

金属纳米探针 BaGdF₅-聚乙二醇作为 CT 淋巴显像剂的实验研究

王秋虎^{1,2} 王涛¹ 苏东伟³ 程超¹ 左长京¹

【摘要】 目的 探讨由聚乙二醇(PEG)修饰的金属纳米探针 BaGdF₅-PEG 作为 CT 淋巴显像(CT-LG)新型造影剂显像兔乳腺前哨淋巴结(SLN)的可行性。**方法** 采用水热法制备金属纳米探针 BaGdF₅-PEG,并用巯基 PEG(HS-PEG₂₀₀₀-NH₂)作为稳定剂进行修正,通过透射电镜、X 射线能谱仪(EDX)等方法对纳米探针进行评估。选取 6 只健康雌性新西兰白兔,于每只兔右侧第 2 乳晕皮下注射 0.5 ml BaGdF₅-PEG,并于注射前以及注射后的 1、5、10、30、40、50、60、90 min 对兔行 CT-LG,扫描范围为整个腋窝至第 2 乳腺下方,通过所获图像识别 SLN,记录 SLN 在不同时间点时的 CT 值,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。根据 Suga 等的方法,如果 SLN 的 CT 峰值与平扫相比增加值超过 30 HU,即可认为存在增强效应。完成 CT-LG 后,以亚甲蓝为示踪剂对兔行乳腺前哨淋巴结活检组织检查(SLNB),并将结果与 CT-LG 结果对照。**结果** 透射电镜图片显示制备的纳米颗粒 BaGdF₅ 呈方形,平均粒径约 20 nm;经修饰后的 BaGdF₅-PEG 的水合动力学直径为 52 nm,所有元素(Ba、Gd、F)均在 EDX 能谱上有显示。以 BaGdF₅-PEG 作为 CT-LG 造影剂,6 只实验兔各成功显影 1 枚 SLN,且 CT-LG 结果与 SLNB 结果一致。SLN 的 CT 值在注射造影剂前为(12.8±5.07) HU,于造影剂注射后的 10 min 达到峰值,为(47.4±9.1) HU,增加值>30 HU。**结论** 金属纳米探针 BaGdF₅-PEG 可以作为 CT-LG 造影剂,并能够实现兔乳腺 SLN 的长时间显像。

【关键词】 金属纳米粒子; 淋巴结; 淋巴造影术

【中图分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A

Experimental study of metal nanoprobe BaGdF₅-PEG as novel contrast agent in computed-tomography lymphography

Wang Qiuhu^{1,2}, Wang Tao¹, Su Dongwei³, Cheng Chao¹, Zuo Changjing¹. ¹Department of Nuclear Medicine, ²Department of Thyroid and Breast Surgery, Shanghai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; ³Department of Medical Imaging, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China

Corresponding author: Zuo Changjing, Email: changjing.zuo@qq.com

【Abstract】 Objective To study the feasibility of metal nanoprobe BaGdF₅-PEG as the novel contrast agent in computed-tomography lymphography (CT-LG) used for detection of sentinel lymph nodes (SLNs) in rabbits. **Methods** The metal nanoprobe BaGdF₅-PEG was synthesized by the hydrothermal method and further modified using HS-PEG₂₀₀₀-NH₂ as stabilizing agents. BaGdF₅-PEG was evaluated by transmission electron microscopy (TEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX). Six healthy female New Zealand rabbits underwent CT-LG after subcutaneous injection of 0.5 ml BaGdF₅-PEG in sub-areolar area of the right second breast. CT images were taken before and 1, 5, 10, 30, 40, 60, 90 min after contrast agent injection. The scanning ranged from the whole axilla to the area beneath the second breast. SLNs were recognized in CT-LG image. CT value of SLNs at different time points was recorded and expressed as $\bar{x} \pm s$. According to Suga et al's method, if the peak CT value of SLNs was 30 HU higher than that of plain scanning, it was considered as enhancement effect. After CT-LG, sentinel lymph node biopsy (SLNB) was performed in rabbits, with methylene blue as tracer. The results of CT-LG were compared with the results of SLNB. **Results** The TEM

image demonstrated that the prepared metal nanoparticles BaGdF_5 was square in shape, with a mean diameter of 20 nm. The hydrated diameter of metal nanoprobe BaGdF_5 -PEG was 52 nm after modification. The involved elements (Ba, Gd and F) were all showed in EDX spectrum. CT-LG with BaGdF_5 -PEG as a contrast agent enabled the visualization of 6 SLNs (one in each rabbit), which was consistent with the results of SLNB. CT value of SLNs was (12.8 ± 5.0) HU before injecting the contrast agent and reached a peak value of (47.4 ± 9.1) HU 10 min after injecting the contrast agent, which was more than 30 HU higher than that of plain scanning. **Conclusion** The metal nanoprobe BaGdF_5 -PEG can be used as a contrast agent of CT-LG, which provides long-time visualization of SLNs in the breasts of rabbits.

【Key words】 Metal nanoparticles; Lymph node; Lymphography

日本学者 Suga 等^[1]通过 CT 淋巴显像(computed-tomography lymphography, CT-LG)技术成功获得健康雌性犬及健康成年女性志愿者乳腺前哨淋巴结(sentinel lymph node, SLN)及其引流淋巴管的 CT 增强图像,从而为临床医师提供了一种新的定位 SLN 的方法。目前,CT-LG 所使用的造影剂主要为小分子质量碘剂,其进入淋巴通路后快速通过,不作停留。因此,当用碘造影剂行 CT-LG 时,存在对 SLN 显像时间过短的问题。

通过纳米技术不仅可以目标元素的功能进行集成,还能够对纳米探针的尺寸进行调控,并且经过生物活性分子修饰后,纳米探针表现出极低的生物毒性,这些特性极大地拓宽了纳米材料在生物医学领域的应用。金属纳米探针有着较高的 X 射线衰减系数,其作为新型 CT 造影剂而受到了广泛的关注。本研究中,笔者通过水热法成功制备了经过聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰后的双金属纳米探针 BaGdF_5 -PEG,因为掺杂的金属元素 Ba 和 Gd 均具有较高的 X 射线衰减系数,因而 BaGdF_5 -PEG 有着良好的 CT 造影性能^[2];此外, BaGdF_5 -PEG 具有良好的水溶性和生物相容性,相比于小分子质量碘剂,纳米探针的粒径更大,在淋巴通路内停留时间也更长。因此,笔者进一步探讨了金属纳米探针 BaGdF_5 -PEG 作为 CT-LG 新型造影剂并长时间显像兔乳腺 SLN 的可行性。

材料与方法

一、实验材料及动物

本研究使用了以下试剂: $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaF, 乙醇($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), 油酸[$\text{cis-CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$], 油胺[$\text{cis-CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{NH}_2$], 环己烷(C_6H_{12})。以上试剂均为分析纯,均购自上海阿拉丁试剂公司。浓盐酸(37% HCl, 上海国药试剂有限公司), 巯基 PEG($\text{HS-PEG}_{2000}\text{-NH}_2$, 北京键凯科技有限公司)。所有动物实验经第二军医大学动物实验中心批准。

采用 6 只健康雌性新西兰大白兔作为实验动物(第二军医大学动物实验中心提供), 月龄 7 个月, 体重 2.0~2.3 kg; 所有实验兔均按照普通级动物分笼饲养, 每笼 1 只, 常规饲料喂养, 自由进食及饮水。

二、实验仪器

通过透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM, 7500 型, 日本日立公司)观察金属纳米颗粒 BaGdF_5 的形貌以及粒径大小, 并利用 TEM 附带的 X 射线能谱仪(energy dispersive X-ray detector, EDX)对纳米颗粒的元素组成进行分析。通过粒度电位分析仪(Zetaser Nano ZS 型, 英国 Malvern 公司)测量纳米探针的水合动力学直径。实验兔的 CT 淋巴显像在 64 层螺旋 CT(Biograph 64 型, 德国西门子公司)上完成。

三、水热法制备纳米探针内核 BaGdF_5

采用水热工艺制备纳米探针内核 BaGdF_5 , 过程如下: 将 30 ml 无水乙醇, 8 ml 油胺及 8 ml 油酸混合搅拌 30 min; 分别称取 0.488 g $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 0.743 g $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 溶于 6 ml 去离子水, 充分溶解后逐滴加入到上述混合溶液中, 搅拌 1 h; 将 0.420 g NaF 粉末溶于 6 ml 去离子水, 逐滴加入混合液中, 搅拌 1 h 后将溶液转入水热反应釜中, 置于 160 °C 烘箱内反应 12 h 后取出, 自然冷却至室温; 倒出釜中上层液体, 收集底部产物, 溶于无水乙醇, 12 000 r/min 离心 10 min(离心机半径 10 cm), 倒掉液体, 保留沉淀; 按环己烷/无水乙醇体积比=1:3 重复洗涤、沉淀 3 次, 最后将所得沉淀物溶于 20 ml 环己烷, 即制得疏水纳米探针内核 BaGdF_5 环己烷溶液。

四、巯基 PEG 修饰纳米探针内核 BaGdF_5 制备 BaGdF_5 -PEG

将上述 BaGdF_5 环己烷溶液转入三孔烧瓶内, 加入 20 ml 去离子水以及 250 μl 浓盐酸, 以 500 r/min 搅拌 1.5 h, 待溶液出现明显的“上清下浊”样分层时, 停止搅拌。吸取并收集下层液体, 12 000 r/min 离心 10 min(离心机半径 10 cm), 将所获沉淀溶于 20 ml 去离子水, 再次离心洗涤(重复 2 次)。将所

得沉淀物溶于 10 ml 去离子水, 并加入 40 mg HS-PEG₂₀₀₀-NH₂, 避光搅拌 24 h 后, 12 000 r/min 离心 10 min(离心机半径 10 cm), 弃去过量 HS-PEG₂₀₀₀-NH₂。将沉淀物溶于适量去离子水中, 超声混匀, 即得到具有良好水溶性和生物相容性的金属纳米探针 BaGdF₅-PEG。

五、CT-LG 检查与评价

注射造影剂前, 先对实验兔行 CT 平扫, 目的是与之后 CT-LG 对比, 以评估淋巴结增强效果。将实验兔麻醉后, 以仰卧位固定, 充分伸展其上肢。CT 扫描参数如下: 管电压 100 kV, 管电流 80 mA, 层厚 1.0 mm, 矩阵 512×512。扫描范围为整个腋窝至第 2 乳腺下方。平扫完成后, 立即于兔右侧第 2 乳晕皮下注射 0.5 ml BaGdF₅-PEG (2 mg/ml Ba+Gd), 按摩 1 min 后行 CT-LG。扫描时间点为注射造影剂后 1、5、10、30、40、50、60、90 min, 扫描参数及范围同平扫。

在 CT-LG 图像中, 如果淋巴结的 CT 值与平扫相比增加值 >30 HU, 即可认为该淋巴结存在增强效应^[3]。扫描完成后, 将所获数据导入工作站。在 CT-LG 中, 将从注射点至腋窝方向上的淋巴引流通路中最先增强的淋巴结定义为 SLN。由 2 位有着 10 年以上临床经验的影像学医师独立阅片, 在达成一致意见后对 SLN 进行评估。完成 SLN 识别后, 通过体表定位栅对 SLN 进行体表定位(图 1)。

六、前哨淋巴结活组织检查(sentinel lymph node biopsy, SLNB)

所有实验兔在完成 CT-LG 后均行乳腺 SLNB。以亚甲蓝作为示踪剂, 注射部位同 BaGdF₅-PEG, 注射剂量 1 ml, 按摩 30 s 后, 由甲乳外科医师在体表标记处作一约 1 cm 切口, 切取视野内所有蓝染淋巴结; 随后扩大切口, 检查有无其他蓝染淋巴结, 记录

切取蓝染淋巴结数目。去除淋巴结表面结缔组织, HE 染色后行病理学检查。

七、数据分析

所有数据录入 Excel 2013 中。记录所有实验兔 CT-LG 显影的 SLN 数目, 并将 CT-LG 结果与 SLNB 结果对照。测量 CT-LG 图像上不同扫描时间点时 SLN 的 CT 值, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结 果

一、BaGdF₅-PEG 的表征

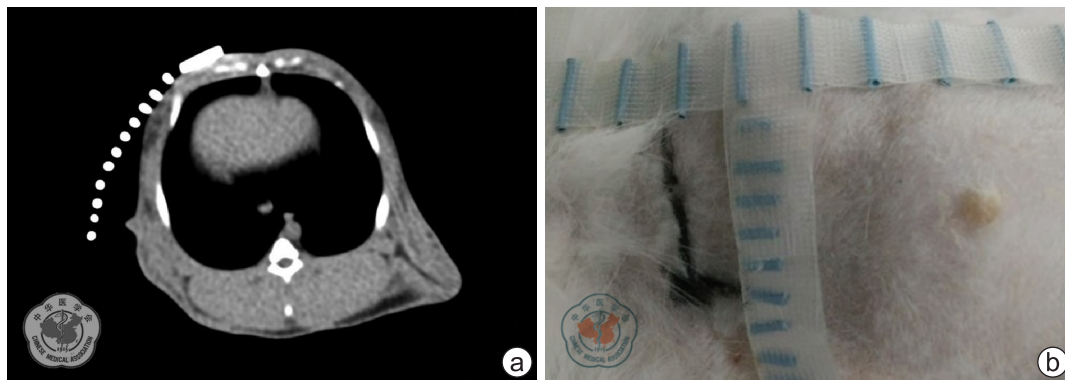
TEM 图像显示纳米颗粒 BaGdF₅ 呈方形, 分布较均匀, 大小较一致, 平均粒径约为 20 nm(图 2)。EDX 能谱图显示, 纳米颗粒的所有元素(Ba、Gd、F)在能谱上均有显示(图 3)。经过 PEG 修饰后的 BaGdF₅-PEG 具有良好的水溶性和生物相容性, 其水合动力学直径为 52 nm。

二、CT-LG 检查情况

以 BaGdF₅-PEG 作为造影剂行 CT-LG, 6 只实验兔共成功显影 6 枚 SLN(每只实验兔各显影 1 枚)。根据造影剂注射前以及注射后不同时间点时 SLN 的 CT 值与时间关系图(图 4)可以看到: 造影剂注射前, SLN 的 CT 值为 (12.8 ± 5.0) HU, 皮下注射 BaGdF₅-PEG 后, SLN 的 CT 值随着扫描时间的延长而逐渐增加, 并于 10 min 时达到峰值, 为 (47.4 ± 9.1) HU。与平扫相比, CT 值的增加 >30 HU, 即皮下注射 BaGdF₅-PEG 后, SLN 显影存在一定的增强效应(图 5), 而在造影剂注射后的 90 min, SLN 的 CT 值基本恢复至平扫时水平。

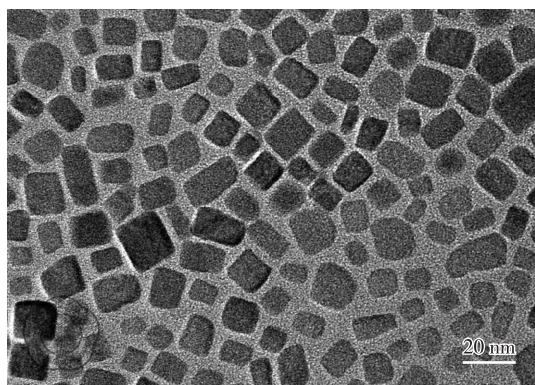
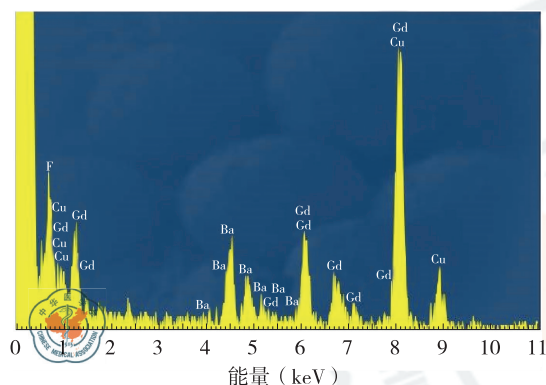
三、SLNB 结果

6 只实验兔在完成 CT-LG 后均行乳腺 SLNB, 每只实验兔各活组织检查出 1 枚蓝染 SLN, 且所有蓝



注: a 图所示, 前哨淋巴结体表定位栅 CT 显像; b 图所示, CT 图像定位前哨淋巴结后于体表相应的 2 个栅格之间做直线, 相交处为前哨淋巴结体表的位置

图 1 兔前哨淋巴结体表定位示意图

图 2 纳米颗粒 BaGdF₅ 的透射电镜观察图图 3 纳米颗粒 BaGdF₅ 的 X 射线能谱图

染 SLN 均于体表标记处检出,扩大切口后没有发现其它蓝染淋巴结(图 6),即亚甲蓝染色显示的 SLN 的数目以及位置与 CT-LG 结果一致。

讨 论

SLNB 能够让腋窝淋巴结阴性的早期乳腺癌患者避免不必要的腋窝淋巴结清扫(axillary lymph node dissection, ALND),现已成为评估早期乳腺癌

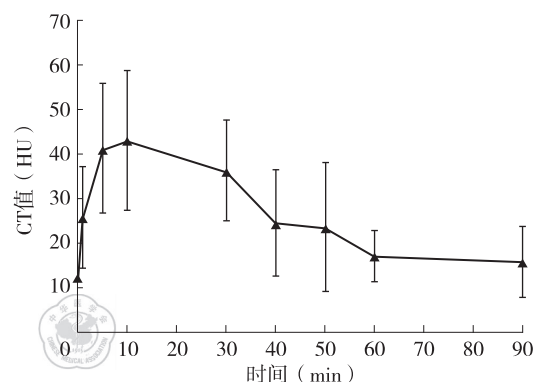
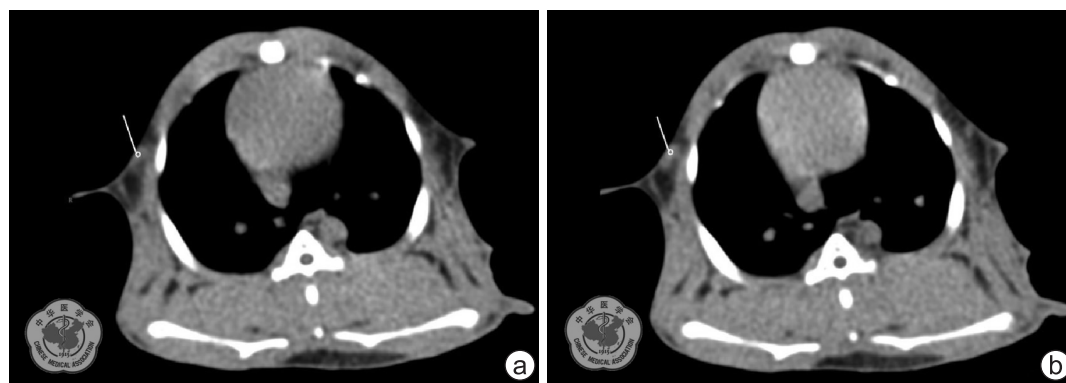


图 4 兔乳腺前哨淋巴结 CT 值与注射造影剂后时间变化的关系

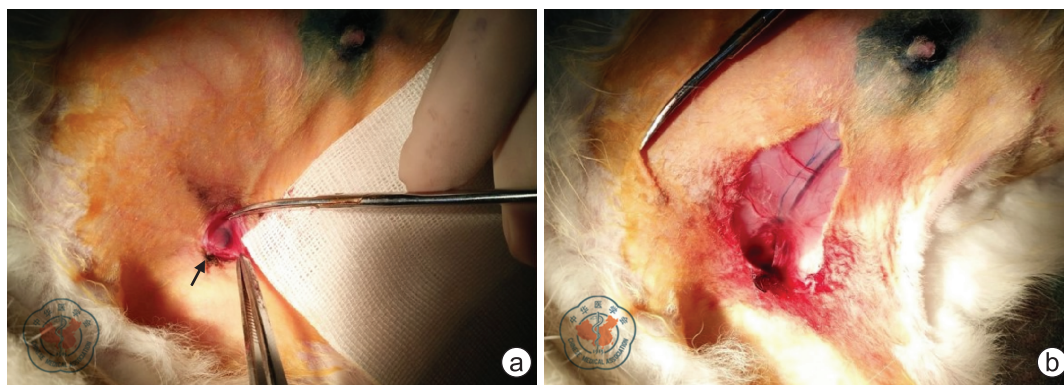
患者腋窝淋巴结状态的一项常规方法^[4]。SLNB 成功的关键在于对 SLN 进行准确的术前定位。传统定位 SLN 的方法主要为核素法、染料法以及联合法,但核素法与染料法在 SLN 定位中存在诸如假阴性率高、准确性存在争议等问题。

CT-LG 技术通过在乳腺肿瘤周围或乳晕皮下注射一定剂量造影剂后行 CT 连续薄层扫描,根据所获的断层及三维图像来对 SLN 进行定位。相对于传统的核素法和染料法,CT-LG 的最大优势在于其图像能够提供乳腺淋巴系统较为详细的解剖位置信息,清晰地显示各淋巴结及其引流淋巴管之间相互的位置关系,从而准确区分 SLN 和非前哨淋巴结。同时,CT 图像还能够准确的将 SLN 与周围组织结构如肌肉、血管等区别开来,避免了周围组织对 SLN 定位的干扰,提高了 SLN 的检出率^[5]。目前,CT-LG 所使用的造影剂主要为碘造影剂。研究表明,以碘造影剂行 CT-LG 时,SLN 的显像时间过短(1 min),这可能会导致 SLN 的漏检、错检^[6]。由于碘造影剂在淋巴通路内的引流速度过快,CT-LG 在术中无法起到像放射性核素或亚甲蓝那样对 SLN 的示踪作用。



注:a 图所示,BaGdF₅-PEG 皮下注射前,前哨淋巴结 CT 值约为(12.8±5.0) HU;b 图所示,造影剂注射后 10 min,前哨淋巴结 CT 值约为(47.4±9.1) HU

图 5 兔乳腺前哨淋巴结 CT 淋巴显像



注:a 图所示,皮下注射亚甲蓝后在体表标记处作切口,可检出 1 枚蓝染淋巴结(箭头);b 图所示,切取淋巴结后扩大切口,未发现其他蓝染淋巴结

图 6 兔乳腺前哨淋巴结活组织检查

淋巴结显像剂在淋巴通路内的迁移速度虽然与其表面修饰物、所带电荷等有一定的关联,但影响其迁移速度的决定性因素是水合动力学直径。直径小于 10 nm 的纳米探针以及小分子质量造影剂在淋巴通路内的移动非常迅速;相反,当显像剂直径在 50 ~ 200 nm 之间时,其在淋巴通路内的迁移速度就相对比较缓慢,但滞留时间会相应的延长;而当直径超过 500 nm 时,显像剂将会长时间地在注射点处停留而难以进入淋巴通路^[7]。碘造影剂作为小分子质量造影剂,其进入淋巴通路后快速通过,几乎不作停留,从而导致 CT-LG 对 SLN 的显像时间过短。以碘造影剂行 CT-LG,SLN 的 CT 值达到峰值的时间为造影剂注射后的 1 min^[8]。本研究制备的金属纳米探针 BaGdF₅-PEG 的水合动力学直径约为 52 nm,该粒径大小的纳米探针能够长时间的在淋巴通路内停留,兔乳腺 SLN 的 CT 值是在 BaGdF₅-PEG 注射后 10 min 时达到峰值,这就给 SLN 提供了一个相对较长的显像时间,从而减少或避免 SLN 漏检、错检情况的发生。研究显示,当粒径小于 5 nm 时,显像剂很容易经毛细血管直接进入血液循环^[9]。本研究制备的 BaGdF₅-PEG 的粒径要远大于 5 nm,故当以 BaGdF₅-PEG 为造影剂行 CT-LG 时,能够避免对血管的显像,从而减少对 SLN 识别的影响。

在本研究中,皮下注射 BaGdF₅-PEG 后,CT-LG 成功地对 SLN 进行了增强显像,这主要是因为金属元素 Ba、Gd 都具有较高的 K 临界值(Ba_{K-edge}:37.4 keV, Gd_{K-edge}:50.2 keV)以及 X 射线衰减系数(在 60 keV 时,Ba:8.51 cm²/g;Gd:1.18 cm²/g;在 80 keV 时,Ba:3.96 cm²/g,Gd:5.57 cm²/g)^[10],故掺杂有这 2 种元素的 BaGdF₅-PEG 具有一定的 CT 造影性能。在本研究中,6 只实验兔各成功显影 1 枚 SLN,SLN

检出情况与文献报道一致^[11]。研究表明,将染料法与 CT-LG 联合后对 SLN 的检出率要高于单独使用染料法或 CT-LG^[12]。因此,笔者在完成 CT-LG 后,选择以亚甲蓝作为示踪剂对实验兔再行 SLNB,以验证 BaGdF₅-PEG 作为造影剂定位 SLN 的准确性。结果显示,SLNB 检出的蓝染 SLN 的数目及位置与 CT-LG 结果一致,表明以 BaGdF₅-PEG 作为造影剂定位 SLN 准确性高。

SLN 是否存在转移是影响乳腺癌患者预后的一个很重要的因素。目前,CT-LG 技术本身还不足以评估 SLN 的性质,但如果将 CT 技术与其他影像技术相结合则能够对 SLN 的性质进行有效的评估。Motomura 等^[13]通过将 CT-LG 与增强磁共振技术相结合,提高了对 SLN 性质评估的敏感度和特异度。由于掺杂的钆离子能够缩短纵向弛豫时间,故 BaGdF₅ 具有良好的磁共振造影性能^[2]。因此,金属纳米探针 BaGdF₅-PEG 既能够作为 CT-LG 造影剂对 SLN 进行定位,也具有对 SLN 进行磁共振显像的潜力,其在 SLN 显像领域的前景值得期待。

参 考 文 献

- [1] Suga K, Ogasawara N, Okada M, et al. Interstitial CT lymphography-guided localization of breast sentinel lymph node: preliminary results [J]. *Surgery*, 2003, 133(2): 170-179.
- [2] Yang D, Dai Y, Liu J, et al. Ultra-small BaGdF₅-based upconversion nanoparticles as drug carriers and multimodal imaging probes [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(6): 2011-2023.
- [3] Suga K, Shimizu K, Kawakami Y, et al. Lymphatic drainage from esophagogastric tract: feasibility of endoscopic CT lymphography for direct visualization of pathways [J]. *Radiology*, 2005, 237(3): 952-960.
- [4] Li CZ, Zhang P, Li RW, et al. Axillary lymph node dissection versus sentinel lymph node biopsy alone for early breast cancer with sentinel node metastasis: A meta-analysis [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2015, 41(8):

- 958-966.
- [5] Motomura K, Sumino H, Noguchi A, et al. Sentinel nodes identified by computed tomography-lymphography accurately stage the axilla in patients with breast cancer[J]. BMC Med Imaging, 2013, 13:42.
- [6] Hyung WJ, Kim YS, Lim JS, et al. Preoperative imaging of sentinel lymph nodes in gastric cancer using CT lymphography[J]. Yonsei Med J, 2010, 51(3):407-413.
- [7] Cousins A, Thompson SK, Wedding AB, et al. Clinical relevance of novel imaging technologies for sentinel lymph node identification and staging[J]. Biotechnol Adv, 2014, 32(2): 269-279.
- [8] Suga K, Yamamoto S, Tangoku A, et al. Breast sentinel lymph node navigation with three-dimensional interstitial multidetector-row computed tomographic lymphography[J]. Invest Radiol, 2005, 40(6): 336-342.
- [9] 李蕾,张秀丽,霍宗伟,等. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -硫胶体不同制备条件及注射部位对乳腺癌前哨淋巴结检出的影响[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2014, 34(4): 296-300.
- [10] Zhang H, Wu H, Wang J, et al. Graphene oxide-BaGdF₅ nanocomposites for multi-modal imaging and photothermal therapy[J]. Biomaterials, 2015, 42:66-77.
- [11] 谭红娜,彭卫军,顾雅佳,等. 淋巴管造影评价兔乳腺前哨淋巴结的实验研究[J]. 中国医学计算机成像杂志, 2013, 19(5): 464-468.
- [12] Takahashi M, Sasa M, Hirose C, et al. Clinical efficacy and problems with CT lymphography in identifying the sentinel node in breast cancer[J]. World J Surg Oncol, 2008, 6:57.
- [13] Motomura K, Ishitobi M, Komoike Y, et al. SPIO-enhanced magnetic resonance imaging for the detection of metastases in sentinel nodes localized by computed tomography lymphography in patients with breast cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(12): 3422-3429.
- (收稿日期:2016-08-24)
(本文编辑:刘军兰)

王秋虎,王涛,苏东玮,等. 金属纳米探针 BaGdF₅-聚乙二醇作为 CT 淋巴显像剂的实验研究[J/CD]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2017, 11(3): 138-143.

