

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.12.1596

## 载介孔二氧化硅纳米囊脂质体对磁共振 T<sub>2</sub> 加权成像的负性增强作用

李叶阔<sup>1\*</sup>, 唐家伟<sup>1</sup>, 段琬璐<sup>1</sup>, 何晶玲<sup>1</sup>, 严飞<sup>2</sup>, 郑海荣<sup>2</sup>

1. 广州军区广州总医院超声科, 广州 510010

2. 中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳 518055

**[摘要]** **目的** 检测载介孔二氧化硅纳米囊脂质体(MSN-LIPO)的弛豫特性,并探索其增强磁共振成像(MRI) T<sub>2</sub> 加权成像的功能。**方法** 在体外条件下,应用 MRI 扫描仪对不同含铁浓度的 MSN-LIPO 行 MRI 扫描,检测 MSN-LIPO 的弛豫特性。在体内条件下,建立 6 只 BALB/c 裸鼠皮下恶性胶质瘤模型,随机分为 2 组,分别经瘤内和静脉注射同一浓度的 MSN-LIPO。并在注射前、后行 MRI 扫描,研究图像特征并对信号值进行统计学分析。**结果** 体外 MRI 显示,随着 MSN-LIPO 含铁浓度的增高,图像信号强度逐渐降低;绘制弛豫率曲线,1/T<sub>2</sub> 和 MSN-LIPO 含铁浓度在一定范围内具有良好的线性关系,测得弛豫率( $r_2$ )为 413.7 mmol<sup>-1</sup> · s<sup>-1</sup>。BALB/c 裸鼠恶性胶质瘤模型 MRI 显示,瘤内注射 MSN-LIPO 后肿瘤信号强度值为 15.34 ± 1.24,低于注射前的 211.44 ± 5.34,差异有统计学意义( $t = 36.38, P < 0.05$ );静脉注射 MSN-LIPO 后肿瘤信号强度值为 179.00 ± 4.35,低于注射前的 235.99 ± 5.17,差异有统计学意义( $t = 14.34, P < 0.05$ )。**结论** MSN-LIPO 有良好的弛豫特性,在体内有良好的 MRI T<sub>2</sub> 加权肿瘤成像负性增强作用,具有 MRI T<sub>2</sub> 加权成像造影剂功能。

**[关键词]** 磁共振成像;造影剂;介孔二氧化硅;脂质体;纳米粒;肿瘤

**[中图分类号]** R 445.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)12-1596-05

## Mesoporous silica nanocapsules loaded liposomes negatively enhance magnetic resonance T<sub>2</sub> weighted imaging

LI Ye-kuo<sup>1\*</sup>, TANG Jia-wei<sup>1</sup>, DUAN Wan-lu<sup>1</sup>, HE Jing-ling<sup>1</sup>, YAN Fei<sup>2</sup>, ZHENG Hai-rong<sup>2</sup>

1. Department of Ultrasound, Guangzhou General Hospital of PLA, Guangzhou 510010, Guangdong, China

2. Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China

**[Abstract]** **Objective** To detect the relaxation property of mesoporous silica nanocapsules loaded liposomes (MSN-LIPO), and to explore their functions of enhancing MRI T<sub>2</sub> weighted imaging. **Methods** *In vitro*, MSN-LIPO with different iron concentrations were scanned by MRI system to detect their relaxation properties. *In vivo*, six BALB/c nude mouse models with subcutaneous malignant glioma were established and randomly divided into two groups, which were injected with the same concentration of MSN-LIPO intratumorally and intravenously, respectively. The mice in the two groups were scanned by MRI before and after injection, and the image characteristics were studied and the signal intensity of tumors was statistically analyzed. **Results** *In vitro* MRI imaging showed that the signal intensities of the images were gradually decreased with the increase of iron concentrations in MSN-LIPO, and 1/T<sub>2</sub> had a good linear relationship with the concentration within a certain range, with the relaxation rate ( $r_2$ ) being 413.7 mmol<sup>-1</sup> · s<sup>-1</sup>. MRI imaging of BALB/c nude mouse models with malignant glioma showed that the signal intensity of the tumor after intra-tumor injection of MSN-LIPO was significantly lower than that before intra-tumor injection (15.34 ± 1.24 vs 211.44 ± 5.34,  $t = 36.38, P < 0.05$ ), and the signal intensity of the tumor after intravenous injection of MSN-LIPO was significantly lower than that before intravenous injection (179.00 ± 4.35 vs 235.99 ± 5.17,  $t = 14.34, P < 0.05$ ). **Conclusion** MSN-LIPO has good magnetic relaxation property and good MRI T<sub>2</sub> weighted contrast enhancement function *in vivo*, suggesting that it can be used as a MRI T<sub>2</sub> contrast agent.

**[收稿日期]** 2017-05-19 **[接受日期]** 2017-09-07

**[基金项目]** 广东省自然科学基金项目(2016A030313611),广东省科技计划项目(2014A020212255),全军医学科研“十二五”计划课题(CWS12J076)。Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (2016A030313611), Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2014A020212255), and “12<sup>th</sup> Five-year Plan” for Medical Science Research Foundation of PLA (CWS12J076).

**[作者简介]** 李叶阔,博士,副教授、副主任医师,硕士生导师。

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 020-88653449, E-mail: yekuoli@163.com

[Key words] magnetic resonance imaging; contrast agent; mesoporous silica; liposome; nanoparticle; neoplasm

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(12): 1596-1600]

高强度聚焦超声 (high-intensity focused ultrasound, HIFU) 在临床上广泛用于治疗肿瘤<sup>[1-2]</sup>。近年有关提高 HIFU 治疗效果的研究多集中在增强 HIFU 对肿瘤的定位成像和增强 HIFU 对肿瘤的杀伤力两个方面。当前临床上定位成像主要通过超声 (ultrasound) 或磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 实现<sup>[3-6]</sup>, 评估疗效主要通过超声造影 (contrast-enhanced ultrasound, CEUS) 或 MRI 造影实现<sup>[7-9]</sup>, 增强疗效主要通过静脉注射超声造影剂或脂质体载纳米材料实现<sup>[10-12]</sup>。MRI 对病灶整体及其与周边组织关系的显示较超声更有优势。然而, 目前临床使用的 MRI 造影剂一般通过静脉注射, 在肿瘤内的存留时间较短, 不利于 HIFU 定位治疗; 此外, 定位、增强疗效及评估疗效均为独立程序, 步骤繁琐、操作复杂。因此, 研制一种集提高可视化精度定位、增强疗效及评估疗效于一体的纳米材料造影剂, 对 HIFU 的临床意义重大。

介孔二氧化硅纳米囊脂质体 (mesoporous silica nanocapsules loaded liposomes, MSN-LIPO) 是一种纳米颗粒, 可以通过被动靶向效应在肿瘤部位持续蓄积达 24 h, 便于完成 HIFU 治疗的整个过程, 其所包封的乙酸异戊酯在 HIFU 作用下由液态转为气态, 从而对 HIFU 起到显著的增强疗效作用。本科室前期构建了一种同时包封乙酸异戊酯和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 的 MSN-LIPO, 揭示了其基本理化特征、生物相容性及被人恶性胶质母细胞瘤细胞株 U-87 MG 的摄取情况, 证实了其对 HIFU 灭活肿瘤细胞的增强作用<sup>[13]</sup>。但 MSN-LIPO 的 MRI 弛豫特征尚待验证, 本研究旨在探索 MSN-LIPO 增强 MRI 显影的特点。

## 1 材料和方法

1.1 仪器与试剂 核磁共振成像系统 (Magnetom Trio, A Tim System 3T MRI System, 德国西门子公司); 自制 MSN-LIPO<sup>[13]</sup>; PBS (美国 Hyclone 公司); 琼脂粉 (天津市大茂化学试剂厂); 人恶性胶质母细胞瘤细胞株 U-87 MG 细胞 (ATCC<sup>®</sup> HTB-14<sup>™</sup>, 美国 ATCC 细胞库)。

1.2 体外 MRI 的弛豫特性检测 将含铁浓度分别为 0.16、0.08、0.04、0.02、0.01、0.005、0.002 5、0.001 25 mmol/L 的 MSN-LIPO 溶液和纯水分别装入到 1.5 mL 密封离心管中, 按照浓度从高到低的顺序依次放入含凝固琼脂的扫描盒孔中, 进行 MRI 扫描。扫描参数: 4 通道小鼠线圈, 自旋回波 (spin echo, SE) 序列, 重复时间 (repetition time, TR) 4 000 ms, 回波时间 (echo time, TE) 17.4 ms, 翻转角 (flip angle, Flip) 180°, 层厚 5 mm, 视野 (field of vision, FOV) 90 mm×180 mm。检测信号强度 (signal intensity, SI) 及 T<sub>2</sub> 值, 以铁浓度为横坐标、1/T<sub>2</sub> 为纵坐标绘制弛豫率曲线。

1.3 荷瘤裸鼠模型的构建 SPF 级 BALB/c 裸鼠 6 只, 雌性, 6~8 周龄, 体质量 18~22 g, 购于广东省医学实验动物中心 [动物生产许可证: SCXK (粤) 2013-0002, 动物使用许可证: SYXK (粤) 2012-0119]。饲料、饮水、垫料均经高压蒸汽灭菌处理 (121 °C、20 min), 自由饮食。采用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 高糖培养液、于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 U-87 MG 细胞。取对数生长期的 U-87 MG 细胞, 胰酶消化 1~2 min, 1 000 r/min (r=15 cm) 离心 4 min, 弃上清液后加入 PBS 重悬, 按照 1×10<sup>7</sup>/只裸鼠的细胞密度接种于裸鼠侧腹部, 隔天观察肿瘤生长情况。

### 1.4 荷瘤裸鼠 MRI 扫描

1.4.1 瘤内注射 取 3 只荷瘤裸鼠麻醉固定, 沿着肿瘤 0、3、6、9 点方向进针, 注射 200 μL 含铁浓度为 0.16 mmol/L 的 MSN-LIPO 溶液, 轻柔按压。瘤内注射前、注射后 5 min 内行 MRI 扫描。扫描参数: 4 通道小鼠线圈, SE 序列, TR 3 700 ms, TE 71 ms, Flip 120°, 层厚 1.2 mm, FOV 48 mm×80 mm。

1.4.2 静脉注射 另取 3 只荷瘤裸鼠麻醉固定, 经尾静脉注射 200 μL 含铁浓度为 0.16 mmol/L 的 MSN-LIPO 溶液。静脉注射前、注射后 30 min 行 MRI 扫描。扫描参数同 1.4.1 项。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析。呈正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 MSN-LIPO 体外 MRI T<sub>2</sub> 加权成像的弛豫特性 不同含铁浓度 MSN-LIPO 的 MRI 扫描结果 (图 1A) 和定量分析结果 (图 1B) 显示, 随着 MSN-

LIPO 含铁浓度的逐渐增加, MRI T<sub>2</sub> 信号强度呈逐渐降低的趋势。弛豫率曲线 (图 1C) 显示, 1/T<sub>2</sub> 在一定的 MSN-LIPO 含铁浓度范围内与铁浓度的呈线性关系, 测得弛豫率 ( $r_2$ ) 为  $413.7 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

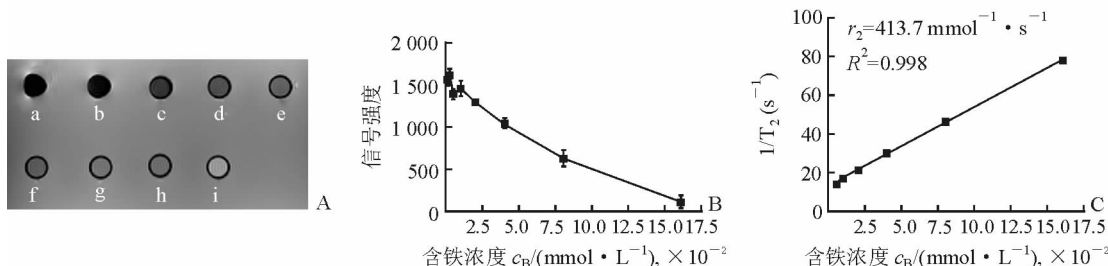


图 1 MSN-LIPO 体外 MRI T<sub>2</sub> 加权成像弛豫特性

A: MRI T<sub>2</sub> 加权成像 (a~h 的含铁浓度分别为 0.16、0.08、0.04、0.02、0.01、0.005、0.002 5、0.001 25  $\text{mmol/L}$ , i 为纯水); B: MSN-LIPO 体外 MRI 模型扫描定量图 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ ); C: 不同含铁浓度 MSN-LIPO 的弛豫效能拟合曲线. MRI: 磁共振成像; MSN-LIPO: 介孔二氧化硅纳米囊脂质体

2.2 瘤内注射 MSN-LIPO 负性增强 BALB/c 荷瘤裸鼠皮下瘤 MRI T<sub>2</sub> 信号 注射前 BALB/c 荷瘤裸鼠肿瘤部位呈现 T<sub>2</sub> 高信号, 肿瘤局部注射 MSN-LIPO 5 min 后, 注射中心区域的信号强度降低, 与

周围组织呈现明显对比 (图 2A、2B)。注射前肿瘤信号强度平均值为  $211.44 \pm 5.34$ , 高于注射后 5 min 的  $15.34 \pm 1.24$ , 差异有统计学意义 ( $t=36.38, P < 0.05$ ; 图 2C)。

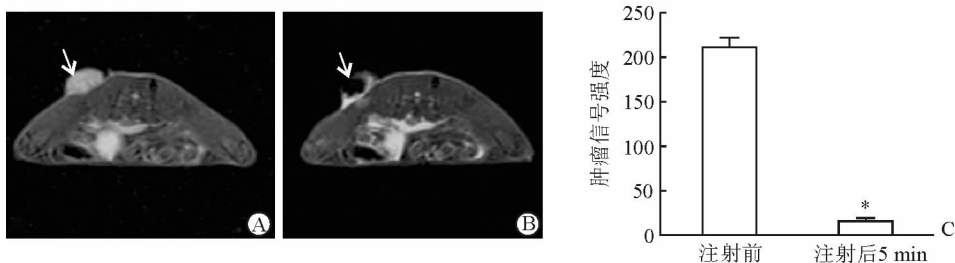


图 2 瘤内注射 MSN-LIPO 增强恶性胶质母细胞瘤 MRI T<sub>2</sub> 加权像及信号值

A: 注射前, 肿瘤呈高信号 (箭头所示); B: 注射后 5 min 肿瘤信号降低 (箭头所示); C: 注射 MSN-LIPO 前后肿瘤的 MRI 信号强度值. MRI: 磁共振成像; MSN-LIPO: 介孔二氧化硅纳米囊脂质体. \*  $P < 0.05$  与注射前比较.  $n=3, \bar{x} \pm s$

2.3 静脉注射 MSN-LIPO 负性增强 BALB/c 荷瘤裸鼠皮下瘤 MRI T<sub>2</sub> 信号 注射前 BALB/c 荷瘤裸鼠肿瘤部位呈现 T<sub>2</sub> 高信号, 静脉注射 MSN-LIPO 30 min 后整个肿瘤区域的信号均降低, 与注射前呈

明显对比 (图 3A、3B)。注射前肿瘤信号强度平均值为  $235.99 \pm 5.17$ , 高于注射后 30 min 的  $179.00 \pm 4.35$ , 差异有统计学意义 ( $t=14.34, P < 0.05$ ; 图 3C)。

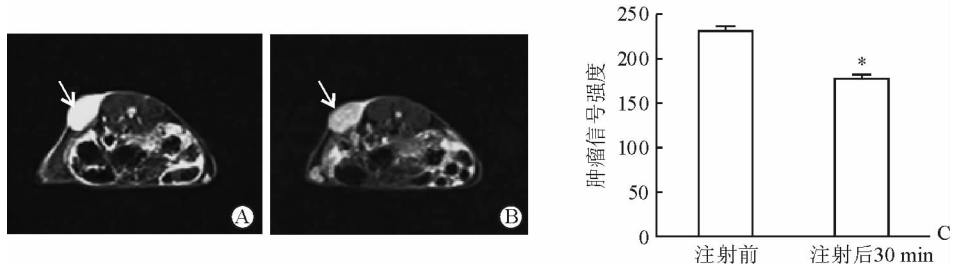


图 3 静脉注射 MSN-LIPO 增强恶性胶质母细胞瘤的 MRI T<sub>2</sub> 加权像及信号值

A: 注射前, 肿瘤呈高信号 (箭头所示); B: 注射后 30 min 肿瘤信号降低 (箭头所示); C: 注射 MSN-LIPO 前后肿瘤的 MRI 信号强度值. MRI: 磁共振成像; MSN-LIPO: 介孔二氧化硅纳米囊脂质体. \*  $P < 0.05$  与注射前比较.  $n=3, \bar{x} \pm s$



### 3 讨论

本研究所构建的 MSN-LIPO 是以乙酸异戊酯为 HIFU 增敏剂内核、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 为 MRI 造影剂的脂质体包封的纳米颗粒。乙酸异戊酯熔点为 -78 ℃, 沸点为 143 ℃, 常温为液态, 在 HIFU 的作用下持续发生液-气相转换, 形成微气泡, 增强 HIFU 消融效应, 从而增强 HIFU 对肿瘤的杀伤力。目前 HIFU 治疗的引导技术为超声或 MRI。虽然 MRI 较超声检查时间长、费用高, 但图像整体性好, 能更清晰地分辨肿瘤与周围正常组织的界限, 更精确地引导 HIFU 对病灶进行热消融, 准确评估疗效。含 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 的 MRI 造影剂具有超顺磁性、性质稳定、生物相容性好、强度高、无毒副作用等特点, 被广泛应用于临床<sup>[14-15]</sup>。本科室前期研究证实 MSN-LIPO 具有对 HIFU 的增效作用<sup>[13]</sup>, 但在 MRI T<sub>2</sub> 加权成像中的效果尚不确定。本研究旨在验证 MSN-LIPO 的 MRI T<sub>2</sub> 加权成像增强效果。

本研究体外实验结果显示, MSN-LIPO 具有良好的 MRI T<sub>2</sub> 加权成像增强功能。弛豫时间的长短决定着信号的强弱。MRI T<sub>2</sub> 信号随着 MSN-LIPO 含铁浓度的降低呈增加趋势, 1/T<sub>2</sub> 与铁浓度呈现线性关系。根据 MSN-LIPO 的弛豫率曲线, 测得弛豫率为 413.7 mmol<sup>-1</sup> · s<sup>-1</sup>。可见 MSN-LIPO 因含 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 而具有 MRI 造影剂功能, 对临床上 HIFU 的精确引导具有潜在的应用价值。

本研究瘤内注射结果表明, MRI T<sub>2</sub> 加权图像可清晰显示肿瘤内部 MSN-LIPO 的分布情况。对于浅表部位的肿瘤, 局部直接注射可使瘤内药物保持高浓度状态, 从而提高疗效。但瘤内注射也存在分布不均的现象, 为了解浅表肿瘤内 MSN-LIPO 的分布情况, MRI T<sub>2</sub> 加权成像非常必要。本研究中在瘤内局部注射 MSN-LIPO 后, 肿瘤各部位 T<sub>2</sub> 信号强度相差悬殊, 中心区域信号值极低, 周围则表现为强信号, 两者在 T<sub>2</sub> 加权图像上形成鲜明对比。这可能是由于肿瘤中心部位有较高浓度的 MSN-LIPO 而在 T<sub>2</sub> 加权图像上呈低信号, 而周围部位 MSN-LIPO 扩散较少或无扩散而呈强信号, 这不仅为 HIFU 提供了良好的消融定位, 还可指导医师及时补充注射、补充消融。

本研究静脉注射结果表明, MSN-LIPO 可增加 MRI T<sub>2</sub> 加权图像的肿瘤显影效果。对于深层及全身转移的肿瘤, 不便于穿刺直接注射, 经静脉注射药物是常用方法。目前临床使用的顺磁性静脉内造影剂钆喷酸葡胺 (Gd-DTPA) 或超顺磁性氧化铁 (SPIO) 不具备被动靶向功能, 在肿瘤内停留时间短。而 HIFU 定位治疗用时较长, 故 Gd-DTPA 与 SPIO 均不能用于引导 HIFU 消融治疗。MSN-LIPO 是一种纳米颗粒, 可通过被动靶向作用在肿瘤部位较长时间聚集<sup>[13]</sup>, 便于引导 HIFU 完成整个消融过程。尾静脉注射 MSN-LIPO 后, 肿瘤部位的 MRI T<sub>2</sub> 信号值也会发生改变, 显示在图像上的差异可被肉眼分辨, 因此, 对于需要静脉注射的肿瘤疾病, MSN-LIPO 可以发挥良好的 MRI T<sub>2</sub> 加权像造影剂功能。然而, 静脉注射 MSN-LIPO 引起的肿瘤组织 T<sub>2</sub> 信号降低水平明显不如瘤内注射, 这可能是因为 MSN-LIPO 经静脉注射进入体内, 除了被稀释外, 肝、脾等脏器的主动摄取也会导致其在肿瘤部位的蓄积量减少。

综上所述, 本研究从体外、瘤内注射和静脉注射 3 个层面验证了 MSN-LIPO 具有良好的 MRI T<sub>2</sub> 加权成像的造影功能, 表明 MSN-LIPO 可以作为 HIFU 消融的造影剂。

### [参考文献]

- [1] SCHULMAN A A, TAY K J, ROBERTSON C N, POLASCIC T J. High-intensity focused ultrasound for focal therapy: reality or pitfall? [J]. *Curr Opin Urol*, 2017, 27: 138-148.
- [2] MARINOVA M, RAUCH M, SCHILD H H, STRUNK H M. Novel non-invasive treatment with high-intensity focused ultrasound (HIFU) [J]. *Ultraschall Med*, 2016, 37: 46-55.
- [3] LUO J, REN X, YU T. Efficacy of extracorporeal ultrasound-guided high intensity focused ultrasound: an evaluation based on controlled trials in China [J]. *Int J Radiat Biol*, 2015, 91: 480-485.
- [4] VIDAL-JOVE J, PERICH E, DEL CASTILLO M A. Ultrasound Guided High Intensity Focused Ultrasound for malignant tumors: the Spanish experience of survival advantage in stage III and IV pancreatic cancer

- [J]. *Ultrason Sonochem*, 2015, 27 (Suppl 1): 703-706.
- [5] EBBINI E S, TER HAAR G. Ultrasound-guided therapeutic focused ultrasound: current status and future directions [J]. *Int J Hyperthermia*, 2015, 31 (Suppl 1): 77-89.
- [6] DE SENNEVILLE B D, MOONEN C, RIES M. MRI-guided HIFU methods for the ablation of liver and renal cancers [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 880: 43-63.
- [7] CHENG C Q, ZHANG R T, XIONG Y, CHEN L, WANG J, HUANG G H, et al. Contrast-enhanced ultrasound for evaluation of high-intensity focused ultrasound treatment of benign uterine diseases: retrospective analysis of contrast safety [J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94: e729. doi: 10.1097/MD.0000000000000729.
- [8] PENG S, HU L, CHEN W, CHEN J, YANG C, WANG X, et al. Intraprocedure contrast enhanced ultrasound: the value in assessing the effect of ultrasound-guided high intensity focused ultrasound ablation for uterine fibroids [J]. *Ultrasonics*, 2015, 58: 123-128.
- [9] ZHAO W P, CHEN J Y, CHEN W Z. Dynamic contrast-enhanced MRI serves as a predictor of HIFU treatment outcome for uterine fibroids with hyperintensity in T<sub>2</sub>-weighted images [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11: 328-334.
- [10] 陈莉,胡兵. HIFU联合超声微泡造影剂治疗肿瘤的研究进展[J]. *中国医学影像学杂志*, 2011, 19: 158-160.
- [11] WANG X, CHEN H, CHEN Y, MA M, ZHANG K, LI F, et al. Perfluorohexane-encapsulated mesoporous silica nanocapsules as enhancement agents for highly efficient high intensity focused ultrasound (HIFU) [J]. *Adv Mater*, 2012, 24: 785-791.
- [12] LI J, KRUPKA T, YAO J, WANG R, JIANG L, ZHOU Y, et al. Liquid-solid phase-inversion PLGA implant for the treatment of residual tumor tissue after HIFU ablation [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10: e117358. doi: 10.1371/journal.pone.0117358.
- [13] 唐家伟,严飞,段琬璐,李叶阔. 载介孔二氧化硅纳米囊脂质体增强高强度聚焦超声对肿瘤细胞的杀伤力[J]. *中国医学影像学杂志*, 2016, 24: 321-328.
- [14] LIU J, XU J, ZHOU J, ZHANG Y, GUO D, WANG Z. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-based PLGA nanoparticles as MR contrast agents for the detection of thrombosis [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 1113-1126.
- [15] LI F, ZHI D, LUO Y, ZHANG J, NAN X, ZHANG Y, et al. Core/shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocubes as T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub> dual modal MRI contrast agents [J]. *Nanoscale*, 2016, 8: 12826-12833.

[本文编辑] 杨亚红