

# 纳米级载药微泡的制备及其超声介导下的抑瘤研究

刘欣欣, 王衍戈, 朱佩娟, 侯振清, 张其清\*

(厦门大学 材料学院, 生物医学工程研究中心, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 具有超声造影剂和药物载体双重功能的聚乳酸(PLA)微泡存在着载药率较低以及不能有效地透过肿瘤组织等缺点. 对此, 以 PLA 和卵磷脂为药物载体, 采用改良的超声复乳法制备载紫杉醇的 PLA-卵磷脂纳米级微泡. 考察了卵磷脂对载药微泡理化特性(包括: 形态、粒径、载药量、包封率和体外释药特性)的影响, 利用 X-射线衍射分析(XRD)考察了药物在微泡中的状态, 最后在超声介导下对荷瘤小鼠的抑瘤率进行了研究. 结果表明, 卵磷脂与 PLA 质量比为 50:250 时可制备得到平均粒径 615 nm、内部空心的纳米级微泡, 药物包封率达  $(90.90 \pm 5.79)\%$ , 载药率为  $(8.26 \pm 0.53)\%$ , 紫杉醇以无定型状态分布在微泡的壳中. 微泡的体外药物释放具有缓释、零级释放以及超声介导加快药物释放的特性, 而通过对 H 22 肝癌荷瘤小鼠的实验研究表明, 相对于紫杉醇针剂而言, 超声介导下载药 PLA-卵磷脂纳米级微泡注射剂能减小对小鼠的毒副作用, 提高抑瘤率.

**关键词:** 超声造影剂; 纳米级微泡; 聚乳酸 卵磷脂; 紫杉醇

**中图分类号:** R 944.9

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0438-0479(2010)06-0874-06

目前, 超声造影剂除了具有增强声学造影作用<sup>[1-2]</sup>外, 还广泛地应用于基因治疗、药物输送、溶栓治栓及肿瘤治疗等领域<sup>[3-7]</sup>, 并向纳米级和功能化方向发展. 体外研究表明, 利用微泡超声造影剂作为紫杉醇药物递送载体结合超声技术, 持续超声和脉冲超声可望实现局部定位释药的目的<sup>[8]</sup>.

但是, 超声造影剂作为药物载体, 由于其载药率低和粒径较大从而限制了它运行到肿瘤靶器官组织释放药物. 针对这样的情况, 一般从改善微泡壁成分增大药物的相容性, 以及制备成为纳米级的微泡来实现理想的药物定位释放. 当前超声造影剂以包裹高密度惰性气体的柔软薄膜微泡的形式存在, 微泡的平均粒径在 2~5  $\mu\text{m}$ , 小于红细胞, 可以自由通过肺循环, 但不透过血管, 是一种血池显像剂, 限制了其对血管外疾病的诊断和治疗<sup>[9]</sup>. 而纳米级造影剂(即粒径小于 1 000 nm 的超声造影剂)较常规造影剂有极强的穿透力. 研究表明, 疾病(如肿瘤)状态的血管内皮间隙扩大, 能允许直径小于 700 nm 的粒子穿过<sup>[10]</sup>. 而粒径小至 500 nm 的微泡能够在 7.5 MHz 的频率下产生有效的造影

效果<sup>[11]</sup>, 所以制备纳米级微泡是实现超声造影剂载药的一个有效手段.

聚乳酸(PLA)、聚羟基乙酸及其共聚物等高分子聚合物由于其稳定性、可修饰性, 以及可生物降解和生物相容性等, 已成为生物降解医用材料领域中最受重视的材料之一. 分别以这三者或者连接靶向基为材料的微球或者微泡的制备已经具备成熟的工艺, 分别用于载药<sup>[12]</sup>和超声造影<sup>[13-14]</sup>. 但是以 PLA 为材料的纳米级微泡不稳定, 加上微泡壳必须有较好的弯曲弹性和柔软度才能产生良好的造影效果, 以及要增加药物的相容性, 都要求 PLA 微泡中加入新的成份以满足上述要求.

卵磷脂是构成细胞生物膜的基本成分之一, 具有较好的流动性和柔软度, 在脂质超声造影剂中已有应用<sup>[15]</sup>; 且能够完全被人体吸收, 对人体皮肤和体内细胞膜的渗透性较强, 极适宜在体内降解, 且无毒性和免疫原性<sup>[16]</sup>, 因此适合应用于药物传递系统中, 已被国家食品药品监督管理局批准可静脉注射. 此外, 由于卵磷脂的分子含有疏水性的脂质成分以及亲水性的磷酸根及胆碱, 具有双亲性, 因此可以作为表面活性剂, 增强材料的分散性和稳定性.

本文将 PLA 与大豆卵磷脂混溶作为微泡的壳材, 用改良的超声复乳法制备成载紫杉醇的纳米级微泡, 以卵磷脂的含量和超声时间来控制微泡的粒径和载药

收稿日期: 2010-03-15

基金项目: 国家科技支撑计划(2007BAD07B05); 厦门市科技计划项目(3502Z20093009)

\* 通讯作者: zhangqiq@xm.u.edu.cn

率, 考察微泡的性质和超声下的药物释放特性, 并研究超声介导下载药微泡对肝癌小鼠的抑瘤效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*D, L*-PLA 粘度摩尔质量为 10 000 g/mol (山东开元生物材料有限公司); 二氯甲烷(分析纯, 北京化学试剂厂); 大豆卵磷脂(广东万凯微生物技术公司); 泊洛沙姆 188(德国巴斯夫(BASF)公司); 罗丹明 B(天津光复精细化工研究所); 紫杉醇(纯度 99.9% (质量分数), 沈阳天峰生物工程技术有限公司); 肝癌小鼠由厦门大学医学院动物中心提供。

XL-30 环境扫描电子显微镜(Philips 公司); JEM-2100 透射电子显微镜(日立公司); 激光共聚焦显微镜(德国莱卡公司); Nano ZS 纳米粒度 Zeta 电位分析仪(Malvern 公司); 高效液相色谱(Waters 公司); Xpert 型粉末 X 射线衍射仪(Panalytical 分析仪器公司); 超声细胞粉碎仪(宁波新芝生物科技有限公司); 超声显像诊断仪(CHISON 600AG 型); 超声发射接收装置(MODEL 5800)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 微泡超声造影剂的制备

空白 PLA 微泡超声造影剂通过超声复乳-溶剂挥发法制备。将 1 mL 0.01 g/mL 的碳酸氢钠溶液作为内水相( $W_1$ ), 注入 10 mL 溶有不同比例 PLA 和卵磷脂的二氯甲烷中(油相, O), 以 200 W 超声波作用 100 s 形成油包水( $W_1/O$ )初乳, 然后在同样超声波作用下将初乳注入加有体积分数为 1% 吐温-80 的 0.01 g/mL 泊洛沙姆溶液(外水相,  $W_2$ )中, 形成水包油包水( $W_1/O/W_2$ )复乳。将复乳缓慢搅拌 10 h, 以挥发有机溶剂, 使有机相固化。8 000 r/min 离心并洗涤 2 次。收集沉淀, 加入 2 mL 0.05 g/mL 甘露醇, 冻干。载有紫杉醇和荧光染色剂罗丹明 B 的微泡只需在微泡制备过程中在有机相中加入二者即可, 其中紫杉醇的质量浓度为 3 mg/mL。

#### 1.2.2 载药微泡的表征

分别采用扫描电镜和透射电镜对微泡的外部形态和内部结构进行观测; 对载有罗丹明 B 的空白 PLA-卵磷脂微泡进行激光共聚焦检测, 以罗丹明 B 的分布反映微泡的内部结构; 用纳米粒度 Zeta 电位分析仪对微泡在水中分散后的粒径进行检测和稳定性考察; 用 X 射线粉末晶体衍射技术检测药物在微泡内的存在形式。

### 1.3 微泡载药量和包封率测定

采用高效液相色谱法检测。色谱柱: Symmetry C<sub>18</sub> 不锈钢柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: V(甲醇): V(水) = 75: 25; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C; 检测波长: 227 nm。精密配置 1~100 μg/mL 的紫杉醇的甲醇标准溶液, 15 μL 进样, 以峰面积(*Y*)对标准溶液浓度(*X*)回归得标准曲线。精密称取冻干后的微泡粉末 10 mg 于 5 mL 离心管中, 加入 0.5 mL 二氯甲烷, 超声使微泡溶解, 再加入 2.5 mL 甲醇漩涡 10 min, 8 000 r/min, 离心 10 min, 取上清液进样 15 μL。测定峰面积, 代入标准曲线计算紫杉醇浓度。载药率(Drug loading content, DC)和包封率(Drug entrapment efficiency, EE)按以下公式计算:

$$DC = \frac{\text{紫杉醇质量}}{\text{微泡质量}} \times 100\%$$

$$EE = \frac{\text{实际载药率}}{\text{理论载药率}} \times 100\%$$

### 1.4 载药微泡的体外药物释放

分别对 PLA 微泡和 PLA-卵磷脂载药微泡进行体外药物释放实验, 并且考察超声对两种微泡体外药物释放的影响。精确称取 50 mg 各样品置于 30 mL 离心管中, 加入 10 mL 释放介质(含体积分数为 1% 吐温-80 和体积分数为 1% 甲醇的 pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液), 漩涡 1 min 后在 37 °C、(75 ± 5) r/min 振荡条件下分别于预定的时间将离心管取出, 8 000 r/min 离心 10 min, 取出所有上清液, 用高效液相色谱测定释放的药物浓度, 并更新新鲜释放介质, 漩涡 1 min 后继续振荡。其中超声组用超声显像诊断仪 3.5 MHz R60 凸阵探头以声强 22.57 mW/cm<sup>2</sup> 超声 10 min, 再放入恒温箱震荡。用上述的高效液相色谱法测定紫杉醇的浓度, 做出累积药物释放曲线, 并比较超声对释药动力学的影响。

### 1.5 动物实验

体质量 20 g 左右 6~7 周的昆明小鼠, 在前肢腋下植入常规皮下移植到第 7 代的小鼠肝癌 H22(由厦门大学医学院动物中心提供), 待荷瘤平均直径达到 0.8 cm 左右, 选择肿瘤生长良好, 无自发性出血坏死、瘤周无感染病灶的裸鼠 49 只为实验模型, 随机分成 7 组: 1) 生理盐水对照组; 2) 紫杉醇注射液组; 3) 空白 PLA-卵磷脂微泡注射液组; 4) 紫杉醇 PLA 微泡组; 5) 紫杉醇 PLA 微泡/超声组; 6) 紫杉醇 PLA-卵磷脂微泡组; 7) 紫杉醇 PLA-卵磷脂微泡超声组。各组均于瘤周围皮下注射, 注射剂量相当于紫杉醇剂量 20 mg/

kg, 每周 3 次, 注射 2 周; 超声组注射后将小鼠瘤周围去毛, 涂上超声耦合剂, 用直径 1.5 cm 的超声探头 (V306, 2.25 MHz) 对注射区域超声 1 min. 到治疗第 21 天, 处死动物, 去除脂肪组织、皮肤、血液以及污物等, 在电子天平上称肿瘤质量, 计算抑瘤率 (Inhibition Rate, IR):

$$IR = (1 - \frac{\text{治疗组平均体质量}}{\text{对照组平均瘤质量}}) \times 100\%$$

实验数据采用 SPSS 16.0 版统计软件进行方差分析和多个样本均数间两两比较. 数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{X} \pm s$ ) 表示, 总体进行方差分析, 两独立样本进行 t 检验,  $\alpha = 0.05$ .

## 2 实验结果

### 2.1 卵磷脂含量对微泡形态粒径和 DC 的影响

卵磷脂含量对微泡的形态粒径和 DC 均有影响. 首先, 随着卵磷脂比例的增加, 冻干后的微泡复溶过程更快, 更容易分散. 图 1(a, b, c) 显示了卵磷脂与 PLA 的质量比分别为 0:300, 50:250, 300:0 时所制得的颗粒的外部形态. 由图 1 可知, 少量卵磷脂的加入, 使微泡分散效果更好, 微泡尺寸减小; 但卵磷脂含量增加到 100% 时, 微泡消失, 表面粗糙粒径为 111 nm 左右的纳米粒子取而代之 (图 1c). 从图 2 的粒径分布图也可得知, 随着卵磷脂的增加, 微泡的粒径有减小的趋势, 粒径的多分散性也减小, 主要表现在: 不含卵磷脂的 PLA 微泡在 200 nm~2 μm 处都有粒径分布; 而随着卵磷脂与 PLA 的质量比从 50:250 增加到 150:150, 微泡的粒径集中于 615 nm, 且分布范围减小, 说明卵磷脂起了稳定纳米级微泡的作用.

另外, 卵磷脂含量对微泡的药物 EE 具有显著影响. 少量卵磷脂提高药物 EE, 卵磷脂含量大于一定程度时降低药物 EE. 在图 2 所示的各不同质量比的卵磷脂与 PLA 制备的微泡中, 卵磷脂与 PLA 质量比在 50:250 时, 药物 EE 达到 (90.90 ± 5.79)%, 明显大于 PLA 微泡 EE (78.00 ± 9.51)%. 在投药量为有机相总量的 10% 时, DC 达 (8.26 ± 0.53)%.

卵磷脂含有疏水性的脂质成分以及亲水性的磷酸根及胆碱, 是一个双亲性分子. 在复乳制备过程中, 少量卵磷脂分布在内水相和油相的界面, 而紫杉醇以氢键的形式与卵磷脂键合, 在微泡中分布在壳内侧, 因此少量卵磷脂的加入能够提高药物 EE; 而卵磷脂加入

过多, 在复乳的内水相与油相以及油相与外水相的界

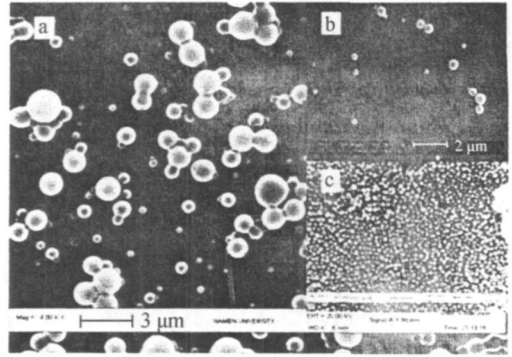


图 1 不同卵磷脂含量微泡的 SEM 照片  
a) PLA 微泡; b) PLA-卵磷脂微泡 (质量比为 250:50); c) 卵磷脂纳米颗粒

Fig. 1 Scanning electron micrograph (SEM) images of bubbles

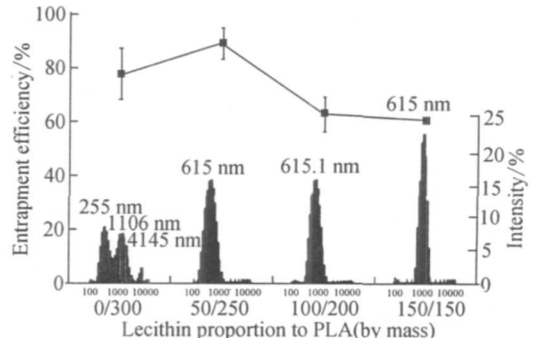


图 2 卵磷脂变化对微泡药物 EE 和微泡粒径分布的影响

Fig. 2 Variation of EE (curve) and bubble size distribution by intensity (bar) corresponding to different lecithin proportion to PLA of bubble component

面达到饱和后, 就会流失在外水相中, 或者自组装成为纳米颗粒 (如图 1c), 而紫杉醇也随之流失到外水相中, 药物 EE 也随之降低.

### 2.2 PLA-卵磷脂微泡的形态

在优化的制备参数和微泡中卵磷脂含量下, 所制得的微泡为粒径 615 nm 的空心微泡, 其分散性良好, 粒径均一, 见图 1b. 其中图 3 为微泡用扫描电镜、透射电镜和激光共聚焦表示的微泡内部结构. 图 3a 为微泡制备过程中增大内水相中碳酸氢钠的浓度所制得的微泡, 图 3 中所示一部分微泡有凹陷或破口的现象, 反映了微泡的空心结构. 而从透射电镜 (图 3b) 中可以看到微泡的粒径为 600 nm 左右, 而外周是一层 100 nm 左右的壳, 壳里面的颜色与泡外颜色深浅相近, 表明是空心结构. 从激光共聚焦显微镜照片图 3c 中, 可以看出罗丹明的红色为环形的分布, 反映了罗丹明的载体层即 PLA 和卵磷脂为微泡的空心结构.

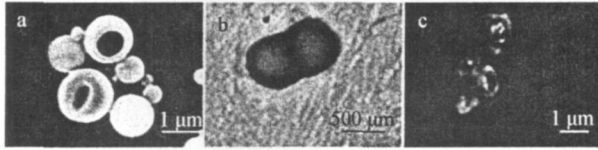


图 3 PLA- 卵磷脂纳米微泡图  
a) 扫描电镜; b) 透射电镜; c) 激光共聚焦  
Fig. 3 Images of PLA- lecithin nanobubbles

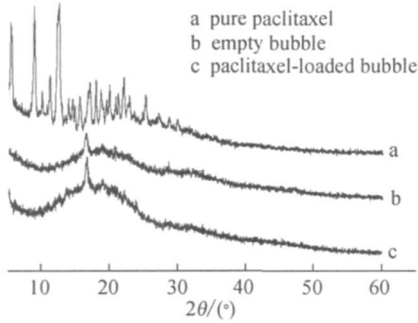


图 4 紫杉醇、空白微泡和紫杉醇微泡的 XRD 图谱  
Fig. 4 XRD diagrams of pure paclitaxel, empty bubbles and paclitaxel loaded bubbles

### 2.3 药物在微泡内的存在状态

通过粉末晶体衍射分析, 紫杉醇在微泡内以无定形态存在. 图 4 显示了紫杉醇晶体、空白微泡和紫杉醇微泡的 XRD 图谱, 由图 4 可知紫杉醇晶体在 20 为 5.14°、8.82° 和 12.38° 有特征峰, 而在 PLA- 卵磷脂微泡中特征峰消失, 说明紫杉醇是以无定形态存在, 这种状态有利于紫杉醇溶于缓冲溶液中并从微泡中释放出来.

### 2.4 药物释放动力学分析

紫杉醇微泡的体外累积释放曲线见图 5. 载药 PLA- 卵磷脂微泡和载药 PLA 微泡的药物释放特征基本相似, 在没有超声刺激的情况下基本上属于零级释放, 没有突释行为, 在第 16 天药物释放率分别为 30.86% 和 38.45%, 具有缓释效果; 而在超声作用下, 两种微泡的药物释放都明显增强, 在第 16 天分别达到 56.47% 和 49.88%.

图 5 中在药物开始释放后第 1, 4, 8 天, 用超声显像诊断仪超声作用 10 min, 两种样品在超声刺激后突释, 表明超声具有促进微泡释放药物的作用. 这种结果对微泡释药体系在体内进行定时释放药物具有重大意义. 而且, 超声对于载药粒子具有靶向传递的作用已经受到了广泛的研究, 所以微泡载药配合体外超声介导有望发展成一种新型的定时定点的释药体系.

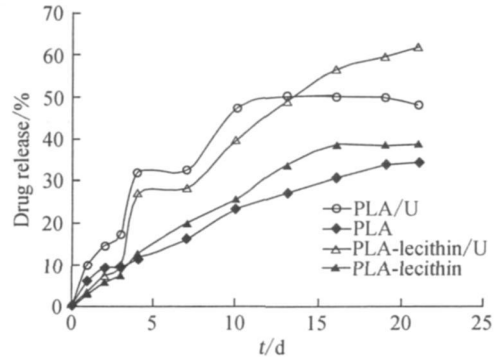


图 5 载药 PLA 微泡和 PLA- 卵磷脂微泡在超声介导下/非超声介导的体外药物释放曲线  
Fig. 5 Ultrasound triggered/ without release profile of drug loaded PLA/ PLA- lecithin bubbles

### 2.5 载药微泡治疗肝癌小鼠的疗效研究

表 1 中显示了各组动物的平均瘤质量和 IR, 对影响实验的各因素进行了对照, 包括各组与生理盐水的对照, 其他紫杉醇载体组与紫杉醇针剂组的对照, 超声组与未超声组的对照, 以及 PLA- 卵磷脂组与不含卵磷脂组的对照. 具体分析如下:

与生理盐水组比较, 除空白 PLA- 卵磷脂微泡对照组外, 含有紫杉醇的其余各组 (c、d、e、g 组) 肿瘤质量均减小 ( $p < 0.05$ ), 说明紫杉醇对 H22 荷瘤肝癌具有一定的抑瘤效果. 本文同时研究了空白 PLA- 卵磷脂微泡组对肿瘤的影响, 由于微泡进入肿瘤内部或附着于瘤上, 使得该组肿瘤比生理盐水组有所增加, 但无显著性差异 ( $p > 0.05$ ).

紫杉醇针剂组由于药物直接作用于组织, 具有较大的毒副作用, 在注射后小鼠出现蜷缩现象, 且剥离的肿瘤有严重溃疡产生, 导致肿瘤质量减轻, 而在其他组溃疡现象不明显. 紫杉醇的 PLA- 卵磷脂微泡超声组的 IR 为 75.38%, 比紫杉醇针剂的 IR (67.40%) 更高; 但 e、f、g 组的 IR 均不如紫杉醇针剂组, 尤其是 f 组 (载紫杉醇 PLA 微泡组), IR 仅为 13.02%, 肿瘤质量与紫杉醇针剂组相比具有显著性差异. 以上现象可以从 PLA 的降解性质、超声和卵磷脂等方面解释.

首先, 由体外药物释放可知, 所制备的微泡具有缓释效果. 本文给药方式为瘤周围皮下注射, 微泡降解较慢. 在取瘤前一周停止注射药物, 可能有 PLA 残留在瘤中, 使肿瘤质量增加.

其次, 在 d 与 e 或 f 与 g 组的对比实验中发现, 两组瘤质量比较均有显著性差异, 说明超声介导能够提高载药微泡的 IR. 超声作用下的空化效应和声孔效应, 一方面使微泡剧烈震荡或破裂而与组织接触面积

表 1 H22 肝癌移植瘤在小鼠体内的瘤重和抑瘤率 (n= 7)  
Tab. 1 H22 tumor weight and inhibition rate in mice (n= 7)

组别	瘤质量/ g	IR/ %
a 生理盐水组	1. 2865±0. 5992	-
b 空白 PLA- 卵磷脂微泡组	1. 3057±0. 6107 <sup>*</sup>	-
c 紫杉醇针剂组	0. 4257±0. 2203 <sup>&amp;</sup>	67. 40
d 紫杉醇 PLA- 卵磷脂微泡组	0. 7150±0. 3073 <sup>&amp;·▲</sup>	45. 24
e 紫杉醇 PLA- 卵磷脂微泡超声组	0. 3214±0. 2279 <sup>&amp;·▲·#</sup>	75. 38
f 紫杉醇 PLA 微泡组	1. 1357±0. 4761 <sup>&amp;·</sup>	13. 02
g 紫杉醇 PLA 微泡超声组	0. 6917±0. 2645 <sup>&amp;·▲·★</sup>	47. 02

\* 与 a 组比较  $p > 0. 05$ ; & 与 a 组比较  $p < 0. 05$ ; ▲ 与 c 组比较  $p > 0. 05$ ; 与 c 组比较  $p < 0. 05$ ;  
# 与 d 组比较  $p < 0. 05$ ; ★ 与 f 组比较  $p < 0. 05$ .

增大, 促进药物释放, 增加疗效; 另一方面导致局部毛细血管和临近组织细胞膜的通透性增高, 细胞膜短暂地形成可逆性小孔, 促进了药物或者纳米级微泡进入肿瘤组织.

再次, 在 d 与 f 或 e 与 g 的对比实验中发现, 载药的 PLA- 卵磷脂微泡抑瘤效果比不含卵磷脂的载药 PLA 微泡抑瘤效果更好. 由前面的实验可知, 微泡中卵磷脂的加入能防止微泡聚集和融合, 因此保持粒径小于 700 nm, 较易穿透组织, 进入肿瘤内部; 另外, 卵磷脂由磷酸、胆碱、脂肪酸等成分构成, 能够完全被人体吸收, 对人体皮肤和体内细胞膜的渗透性较强, 极适宜在体内降解. 因此 PLA- 卵磷脂微泡中的卵磷脂被吸收后, 剩下的 PLA 容易被组织液渗透, 从而也会加快 PLA 降解和药物的释放.

综上所述, 超声介导下的 PLA- 卵磷脂载药微泡具有最好的疗效, 不但减轻了紫杉醇针剂的毒副作用, 还能使 IR 达到比针剂更好的效果.

### 3 结 论

本实验制备了平均粒径 615 nm, 分散性较好的载药 PLA- 卵磷脂纳米级微泡, 这种微泡由于能透过肿瘤组织的毛细血管, 由瘤周围注射可进入肿瘤内部; 微泡对紫杉醇的 DC 和药物 EE 分别达 (8. 26±0. 53)% 和 (90. 90±5. 79)%, 并且以无定形态存在于微泡的壳材中; 体外药物释放实验表明载药 PLA- 卵磷脂微泡具有缓释的效果, 并且微泡在超声介导下能加快药物释放; 在对肝癌小鼠的瘤周围注射治疗中, 发现 PLA- 卵磷脂载药微泡结合超声定位介导的抑瘤率高于紫杉醇针剂, 并且没有溃疡等副作用, 具有良好的疗

效.

### 参考文献:

- [1] Unger E, Lund P, Shen D, et al. Nitrogen filled liposome as a vascular US contrast agent: preliminary evaluation [J]. Radiology, 1992, 185: 453-456.
- [2] Unger E, Shen D, Fritz T, et al. Gas filled lipid bilayers as ultrasound contrast agents [J]. Invest Radiol, 1994, 29 (Sup. 2): 134-136.
- [3] 冉拇涛, 任红, 王志刚, 等. 超声波空化效应对体外培养细胞细胞膜作用的实验研究 [J]. 中华超声影像学杂志, 2003, 12: 499-501.
- [4] 杨春江, 王志刚, 李兴升, 等. 载药脂质微气泡的制备及其应用 [J]. 中华超声影像学杂志, 2006, 15(7): 535-538.
- [5] 汪国忠, 胡申江, 郑哲岚, 等. 新型载基因微泡的制备及其在心肌细胞报告基因转染中的应用 [J]. 生物医学工程学杂志, 2006, 23(4): 856-861.
- [6] Hamilton A, Huang S L, Wamick D, et al. Left ventricular thrombus enhancement following intravenous injection of echogenic immunoliposomes: studies in a new experimental model [J]. Circulation, 2002, 105: 2772-2778.
- [7] 朱栋晓. 高强度聚焦超声治疗肿瘤的研究进展 [J]. 实用临床医药杂志, 2005, 9(5): 39-41.
- [8] Unger E C, McCreery T P, Sweitzer R H, et al. Acoustically active lipospheres containing paclitaxel: a new therapeutic ultrasound contrast agent [J]. Invest Radiol, 1998, 33(12): 886-892.
- [9] Mattrey R, Afuirre D A. Advances in contrast media research [J]. Academic Radiology, 2003, 10(12): 1450-1460.
- [10] Oeffinger B E, Wheatley M A. Development and characterization of a nanoscale contrast agent [J]. Ultrasonics, 2004, 42: 343-347.

- [ 11 ] Lanza G M, Wickline S A. Targeted ultrasonic contrast agents for molecular imaging and therapy[J]. *Curr Probl Cardiol*, 2003, 28( 12 ): 625- 653.
- [ 12 ] Kingsley J D, Dou H, Morehead J, et al. Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system [ J ]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2006, 1( 3 ): 340- 350.
- [ 13 ] Pridgen E M, Langer R, Farokhzad O C. Biodegradable polymeric nanoparticle delivery systems for cancer therapy[ J ]. *Nanomed*, 2007, 2: 669- 680.
- [ 14 ] Soppimath K S, Aminabhavi T M, Kulkarni A R, et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices[ J ]. *J Control Release*. 2001, 70( 1/2 ): 1- 20.
- [ 15 ] 朱斌, 许时婴, 夏书芹. 脂质体空气微泡的制备[ J ]. *食品与生物技术学报*, 2007, 26( 3 ): 1673- 1689.
- [ 16 ] 蔡卓, 程龙军, 江彩英, 等. 大豆卵磷脂的研究现状[ J ]. *化工技术与开发*, 2008, 37( 9 ): 34- 37.

## Preparation of Drug loaded Nanobubbles and Their Ultrasound mediated Antitumor Effect

LIU Xirxin, WANG Yange, ZHU Peiruan, HOU Zhenqing, ZHANG Qiqing<sup>\*</sup>  
(Research Center of Biomedical Engineering, College of Materials, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Drug loaded PLA microbubbles that combine properties of ultrasound imaging contrast agents and drug carriers suffer from low encapsulation efficiency and do not allow effective extravasation into tumor tissue. In this paper, paclitaxel loaded PLA lecithin nanobubbles were developed with the method of modified ultrasonic double emulsion solvent evaporation technology. The impact of lecithin content on physical and chemical properties of drug loaded bubbles including morphology, particle size, drug loading, encapsulation efficiency and in vitro drug release characteristics were investigated, encapsulated drug state in the bubbles was detected, and drug loaded bubbles combining ultrasound treatment of H22 tumor-bearing mice was carried out. The results showed that the nanobubbles prepared with the mass ratio of PLA and lecithin at 250: 50 were characterized to be inner hollow, the size was around 615 nm, and the drug loading and encapsulation efficiency reached  $(8.26 \pm 0.53)\%$  and  $(90.90 \pm 5.79)\%$  respectively. X-ray diffraction analysis (XRD) showed paclitaxel was amorphously dispersed within the shell of the nanobubble. The in vitro drug release showed retained, zero-order release and ultrasound triggered properties. Paclitaxel loaded nanobubbles combining ultrasound treatment of H22 tumor-bearing mice presented enhanced antitumor rate and reduced side effects compared with the paclitaxel injection. The results illustrated that the PLA-lecithin nanobubbles have great potential in targeted delivery to tumor tissue and ultrasound mediated anticancer therapy.

**Key words:** ultrasound contrast agent; nanoscaled bubble; poly lactic acid (PLA)-lecithin; paclitaxel