# • **实验研究**• 组织间隙注射 Gd-PBCA 纳米微粒鉴别良恶性淋巴结的实验研究

吕国士,许乙凯,胡蓉

【摘要】目的:制备 Gd-DTPA 聚氰基丙烯酸正丁酯纳米微粒(Gd-PBCA-NP),组织间隙注射 Gd-PBCA-NP,评估其 在良恶性淋巴结诊断和鉴别诊断中的价值。方法:采用阴离子乳化聚合法制备 Gd-PBCA-NP,测定其粒径及分布、包封率 及载药量,透射电镜观察其形态。选取健康成年新西兰白兔 12 只,采用随机数字法将其分为反应性增生淋巴结组及肿瘤 转移淋巴结组 2 组。MRI 平扫后 2 只反应性增生淋巴结于兔后脚掌注射后第 1、3、6、12、24 和 48 h 点扫描,其余为给药后 第 24 h 扫描。测量淋巴结大小、平扫及增强后各组淋巴结信号强度并作统计学分析,观察增强后各组淋巴结 MRI 表现。 结果:透射电镜观察 Gd-PBCA-NP 呈类圆形,大小均匀,表面平滑完整,粒子之间无粘连,具有明显的核-壳结构,其平均粒 径 65.7 nm,粒径分布为 0.09,平均包封率和载药量分别为 81.97%、51.23%。反应性增生淋巴结和肿瘤转移性淋巴结均 制作成功,平扫两组淋巴结在 4 个序列图像上的 SNR、大小差异均无显著性意义。组织间隙注射 Gd-PBCA-NP 后,反应 性增生淋巴结信号强度呈缓慢上升,于 24 h 左右达到高峰,在 T<sub>1</sub>WI、T<sub>1</sub>WI FS 上表现为显著均匀强化,而肿瘤转移淋巴 结表现为不均匀强化或无强化,两组 SNR 对比差异有显著性意义;在 T<sub>2</sub>WI、T<sub>2</sub>\*WI 像上两组均未见强化,两组对比差异 无显著性意义。结论:组织间隙注射 Gd-PBCA-NP 后,反应性淋巴结与肿瘤转移性淋巴结表现出不同的强化特征,在良恶 性淋巴结鉴别中具有潜在的应用价值。

【关键词】 磁共振;对比剂;纳米结构;淋巴结

【中图分类号】R445.2; R733.4; R814.43 【文献标识码】A 【文章编号】1000-0313(2007)10-1021-05

**Differentiation of Metastatic from Benign Lymph Nodes with Interstitial Injection of Gd-PBCA Nanoparticles** LV Guo-shi, XU Yi-kai, HU Rong, Center of Imaging, the 251st Hospital of PLA, Zhangjiakou 075000, P. R. China

[Abstract] Objective: To prepare polybutylcyanoacrylate (PBCA) nanoparticles loaded with Gd-DTPA (Gd-PBCA-NP) and evaluate the effect in differentiation of metastatic from benign lymph nodes after interstitial injection of Gd-PBCA-NP. Methods: Gd-PBCA-NP were prepared by anionic emulsion polymerization. The size and encapsulation efficiency and loading capacity of Gd-PBCA-NP were measured. The morphology of Gd-PBCA-NP was examined by transmission electron microscopy, 12 New Zealand White Rabbits were divided into 2 groups at random; reactive hyperplasis group and tumorbearing group. All MR imaging was performed. Two animals were scanned at 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h but the others were scanned at 24h after injection of contrast agents. The signal intensity and size of all lymph nodes was measured on different sequences of images before and after contrast enhancement. The enhanced appearance of lymph nodes was observed in two groups. Results: The morphology of Gd-PBCA-NP was oval shaped with core-shell structure without adherence between particles observed by transmission electron microscopy. The average size of Gd-PBCA-NP was 65, 7nm and the index of size distribution was 0.09. The average encapsulation efficiency and loading capacity of Gd-PBCA-NP were respective 81.97 %, 51, 23%. The reactive hyperplasia and metastatic lymph node models in all New Zealand White Rabbits were successfully developed. On unenhanced images, the SNR and the size of lymph nodes had no significant difference in four sequences of images in two groups. After interstitial injection of Gd-PBCA-NP, the SNR of the reactive hyperplasia lymph nodes increased slowly, and the maximal enhancement occurred at 24 hour. The reactive hyperplasia lymph nodes demonstrated obviously homogenous enhancement while metastatic lymph nodes showed heterogeneous or no enhancement, there were significant difference in the SNR of lymph nodes on enhanced T<sub>1</sub>WI and T<sub>1</sub>WI with FS images, but no significant difference on T<sub>2</sub> WI and T<sub>2</sub> \* WI images between two groups, **Conclusion**. After interstitial injection of Gd-PBCA-NP, metastatic lymph nodes showed different enhancing characteristics from those of reactive hyperplasia nodes and it has the potential value in differentiating metastatic from benign lymph nodes.

[Key words] Magnetic resonance imaging; Contrast media; Nanostructures; Lymph nodes

目前纳米靶向给药系统已成为药剂学研究的热

点,纳米微粒是指粒径范围在 10~1000 nm 的固态胶体颗粒,药物可吸附其表面或包封其内部,进入体内后 主要被网状内皮细胞吞噬,可被动靶向于肝、脾、淋巴 结和骨髓等富含网状内皮细胞的器官。大量研究证实

**作者单位:**075000 河北,张家口解放军 251 医院影像中心(吕国士);510515 广州,广州市南方医院影像中心(许乙凯);010000 北京,北京空军总医院(胡蓉)

作者简介:吕国士(1970-),男,内蒙古乌兰察布人,博士,主治医师,主要从事于 CT、MR 诊断工作。

其可作为药物、核苷酸的载体,用于疾病的诊断与治疗<sup>[1,2]</sup>。本研究以聚氰基丙烯酸正丁酯(polybutylcyanoacrylate,PBCA)为合成材料,尝试制备 Gd-DTPA 聚氰基丙烯酸正丁酯纳米微粒(Gd-PBCA-NP),并在 动物实验中组织间隙注射 Gd-PBCA-NP,评估其在良 恶性淋巴结诊断中的作用。

# 材料与方法

1. Gd-PBCA-NP 的制备

参照文献<sup>[3]</sup>采用阴离子乳化聚合法,精密称取一 定量 Gd-DTPA(广州康臣制药厂,V/V)、Dextran-70 (美国 Sigma 公司, W/V),溶于双蒸水中,用 0.1N HCL 调节 PH 于酸性状态(PH=2.5),在磁力搅拌器 下缓慢加入一定量 PBCA 单体(广州白云医用胶公 司,V/V),搅拌 4h,然后加入一定量 1N NaOH 调节 PH 于 7.0,反应终止,随后用 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 将滤液存于 4℃冰箱内备用。

Gd-PBCA-NP 粒径及其分布的测定:用激光粒度 分析仪(Malvern-3000HS)测定粒径及其分布,测试结 果分别给出均粒径和多分散度。

透视电镜(日立 H-600)观察 Gd-PBCA-NP 大体 形态。取少量上述混合液,用 5% 葡萄糖溶液透析 48 h,除去游离 Gd-DTPA、Dextran-70 及无机离子。 取 1 滴纯净 Gd-PBCA-NP 液体放在镀膜铜网上,加入 2%磷钨酸染 30 s,干燥后电镜下观察。

Gd-PBCA-NP包封率及载药量的测定:取5ml制备的混合液按上述方法透析,透析液总量为2000ml。 取20ml透析液(含游离Gd-DTPA)送交广州科学院分析测试中心,采用高频电感耦合等离子0000发射光 谱法(ICP-AES)测定透析液中Gd离子浓度,按以下 公式计算Gd-PBCA-NP的包封率及载药量:

包封率
$$=\frac{Ca-Cs}{Ca}$$
×100%  
载药量 $=\frac{Ca-Cs}{C_{PBCA}}$ ×100%

Ca:母液 Gd-DTPA 浓度;Cs:透析液 Gd-DTPA 浓度;CpBCA:母液 PBCA 浓度。

2. 组织间隙注射 Gd-PBCA-NP 鉴别良恶性淋巴 结的动物实验

健康成年新西兰白兔 12 只,体重 2.0~2.5 kg,采 用随机法分为 2 组。反应性增生淋巴结组(n=6):用 5 ml 注射器取 2 ml 蛋黄乳胶,单侧肌肉注射 0.5 ml, 3~4 d 后再重复上次操作 1 次,其后 4~5 d 于注射侧 腘窝即可触及约 1 cm 大小的淋巴结。 肿瘤转移淋巴结组(n=6):从 VX<sub>2</sub> 荷瘤种兔(同 济医科大学肿瘤病理研究所提供)肿瘤边缘切取生长 活跃的鱼肉样组织,放于少量生理盐水中,用研磨棒将 其研磨成混悬液,用 5 ml 注射器抽取 0.5 ml VX<sub>2</sub> 肉 瘤组织混悬液,单侧后腿肌肉接种,2~3 周后接种侧 后腿肿块形成,腘窝淋巴结明显肿大,VX<sub>2</sub> 肉瘤淋巴 结转移模型建成。

平扫:将动物麻醉后,选用头部相控阵线圈,扫描 序列及参数  $T_1$  WI(TR 539 ms, TE 14 ms, 二次采集), 脂肪抑制  $T_1$  WI(TR 539 ms, TE 14 ms, 二次采集);  $T_2$  WI(TR 2234 ms, TE 85 ms, 二次采集)。 $T_2$ \* WI (TR 550 ms, TE 22 ms, 翻转角 30°, 一次采集)。

增强扫描:在平扫完毕后,取2只反应性淋巴结新 西兰白兔淋巴结增大侧后脚掌注射0.5 ml0.25 mol Gd/l的 Gd-PBCA-NP,局部按摩5 min,给药后第1、 3、6、12、24 和48 h 点扫描,以绘制 Gd-PBCA-NP 增 强-时间曲线。依据淋巴结最大强化点,其余新西兰白 兔(n=10)给药后扫描时间点为第24 h,注射方式及注 射剂量同上,扫描参数同平扫。

图像评估:所有图像由两位有经验的影像学医师 共同评估,如有歧异,协商取得一致。

测量淋巴结大小、平扫及增强后各组淋巴结信号 强度:在不同序列上分别测量平扫、增强后各组腘窝淋 巴结的信号强度,兴趣区(region of interest,ROI)尽 量包括整个淋巴结,避免取边缘部分像素点,在背景区 域选取较大的 ROI,测量背景噪声的标准差(standard deviation of the noise,SD<sub>N</sub>)。计算各组淋巴结的信噪 比(signal to noise ratio,SNR)

$$SNR = \frac{SI_L}{SD_N}$$

上述公式中 SIL 代表淋巴结信号强度。

Gd-PBCA-NP 增强-时间曲线:在T<sub>1</sub> WI FS 像测量 Gd-PBCA-NP 增强后反应性增生淋巴结组上各时间点的 SNR,并按以下公式计算强化率(Enhancing rate,En%)

$$En \frac{\%}{0} = \frac{SNR_{enhanced} - SNR_{unenhanced}}{SNR_{unenhanced}} \times 100 \frac{\%}{0}$$

SNR<sub>unenhanced</sub>、SNR<sub>enhanced</sub>分别代表平扫时淋巴结的 SNR 和增强后各时间点淋巴结的 SNR。

观察增强后各组腘窝淋巴结 MRI 表现:与平扫相 比,将淋巴结强化形态分为均匀强化、不均匀强化(偏 心性或充盈缺损)、无强化3种。

统计学分析:应用 SPSS 10.0 软件包,采用完全随机设计方差分析(One-Way ANOVA)评价两组平扫不同序列淋巴结的SNR、Gd-PBCA-NP增强后SNR

差异是否有显著性意义。P<0.05认为 差异有显著性意义。

### 结果

# 1. Gd-PBCA-NP 理化特性

透射电镜观察 Gd-PBCA-NP 呈类 圆形,大小均匀,表面平滑完整,粒子之 间无粘连,具有明显的核-壳结构,即 Gd-DTPA 被白色聚合物包裹(图 1)。Gd-PBCA-NP 平均粒径 65.7 nm,粒径分布 为 0.09。平均包封率为 81.97%,平均 载药量为 51.23%。

2. 组织间隙注射 Gd-PBCA-NP 良 恶性淋巴结的 MRI 表现

淋巴结大小:全部模型均制作成功,6 只反应性增 生淋巴结组共发现 6 个肿大淋巴结,在 T<sub>1</sub>WI 脂肪抑 制像上的短径平均为(8.93±0.21) mm。6 只肿瘤转 移性淋巴结组共发现 8 个肿大淋巴结,在 T<sub>1</sub>WI 脂肪 抑制像上的短径平均为(9.18±0.41) mm,与反应性 增生淋巴结组对比差异无显著性意义(F 值=3.763, P=0.063, P>0.05)。

各组淋巴结平扫信号特点及 SNR 对比(表 1):在 T<sub>1</sub>WI上,相对于肌肉及脂肪,各组淋巴结均呈低信 号,在 FS T<sub>1</sub>WI上,相对于肌肉,各组淋巴结呈等或高 信号,在 T<sub>2</sub>WI上,相对于肌肉,各组淋巴结均呈高信 号,在 T<sub>2</sub>\*WI上,相对于肌肉,各组淋巴结均呈高信 号(图 2、3)。

表1 平扫不同序列各组淋巴结的 SNR( $\overline{x} \pm s$ )

分组	反应性增生	肿瘤转移	F 值	P 值
$T_1 WI$	23.76 $\pm$ 1.26	24.50 $\pm$ 1.12	2.727	0.111
$FS T_1 WI$	$29.63 \pm 2.22$	$30.06 \pm 2.02$	0.294	0.592
$T_2 WI$	83.46±3.52	$83.78 \pm 3.70$	0.053	0.819
$T_2 * WI$	58.42 $\pm$ 2.04	59.45 $\pm$ 2.65	1.258	0.272

注:各序列上两组对比差异无显著性意义(P>0.05)。

3. 反应性淋巴结 Gd-PBCA-NP 淋巴结增强-时间 曲线

组织间隙注射 Gd-PBCA-NP 后,在 FS T<sub>1</sub>WI 上, 反应性增生淋巴结第 1 小时强化率为 14.2%,随后缓 慢升高,第 3 小时达 32.6%、第 6 小时为 65.1%、第 12 小时达 128.9%,第 24 小时达 228.0%,第 48 小时强 化率降低,但仍达 167.2%。

4. 增强后各组淋巴结 MRI 表现及其 SNR 对比

反应性增生淋巴结与平扫相比,淋巴结(6个)在  $T_1WI,T_1WIFS$ 上表现为显著均匀强化,在 $T_2WI,$  $T_2*WI$ 像上未见明显信号改变(表 2,图 2~6)。肿瘤



图 1 Gd-PBCA-NP 的电镜照片。a) 原放大倍数 50000; b) 原放大倍数 100000。

转移性淋巴结(8个)在  $T_1$  WI、 $T_1$  WI FS 上表现为阳 性不均匀强化(3个不规则偏心缺损,1个边缘强化),4 个无强化;在  $T_2$  WI、 $T_2$ \* WI 像上均未见信号改变。

分组	反应性增生	肿瘤转移	F值	P 值
$T_{1} WI$ $T_{1} WI FS$ $T_{2} WI$ $T_{2} * WI$	75.84 $\pm$ 3.59	$29.95 \pm 3.88^{*}$	483.663	0.000
	99.59 $\pm$ 5.42	$32.29 \pm 3.36^{*}$	749.723	0.000
	83.18 $\pm$ 3.43	$83.68 \pm 4.59$	0.047	0.833
	58.73 $\pm$ 2.59	$59.68 \pm 3.76$	0.296	0.615

注:\*组对比差异有显著性意义(P<0.05)。

### 讨论

1. Gd-PBCA-NP 形成机制

制备纳米微粒载体的材料一般都是高分子化合 物,以合成的可生物降解的聚合物体系(如聚氰基丙烯 酸烷基酯、聚乳酸聚乙醇酸共聚物等)和天然的大分子 体系为主(如天然的蛋白、明胶、多糖等),其中 PBCA 由于可生物降解及其在外科临床应用中的安全性而成 为较有前景的纳米合成材料。PBCA 在水或催化剂的 催化下,亲核基团 OH-与 PBCA 单体反应,导致多个 嘉单体聚合而形成均一骨架型纳米微粒,药物可吸附 于纳米微粒表面或包封其内部[4]。在这种情况下,包 被的药物必须满足一定的水溶性;在酸性条件下药物 稳定,不会解离两个条件。DTPA 作为一种八齿状螯 和物,具有化学性质稳定及高度水溶性的特点,完全满 足以上条件。本研究透射电镜结果也表明 Gd-PBCA-NP 为核-壳结构,Gd-DTPA 包封于纳米球内部(不透 光,黑色物),而且Gd-PBCA-NP 具有较高的药物包封 率和粒径均匀度。

2. 组织间隙注射 Gd-PBCA-NP 鉴别良恶性淋巴 结的原理



图 2 反应性增生淋巴结。a) T<sub>1</sub>WI上呈略高信号(箭); b) FS T<sub>1</sub>WI上呈略高信号(箭); c) T<sub>2</sub>WI上呈明显高信号; d) T<sub>2</sub>\* WI上呈明显高信号(箭)。 图 3 肿瘤转移性淋巴结。平扫表现示淋巴结呈长形(箭),信号特点与反应性淋巴结相似。a) T<sub>1</sub>WI上呈略高信号(箭); b) FS T<sub>1</sub>WI上呈略高信号(箭); c) T<sub>2</sub>WI上呈明显高信号(箭); d) T<sub>2</sub>\*WI上呈明显高信号(箭)。



图 4 Gd-PBCA-NP 增强后反应增生性淋巴结均匀明显强化(箭)。a) 平扫 T<sub>1</sub>WI; b) 增强 T<sub>1</sub>WI; c) 增强 T<sub>1</sub>WI FS。
 图 5 Gd-PBCA-NP 增强后肿瘤转移性淋巴结无均匀明显强化(箭)。a) 平扫 T<sub>1</sub>WI; b) 平扫 T<sub>1</sub>WI FS; c) 增强 T<sub>1</sub>WI FS。
 图 6 Gd-PBCA-NP 增强后肿瘤转移性淋巴结强化表现。a) 平扫 T<sub>1</sub>WI 示肿瘤转移性淋巴结(箭)呈等信号; b) 增强 T<sub>1</sub>WI 示 淋巴结内充盈缺损(箭)。

经典网状内皮阴性对比剂 SPIO 也属于纳米颗 粒,大量研究<sup>[5-7]</sup>证明组织间隙注射 SPIO 可靶向淋巴 结成像,可显著提高良恶性淋巴结诊断的敏感性和特 异性。Gd-PBCA-NP 与 SPIO 强化原理相类似,组织 间隙注射后,纳米级颗粒主要由毛细淋巴管吸收,随淋 巴液运载到正常或增生性淋巴结被 kuppfers 细胞吞 噬,但在转移性淋巴结,正常淋巴组织由肿瘤细胞所取 代,淋巴窦受压变形,使得淋巴结对纳米颗粒的摄取减 少或不摄取<sup>[8,9]</sup>。因此,在 MRI 图像上肿瘤转移性淋 巴结保持信号不变或强化不均匀,而反应性增生淋巴 结强化。但两者网状内皮细胞对比剂不同的是前者主 要缩短组织的 T<sub>1</sub>值,引起 T<sub>1</sub>WI 像上组织信号增强, 而后者主要缩短组织的 T<sub>2</sub>值,引起 T<sub>2</sub>WI、T<sub>2</sub>\*WI 像 上组织信号下降。

相对来说,SPIO淋巴造影应用最广泛也最为成 熟,目前已经进入临床试验阶段,但在应用中也存在以 下问题:T<sub>2</sub>WI、T<sub>2</sub>\*WI图像分辨率和信噪比较低,一 定程度上影响了淋巴结结构的评价;T<sub>2</sub>WI、T<sub>2</sub>\*WI 像 上容易出现磁化率伪影,影响微转移性淋巴结的检出, 而且容易与正常淋巴结相混淆。与 T<sub>2</sub>WI、T<sub>2</sub>\*WI 图 像相比, T<sub>1</sub>WI 像具有高信噪比, 高解剖分辨率的优 点,而且没有磁敏感伪影,因此,T1 阳性对比剂有望弥 补 SPIO 所存在的缺陷。本研究结果表明,组织间隙 注射 Gd-PBCA-NP (T<sub>1</sub> 阳性对比剂)后反应性增生淋 巴结(富含巨噬细胞)在T<sub>1</sub>WI表现为明显、均匀性强 化,而肿瘤转移性淋巴结像表现为不规则偏心缺损强 化化或无强化,前者是因转移性淋巴结还保留一些正 常结构和巨噬细胞,仍摄取了一定量的 Gd-PBCA-NP 粒子;而后者则因为淋巴结被肿瘤细胞完全破坏、取 代,丧失了摄取 Gd-PBCA-NP 粒子的能力,良恶性淋 巴结强化的不同特征在于其病理组织学改变的不同, 因此,Gd-PBCA-NP 增强可以根据淋巴结强化的不同 方式而不是特异性较低的形态学标准来评价良恶性淋 巴结,可以更为有效的发现"正常"淋巴结(直径小于 10 mm 或 15 mm)内的转移灶。

本研究结果表明在平扫上反应增生性和肿瘤转移 性淋巴结的 SNR 对比在各个序列上均无显著性差异, 因此,单纯依靠信号改变难以鉴别良恶性淋巴结,虽然 淋巴结大小是鉴别良恶性淋巴结的间接标准<sup>[10]</sup>,但单 纯依靠淋巴结的形态学诊断标准,对恶性淋巴结的诊 断敏感度和特异度均不高,而且对正常大小淋巴结的 微转移,敏感性更低。Gd-PBCA-NP 是一种较为理想 的 T<sub>1</sub> 阳性网状内皮细胞对比剂,组织间隙注射后,可 提供淋巴结解剖和功能两方面的信息,在良恶性淋巴 结鉴别中具有潜在的应用价值。

## 参考文献:

- Friese A, Seiller E, Quack G, et al. Increase of the Duration of the Anticonvulsive Activity of a Novel NMDA Receptor an Tagonist Using Poly (butylcyanoacrylate) Nanoparticles as a Parenteral Controlled Release System[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2000, 49 (1):103-109.
- [2] Kreuter J. Nanoparticulate Systems for Brain Delivery of Drugs[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 47(1):65-81.
- [3] AC de Verdiere, Dubernet C, Nemati F, et al. Reversion of Multidrug Resistance with Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles: Towards a Mechanism of Action[J]. Br J Cancer, 1997, 76(1): 198-205.
- [4] Michel SC, Keller TM, Frohlich JM, et al. Preoperative Breast Cancer Staging: MR Imaging of the Axilla with Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Enhancement [J]. Radiology, 2002, 225 (2):527-536.
- [5] Yoshimi A, Catherine W, Piccoli M, et al. Evaluation of Neck and Body Metastases to Nodes with Ferumoxtran 10 Enhanced MR Imaging:Phase Ⅲ Safety and Efficacy Study[J]. Radiology,2003, 228(3):777-788.
- [6] 吴元魁,许乙凯,黄其鎏,等.超顺磁氧化铁粒子增强 MRI区分肿 瘤转移性与良性淋巴结的实验研究[J].中华放射学杂志,2002, 36(6):562-565.
- [7] Oussoren C, Zuidema J, Crommelin G, et al. Lymphatic Uptake and Biodistribution of Liposomes after Subcutaneous Injection.
   [I. Influence of Liposomal Size, Lipid Composition and Lipid Dose, Biochim[J]. Biophys Acta, 1997, 7(2):227-240.
- [8] Misselwitz B, Platzek J, Weinmann HJ. MR Lymphography after Interstitial Injection of Contrast Media[J]. Lymphology, 1998, 31 (2): 326 -329.
- [9] 罗德红,石木兰,徐震纲,等.颈部转移淋巴结德 CT、B 超扫描与 临床触诊对比分析[J].中华肿瘤杂志,1998,20(1):48-50.
- [10] Misselwitz B, Platzek J, Weinmann HJ, et al. Early MR Lymphography with Gadofluorine M in Rabbits[J]. Radiology, 2004, 231
   (3):682-688.

(收稿日期:2006-12-25)