

钆喷酸葡甲胺脂质体的制备及对大鼠肝癌灶的诊断作用

许乙凯 刘杏元 张嘉惠 乔东访

【摘要】 目的: 探讨 Gd-DTPA 脂质体造影剂对大鼠肝癌灶的诊断价值。方法: 采用冻融超声法制备出粒径 $0.61 \pm 0.34 \mu\text{m}$ 的装载 Gd-DTPA 的脂质体, 二乙基亚硝胺法建立大鼠肝癌灶模型(5 例); 观察静注 $0.1 \text{ mmol}/100 \text{ g}$ 体重 Gd-DTPA 脂质体后大鼠肝癌灶显示情况, 并与尸检对照。结果: 脂质体造影剂包裹率为 20.1%, 能有效、持续地造成肝脏选择性靶向强化, 从而衬托出肝癌病灶, 使癌灶检出率由平扫 17.6% 上升至增强后的 76.5% ($0.01 < P < 0.05$)。结论: 顺磁性脂质体能有效地提高肝脏造影效果, 对提高肝细小癌灶检出水平有重要价值。

【关键词】 造影剂 磁共振成像 肝癌 脂质体

Preparation and application of liposomes loaded with Gd-DTPA in early detection of small hepatocellular carcinomas in rat model Xu Yikai, Liu Xingyuan, Zhang Jiahui, et al. Medical Imaging Center, Nan Fang Hospital, the First Military Medical University, Guangzhou 510515

【Abstract】 **Objective:** To investigate the value of liposomal Gd-DTPA enhanced MR imaging for improving detection of small hepatocellular carcinoma nodules (HCCs) in rat model. **Methods:** Gd-DTPA liposomes, which averaged $0.61 \pm 0.34 \mu\text{m}$ in diameter, were synthesized by freeze-thaw-sonification extrusion process. The rat model with HCCs was chemically induced by oral administration of diethylnitrosamine (DEN) for 16 weeks ($n = 5$). After intravenous injection of Gd-DTPA-liposomes at a dose of 0.1 mmol per 100 g body weight, MR contrast features of HCCs were observed and correlated with pathologic changes. **Results:** Encapsulation efficiency was 20.1% in the present liposomal Gd-DTPA preparation. After the injection, liposomal Gd-DTPA resulted in a persisting and considerable liver parenchymal contrast enhancement, and permitted significant improvement of detection of HCCs. The detecting rate of HCCs was 17.6% on precontrast T_1 weighted images, while rised to 76.5% on the postcontrast images ($0.01 < P < 0.05$). **Conclusions:** Paramagnetic liposomes can markedly increase hepatic uptake and result in persisting liver enhancement. It has high values for improving detection of tiny HCC nodules.

【Key words】 Contrast agent Magnetic resonance imaging Hepatocellular carcinoma Liposome

钆喷酸葡甲胺(Gd-DTPA)是目前应用最为广泛的磁共振阳性造影剂,其分子量小(仅 590 道尔顿),属全身非特异性分布,对肝脏疾病的强化效果远不如中枢神经系统疾病理想^[1]。本文尝试将 Gd-DTPA 包裹入脂质体(liposomes)中,目的是提高肝脏靶向强化效果,并探讨其对大鼠肝癌模型的诊断价值。

材料和方法

1. Gd-DTPA 脂质体的制备

装载(包裹)Gd-DTPA 的脂质体采用冻融超声法制备^[2]: 2.83g 卵磷脂和 0.93g 胆固醇溶解在 25ml 氯仿中,置圆底烧瓶,用旋转式蒸发器将氯仿挥发至尽,此时瓶壁上留下一层磷脂膜;加入 $0.5 \text{ mol}/1$ 20ml,剧烈震荡;置塑料离心管中,再放入液氮罐中冰冻 5min,转至 37°C 水浴融化,超声波(输出功率 60W)作用 30s,

如此反复冻融及超声处理 3 个循环。最近将产物用 $0.2 \text{ mol}/1$ PBS 缓冲液透析 72h(换水 4000ml),除尽游离 Gd-DTPA。最后过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜除去过大粒子及滤菌,浓缩至 20ml 左右备用。

2. Gd-DTPA 脂质体形态观测

取 1 滴上述脂质体造影剂,放在镀膜铜网上,滤纸吸去多余液体,加入 2% 磷钨酸染 30s,干燥后移入透视图电观测脂质体大小及形态。

3. 脂质体造影剂的浓度及包裹(包封)率测定

①建立 Gd-DTPA 浓度与 MR 信号强度值关系的工作曲线: 现已证明,在较低的浓度范围下($\text{Gd-DTPA} < 0.5 \text{ mmol}/1$),信号强度与 Gd-DTPA 的浓度成正比^[3,4]。因此,我们用 $0.2 \text{ mol}/1$ PBS 配制浓度梯度为 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 和 $0.5 \text{ mmol}/1$ 的 Gd-DTPA 液(每管 10ml),置我院 1.5Tesla MR 仪(Siemens, vision Plus)进行 SE 序列扫描(参数规定 $\text{TR}/\text{TE} = 400 \text{ ms}/15 \text{ ms}$, 温度 22°C),用 Evaluation 软件测各管信号强

作者单位: 510515 广州第一军医大学南方医院影像中心(许乙凯, 刘杏元); 华南农业大学兽医学系药理教研室(张嘉惠); 第一军医大学电镜室(乔东访)

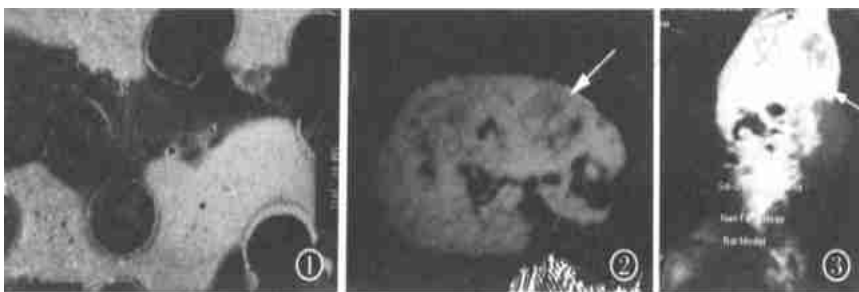


图 1 Gd-DTPA 脂质体电镜下放大 4800 倍所见, 呈类圆形, 周边可见透亮的双脂膜。图 2 大鼠肝癌模型轴位 T₁ 加权像, 肝内可见 1 个瘤灶。图 3 同 1 大鼠模型注射 Gd-DTPA 脂质体后冠状切面 T₁ 加权像, 肝实质明显强化, 衬托出斑片状分布的多个瘤灶。

度, 求出 Gd-DTPA 浓度梯

度(y)与信号强度(x)的直线回归方程:

$$y = 373.7 \pm 1934. x \quad (r = 0.98, P < 0.01)$$

②脂质体造影剂浓度测定: 取 1ml Gd-DTPA 脂质体, 加入 5% Triton X-100 2ml, 使脂质体破裂, 再稀释至 20ml, 用上述同样参数测信号强度, 代入直线回归方程式求出 Gd-DTPA 脂质体中含 Gd-DTPA 的浓度为 0.1mmol/ml。

③包裹率测定: 将制备脂质体造影剂过程中 4000ml 透析液(内含未被包裹的游离 Gd-DTPA), 按上述同样方式扫描及测信号强度, 代入直线回归方程求出游离 Gd-DTPA 总含量。脂质体包裹率定义为(投料时 Gd-DTPA 加入总量-透析液中游离 Gd-DTPA 含量)/投料时 Gd-DTPA 加入总量 × 100%。

4. 大鼠肝癌模型建立及 Gd-DTPA 脂质体增强试验

15 只清洁级雄性 Wistar 大鼠, 体重 154.5 ± 19.7g, 按先前报道的方法诱癌^[2]至 22 周时先后死亡 10 只, 余 5 只分别腹腔注射 50mg/kg 戊巴比妥麻醉, 用头部线圈行 Turbo-SE 平扫 T₁ 加权像(TR/TE = 500ms/15ms)和 T₂ 加权像(TR/TE = 2000ms/90ms); 随后, 从尾静脉注入 1ml/100g (含 Gd-DTPA 0.1mmol/100g) Gd-DTPA 脂质体, 分别于注药后 5min、10min、30min 获 T₁ 加权像比较增强前后大鼠模型病灶显示情况, 并与肉眼检查及镜下病理染色(HE 染色)对照分析。

结 果

1. Gd-DTPA 脂质体的包裹率及形态特点

本文 Gd-DTPA 脂质体的包裹率为 20.3%, 透视电镜下脂质体被染成电子致密圆形影, 周边有透光的

磷脂膜(图 1), 粒度范围 0.03~2.6μm, 平均粒径 0.61 ± 0.34μm。

2. 大鼠肝癌 MR 表现与病理对照结果

5 只大鼠, 病理检查共发现 17 个瘤灶, 大小 1.0~10mm, 平均 3.8 ± 2.9mm, 平扫 T₁ 加权像上多呈等信号或仅信号稍不均匀, 瘤灶检出率 17.6% (3/17); T₂ 加权像上瘤灶呈略高信号或等信号, 检出率 52.9% (9/17); 注射脂质体造影剂后, 肝实质 15min 左右强化达高峰, 持续强化达 30min 以上; 此外, 肾脏也有一定程度强化, 而肌肉、肺、脑组织未见明显强化, 提示 Gd-DTPA 脂质体有靶向趋肝的特性; 瘤灶在明显强化的肝实质衬托下呈清楚的低信号, 增强后瘤灶检出率上升为 76.5% (13/17), 远高于平扫时 T₁ 加权像的检出率($\chi^2 = 6.4$, 0.01 < P < 0.05, 图 2、3)。

结 果

脂质体(liposomes)是由类脂质双分子层所形成的小囊中, 囊内为含液空间, 起药物载体作用。它可使包封的药物在血液循环中免遭破坏或清除, 并借助肝脏 Kupffer 细胞吞噬作用^[6], 选择性地到达靶器官——肝脏。利用脂质体这一特性能大大提高 Gd-DTPA 造影剂在肝脏的浓度水平, 产生明显和持续的肝脏靶向增强效果。由于肝癌缺乏 Kupffer 细胞, 因此, 脂质体造影剂在癌灶区的分布少, 瘤灶在明显强化的肝实质的衬托下显示更加清晰。本文试验结果表明, 注射脂质体造影剂后, 肝癌灶检出率由平扫的 17.6% 上升至 76.5% (0.01 < P < 0.05), 进一步支持国外学者观点: 脂质体能有效改变 Gd-DTPA 在体内非特异性全身分布为肝脏相对集中分布的特征, 从而有效提高肝癌灶检出水平^[6], 对提高肝脏病灶的检出水平将有重要价值。我们认为, 脂质体装载 Gd-DTPA 造影剂尚具有下列优点: ①构成脂质体的磷脂膜可生物降解, 对人体无毒; ②由于构成脂质体的磷脂膜与体内生物膜成份上十分相似, 因而有良好的生物相容性; ③每个脂质体的载药量大, 且包裹过程仅为简单物理学过程, 并没有改变 Gd-DTPA 造影剂的分子结构, 因此可望获得较佳安全性。

本文制备的脂质体造影剂在粒径上稍大于国内、外报道, 包裹率仍较低(仅 20.1%), 有待今后进一步改进。此外, Gd-DTPA 脂质体的贮存稳定性仍不理

想^[7]。其原因主要是脂质体多用天然磷脂(如鸡蛋黄卵磷脂)为原料,分子结构上含有相当数量的不饱和键,易产生氧化,导致脂质体的渗漏及结构破裂,因此脂质体稳定期仍较短。如果采用加氢法预先饱和天然磷脂的双键,则一定程度上可望克服上述问题。

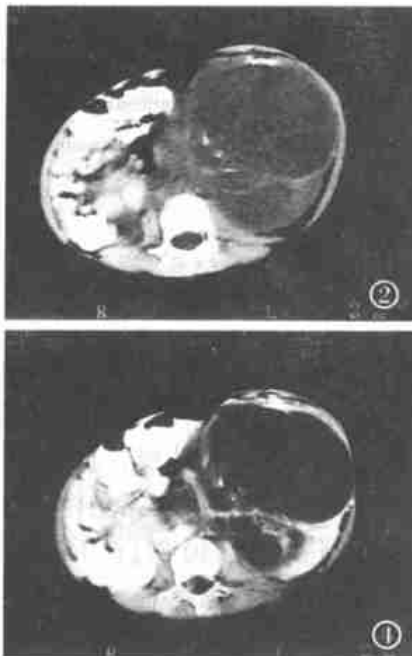
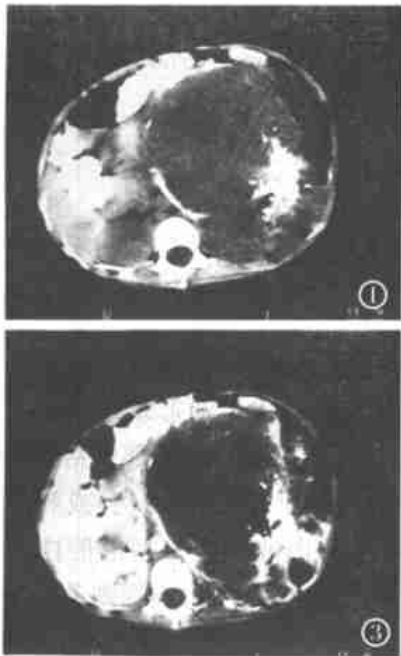
参考文献

- Okenda A, Hals PA. Biodistribution and toxicity of MR imaging contrast media[J]. JMRI, 1993, 3: 157.
- Tilcock C, Unger E, Cullis P, et al. Liposomal Gd-DTPA: preparation and characterization of relaxivity[J]. Radiology, 1989, 171: 77.
- Koenig SH. From the relaxivity of Gd(DTPA) 2- to everything else [J]. MRM, 1991, 22: 183.
- 戴平丰, 刘继汉, 余伟南, 等. 顺磁性造影剂 Gd-DTPA 与 FAC 弛豫增强特性的实验研究[J]. 中国医学计算机成像杂志, 1998, 4(1): 60.
- 张嘉宁, 顾为望, 许乙凯, 等. 大鼠肝癌模型的建立及影像学表现[J]. 中国实验动物学杂志, 1999, 9(2): 98.
- Unger EC, Shen Dk, Fritz TA. Status of liposomes as MR contrast agents[J]. JMRI, 1993, 3: 1957.
- Unger EC, Winokur T, Mac Dougall P, et al. Hepatic metastases: liposomal Gd-DTPA-enhance MR imaging[J]. Radiology, 1989, 171: 81.

(1999-11-01 收稿)

·读片追踪·

有奖图片读解



陈军

表面皮肤无粘连,无血管杂音,肝脾未及,肠鸣音正常。浅表淋巴结未触及,心肺未及异常。生命体征稳定。实验室检查:尿常规 Leu(+), Ery(+). 血常规: WBC $7.7 \times 10^9/L$, RBC $3.44 \times 10^{12}/L$, HGB 97g/L. 尿 VMA(-), 血 AFP(+). 肝肾功能正常。

胸腹平片:左上腹可见环状钙化影,余无特殊。

腹部 CT: 平扫(图 1、2)示左腹部巨大分叶状低密度团块影,上缘位于膈下,下达髂窝,范围约 $18\text{cm} \times 13.5\text{cm} \times 13.5\text{cm}$, CT 值为 38HU,密度较均匀,可见软组织密度条索状分隔呈大小不等多房状,并见弧形,斑片状高密度钙化影。左肾向下受压移位,部分层面仍可见受压变薄的肾实质。周围肠管及胰腺受推移,腹主动脉、腔静脉向右移位。右肾未见异常。增强后(图 3、4)示该团块影呈网格状强化,整个病灶呈分房状,其内容物未见强化。诊断:左侧腹部巨大肿块,考虑:①畸胎瘤,②神经母细胞瘤,③肾母细胞瘤。

综上临床及影像学表现,您将考虑哪种疾病可能性最大? 请参与读片解答,答案请寄《放射学实践》编辑部,正确者有奖。

(2000-01-10 收稿)

女性患者,10岁,4年前因高热,浮肿,血尿在当地医院拟诊肾炎,治疗期间发现腹部一包块,无疼痛不适,几年来未予就诊。现包块渐大,遂至我院门诊,以“腹部包块性质待查”收入院。查体:神志清楚,苍白面容,食欲睡眠均可,大小便正常,无明显体重下降。左腹部膨隆,可触及一约 $15\text{cm} \times 15\text{cm}$ 大包块,质中,上极达左肋弓下,下极达脐下4指,包块表面光滑,边缘不规整,向右超过中线。包块无触压痛,略可活动,与

作者单位: 430030 武汉,同济医科大学附属同济医院放射科