着良好的应用前景。本研究观察自制载 SPIO 高分子微球(s-PLGA)对兔肝癌 MR 成像效果的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料 实验动物:纯种新西兰大白兔 12 只(重庆医科大学动物实验中心提供),体质量 2.0~2.5 kg, VX2 荷瘤兔 1 只(重庆医科大学超声医学研究所提供)。乳酸/羟基乙酸共聚物(PLGA, 50:50, 济南岱罡)、SPIO(10 nm, 31 mg/ml, Ocean)纳米颗粒、聚乙烯醇(PVA, Sigma)、3%戊巴比妥钠、电子天平、超声振荡仪(SONICS)、高速分散均质机(FJ300-SH)、高速离心机、Malvern 激光测径仪,综合物性测量系统(PPMS Model 6000)。

1.2 s-PLGA 的制备及表征分析 将 1 g PLGA 与 2 ml SPIO 加入 20 ml 三氯甲烷中,充分搅拌至其完全溶解,然后加入 2 ml 双蒸水,声振仪振荡 30 s,成棕色乳化液(W/O 微球)。取适量 5% PVA 溶液倒入乳化液中,以高速分散均质机均质 5 min(W/O/W 微球)。室温下放置搅拌 2 h,使三氯甲烷充分挥发,再经多次双蒸水洗涤、离心、收集,即得 s-PLGA 微球。以 PPMS 测定其理化性质,显示 s-PLGA 的磁滞回线。

1.3 建立兔 VX2 肝移植瘤模型 术前 12 h 停饲、停饮,术区备皮。手术剥离荷瘤兔实质包块,取肿瘤边缘生长旺盛的鱼肉样组织,切成 1 mm³ 大小的瘤块备用。以 3%戊巴比妥钠(1 ml/kg 体质量)麻醉拟行接种的实验兔,将兔仰卧位保定于动物手术台上。常规消毒,无菌条件下,沿剑突下腹白线逐层分开腹壁皮肤、肌肉、腹膜,暴露兔肝脏右中叶,将 1 粒瘤块包埋于此。无菌纱布压迫止血片刻后,逐层缝合腹膜、肌肉、腹壁皮肤,碘伏消毒。

1.4 活体 MR 成像 肿瘤接种后 21 天,采用 Philips Achieva 3.0T TX MR 仪对实验兔进行扫描。将 12

只兔 VX2 肝癌模型随机分为 3 组,每组 4 只。检查前以 3%戊巴比妥钠麻醉动物,仰卧位保定于 MR 扫描架上。先行腹部 MR 平扫,然后对各组兔经耳缘静脉分别注入 s-PLGA(s-PLGA 组)、生理盐水(生理盐水组)及 PLGA 1 ml/kg 体质量(PLGA 组)。于注射后 30 s、5 min 行 MR 增强扫描,采集 T₂WI,并对 s-PLGA 组于注射后 10、30、60 min 采集 T₂WI。扫描参数:TSE 序列,TR 2500 ms, TE 80 ms,翻转角 90°, FOV 160 mm,层厚 4 mm。

1.5 图像分析 扫描结束后,于 T₂WI 上手工选择 ROI,测量增强前、增强后肝实质及肝肿瘤的信号强度(signal intensity, SI)值。选择 ROI 时尽量在相同层面并避开肝内血管、胆管等管道结构,于不同位置 ROI 测量 3 次,取平均值。根据增强前、增强后(30 s、5 min)3 组肝实质 SI 及肝肿瘤 SI,计算各时间点的肿瘤/肝实质 SI 比。

1.6 病理检测 扫描结束后立即处死实验兔,取出肝组织及肿瘤组织,置于 10%甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋、切片,进行 HE 染色及普鲁士蓝染色,于光镜下观察肝脏内铁离子的分布。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件包,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析对自身注射前、后及组间均数进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 s-PLGA 的表征 制备的 s-PLGA 外观呈棕色混悬液,镜下呈球形,形态规则,分散度好,直径约 800 nm。磁滞回线显示,室温下 s-PLGA 无磁滞现象,呈超顺磁性,饱和磁化强度为 1.0 emu/g(图 1)。

2.2 接种情况 12 只实验兔均成功建立肝癌模型。接种后 21 天,超声可见肿瘤生长于肝脏,呈低回声,约 1 cm×1 cm×1 cm。建模期间荷瘤兔生长状态良好。

2.3 兔肝实质及肿瘤 MRI 信号变化 生理盐水组及 PLGA 组兔注射前、后肝实质及肿瘤 SI 均无明显变化,肿瘤/肝实质 SI 比差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。注射 s-PLGA 微球后,肝肿瘤 SI 虽无明显变化,但肿瘤周围肝实质 SI 显著降低,肿瘤/肝实质 SI 比明显高于其他两组($P < 0.05$,图 2、3)。注射 s-PLGA 后 30 s,肝实质信号急剧下降,肝脏几乎呈黑色

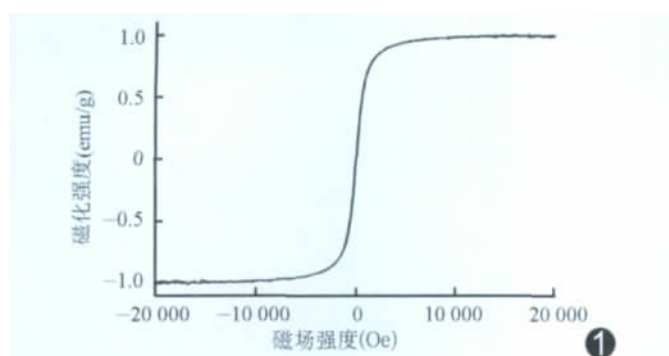


图1 s-PLGA 磁滞回线

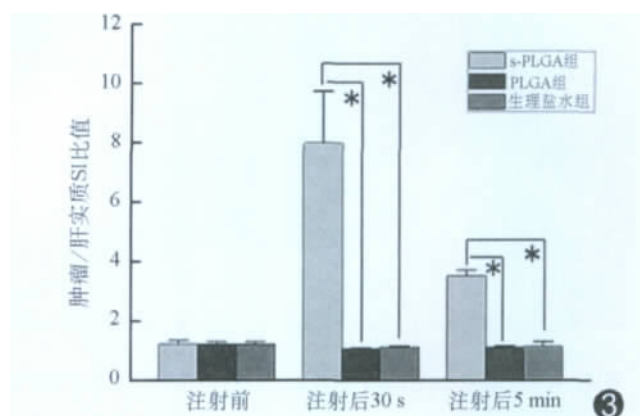


图3 各组兔注射对比剂前后肿瘤/肝实质 SI 比值的变化

(图 2C);此后,随时间推移(5、10、30、60 min),肝实质信号逐渐升高。

2.4 病理结果 HE 染色片示肝癌细胞体积明显增大,核大、浓染,排列紊乱,与正常肝细胞相移行。普鲁士蓝染色后,s-PLGA 组兔肝实质内有较多蓝染颗粒分布,而肿瘤组织中未见蓝染颗粒;生理盐水组和 PLGA 组普鲁士蓝染色均为阴性(图 4)。

3 讨论

MRI 具有很高的组织分辨力,无电离辐射,可多参数、多方位成像,是一种高效而无创的肝癌检查方法^[6-7]。应用肝脏特异性 MRI 对比剂,能够获得空间分辨力高的结构和功能图像,有利于肝癌的早期发现和早期诊断,对进一步实施规范化综合治疗具有重要意义。

SPIO 具有良好的生物相容性、可降解性,无长期毒性,血浆半衰期长,易被肝巨噬细胞吞噬摄取,是一种较理想的肝脏特异性 MRI 阴性对比剂。SPIO 主要通过影响其周围氢质子的弛豫来改善和提高 MR 成

像的对比度,对 T2 时间有着更为显著的影响^[8]。高分子有机材料 PLGA 作为载体,稳定性高、生物相容性好,体内血液循环时间长,可包裹成像剂或药物在体内逐步降解释放,且具有良好的声学特性,常被制备用于超声显像剂^[9-10]。本研究在前期工作基础上,采用双乳化法制备载 SPIO 的高分子微球(s-PLGA),经耳缘静脉注射至兔 VX2 肝癌模型,通过对比注射前、后 MR 成像的改变,评价 s-PLGA 对肝脏肿瘤 MR 成像效果的影响。本研究发现,经兔耳缘静脉团注 s-PLGA 后,兔肝实质 SI 显著下降,肿瘤信号强度无明显变化而肿瘤/肝实质 SI 比值呈相对高信号,改善了肿瘤组织与正常肝组织信号的强度对比,有利于提高肿瘤检出率。推测在肝脏肿瘤 MR 成像中,s-PLGA 主要利用 Kupffer 细胞在正常肝组织和肿瘤组织之间的分布差异而实现对肿瘤的相对显影。正常肝组织中 Kupffer 细胞数量和功能正常,大量吞噬 s-PLGA 微球,在外加磁场作用下被诱导产生更强的局域磁场,进

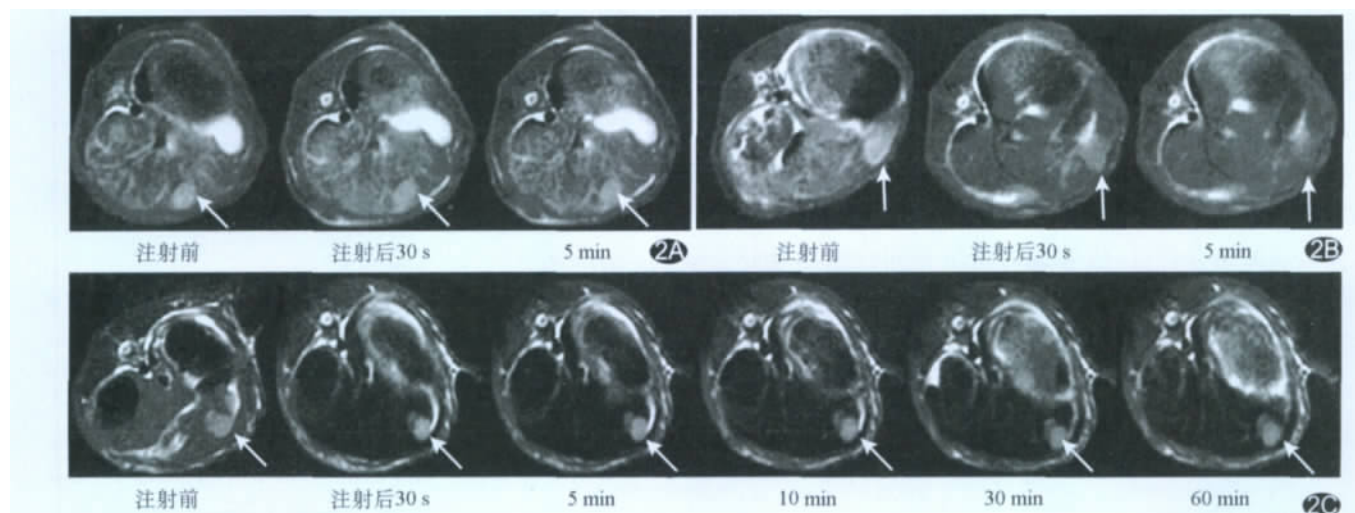


图2 兔 VX2 肝癌模型 T2WI, 箭示病灶 A. 生理盐水组; B. PLGA 组; C. s-PLGA 组

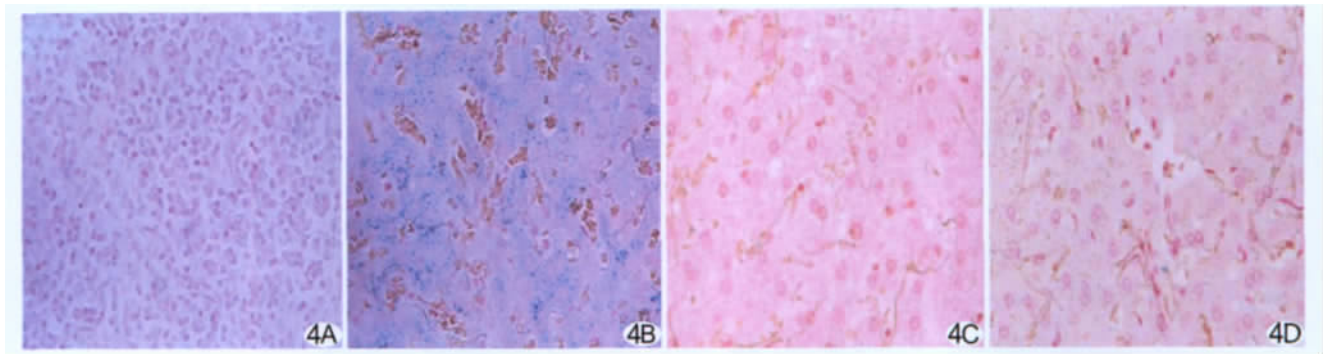


图 4 普鲁士蓝染色病理图(×400) A. 注射 s-PLGA 后的肿瘤组织; B. 注射 s-PLGA 后的肝实质; C. 注射生理盐水后的肝实质; D. 注射 PLGA 后的肝实质

而强烈影响颗粒周围水分子中氢质子的弛豫时间,明显缩短 T2 时间,使所得到的肝组织 T2WI 变暗,表现出负增强效果;而肿瘤组织中不含或含少量 Kupffer 细胞,故 s-PLGA 对肿瘤组织影响甚微。普鲁士蓝染色结果亦证实,注射 s-PLGA 后兔正常肝组织内出现较多蓝色颗粒,推测与 MR 显像原理一致,为 Kupffer 细胞吞噬 s-PLGA 聚集而成。李奥等^[11]观察载 SPIO 的液态氟碳纳米粒(Fe_3O_4 -PFOB)对大鼠肝脏 MRI 效果的影响,发现注射 Fe_3O_4 -PFOB 纳米粒后,大鼠肝实质信号显著降低。牛诚诚等^[12]成功制备了载 SPIO 和 DiI 荧光的高分子显像剂,用于巨噬细胞成像,获得了良好的 MR 成像效果,且荧光信号强烈。

然而上述对 SPIO 成像的研究主要基于网状内皮系统对磁性纳米颗粒的吞噬作用,属被动性靶向,未进一步在细胞水平或分子水平进行观察。近年来,随着纳米材料合成技术的发展和完善,易于进行表面修饰、结构和功能更加复杂的 SPIO 陆续出现。通过在 SPIO 颗粒表面加载可有效识别肿瘤的靶向分子,制备具有主动识别功能的 SPIO 纳米颗粒探针^[13],引导其在肿瘤病灶部位富集,能够为临床提供更多的接近病理的相关信息,从而实现对肿瘤的分子成像。此外,整合各种成像技术优势,发展多模态分子成像手段也是医学影像学发展的重要方向。SPIO 作为纳米载体,具有大量表面结合位点,能够成为携带不同检测信号分子(原子)的载体,进而实现多模态影像探针的构建,将为肿瘤的诊疗开辟新的蓝图。

[参考文献]

[1] Claire C, Philippe R, Jean-Marc I, et al. Recent advances in Iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006,58(14):1471-1504.

[2] Ling Y, Wei K, Luo Y, et al. Dual docetaxel/superparamagnetic Iron oxide loaded nanoparticles for both targeting magnetic resonance imaging and cancer therapy. *Biomaterials*, 2011,32(29):7139-7150.

[3] Ma HL, Xu YF, Qi XR, et al. Superparamagnetic Iron oxide nanoparticles stabilized by alginate; Pharmacokinetics, tissue distribution, and applications in detecting liver cancers. *Int J Pharm*, 2008,354(1-2):217-226.

[4] Smirnov P, Lavergne E, Gazeau F, et al. In vivo cellular imaging of lymphocyte trafficking by MRI: A tumor model approach to cell-based anticancer therapy. *Magn Reson Med*, 2006,56(3):498-508.

[5] Brähler M, Georgieva R, Buske N, et al. Magnetite-loaded carrier erythrocytes as contrast agents for magnetic resonance imaging. *Nano Lett*, 2006,6(11):2505-2509.

[6] Brindle K. New approaches for imaging tumour responses to treatment. *Nat Rev Cancer*, 2008,8(2):94-107.

[7] Han Z, Fu A, Wang H, et al. Noninvasive assessment of cancer response to therapy. *Nat Med*, 2008,14(3):343-349.

[8] Jun YW, Seo JW, Cheon J. Nanoscaling laws of magnetic nanoparticles and their applicabilities in biomedical sciences. *Acc Chem Res*, 2008,41(2):179-189.

[9] Ao M, Wang ZG, Ran HT, et al. Gd-DTPA-loaded PLGA microbubbles as both ultrasound contrast agent and MRI contrast agent—A feasibility research. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2010,93(2):551-556.

[10] 冉海涛,任红,王志刚,等.包裹阿霉素的高分子材料微泡声学造影剂制备及显影效果实验研究. *临床超声医学杂志*, 2005,7(4):217-220.

[11] 李奥,王志刚,吴伟,等.载 Fe_3O_4 液态氟碳纳米粒增强磁共振成像的实验研究. *中国医学影像技术*, 2011,27(3):453-456.

[12] 牛诚诚,郑元义,鄢雄,等.载超顺磁性氧化铁和 DiI 荧光高分子微球巨噬细胞 MR 成像. *中国医学影像技术*, 2011,27(9):1747-1750.

[13] Abdalla MO, Karna P, Sajja HK, et al. Enhanced noscapine delivery using uPAR-targeted optical-MR imaging trackable nanoparticles for prostate Cancer therapy. *J Control Release*, 2011,149(3):314-322.