

# Progress of Ultrasound Contrast Agent Containing Liquid Perfluorocarbons\*

Zhong Cao<sup>#</sup>, Chunyang Zhang, Wenjian Zhu, Hao Li

Department of Biomedical Engineering, College of Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou  
Email: <sup>#</sup>cz.83@163.com

Received: Jan. 14<sup>th</sup>, 2013; revised: Feb. 8<sup>th</sup>, 2013; accepted: Feb. 20<sup>th</sup>, 2013

**Abstract:** With the advancement of nanotechnology and ultrasound molecule imaging, a novel contrast agent has become a new research approach. Liquid perfluorocarbons coated with different materials as ultrasound contrast agents exhibit different characteristics. This article reviews the background, application and prospect of perfluorocarbon nanoparticle.

**Keywords:** Liquid Perfluorocarbons; Ultrasound Contrast Agent; Lipid; Polymer; Silica

## 包裹液态氟碳超声造影剂的研究进展\*

曹 众<sup>#</sup>, 张春阳, 朱文健, 李 皓

中山大学工学院生物医学工程, 广州  
Email: <sup>#</sup>cz.83@163.com

收稿日期: 2013 年 1 月 14 日; 修回日期: 2013 年 2 月 8 日; 录用日期: 2013 年 2 月 20 日

**摘 要:** 随着纳米技术和超声分子成像技术的迅速发展, 一种新型造影剂——液态氟碳超声造影剂应运而生。不同包膜材料的液态氟碳超声造影剂分别表现出不同的性质。本文就氟碳类超声造影剂的背景、材料、应用现状及展望等方面做一综述。

**关键词:** 液态氟碳; 超声造影剂; 磷脂; 高分子材料; 二氧化硅

### 1. 引言

超声造影剂(Ultrasound contrast agent)简称UCA, 是一类能够显著增强超声背向散射强度的诊断试剂, 在医学影像诊断方面具有良好的应用前景。近年来一种新型超声造影剂——液态氟碳纳米超声造影剂, 受到了众多科研工作者的关注。

### 2. 液态氟碳类显影剂发展和优点

1977 年 Liuand<sup>[1]</sup>首次发现液态氟碳可同时作为超

声造影剂和核磁共振(MR)对比剂, 此后液态氟碳化合物成为研究热点。随着超声造影剂的不断发展, 近年来以氟碳类超声造影剂为介导的影像诊断和治疗技术进展迅速。

氟碳化合物是氟化的脂肪族类复合物, 短氟碳链化合物以气体形式存在, 如全氟丙烷; 长氟碳链化合物则以密度高于水的液体形式存在。可用于制备超声造影剂的氟碳液体主要有全氟丁烷(DFB)、全氟戊烷(PFP)、全氟己烷(PFH)、全氟辛溴(PFOB)、全氟萘烷(PFD)等。不同液态氟碳化合物的声学特性不同, 如 PFP、PFH 沸点很低, 进入体内后会有液气相的转变, 最终形成大的微泡来加强显影效果, 而 PFOB 和 PFD

\*资助信息: 本研究受到国家自然科学基金(No. 81101142), 广东省自然科学基金(S2011040005922)和中山大学高校基本科研业务费(12lgy06)的资助。

<sup>#</sup>通讯作者。

沸点较高,在体内主要通过聚集的方式实现超声显影效果的增强。

与气态氟碳类造影剂相比,液态氟碳类造影剂在体内显像方面存在更多优势,具有以下优点:1)由于内部包裹物为液体,表面张力较小,可以制成更小粒径的微泡,粒径在几十纳米至几百纳米之间,这样大小的微粒可穿过血管内皮细胞到达血管外靶标,大大增强了其穿透力<sup>[2]</sup>;2)稳定性更强,在血管内存留时间长,在体内的循环半衰期可达数小时,延长了诊断时间<sup>[3]</sup>;3)微球内部不含气体,只有大量聚集时才具有较强的反射和背向散射性能而显影,未聚集时并不显影,且这种聚集显影不像微泡造影剂那样具有声影现象与背景噪声,从而可以大大提高分辨准确性,有利于提高诊断的准确性;4)有望成为一种多功能造影剂,有关研究报道了液态氟碳造影剂可用作靶向显影与治疗以及在CT、MRI中的使用情况,因此液态氟碳纳米粒还具备成为一种理想的多模态、多功能分子成像造影剂的潜能。

### 3. 氟碳类超声造影剂的研究进展

#### 3.1. 脂质包被的液态氟碳微球超声造影剂

脂质包被的液态氟碳微球超声造影剂,最早由Lanza等<sup>[4,5]</sup>研制,其核心为全氟辛溴(PFOB),外层单层膜由卵磷脂(64%)、胆固醇(35%)和biotin-LC-DPPE(1%)组成,脂质表面的生物素可以连接一些靶向配体,从而使造影剂具有靶向功能。与传统的超声微泡造影剂相比,液态氟碳纳米乳剂粒径小,约100~200 nm,具有更高的体内稳定性及组织穿透力。而且它们只有聚集时,才产生较强的超声回声信号,可降低背景噪声,非常有利于超声分子显像。Kaneda等<sup>[6]</sup>采用

高压均质法制备脂质包裹的纳米液态氟碳乳剂用作超声显像,取得了较好的效果。

近年来国内对脂质液态氟碳超声造影剂的研究也取得了较大进展。王志刚教授课题组<sup>[7-9]</sup>做了大量的工作,以磷脂为材料制备了叶酸受体靶向液态氟碳纳米粒造影剂,还进行了CT显像的研究,发现液态氟碳纳米粒具有持续性增强大鼠肝脾实质及脉管系统CT显像的能力<sup>[10]</sup>。谢明星教授课题组<sup>[11]</sup>构建的液态氟碳纳米脂质微粒,通过MCP-1单克隆抗体及“生物素-亲和素”桥连系统,能够靶向识别大鼠心肌缺血-再灌注模型中的存活心肌,并使其特异性显影增强。

Paul S. Sheeran<sup>[12]</sup>等人用二硬脂酰磷脂酰胆碱(DPPC)等磷脂包覆全氟丁烷(DFB)制备了一种脂质氟碳相变造影剂(图1),粒径在200~300纳米左右,升高温度后,该造影剂能增大到1~5 μm,这样就可以增强纳米氟碳显影剂的显影效果。但由于DFB沸点很低,常温下相对不稳定,所以整个制备、储存过程要在温度很低的情况下才能完成,其制备工艺要求较高,所以具有一定的局限性。

#### 3.2. 高分子聚合物包被的液态氟碳超声造影剂

与传统磷脂超声造影微泡相比,高分子超声造影微泡显示了非常优越的稳定性,其原因在于高分子外壳在抵抗超声波的破坏方面比单分子多层磷脂或表面活性剂更有耐力<sup>[13-16]</sup>。将高分子的稳定性能与氟碳类液体相结合,通过常规方法可将高分子微胶囊粒径控制在纳米至微米范围内。其中聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)以其本身良好的生物相容性及可降解性成为制备高分子超声造影剂的首选囊材。Pisani<sup>[17]</sup>

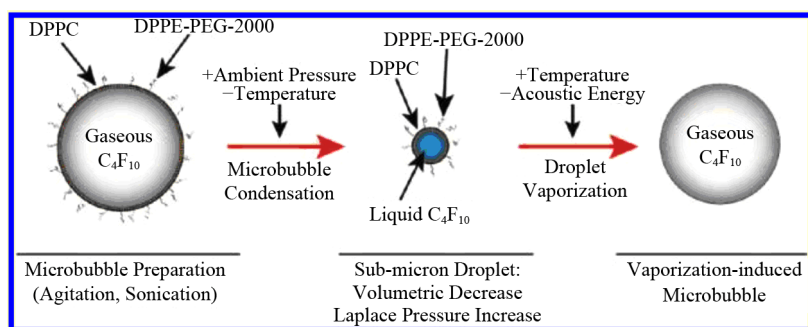


Figure 1. Scheme of a new phase-shift agent<sup>[12]</sup>

图1. 相变造影剂的制备过程<sup>[12]</sup>

等以聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为囊材、以液态的全氟己烷(PFH)、全氟萘烷(PFD)、全氟辛溴(PFOB)为内容物通过溶剂蒸发法制备高分子超声造影微胶囊。该 PLGA 微胶囊具有完整球形结构, 内部包裹全氟化碳液体, 抽真空后有部分显示空腔结构, 如图 2 所示。激光共聚焦显微镜图片显示 PLGA 均匀的包裹在氟碳液体的外层。

为了延长高分子超声造影微胶囊在人体内循环的时间, 研究工作者主要在两方面进行了研究, 一方面降低高分子微胶囊的粒径, 避免其在通过肺毛细血管滤过作用, 与此同时小粒径的高分子超声造影剂具有血管外显影的潜力, 结合肿瘤部位新生血管的 EPR 效应<sup>[18]</sup>可作为肿瘤部位显影剂。虽然纳米级超声造影剂超声反射信号较弱, 但是通过连接具有主动靶向功能的特异性配体使其在靶向部位聚集<sup>[19]</sup>, 可以显著提高超声反射信号。另一方面在高分子表面修饰具亲水性基团聚乙二醇(PEG), 使微胶囊表面带有亲水性壳层, 便于高分子微胶囊逃离单核巨嗜细胞的吞噬, 从而延长高分子微胶囊体内循环的时间。Nicolas Tsapis<sup>[20,21]</sup>等通过乳液-蒸发法制备了粒径集中在 170 nm 左

右的 PLGA 包裹 PFOB 的纳米球, 如图 3 所示。

体外、体内超声成像实验结果显示表面修饰了 DSPE-PEG 后, 超声造影剂在鼠肿瘤部位具有更明显的显影效果, 从而证明了该种超声造影剂具有一定的超声成像的功能和在肿瘤组织中积累的效应, 说明其在肿瘤的早期诊断与治疗方面的潜在应用价值。

由于液态氟碳类物质具有高浓度的氟原子可以作为 MR 的对比剂, 与负载液体氟碳类高分子的超声造影能力相结合, 形成具有双模态的显影系统。Pisani<sup>[22]</sup>等通过溶剂蒸发法将全氟辛溴(PFOB)包裹于 PLGA 中, 实验证明, 这种高分子超声造影剂微胶囊壳层厚度越薄、微胶囊的可压缩性越好, 超声显影效果增强的效果就越好。超声造影结果显示该高分子超声造影剂具有良好的肝部血池显影效果的同时, 还具有 MR 显影能力。

近来国内对高分子液态氟碳超声造影剂的研究也取得了较大进展。王志刚教授课题组<sup>[23]</sup>采用乳化-蒸发法制备包裹液态氟碳的乳酸-羟基乙酸共聚(PLGA)微球, 成功制备了分别包裹 PFOB 和 PFH 的 PLGA 微球, 微球粒径小, 稳定性好。PFH/PLGA 微球

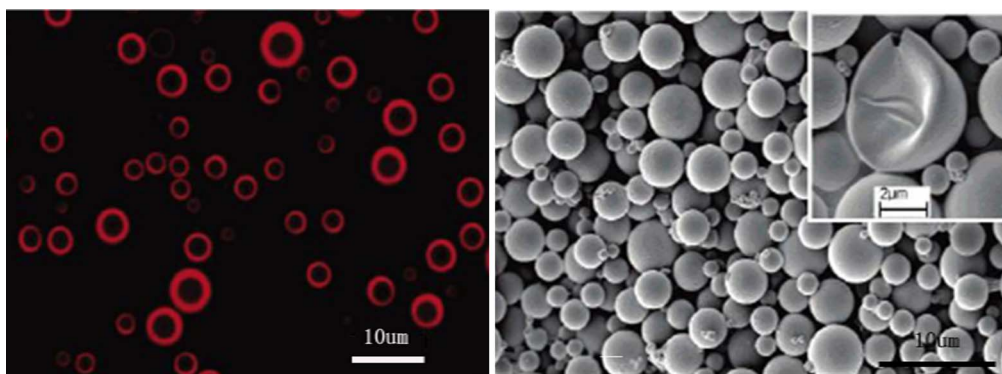


Figure 2. Confocal microscopy image (scale bar = 10  $\mu\text{m}$ ) (Left). SEM images of microcapsules (right)<sup>[17]</sup>  
图 2. PLGA 微胶囊激光共聚焦显微镜图片(标尺为 10 微米)和扫描电子显微镜图片<sup>[17]</sup>

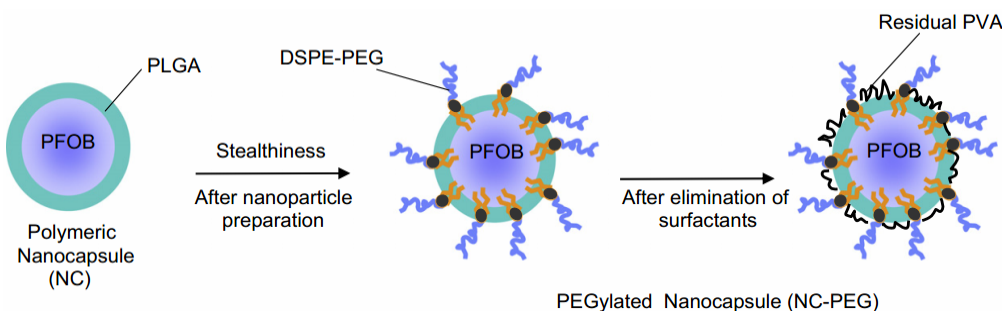


Figure 3. Scheme of surface modification of polymeric nanocapsule<sup>[20]</sup>  
图 3. 表面改性的聚合物纳米胶囊制备过程<sup>[20]</sup>

在水域中加热到 70℃时,光镜及体外超声可见微球随加热温度升高体积逐渐增大、数量逐渐减少,可发生液气转变,有望成为一种新型超声造影剂。李皓等<sup>[24]</sup>以生物可降解的两亲性嵌段共聚物-聚乙二醇-*b*-聚( $\epsilon$ -己内酯)为原料,通过双乳化法制备一种负载全氟己烷的、可控超声显像的纳米囊颗粒。所得纳米囊的粒径在 200 nm 左右,能穿透肿瘤血管壁到达肿瘤组织内部并被肿瘤细胞所吞噬。在辐照区域内,超声的热效应会使组织温度升高,导致造影剂内核全氟己烷(PFH)的汽化,从而引发纳米囊的膨胀直至显著成像。

### 3.3. 二氧化硅包裹的液态氟碳超声造影剂

中空微胶囊常以高分子或二氧化硅为材料,通过渗透膨胀<sup>[25]</sup>、乳液滴加法、层层自组装及去除模板等方法制备得到,这种微胶囊无论从硬度、形状结构到粒径范围,都符合作为超声造影剂的要求。二氧化硅已经被研究工作者证明是一种具有较好生物相容性的材料,结合溶胶-凝胶法可作为保护层<sup>[26,27]</sup>。近年来,有研究报道通过核壳方法制备二氧化硅中空微胶囊具有超声敏感的特性。Hall<sup>[28]</sup>等以粒径均一的聚苯乙烯为模板,以正硅酸乙酯(TEOS)、三烷氧基硅烷(OTES)、4-四氢邻苯二甲酰酐基三甲氧基硅烷(TSPA)为材料,通过静电自组装和 Stöber 法使微球表面形

成硅酸盐壳层,该壳层的厚度可根据正硅酸乙酯溶液浓度进行调控,最后用四氢呋喃溶解聚苯乙烯微球形成具有中空结构的二氧化硅微胶囊(图 4)。扫描电镜显示 Si-O-Si 的网状结构有效地维持微胶囊的完整球形结构,间接证明二氧化硅微胶囊具有很好的稳定性,超声实验证明具有较好的成像效果。

杨仕平<sup>[29]</sup>等人在带氨基的二氧化硅微胶囊(粒径约为 1  $\mu\text{m}$ )表面进一步修饰 PEG,溶血实验与细胞实验表明此种材料具有良好的血液相容性,低的细胞毒性。超声实验显示其具有良好的超声效果,与临床使用的商品声诺维在相同超声参数及浓度条件下进行比较(如图 5),表现出优越的稳定性,超声显影时间明显增长。

针对二氧化硅微胶囊作为超声造影剂具有突出稳定性这一特点结合临床需要,施剑林<sup>[30]</sup>等将负载全氟己烷的二氧化硅微胶囊(如图 6)作为高强度聚焦超声的显影材料。由于传统的超声造影剂如脂质超声造影剂稳定性较差,在高超声能量条件下易破裂,无法长时间维持显影效果。施剑林等将温敏性的全氟己烷(沸点:56℃)负载于中空结构的二氧化硅微胶囊中,在高度聚焦超声的条件下局部温度升高使全氟己烷气化持续从二氧化硅微胶囊中释放出来,产生持续的显影效果的同时增加了局部治疗效果。

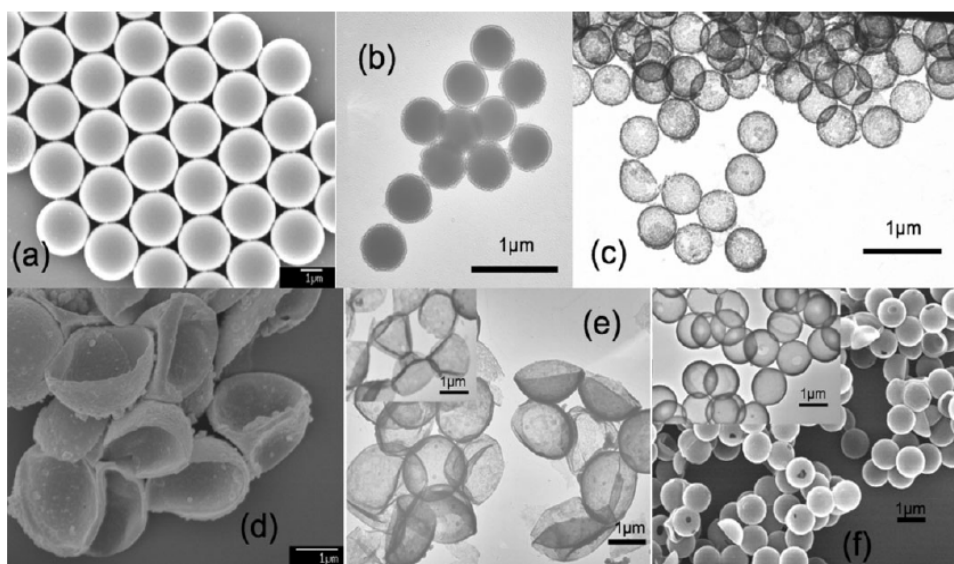


Figure 4. (a) SEM images for near-monodisperse negatively charged polystyrene particles; (b) TEM image shows polystyrene-silica core/shell particles revealing thin silica lamination; (c) The etched hollow particles under TEM; (d), (e) SEM and TEM image of OTES-TSPA-TEOS composite hollow particles; (f) SEM (left) and TEM (right) images of composite laminate of TSPA-TEOS particle<sup>[28]</sup>  
图 4. (a) 聚苯乙烯的 SEM 图; (b) 修饰硅壳的 TEM 图; (c) 除去 PS 后二氧化硅微胶囊的 TEM 图; (d), (e) OTES-TSPA-TEOS 复合微胶囊 SEM 与 TEM 图片; (f) TSPA-TEOS 复合微胶囊 SEM(左)与 TEM 图片(右)<sup>[28]</sup>

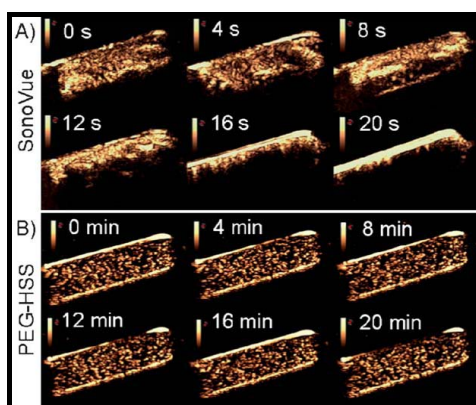


Figure 5. *In vitro* ultrasound images of SonoVue and PEG-HSS in physiological saline solution recorded at different imaging times<sup>[29]</sup>  
图 5. 声诺维与二氧化硅微胶囊在不同时间条件下的体外超声实验<sup>[29]</sup>

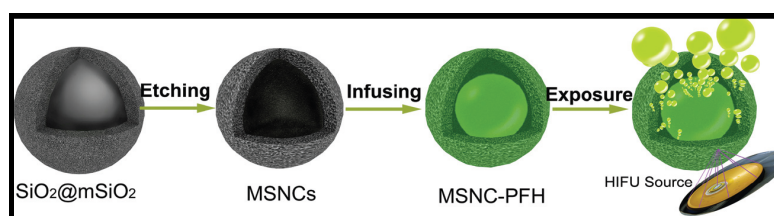


Figure 6. Schematic illustration of the fabrication process of MSNC-PFH<sup>[30]</sup>  
图 6. 负载全氟己烷二氧化硅微囊制备的示意图<sup>[30]</sup>

#### 4. 存在问题与展望

虽然包裹液态氟碳的造影剂在显像与治疗中的应用广泛，但目前仍存在许多亟待解决的问题：脂类氟碳超声造影剂也存在一些缺点，如稳定性较差，有效增强显影时间较短、成本较高等。高分子和二氧化硅氟碳超声造影剂由于外壳较脂类硬，因此抗压性和稳定性有显著的提高，显影持续时间较长。但这两种材料外壳常较硬，需较高的声学输出，才能产生增强的对比，成像时容易肺出血、毛细血管破裂等，因此应继续探寻对人体更安全的新材料。另一方面液态氟碳类纳米超声造影剂粒径小，穿透能力强，但声学回声弱，特别是直径  $< 400 \text{ nm}$  的粒子，所以目前的造影剂要实现肿瘤细胞的分子成像还存在一定的困难。因此，制备稳定的纳米级超声造影剂，使其既能直接穿透血管到达靶组织，又能增强组织超声显影是学者研究的热点，也是科研工作者努力的方向。液态氟碳超声造影剂可作为一种真正多模态、多功能的造影剂，对其深入研究将为分子影像学带来新的进展。

#### 5. 致谢

感谢国家自然科学基金(No. 81101142)，广东省自

然科学基金(S2011040005922)和中山大学高校基本科研业务费(12lgpy06)给予本研究的支持。

#### 参考文献 (References)

- [1] M. S. Liu, D. M. Long. Perfluorooctylbromide as a diagnostic contrast medium in gastroenterography. *Radiology*, 1977, 122(1): 71-76.
- [2] T. Cyrus, P. M. Winter, C S. D. aruthers, et al. Magnetic resonance nanoparticles for cardiovascular molecular imaging and therapy. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 2005, 3(4): 705-715.
- [3] R. Diaz-Lopez, N. Tsapis, M. Santin, et al. The performance of PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as an ultrasound contrast agent. *Biomaterials*, 2010, 31(7): 1723-1731.
- [4] G. M. Lanza, K. D. Wallace, M. J. Scott, et al. A novel site-targeted ultrasonic contrast agent with broad biomedical application. *Circulation*, 1996, 94(12): 3334-3340.
- [5] G. M. Lanza, P. M. Winter, S. D. Caruthers, et al. Magnetic resonance molecular imaging with nanoparticles. *Journal of Nuclear Cardiology*, 2004, 11(6): 733-743.
- [6] M. M. Kaneda, S. Caruthers, G. M. Lanza, et al. Perfluorocarbon nanoemulsions for quantitative molecular imaging and targeted therapeutics. *Annals of Biomedical Engineering*, 2009, 37(10): 1922-1933.
- [7] 周洋, 郑元义, 冉海涛等. 叶酸受体靶向液态氟碳纳米粒造影剂的制备及体外寻靶[J]. *中国医学影像技术*, 2012, 28(1): 52-54.
- [8] 李奥, 王志刚. 液态氟碳纳米粒——一种多功能影像学造影剂[J]. *临床超声医学杂志*, 2008, 10(12): 830-832.
- [9] 沈红霞, 郑元义, 王志刚. 包裹液态氟碳的高分子超声造影剂的研究进展[J]. *中国介入影像与治疗学*, 2010, 7(6): 684-687.

- [10] 杨扬, 王志刚, 郑元义等. 液态氟碳纳米脂质微球超声对比剂用于增强正常大鼠 CT 显像实验研究[J]. 中国医学影像技术, 2008, 24(9): 1341-1344.
- [11] 刘莹莹. 液态氟碳纳米脂质微粒靶向识别存活心肌实验研究[D]. 华中科技大学, 2010.
- [12] P. S. Sheeran, S. Luois, P. A. Dayton, et al. Formulation and acoustic studies of a new phase-shift agent for diagnostic and therapeutic ultrasound. *Langmuir*, 2011, 27(17): 10412-10420.
- [13] W. Cui, J. Z. Bei, S. G. Wang, et al. Preparation and evaluation of poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA) microbubbles as a contrast agent for myocardial contrast echocardiography. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2005, 73B(1): 171-178.
- [14] J. R. Lindner. Microbubbles in medical imaging: Current applications and future directions. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004, 3(6): 527-533.
- [15] J. A. Straub, D. E. Chickering, C. C. Church, et al. Porous PLGA microparticles: AI-700, an intravenously administered ultrasound contrast agent for use in echocardiography. *Journal of Controlled Release*, 2005, 108(1): 21-32.
- [16] A. L. Klivanov. Ultrasound molecular imaging with targeted microbubble contrast agents. *Journal of Nuclear Cardiology*, 2007, 14(6): 876-884.
- [17] E. Pisani, N. Tsapis, J. Paris, et al. Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: Physical characterization. *Langmuir*, 2006, 22: 4397-4402.
- [18] F. Yuan, M. Dellian, D. Fukumura, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: Molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Research*, 1995, 55(17): 3752-3756.
- [19] G. M. Lanza, D. R. Abendschein, C. S. Hall, et al. *In vivo* molecular imaging of stretch-induced tissue factor in carotid arteries with ligand-targeted nanoparticles. *Journal of the American Society of Echocardiography*, 2000, 13(6): 608-614.
- [20] R. Diaz-Lopez, N. Tsapis, M. Santin, et al. The performance of PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as an ultrasound contrast agent. *Biomaterials*, 2010, 31(7): 1723-1731.
- [21] R. Diaz-Lopez, N. Tsapis, D. Libong, et al. Phospholipid decoration of microcapsules containing perfluorooctyl bromide used as ultrasound contrast agents. *Biomaterials*, 2009, 30(8): 1462-1472.
- [22] E. Pisani, N. Tsapis, B. Galaz, M. Santin and B. Romain. Perfluorooctyl bromide polymeric capsules as dual contrast agents for ultrasonography and magnetic resonance imaging. *Advanced Functional Materials*, 2008, 18(19): 2963-2971.
- [23] 沈红霞. 包裹液态氟碳的 PLGA 微球增强 HIFU 能量沉积的实验研究[D]. 重庆医科大学, 2012.
- [24] 李皓, 王建好, 张超, 蒋庆. 声控纳米超声造影剂的制备与性能研究[A]. 广东省生物医学工程学会成立 32 周年纪念大会[C]. 广州: 广东省生物医学工程学会, 2012: 162-169.
- [25] C. J. McDonald, M. J. Devon. Hollow latex particles: Synthesis and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2002, 99(3): 181-213.
- [26] J. Gallardo, P. Galliano, R. Moreno, et al. Bioactive sol-gel coatings for orthopaedic prosthesis. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 2000, 19(1-3): 107-111.
- [27] J.-M. Yeh, C.-J. Weng, W.-J. Liao, et al. Anticorrosively enhanced PMMA-SiO<sub>2</sub> hybrid coatings prepared from the sol-gel approach with MSMA as the coupling agent. *Surface & Coatings Technology*, 2006, 201: 1788-1795.
- [28] P. L. Lin, R. J. Eckersley and E. A. H. Hall. Ultrabubble: A laminated ultrasound contrast agent with narrow size range. *Advanced Materials*, 2009, 21(38-39): 3949-3952.
- [29] H. Hu, H. Zhou, J. Du, et al. Biocompatible hollow silica microspheres as novel ultrasound contrast agents for *in vivo* imaging. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21: 6576-6583.
- [30] X. Wang, H. Chen, Y. Chen, et al. Perfluorohexane-encapsulated mesoporous silica nanocapsules as enhancement agents for highly efficient High Intensity Focused Ultrasound (HIFU). *Advanced Materials*, 2012, 24(6): 785-791.