

# 氢气微泡的制备及其超声成像研究

韦紫君 潘 敏 王 辰 严 飞

(中国科学院深圳先进技术研究院 生物医学与健康工程研究所  
保罗·C·劳特伯生物医学成像研究中心 深圳 518055)

**摘 要** 氢气是一种新型、简单、安全的选择性抗氧化剂。但氢气的水溶性低、难以实时追踪和定点可控释放限制了其在生物医学上的应用。微泡具有造影、载气及定点可控释放的特性。文章将氢气与全氟丙烷通过一定比例混合制备了一种新型的载氢气微泡。体外、体内超声成像实验发现载氢气微泡在磷酸盐缓冲液以及在大鼠左心室和肝脏中均有很好的超声成像性能。该研究为进一步利用氢气微泡来实现超声定点释放和治疗奠定了实验基础。

**关键词** 氢气；微泡；超声成像

**中图分类号** R 331 **文献标志码** A

## Investigation on Preparation and Ultrasound Imaging of Hydrogen-Microbubbles

WEI Zijun PAN Min WANG Chen YAN Fei

(Paul C. Lauterber Research Center for Biomedical Imaging, Institute of Biomedical and Health Engineering,  
Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

**Abstract** Hydrogen gas ( $H_2$ ) is a novel, simple and safe antioxidant. However, its poor solubility in water, the difficulties to track by imaging and to be released in a controllable manner limit its bio-medicine application. Microbubbles (MBs) are ideal ultrasound contrast agents and can be used as the ultrasound-activated drug carriers. In this work, hydrogen-loaded microbubbles ( $H_2$ -MBs) were prepared and their performance in ultrasound imaging in vitro and in vivo were examined. Experiment results showed that  $H_2$ -MBs have excellent ultrasound imaging capability both in phosphate buffered saline and in the rat left ventricular and liver. The study provided a novel  $H_2$  formulation and laid the foundation for further  $H_2$  therapy application.

**Keywords** hydrogen; microbubbles; ultrasound imaging

## 1 引 言

研究表明，氢气是一种新型、简单、安全的

选择性抗氧化剂，具有抗氧化、抗炎、抑制细胞凋亡等多种生物学效应。长期以来，氢气被认为是生理惰性气体，其溶解度低，不能被机体大量吸收，在高等生物体内的作用一直没有得到足

收稿日期：2016-04-05 修回日期：2016-06-02

基金项目：国家自然科学基金(81571701、81371563)；深圳市科技计划(JCYJ20150521144321010、JCYJ20150331091304763)

作者简介：韦紫君，硕士研究生，研究方向为生物医学影像；潘敏，博士，研究方向为超声分子影像；王辰，博士研究生，研究方向为超声微流控；严飞(通讯作者)，副研究员，研究方向为超声分子影像，E-mail: fei.yan@siat.ac.cn。

够的重视。直至 2007 年, Ohsawa 等<sup>[1]</sup>发现氢气可以通过选择性的中和羟自由基和过氧亚硝基的作用, 从而保护脑缺血-再灌注损伤。自此, 氢气作为一种治疗性气体迅速成为研究热点, 并掀起了氢气治疗疾病的热潮。在短短的几年时间内, 大量的研究表明: 氢气在大脑<sup>[2,3]</sup>、心脏<sup>[4,5]</sup>、脊髓<sup>[6]</sup>、视网膜<sup>[7]</sup>、肺<sup>[8]</sup>、肝脏<sup>[9]</sup>、肾脏<sup>[10]</sup>以及睾丸<sup>[11]</sup>等众多的组织或器官缺血-再灌注损伤中均具有较好的保护或治疗作用。我国第二军医大学的孙学军教授是国内率先开展关于氢气生物学效应方面研究的学者, 并发表了一系列的研究成果, 证明氢气在多种器官或组织缺血-再灌注损伤、脊髓损伤、肺氧中毒、肝损伤等方面均有较好的保护作用<sup>[12-16]</sup>。

然而, 氢气分子量小, 难溶于水, 挥发性强, 难以实时追踪及定点可控释放, 在一定程度上限制了它的疗效和应用价值。因此, 发展一种既安全又能保证其疗效的氢气给药途径已成为当前的研究热点。超声微泡是一种尺寸在微米量级的微小气泡, 可以作为治疗性气体的理想载体, 其造影成像、载药及超声爆破靶向药物传递的特性赋予了它在生物医学领域巨大的应用潜力。本研究通过将氢气包裹于超声微泡, 获得一种性能稳定、声学性能较好的载氢气微泡(简称氢气微泡)。同时, 通过对氢气微泡进行体外和体内超声成像, 实现氢气微泡的实时示踪, 为下一步的超声定点释放治疗性氢气以用于缺血-再灌注损伤的治疗提供前期的实验基础, 也为缺血再灌注损伤疾病的防治提供一种新的治疗思路。

## 2 材料与方 法

### 2.1 主要材料与仪器

二硬脂酸磷脂酰胆碱(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine, DSPC)、二硬脂酸磷脂酰乙醇胺聚-乙二醇 2000(1,2-distearoyl-

sn-glycero-3-phos-phoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000], DSPE-PEG2000): 购于美国 Avanti Polar Lipids 公司; 水合氯醛: 购于上海国药集团化学试剂有限公司; 全氟丙烷( $C_3F_8$ ): 购于天津核工业理化研究院; 氢气( $H_2$ ): 购于深圳深特工业气体有限公司; 250~300 g 的 SD 雄性大鼠: 购于广东省实验动物中心。

超声成像系统: 加拿大 Visual Sonics 公司制造; 颗粒计数分析仪: 美国 Particle Sizing Systems (PSS) 公司制造; 通台式离心机: 美国 Beckman Coulter 公司制造; 正置金相荧光显微镜: 德国 Leica DM 4000 M 制造。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 氢气微泡的制备

将二硬脂酸磷脂酰胆碱(DSPC)和二硬脂酸磷脂酰乙醇胺聚-乙二醇(DSPE-PEG2000)以摩尔比 9:1 于三氯甲烷中溶解, 并在涡旋混合器上混匀。采用干燥的  $N_2$  流除去溶剂, 使磷脂在试管壁上形成一层均匀的薄膜, 并置于真空烘箱中干燥 2 小时以上。抽真空后加入 5 mL 脱气的 0.1 mol/L Tris 缓冲溶液(含 10% 甘油和 10% 丙二醇, pH 7.4), 加热溶液到其相转变温度(55~60℃)进行水化, 并用水浴超声处理制成清澈透明的磷脂溶液, 分装到 5 瓶 4 mL 的西林瓶中(1 mL/瓶), 密封后将瓶中的空气用全氟丙烷进行置换, 获得纯全氟丙烷微泡(即普通微泡), 然后再以一定数量的氢气置换其中的全氟丙烷, 采用机械震荡法即可获得以一定比例混合的  $C_3F_8/H_2$  微泡, 简称氢气微泡。

#### 2.2.2 氢气微泡的表征分析

氢气微泡经离心后, 通过颗粒计数分析仪检测其粒径分布及浓度, 重复 3 次; 将其悬浮液稀释后, 利用正置显微镜明场下观察其形态及分散性。

#### 2.2.3 氢气微泡在自然条件下的氢气释放特性

取一定量的氢气微泡置于一定体积的磷酸盐

缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)中, 迅速注入锥形瓶中并盖上胶塞, 用便携式氢气检测仪检测氢气微泡在自然条件下氢气释放量随时间的变化关系。其中, 以时间为  $x$  轴, 氢气浓度为  $y$  轴画图。

### 2.2.4 氢气微泡的体外超声成像

将浓度分别为  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$  微泡/毫升的氢气微泡置于琼脂仿体胶孔中, 以不含氢气微泡的 PBS 为阴性对照, 用超声成像仪从防体侧面检测氢气微泡的超声成像效果, 以确定该浓度微泡的超声信号强度。

### 2.2.5 氢气微泡的体内超声成像

SD 雄性大鼠经水合氯醛麻醉后仰卧位固定, 将用 PBS 稀释后的微泡通过尾静脉注射于大鼠体内, 用超声成像仪对大鼠左心室室腔、心肌组织以及肝脏等部位进行超声成像, 评价氢气微泡在体内的超声成像效果, 并测定氢气微泡的体内超声信号强度随时间的变化关系。

## 3 结果

### 3.1 氢气微泡的制备及其表征

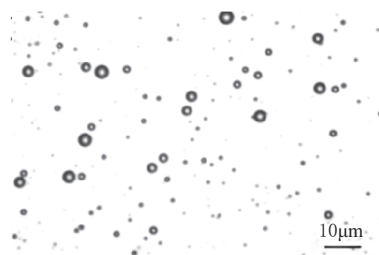
震荡前, 将获得的普通微泡(具体过程见方法部分)通过 2.5 mL 注射器将 1.5 mL 氢气置换到西林瓶中, 同时通过另一针头将瓶中质量较重的全氟丙烷挤压出去, 换气后机械震荡 30 s 便可获得氢气微泡( $H_2:C_3F_8=1:1$ ), 结果如图 1(a)所示。将氢气微泡置于显微镜下观察其形态, 可见微泡形态规则、呈球形、中心透亮、分散性好、彼此之间无黏附聚集, 具体如图 1(b)所示。用颗粒计数器检测其粒径分布和浓度, 测得氢气微泡平均粒径为  $(0.92 \pm 0.03) \mu m$ , 浓度为  $(1.14 \pm 0.07) \times 10^{10}$  微泡/毫升, 结果如图 1(c)所示。

### 3.2 氢气微泡的体外释放

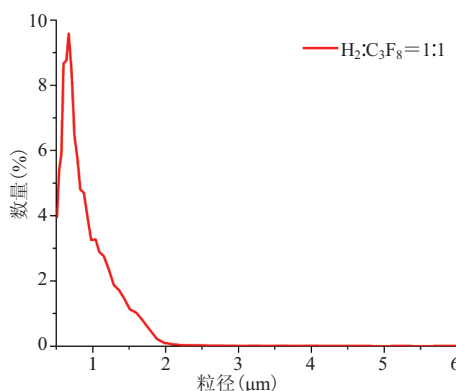
取新鲜制备的含 1 mL 氢气微泡的 PBS 溶



(a) 1:1 氢气微泡实物图



(b) 在光学显微镜下的氢气微泡(黑色标尺为 10  $\mu m$ )



(c) 氢气微泡的粒径分布曲线

图 1 氢气微泡的制备与表征

Fig. 1 Preparation and characterization of  $H_2$ -MBs

液, 用便携式氢气检测仪测得氢气释放量随时间的变化关系(见图 2)。从图 2 可以看出, 随着时间增加, 微泡释放氢气含量显著增加, 大约在 80 s 时, 氢气含量达到最大值, 约为  $(33.45 \pm 0.67)$  ppm, 之后保持不变。

### 3.3 氢气微泡的体外超声造影

将氢气微泡悬浮液分别稀释至  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$  微泡/毫升浓度, 超声成像结果如图 3 所示。结果显示, 氢气微泡回声较为均匀, 且随着微泡浓度增加, 其超声信号

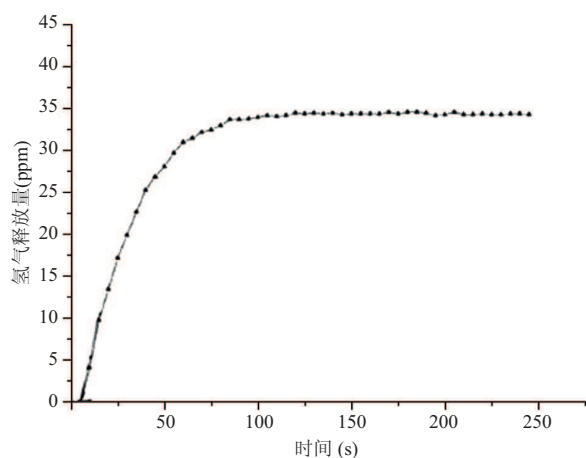


图2 氢气微泡释放量随时间的变化关系

Fig. 2 The relationship about the released hydrogen over time for  $H_2$ -MBs

强度也在增加, 各浓度微泡平均灰阶强度分别为  $(173.74 \pm 4.35)$  a.u.、 $(190.09 \pm 5.12)$  a.u.、 $(207.42 \pm 3.69)$  a.u.

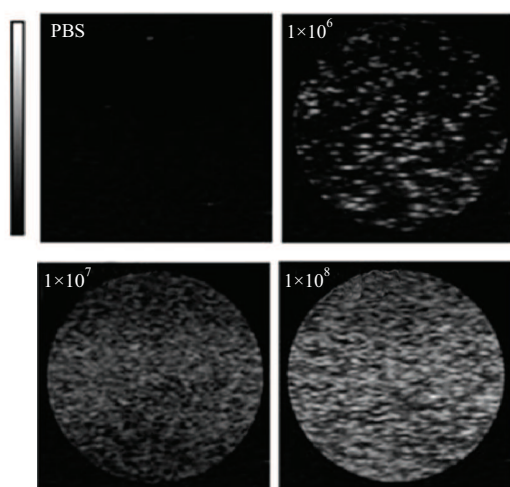


图3 体外氢气微泡实时超声成像

Fig. 3 Ultrasound contrast images for PBS and different concentrations of  $H_2$ -MBs in vitro

### 3.4 氢气微泡的体内超声成像

通过尾静脉注射  $0.1 \text{ mL } 1 \times 10^8$  微泡/毫升浓度的氢气微泡后, 大鼠左心室超声造影成像结果如图 4(a) 所示: 注射微泡后, 左心室室腔以及心肌组织的信号强度明显增强。从图 4(b) 的左心室定量分析结果可以看到, 心肌组织的信号衰减远

远快于左心室室腔: 心肌组织注射微泡后 5 s 左右即达到峰值, 为  $(80.05 \pm 0.82)$  dB, 在 86 s 时信号强度迅速衰减至  $(62.11 \pm 0.72)$  dB, 之后保持平缓降低; 左心室室腔在 80 s 后微泡信号强度达到最大, 为  $(81.26 \pm 0.68)$  dB, 之后保持一段时间的平缓灌注, 在 200 s 后开始下降。从图 4(c) 的大鼠肝脏超声造影成像结果可见, 超声信号在氢气微泡注射后明显增强。图 4(d) 是肝脏的超声信号强度定量分析结果: 注射微泡后约 5 s, 可看到超声信号强度迅速增强, 100 s 左右达到最大值, 为  $(71.75 \pm 0.43)$  dB, 至 450 s 时降至最低。目前国内还没有载氢气微泡的文献报道, 类似的已有用微泡包裹  $CO_2$  的研究<sup>[17,18]</sup>, 该作者的研究表明, 载  $CO_2$  也表现出较好的超声成像效果, 可见用微泡来作为治疗性气体是一种可行的途径。

## 4 讨论

近年来把氢气作为一种治疗性气体越来越受到学者的广泛关注。作为一种新型的治疗性气体, 氢气具有无毒、易扩散、安全性好的特点, 在消除缺血-再灌注过程中产生的过量氧自由基, 缓解缺血-再灌注引起的损伤具有独特的优势。除应用于缺血-再灌注损伤之外, 氢气也在放射损伤、器官缺血、动脉硬化、肝硬化、氧中毒、糖尿病、器官和系统炎症、创伤、一氧化碳中毒、神经退行性疾病等具有很好的防治作用<sup>[19]</sup>。其主要机制表明: 氢气主要可以通过抗氧化、抗炎、抗凋亡及信号通路调节等多方面发挥氢气的生物学效应, 其中氢气抗氧化作用被认为是氢气生物学效应的核心机制。此外, 氢气具有以下优点, ①选择性: 氢气的还原性相对较弱, 只有活性强和毒性强的活性氧才能与之反应, 而不与有重要信号作用的活性氧反应, 不会过多消除细胞内必不可少的活性氧, 这也是氢气选择性抗氧化的基

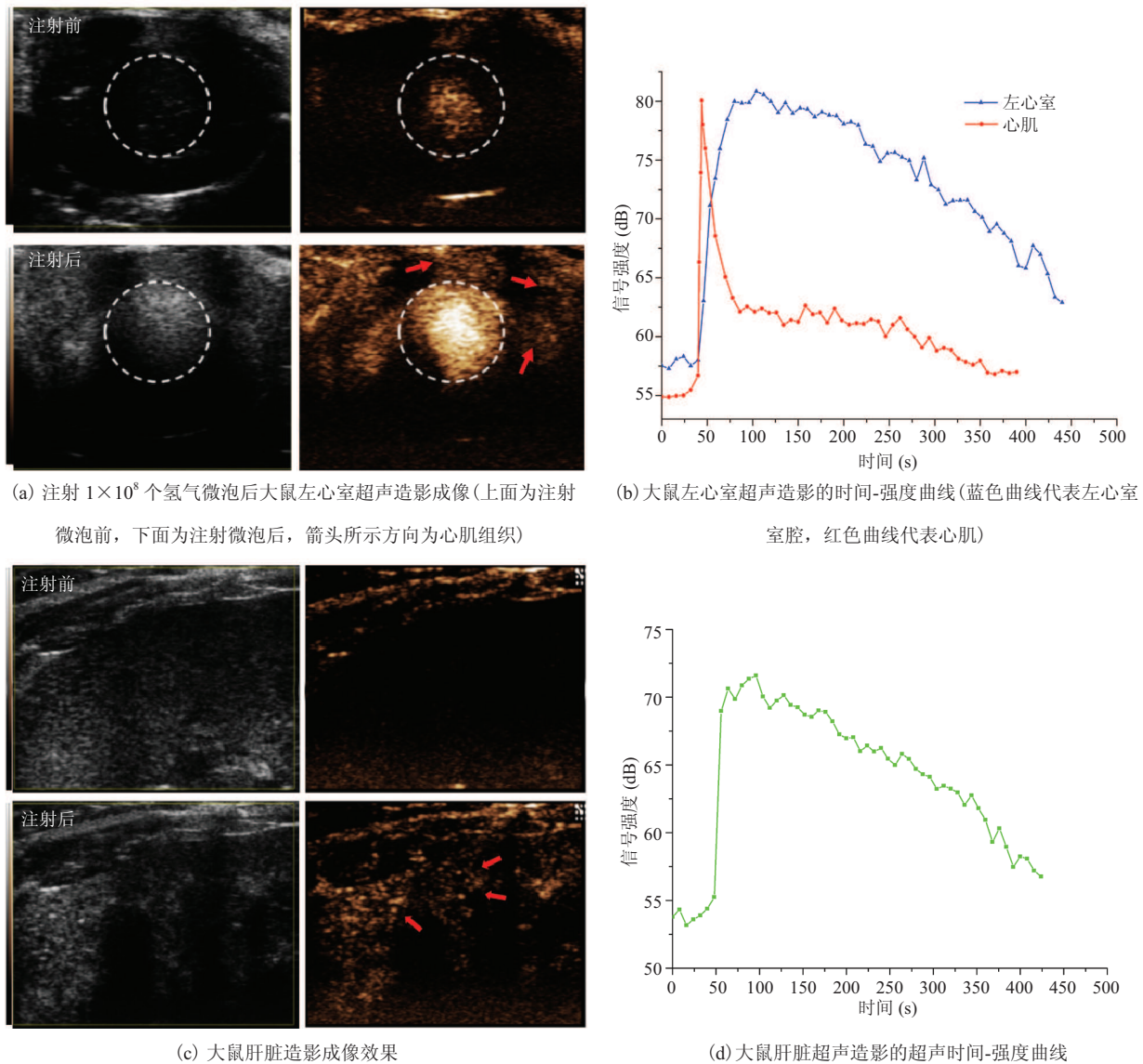


图 4 氢气微泡的体内超声成像

Fig. 4 Ultrasound imaging of the H<sub>2</sub>-MBs in vivo

础。②高效性: 氢气可以穿透生物膜, 弥散到胞质、线粒体及胞核中, 尽管氢气还原活性一般, 但作为气体, 其扩散速度快, 可更加高效地清除细胞内的毒性基团。③易清除性: 氢气不会在身体积累, 很容易通过呼吸释放到体外, 不会有任何残留, 这是明显不同于其他抗氧化物质的优势所在。④安全性: 潜水医学的长期研究表明, 人即使呼吸高压氢气也无明显不良反应。氢气水饮用的人体试验也证明饮用氢气水无明显不良反应<sup>[20]</sup>。

随着超声微泡的不断发展, 作为药物传递的载体用于疾病治疗具有以下几方面的优势: ①超声微泡可作为超声造影剂用于药物的示踪成像, 可实现药物在病灶部位的实时追踪; ②超声微泡用作药物的载体不仅可以较好地保护药物的活性, 还能在较高声压条件下被击碎, 释放所携带的药物, 可实现药物的定点控释; ③微泡在声场作用下产生的空化效应, 可使临近的内皮细胞产生瞬间可修复的微小孔隙并增大内皮细胞之间的

空隙, 血液中或微泡释放的药物可顺利透过血管或进入细胞, 从而增加药物的生物利用度。超声微泡这些优势使得超声靶向微泡爆破技术成为一种新型的超声辅助给药方法并引起广泛的关注<sup>[21]</sup>。

以上超声微泡的发展与应用, 使得氢气在体内可视化、输运、安全和稳定的治疗成为了可能。这是因为超声微泡是一种尺寸在微米量级、内含气体的微小气泡, 此外它还可以作为造影剂用于药物的示踪成像, 可实现药物在病灶部位的实时追踪, 实现了超声分子影像成像的目的。

本实验用超声脂质微泡包裹氢气, 以制成氢气微泡, 其粒径在 900 nm 左右, 有着性能稳定、声学性能好等优势。通过氢气微泡体外释放实验, 我们发现制备的氢气微泡可以在自然条件下自由释放氢气, 释放的氢气最高浓度达到约 34 ppm, 可以满足后续治疗实验的要求。通过对大鼠左心室和肝脏造影成像, 表明氢气微泡能显著增强左心室和肝脏的超声显影效果。由于氢气在生物体内抗氧化作用, 可以达到防护, 治疗某种疾病的目的, 因此, 氢气微泡既可用于造影成像, 也可用于药物传递, 基于这些优良的特性, 我们相信氢气微泡将来可作为一种新型超声辅助给药手段有着巨大的潜在应用。

## 5 结 论

本研究采用机械震荡法制备了新型的、性能稳定的载氢气的微泡。这种氢气微泡在光学显微镜下分散性好, 形态规则, 且在自然条件下可以自由释放氢气。更重要的是, 制备获得的氢气微泡具有较好的超声成像性能, 实现了氢气微泡在体内的实时示踪。我们的研究为氢气等治疗性气体在生物医学上的应用提供了有益的尝试和初步的成功经验。

## 参 考 文 献

- [1] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals [J]. *Nature Medicine*, 2007, 13(6): 688-694.
- [2] Nagatani K, Wada K, Takeuchi S, et al. Effect of hydrogen gas on the survival rate of mice following global cerebral ischemia [J]. *Shock*, 2012, 37(6): 645-652.
- [3] Manaenko A, Lekie T, Ma QY, et al. Hydrogen inhalation is neuroprotective and improves functional outcomes in mice after intracerebral hemorrhage [M] // *Intracerebral Hemorrhage Research*. Springer Vienna, 2011: 179-183.
- [4] Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, et al. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2008, 373(1): 30-35.
- [5] Nakao A, Kaczorowski DJ, Wang Y, et al. Amelioration of rat cardiac cold ischemia/reperfusion injury with inhaled hydrogen or carbon monoxide, or both [J]. *Journal of Heart Lung Transplantation*, 2010, 29(5): 544-553.
- [6] Huang Y, Xie KL, Li JP, et al. Beneficial effects of hydrogen gas against spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits [J]. *Brain Research*, 2011, 1378(5): 125-136.
- [7] Oharazawa H, Igarashi T, Yokota T, et al. Rapid diffusion of hydrogen protects the retina: administration to the eye of hydrogen-containing saline in retinal ischemia-reperfusion injury running title: protective effect of H<sub>2</sub> against retinal I/R injury [J]. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2010, 51(1): 487-492.
- [8] Kawamura T, Huang CS, Tochigi N, et al. Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of lung transplant-induced ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Transplantation*, 2010, 90(12): 1344-1351.
- [9] Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, et al. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by

- ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 361(3): 670-674.
- [10] Shingu C, Koga H, Hagiwara S, et al. Hydrogen-rich saline solution attenuates renal ischemia-reperfusion injury [J]. *Journal of Anesthesia*, 2010, 24(4): 569-574.
- [11] Lee JW, Kim JI, Lee YA, et al. Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of testicular ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Journal of Pediatric Surgery*, 2012, 47(4): 736-742.
- [12] Han C, Lin L, Zhang W, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning alleviates myocardial ischemic injury in rats [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2008, 233(11): 1448-1453.
- [13] Zheng X, Mao Y, Cai J, et al. Hydrogen-rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Free Radical Research*, 2009, 43(5): 478-484.
- [14] Chen C, Chen Q, Mao Y, et al. Hydrogen-rich saline protects against spinal cord injury in rats [J]. *Neurochemical Research*, 2010, 35(7): 1111-1118.
- [15] Zheng J, Liu K, Kang Z, et al. Saturated hydrogen saline protects the lung against oxygen toxicity [J]. *Undersea and Hyperbaric Medicine*, 2010, 37(3): 185-192.
- [16] Sun HY, Chen L, Zhou WP, et al. The protective role of hydrogen-rich saline in experimental liver injury in mice [J]. *Journal of Hepatology*, 2011, 54(3): 471-480.
- [17] Matsuda Y, Yabuuchi I. Hepatic tumors: US contrast enhancement with CO<sub>2</sub> microbubbles [J]. *Radiology*, 1986, 161(3): 701-705.
- [18] Zhang K, Xu HX, Chen HG, et al. CO<sub>2</sub> bubbling-based 'Nanobomb' system for targetedly suppressing panc-1 pancreatic tumor via low intensity ultrasound-activated inertial cavitation [J]. *Theranostics*, 2015, 5(11): 1291-1302.
- [19] Huang CS, Kawanura TY, Nakao A, et al. Recent advances in hydrogen research as a therapeutic medical gas [J]. *Free Radical Research*, 2010, 44(9): 971-982.
- [20] 扈红蕾, 白冰玉. 氢气在抗损伤实验研究中的应用探讨 [J]. *现代医药卫生*, 2012, 28(23): 3678.
- [21] Geis NA, Katus HA, Bekeredjian R. Microbubbles as a vehicle for gene and drug delivery: current clinical implications and future perspectives [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2012, 18(15): 2166-2183.