

• 综述 •

# Applications and preparations of drug-delivery lipid ultrasound microbubble contrast agent

LIU Xue-bing, WANG Zhi-gang\*, XU Chuan-shan

(Institute of Ultrasound Imaging, the Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

**ABSTRACT** Drug-delivery lipid microbubbles have been one of the investigative hot spots nowadays, and as results both micrometer and nanometer drug-delivery lipid microbubbles have been prepared. The features, preparations and applications of drug-delivery lipid microbubbles were reviewed in this article, as well as the potential disadvantages and perspectives.

**KEY WORDS** Ultrasound microbubble contrast agents; Drug; Lipid

## 载药脂质超声微泡造影剂的制备及应用研究

刘学兵 综述, 王志刚\*, 许川山 审校

(重庆医科大学附属第二医院超声影像学研究所, 重庆 400010)

**[摘要]** 载药脂质微泡是近年来国内外研究的热点之一, 目前已制备出微米级及纳米级载药脂质微泡, 本文就载药脂质超声微泡造影剂的特点、制备、应用、现存的问题及发展前景做一综述。

**[关键词]** 超声微泡造影剂; 药; 脂质

**[中图分类号]** R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-8475(2008)02-0156-04

自从 1968 年 Gramiak 首次报道超声微泡造影剂的应用以来, 超声微泡造影剂的研究已有 30 余年的历史。近年来国内外已相继成功研制蛋白类、糖类、非离子表面活性剂类、脂质类、高分子等多种包膜的超声微泡, 研究表明, 这些超声微泡能有效增强心肌、肝、肾、脑等实质器官的二维灰阶显像和多普勒血流信号, 明显提高超声诊断的敏感性和特异性<sup>[1]</sup>。随着生物医药技术的迅猛发展, 人们发现超声微泡不仅是一种良好的超声显像对比剂, 而且是一种重要的药物递送载体。近几年国内外已针对载药或载基因超声微泡的研究取得了许多重要进展, 本文拟就载药脂质微泡的特点、制

备及应用做一简述和探讨。

### 1 载药脂质微泡的特点

作为药物载体, 超声微泡结合超声技术可望实现局部定位释药, 达到保护药物、延缓药物释放、减少给药次数和剂量以及降低毒性药物对其他组织或器官损害的目的<sup>[2]</sup>。

不同包膜载药微泡具有各自的特点。与白蛋白类和非离子表面活性剂类微泡相比, 脂类微泡具有更多优势, 原因在于脂类微泡具有以下特性: 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: 一方面脂类微泡化学性质稳定, 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, 与白蛋白微泡相比, 脂质微泡在慢流速中气体溶出更少, 微泡破坏对机体损害更小<sup>[3]</sup>; ④增加造影效果: 形成膜的类脂类在水介质中具有形成液晶双层, 其分子几何形状中亲水和疏水部分大小相近, 研究发现含

**[基金项目]** 国家 863 计划项目(2006AA02Z4FO)、国家自然科学基金重点项目(30430230)。

**[作者简介]** 刘学兵(1976—), 男, 四川安岳人, 在读硕士, 主治医师。研究方向: 心脏超声的诊断与治疗。E-mail: 960832@163.com

**[通讯作者]** 王志刚, 重庆医科大学超声影像学研究所, 400010。E-mail: wzg62942443@163.com

**[收稿日期]** 2007-12-18 **[修回日期]** 2008-01-16

有这种脂类的造影剂能显著增加造影效果<sup>[1]</sup>;⑤脂质微泡具有更高的传输效率:脂质微泡因其壳的特性,还可以在其表面装配不同的配体,实现靶向显像与治疗,从而提高药物的传输效率。

## 2 载药脂质微泡的制备过程

目前国内外制备载药脂质微泡优选的成膜类脂类主要来源于磷脂如二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)等,因为这类磷脂高度饱和,脂肪链长,与普通的卵磷脂相比具有更高的稳定性,药物的包封率高,渗漏率低。Borden 等<sup>[4]</sup>比较不同磷脂组成的微泡,发现磷脂的组分直接影响着微泡的稳定性。增加长链酰基磷脂组分的微泡在超声作用下更趋稳定,原因可能是脂质微泡每个烃链上亚甲基的增多可增加单层外膜分子间的相互吸引力,增加了单层分子的内聚性,内聚性的增加可使微泡在试验的振荡中、体内更稳定<sup>[5]</sup>。近期研究表明,聚乙二醇(PEG)的修饰也可延长微泡的循环时间、增加微泡稳定性,主因是 PEG 的亲水性使其在微泡表面形成一层水化膜,掩盖微泡表面的疏水结合位点,阻碍血浆成分接近微泡,从而降低网状内皮系统的识别和摄取。具有不同电性的 PEG 衍化聚合物可制得负电性或正电性的脂质微泡,用于包封电性相反的药物,这种方法也可以获得较高的药物包封率。

目前国内外常用的载药脂质微泡的制备方法有中和法、吸附法、机械匀化法、声空化法、冷冻干燥法和薄膜水化法等,文献<sup>[6]</sup>认为往复式振荡即机械振荡法是制备造影剂的较好方式。与漩涡式振荡相比,此方法可以获得更高浓度的微泡,并大大节省制备时间。机械振荡法最突出的特点是稳定,且制备工艺相对简单、更易控制,因而机械振荡法所制备的造影剂更稳定,工艺重现性更好。杨春江等<sup>[7]</sup>采用机械振荡法制备载紫杉醇脂质微泡,结果显示采用机械振荡法制备的紫杉醇脂质微泡包封率和载药量均较高,粒径分布好,体内显像效果好。纳米级微泡的常用制备方法有界面聚合法、乳化聚合法、乳化-蒸发法、高压均质法、微乳法等,近年来纳米药物载体的“智能化”逐渐成为研究的热点之一。智能纳米药物就是在靶向给药基础上,设计合成缓释药包膜,以纳米技术制备纳米药物粒子,结合靶向给药和智能释药优点用纳米技术完成制备智能纳米缓释药的目的,即除定点给药之外,还能根据用药环境的变化,自我调整对环境进行自动释药。制备纳米智能药物载体就是通过对纳米药物载体的结构设计、合

成,制备出具有智能释药能力的纳米药物载体。已有作者利用纳米颗粒与病毒基因片段及其他药物结合构成纳米微球,在动物实验中靶向治疗乳腺肿瘤获得成功<sup>[8]</sup>。

微泡与药物或基因的结合方法包括:①药物直接黏附在微泡的表面,如带负电基团的药物容易黏附在带正电的脂质微泡表面;②某些药物可和气体一起包被在微泡的内部;③与微泡形成非共价结合方式,如某些药物或 DNA 可以静电吸附等方式非共价键结合在微泡表面;④药物嵌入微泡膜中间,可增加微泡外壳的稳定性;⑤疏水性药物可以混合在一层油脂层内,形成一层薄膜包绕在微泡内,其外包被着一层稳定的膜,在这种结合方式下可连接抗体用于靶向释放药物<sup>[9]</sup>。超声结合靶向载药微泡能够促进血栓的溶解,因此靶向载药微泡在诊断及治疗中都具有重要的作用<sup>[10]</sup>。很小剂量的超声微泡造影剂就具有较好的显影效果,目前已完成炎症、缺血再灌注损伤、血栓靶向显影的动物模型,载药物或基因的微泡结合超声在多个动物模型的体内外研究中也已获得成功。

提高脂质微泡药物包封率的方法包括:①前体药物法:通过适当修饰,将药物转变为水溶性或脂溶性大的药物,有利于提高包封率;通过合成亲脂性前体药物更可大大提高其包封率<sup>[11]</sup>,解决微泡因气体存在而减少携带药物、基因数量的问题;通过将药物前体成分整合到微泡中,当微泡破裂后药物在病变部位释放而起到杀灭肿瘤的作用。②离子梯度法:离子梯度法是一类主动载药技术,包括 pH 梯度法和硫酸铵梯度法,可以制备稳定性好、包封率高的脂质体。用于两亲性药物如多柔比星、米托蒽醌、环丙沙星等的跨膜转运,包封率可达 90% 以上。影响梯度法载药的因素很多,主要包括跨膜 pH 梯度、孵育时间和温度、内水相介质浓度及药物-脂质比例等<sup>[12]</sup>。

## 3 载药超声微泡造影剂的应用

3.1 抗肿瘤 在分子水平上发展起来的基因疗法和药物释放方法目前也是超声联合微泡技术介导肿瘤治疗的基础研究热点。以微泡作为载体可以降低超声的空化阈值,负载治疗基因或药物的微泡到达靶目标后,超声辐照可在特定空间(聚焦区)和特定时间破坏微泡剂,产生空化效应和声化学反应,使微泡爆破后释放出基因或药物而进入靶组织和器官的血管外间质内,实现靶向转染基因或靶向药物释放的目的。微泡剂介导基因转导或药物靶向输送的有效性、安全性已被许多研究所证实。van Wamel 等<sup>[13]</sup>培养了大鼠胰腺肿瘤

细胞,采用超声造影技术进行治疗,结果表明微泡作为载体携带放射性核素进行肿瘤治疗是可行的。Anwer 等<sup>[14]</sup>应用带正电的磷脂-胆固醇复合物递送 IL-12 基因到鼠肿瘤模型。结果表明超声作用显著增加基因表达,并且基因转染区域仅限于肿瘤脉管系统。与对照组比较 IL-12 的表达足以抑制肿瘤的生长。研究表明,疾病(如肿瘤)状态中的血管内皮间隙虽有扩大,但至多允许直径小于 700 nm 的颗粒穿过<sup>[15]</sup>;而纳米级药物载体通过在制作过程中调整参数,完全可做到 700 nm 以下的小粒径,故可穿越血管内皮间隙,将药物递送到靶组织,甚至穿过细胞膜进入胞质。Crowder 等<sup>[16]</sup>运用全氟化碳脂质纳米造影剂进行了体外靶向药物研究,将载脂溶性药物的靶向纳米造影剂加到体外培养高表达的  $\alpha v \beta 3$  的 C32 黑色素瘤细胞中,结合超声辐照,可见细胞浆内脂溶性药物浓度是对照组(不用超声辐照)的 2 倍,表明脂质纳米造影剂是一种安全、能增强药物传递的药物载体。

3.2 溶栓 治疗性超声、微泡、溶栓药物联合应用于溶栓的效果明显好于超声与药物联合应用或单独使用药物溶栓,不仅更有效,更快速,且能减少所需溶栓药剂用量,减轻或避免不良反应,因此溶栓治疗已成为超声微泡药物运载系统最有前景的应用方向。Hynynen 等<sup>[17]</sup>在体外实验中观察到 MRX-408 可黏附于血栓表面,即使在盐水的不断冲刷下 MRX-408 仍可连接上去,而且在 MRX-408 的脂质膜上可以结合溶栓药物,还有实验证实微泡增强溶栓在溶解血栓的同时并未破坏周围组织。于锐等<sup>[18]</sup>将尿激酶结合到其外膜上,在体外实验中观察到微泡与血栓结合后,用超声波照射使微泡破裂,释放出药物,从而使血栓软化,加速溶解。

3.3 炎症 Villanueva 等<sup>[19]</sup>将抗 ICAM-1 抗体共价连接于全氟丁烷微泡的脂质外壳上,此种微泡可选择性结合于表达黏附分子的活化内皮细胞,使炎症的靶向显影具有更高的针对性和选择性。利用对炎症部位有靶向作用的微泡,不仅能使炎症靶向显影,评价炎症的严重程度,且可利用微泡来携带抗炎的药物到达炎症部位,从而达到治疗目的<sup>[20]</sup>。若能将抗感染药物整合至微泡中,利用微泡对炎症部位的靶向作用,当微泡在炎症部位聚集时,给予超声照射,通过超声对微泡的空化效应破坏微泡,使得药物在病变局部释放出来,不仅能提高药物在病变局部的浓度,使治疗效果显著增加,而且可减少全身的药物不良反应。

3.4 问题及展望 超声微泡为实现药物递送提供了载体,脂质微泡具有高载药量、一定的靶向性、无免疫

原性和可修饰等诸多优点,因而深受医药研究人员的广泛青睐。脂质载药微泡的研究已经取得了较大的进展,但在应用脂质微泡递送药物前,仍然存在一些问题需要解决:①提高载药微泡的包封率及载药量;②优化体内载药微泡的显影效果;③能够透过血管壁直接与靶组织结合;④提高微泡的稳定性及显影时间。随着国内外对载药微泡研究的不断深入,载药微泡将超声医学、药理学、材料科学、分子生物学、临床医学等学科联系起来,必将有着广阔的应用前景。

[参考文献]

[1] Zhang XJ, Chen YQ, Li LJ, et al. Progress of encapsulated microbubbles ultrasound contrast agent. Chin J Med Imaging Technol, 2005, 21(5): 819-821.  
张雪娇,程永清,李丽君,等.包膜微泡超声造影剂的研究进展.中国医学影像技术,2005,21(5):819-821.

[2] Lu MF, Chen YQ, Li LJ, et al. Microbubbles ultrasound contrast agent: a novel drug targeting delivery system. Chin J Med Imaging Technol, 2005, 21(4): 513-515.  
逯敏飞,程永清,李丽君,等.微泡超声造影剂:一种新型的靶向载体.中国医学影像技术,2005,21(4):513-515.

[3] Hasik MJ, Kim DH, Howle LE, et al. Evaluation of synthetic phospholipid ultrasound contrast agents. Ultrasonics, 2002, 40(9): 973-982.

[4] Borden MA, Kruse DE, Caskey CF, et al. Influence of lipid shell physicochemical properties on ultrasound-induced microbubble destruction. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 2005, 52(11): 1992-2002.

[5] Kim DH, Costello MJ, Duncan PB, et al. Mechanical properties and microstructure of polycrystalline phospholipid monolayer shells: Novel solid microparticles. Langmuir, 2003, 19(20): 8455 - 8466.

[6] Tan KB, Gao YH, Liu P, et al. Preparation of lipid-coated ultrasound contrast agent by mechanical shaking: a preliminary experimental study. Chinese J Ultrasound, 2006, 22(8): 561-563.  
谭开彬,高云华,刘平,等.机械振荡法制备脂膜超声造影剂的初步实验研究.中国超声医学杂志,2006,22(8):561-563.

[7] Yang CJ, Wang ZG, Li XS, et al Preparation of acoustically active lipospheres containing paclitaxel. Chin J Ultrasonogr, 2006, 15(7): 535-538.  
杨春江,王志刚,李兴升,等.载药脂质微气泡的制备及其应用.中华超声影像学杂志,2006,15(7):535-538.

[8] Li L. Research on nano-drug carriers. Materials Herald, 2002, 16(7): 58-59.  
李玲.纳米药物载体研究.材料导报,2002,16(7):58-59.

[9] Unger EC, Porter T, Culp W, et al. Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56(9): 1291-314.

- [10] Klivanov AL. Microbubble contrast agents: targeted ultrasound imaging and assisted drug-delivery applications. *Invest Radiol*, 2006, 41(3):354-362.
- [11] Huang X, Molema G, King S, et al. Tumor infarction in mice by antibody directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Science*, 1997, 275(5299):547-550.
- [12] Li TL, Hao LM. Progress of the liposome encapsulation efficiency. *Foreign Medical Sciences Section of Pharmacy*, 2006, 33(3):224-227.  
李唐棣, 郝丽梅. 脂质体封装率的研究进展. *国外医学药学分册*, 2006, 33(3):224-227.
- [13] van Wamel A, Bouakaz A, Bernard B, et al. Radionuclide tumour therapy with ultrasound contrast microbubbles. *Ultrasonics*, 2004, 42(1-9):903-906.
- [14] Anwer K, Kao G, Proctor B, et al. Ultrasound enhancement of cationic lipid-mediated gene transfer to primary tumors following systemic administration. *Gene Ther*, 2000, 7(21):1833-1839.
- [15] Oeffinger BE, Wheatley MA. Development and characterization of a nano-scale contrast agent. *Ultrasonics*, 2004, 42(1-9):343-347.
- [16] Crowder KC, Hughes MS, Hughes MS, et al. Sonic activation of molecularly-targeted nanoparticles accelerates transmembrane lipid delivery to cancer cells through contact-mediated mechanisms: implications for enhanced local drug delivery. *Ultrasound Med Biol*, 2005, 31(12):1693-1700.
- [17] Hynynen K, McDannold N, Vykhodtseva N, et al. Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits. *Radiology*, 2001, 220(3):640-646.
- [18] Yu R, Cheng Y. The thrombolysis effect of ultrasound and Ultrasound microbubbles agent. *J Ultrasound in Clin Med*, 2006, 6(6):363-365.  
于锐, 程远. 超声和超声微泡造影剂的溶栓作用. *临床超声医学杂志*, 2006, 6(6):363-365.
- [19] Villanueva FS, Jankowski RJ, Klivanov S, et al. Microbubbles targeted to intercellular adhesion molecule-1 bind to activated coronary endothelial cells. *Circulation*, 1998, 98(1):1-5.
- [20] Lindner JR, Song J, Xu F, et al. Noninvasive ultrasound imaging of inflammation using microbubbles targeted to activated Leukocytes. *Circulation*, 2000, 102(22):2745-2750.

## 第八届全国介入放射学学术大会(2008CSIR)通知

全国介入放射学学术大会每两年举行一次,是目前我国介入放射学领域最大规模的学术会议。第八届全国介入放射学学术大会(Chinese Society of Interventional Radiology, 2008 CSIR)定于2008年8月20-24日在北京中信国安第一城举办,本次会议由中华医学会放射学分会(全国介入放射学组)主办,首都医科大学附属北京朝阳医院、北京大学第一医院、北京大学第三医院承办。会议将以“交流、互动、合作、创新”为宗旨,按照国际标准和惯例来筹划2008CSIR。本次会议的国内外代表预计1500人。

会议将按照血管介入、非血管介入、肿瘤介入、神经介入、介入学科建设与发展论坛及介入护理等专题,聘请国内外专家作专题学术报告,充分展示本领域的前沿知识、最新学术动态和规范化的诊疗经验;同时还将提供各种形式的学习交流渠道,包括大会学术交流、论文报告、论文展示(中英文展板)等,以适应不同层次学者的需要。本次会议将采用双语(Chinese-English)进行交流,国内外演讲者一律使用中英文双语幻灯。

目前已开通了会议中英文网站 <http://www.2008csir.org.cn>,有网上注册、网上投稿、信息查询、留言板,还将开通网上缴纳注册费、预订房间等栏目,会议授予与会者国家级Ⅰ类继续医学教育学分(10分)。

众所周知,2008年8月8日-24日北京将举办第29届奥运会,本次会议在奥运会后期举行,与奥运会同期闭幕,与会者将有机会免费获得奥运会门票,与奥运同在,感知奥运,亲历奥运。

我们诚挚地欢迎各位同仁来北京参加此次会议!并衷心感谢您的积极参与和大力支持!