

# 载 IR780/PFH 纳米粒双模态成像及增效高强度聚焦超声消融牛肝的实验研究

杜燕 唐瑜 欧霞 林丽 张中 汪瑶 台罗 勇 邹建中

**摘要** 目的 制备载 IR780/全氟己烷(PFH)的脂质体纳米粒(IR780-CLs),评估其体外超声成像、光声成像和靶向肿瘤的能力,以及协同高强度聚焦超声(HIFU)消融牛肝的效果,探讨其增效 HIFU 的机制。方法 采用薄膜水化法制备 IR780-CLs,检测其基本理化性质,并观察其与 4TI 乳腺癌细胞的结合情况。体外超声成像即使用 120 W、30 s 的能量辐照 PBS 和 IR780-CLs 溶液,比较辐照前后二维超声和超声造影回声信号灰度变化值的差异;体外光声成像即将 IR780-CLs 分别配置成不同浓度(20、40、60、80  $\mu\text{g/ml}$ )溶液,获取其对应的光声信号值。通过离体牛肝实验评估 IR780-CLs 增效 HIFU 的作用,行被动空化检测并取宽带噪声信号幅度的均方根值(RMS)随时间变化曲线反映实时空化信号,比较牛肝内注入 PBS(PBS 组)和 IR780-CLs 溶液(IR780-CLs 组)后 RMS 的差异。结果 成功制备的 IR780-CLs 呈均匀的球形,平均电位为(34.5 $\pm$ 3.2)mV,平均粒径为(246.5 $\pm$ 12.4)nm,包封率为 88%,其能高效靶向 4TI 乳腺癌细胞。体外超声成像显示,IR780-CLs 辐照前后二维超声回声信号的灰度变化值分别为 42.09 $\pm$ 0.35 和 48.25 $\pm$ 0.93,超声造影回声信号的灰度变化值分别为 45.10 $\pm$ 0.74 和 87.30 $\pm$ 1.76,两者辐照前后回声信号的灰度变化值比较差异均有统计学意义(均  $P < 0.001$ );体外光声成像显示,浓度为 20、40、60、80  $\mu\text{g/ml}$  的 IR780-CLs 溶液对应的光声信号值分别为 0.476、0.864、1.378、1.996 a.u.。离体牛肝实验表明,IR780-CLs 具有显著增效 HIFU 的作用;被动空化检测结果显示,IR780-CLs 组 RMS 高于 PBS 组。结论 本实验成功制备 IR780-CLs,其具有良好的体外超声、光声双模态成像能力和靶向肿瘤的能力,并能显著提高 HIFU 消融牛肝的效率,其增效 HIFU 的主要机制为空化效应。

**关键词** 高强度聚焦超声;纳米粒;光声成像;空化效应

[中图分类号]R445.1

[文献标识码]A

## In vitro experimental study on bimodal imaging and enhanced high intensity focused ultrasound ablation of bovine liver with IR780/PFH nanoparticles

DU Yan, TANG Yu, OU Xia, LIN Li, ZHANG Zhong, WANG Yaotai, LUO Yong, ZOU Jianzhong  
College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**ABSTRACT Objective** To prepare loaded IR780/PFH nanoparticle (IR780-CLs), and to evaluate its in vitro ultrasound, photoacoustic imaging, tumor targeting ability, and the effect of ablation of bovine liver with high intensity focused ultrasound (HIFU), and to explore the mechanism of its synergistic effect on HIFU. **Methods** IR780-CLs were prepared by film-hydration method. The basic physicochemical properties of the nanoparticles were detected, and the binding of the nanoparticles to 4TI breast cancer cells was observed. In vitro ultrasound imaging was performed by irradiating PBS and IR780-CLs solution with energy of 120 W and 30 s, and the difference in grayscale changes of two-dimensional ultrasound and contrast-enhanced ultrasound echo signals before and after irradiation was compared. In vitro photoacoustic imaging configures IR780-CLs into different concentrations (20, 40, 60, 80  $\mu\text{g/ml}$ ) solution, its corresponding photoacoustic signal value was obtained. In vitro bovine liver experiment was used to evaluate the synergistic effect of IR780-CLs on HIFU in vitro, and through passive cavitation detection, the change curve of root mean square (RMS) of broadband noise signal amplitude with time was taken to reflect real-time cavitation signal. The difference in RMS after injection of PBS (PBS group) and IR780-CLs solution

基金项目:2021年度重庆市博士后科学基金项目(cstc2021jcyj-bshx0169)

作者单位:400016 重庆市,重庆医科大学生物医学工程学院 超声医学工程国家重点实验室

通讯作者:邹建中,Email:zoujzh@cqmu.edu.cn

(IR780-CLs group) into bovine liver was compared. **Results** The synthesized IR780-CLs were spherical and uniform, with an average surface potential of  $(34.5 \pm 3.2) \text{ mV}$  and diameter of  $(246.5 \pm 12.4) \text{ nm}$ , and encapsulation efficiency was 88%. IR780-CLs could efficiently target 4T1 breast cancer cells. In vitro ultrasound imaging showed that the grayscale changes of two-dimensional ultrasound and contrast-enhanced ultrasound before and after irradiation of IR780-CLs were  $42.09 \pm 0.35$ ,  $48.25 \pm 0.93$  and  $45.10 \pm 0.74$ ,  $87.30 \pm 1.76$ , respectively. The differences in grayscale changes before and after irradiation were statistically significant (both  $P < 0.001$ ). In vitro photoacoustic imaging showed that the corresponding photoacoustic signal values of IR780-CLs solutions with concentrations of 20, 40, 60, and 80  $\mu\text{g/ml}$  were 0.476, 0.864, 1.378 and 1.996 a.u., respectively. In vitro bovine liver experiment showed that it had a significant synergistic effect on HIFU. Passive cavitation detection showed that the RMS in IR780-CLs group was higher than that in PBS group. **Conclusion** IR780-CLs are successfully prepared in this experiment, which have good in vitro ultrasound and photoacoustic imaging capabilities, and can significantly improve the efficiency of HIFU ablation of bovine liver, cavitation effect is the main mechanism of enhancing the efficiency of HIFU.

**KEY WORDS** High intensity focused ultrasound; Nanoparticles; Photoacoustic imaging; Cavitation effect

恶性肿瘤会严重影响人类身心健康,尤其是乳腺癌,作为女性最常见的恶性肿瘤之一,受环境、遗传、生活方式等影响,近年其发病呈年轻化趋势<sup>[1-2]</sup>。因此,迫切需要探索一种精准的诊疗方式,早期发现并对症治疗,以减轻手术、放化疗带来的身体及心理负担,提高患者生活质量<sup>[3]</sup>。高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)作为一种非侵入性肿瘤消融新技术在临床已广泛应用,纳米粒协同 HIFU 可以提高消融肿瘤的效率,但其存在靶向性差、成像模式单一的局限。因此,如何更安全、高效地提高纳米粒协同 HIFU 消融肿瘤的疗效是临床亟需解决的问题。本实验通过制备载 IR780/全氟己烷(PFH)的脂质体纳米粒(IR780-CLs),旨在实现诊疗一体化的目的,为乳腺癌的精准诊疗提供新思路。

## 材料与方法

### 一、主要实验材料及仪器

1. 主要材料: IR780 碘化物(美国 Sigma 公司); 二甲基亚砜(DMSO)、三氯甲烷(重庆川东化工有限公司); 二棕榈酰基卵磷脂(DPPC)、聚乙二醇 2000(DSPE-PEG2000-Amine)、胆固醇盐酸盐(美国 Avanti 公司); PFH(上海麦克林生化科技有限公司); 4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、细胞膜红色荧光探针(DiI)均由上海碧云天生物技术有限公司提供; 4T1 乳腺癌细胞由重庆医科大学超声影像学研究所提供。

2. 主要仪器: 声震仪(XL2020, 美国 Sonic 公司); 旋转蒸发仪(RE-52AA, 上海亚荣生化仪器厂); 透射电镜(H-7600, 日本日立公司); Zeta 电位及粒度分析仪(美国布鲁克海文仪器公司); 超声波清洗仪(上海超声仪器有限公司); 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); 紫外分光光度计(NanoDrop 2000, 美国 Thermo

Scientific 公司); 高速离心机(德国 Eppendorf 公司); 声成像系统(Vevo LAZR, 加拿大 Visual Sonics 公司); 共聚焦显微镜(A1+R, 日本 Nikon 公司); DFY 软件(重庆医科大学超声影像学研究所), JC 200 海扶刀® 聚焦超声肿瘤治疗系统(重庆海扶医疗科技股份有限公司)。被动空化检测由空化检测换能器(V309-SU, 焦距 40 mm, 直径 13 mm, 中心频率 5 MHz, 美国泛美公司)、NI 超高速数据采集卡(PXIe-5122, 美国国家仪器有限公司)及 LabVIEW 数据采集程序(v10.0.1, 美国国家仪器有限公司)组成。

### 二、实验方法

1. IR780-CLs 的制备: 使用电子天平按质量比 12:4:4:1 精密称取 DPPC、DSPE-PEG2000-Amine、胆固醇盐酸盐、IR780 碘化物, 加入 100 ml 的圆底烧瓶内, 并将 15 ml 三氯甲烷置于水浴锅内充分溶解。于避光条件下将装有混合物的圆底烧瓶连接在旋转蒸发仪上, 设置参数为  $45^\circ\text{C}$ 、100 r/min, 1 h 后去除圆底烧瓶内的三氯甲烷, 瓶壁形成均匀的脂质体薄膜。加入 2 ml PBS 至烧瓶内, 置于超声波清洗仪上充分振荡使脂质体薄膜完全溶解, 将溶解后的脂质体溶液转移至 10 ml EP 管内, 加入 200  $\mu\text{l}$  PFH, 在冰浴条件下将上述混合液用声振仪均质乳化 3 min (功率 125 W, 工作时间 2 s, 间歇 1 s)。将乳化后的 IR780-CLs 溶液转移至 15 ml 离心管, 加入双蒸水至 10 ml 再放入高速离心机(8000 r/min、5 min)中洗涤 3 次, 弃掉离心后的上清液和未包裹的材料, 得到同时包裹 IR780 与 PFH 的脂质体纳米粒白色沉淀, 最后加入 10 ml 去离子水重悬纳米粒, 置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱保存、备用。

2. IR780-CLs 基本理化性质的检测: 将制备好的 IR780-CLs 用去离子水稀释后, 使用透射电镜观察纳米粒的形态, Zeta 电位及粒度分析仪检测其电位和粒

径。将 IR780 碘化物溶解于 DMSO 配置成不同浓度 (1、2、5、10、20、30、40  $\mu\text{g/ml}$ ) 的混合液, 使用紫外分光光度计检测其特异性吸收峰和不同浓度 IR780 在特异性吸收峰下的吸光度, 并绘制标准曲线计算其包封率。

3. IR780-CLs 的体外靶向性检测: 将对数生长的 4T1 乳腺癌细胞接种至共聚焦培养皿中培养, 24 h 后加入 DiI 标记的 IR780-CLs, 分别孵育 0.5、2、4 h 后用 PBS 洗涤 3 次, 去除多余纳米粒, 并用 4% 多聚甲醛固定细胞, 最后避光加入 DAPI 进行细胞核染色, 使用共聚焦显微镜观察纳米粒与 4T1 乳腺癌细胞的结合情况。

4. IR780-CLs 的体外双模态成像: ①体外超声成像。使用琼脂糖凝胶粉制作带孔的固体脂糖凝胶模型, 取 PBS 和 IR780-CLs 溶液 (80  $\mu\text{g/ml}$ ) 各 1 ml 置于琼脂糖凝胶块中, 用 120 W、3 s 的能量辐照, 采集辐照前后的二维及超声造影图像, 并用 DFY 软件对回声信号的灰度变化值进行定量分析。②体外光声成像。使用琼脂糖凝胶粉制作带孔的固体脂糖凝胶模型, 将 IR780-CLs 配置成不同浓度 (20、40、60、80  $\mu\text{g/ml}$ ) 溶液, 取上述溶液各 100  $\mu\text{l}$  分别置于琼脂糖凝胶块中, 放入光声成像系统进行光声成像, 获取其光声信号值。

5. 离体牛肝实验及被动空化检测: 选择肝实质均匀、肝内管道较少的一整叶新鲜离体牛肝, 洗净后将其置于脱气水中负压脱气 50 min, 切成 100 mm $\times$ 100 mm $\times$ 50 mm 块状并置于底部有透声膜的 HIFU 专用模具内, 用注射器抽取 PBS 和 IR780-CLs 溶液各 100  $\mu\text{l}$  垂直插入牛肝内 (分别设为 PBS 组和 IR780-CLs 组), 通过聚焦超声肿瘤治疗系统对牛肝内针头的位置进行准确定位, 保证针头位置与 HIFU 辐照焦点重合, 然后推出注射器内溶液, 即刻用不同能量 (120 W、3 s, 150 W、3 s, 180 W、3 s) 进行辐照, 同时采用空化检测换能器检测空化信号。使用带通滤波器提取 3~7 MHz 信号, 并对该频带范围内的谐波信号及高次谐波附近  $\pm 30$  kHz 的信号进行滤除, 得到瞬态空化发生特征信号的宽带噪声。取宽带噪声信号幅度的均方根值 (RMS) 随时间变化曲线作为反映实时空化信号的指标。HIFU 辐照后, 沿消融最大面切开, 测量靶区凝固性坏死区体积并计算能效因子 (EEF),  $\text{EEF}(\text{J}/\text{mm}^3) = \eta \text{PT}/V$ , 其中  $\eta = 0.7$ , 为 HIFU 换能器系数,  $V$  为 HIFU 辐照后靶区产生的凝固性坏死区体积,  $P$  为辐照功率,  $T$  为辐照时间。EEF 越低, 代表 HIFU 消融效率越高。

### 三、统计学处理

应用 SPSS 25.0 统计软件, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多

组比较采用单因素方差分析, 两组比较采用独立样本  $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、IR780-CLs 的基本理化性质

成功制备的 IR780-CLs 外观呈绿色乳液状, 透射电镜显示纳米粒呈表面光滑的球形, 粒径约 200~300 nm (图 1), 平均粒径为  $(246.5 \pm 12.4) \text{ nm}$ , 表面带正电荷, 平均电位为  $(34.5 \pm 3.2) \text{ mV}$ 。紫外分光光度计检测不同浓度 IR780 吸收光谱, 发现 IR780 在 780 nm 处出现特异性吸收峰。通过特异性吸收峰与浓度的关系, 得到 IR780 浓度-吸光度标准曲线:  $Y = 0.0191X + 0.0439 (R^2 = 0.9909)$ , 其包封率为 88%。

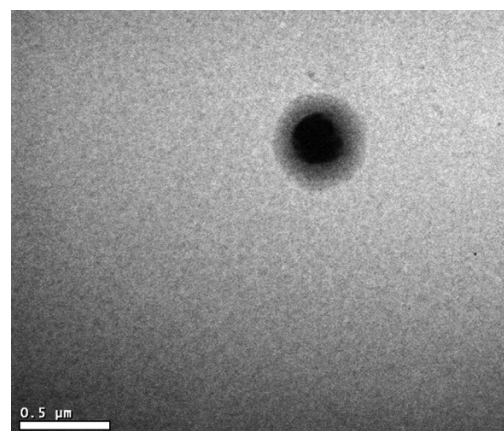


图 1 IR780-CLs 透射电镜图

### 二、IR780-CLs 的体外靶向性检测结果

共聚焦显微镜显示 DiI 标记的纳米粒呈红色荧光, DAPI 标记的细胞核呈蓝色荧光。随着孵育时间的延长, 靶向至细胞周围的 IR780-CLs 逐渐增多。见图 2。

### 三、IR780-CLs 的体外双模态成像结果

1. 体外超声成像显示, IR780-CLs 辐照前后二维超声回声信号的灰度变化值分别为  $42.09 \pm 0.35$  和  $48.25 \pm 0.93$ , 超声造影回声信号的灰度变化值分别为  $45.10 \pm 0.74$  和  $87.30 \pm 1.76$ , 两者辐照前后回声信号的灰度变化值较差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ ); 而 PBS 无明显变化。见图 3。

2. 体外光声成像显示, 浓度为 20、40、60、80  $\mu\text{g/ml}$  的 IR780-CLs 溶液对应的光声信号值分别为 0.476、0.864、1.378、1.996 a.u.。见图 4。

### 四、离体牛肝增效实验结果

HIFU 辐照后, 牛肝靶区凝固性坏死区呈边界清晰、形态规则的灰白色 (图 5); 随辐照能量的增加, IR780-CLs 组和 PBS 组牛肝凝固性坏死区体积均增



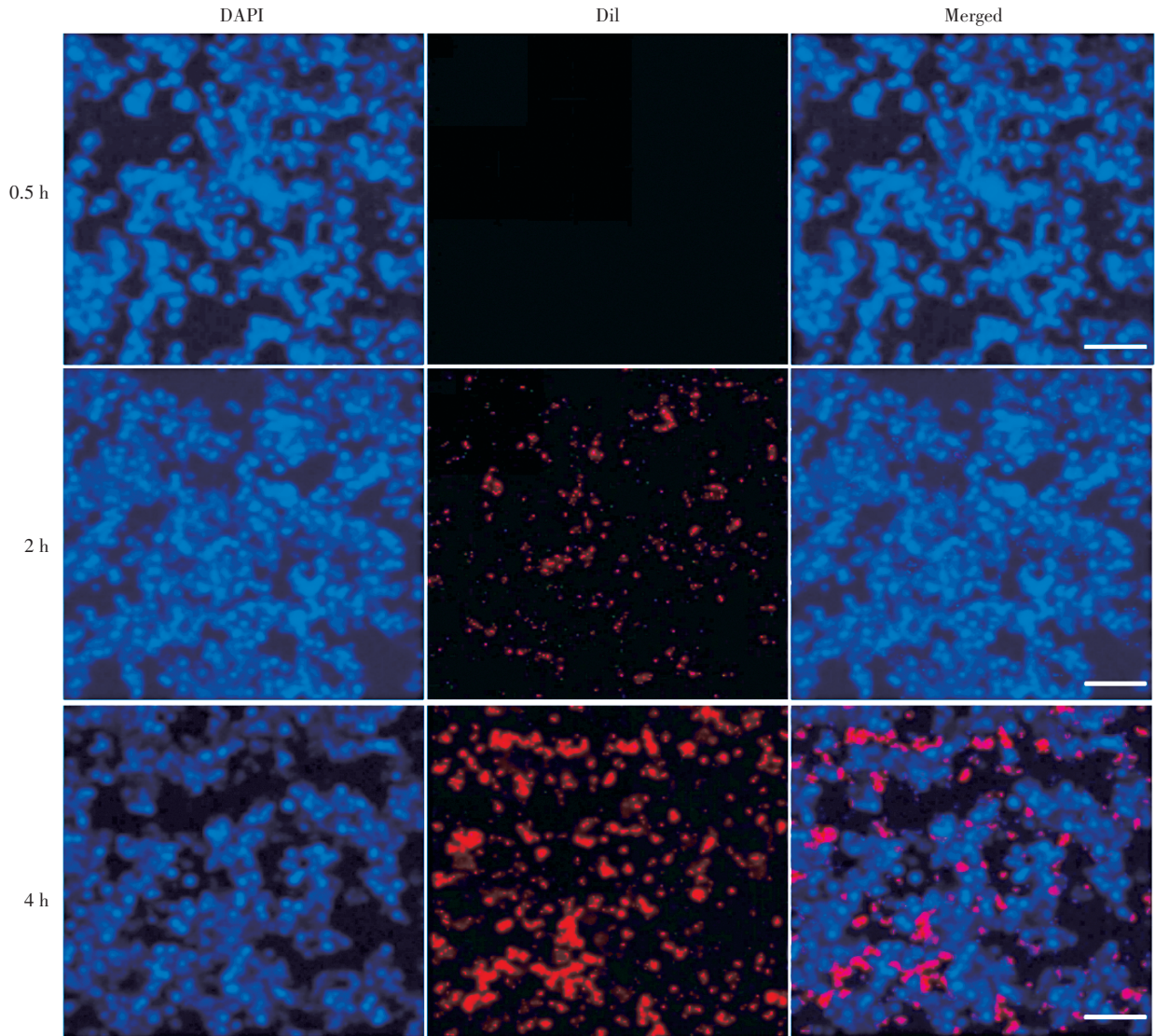


图2 IR780-CLs的体外靶向性检测图(标尺为100 μm)

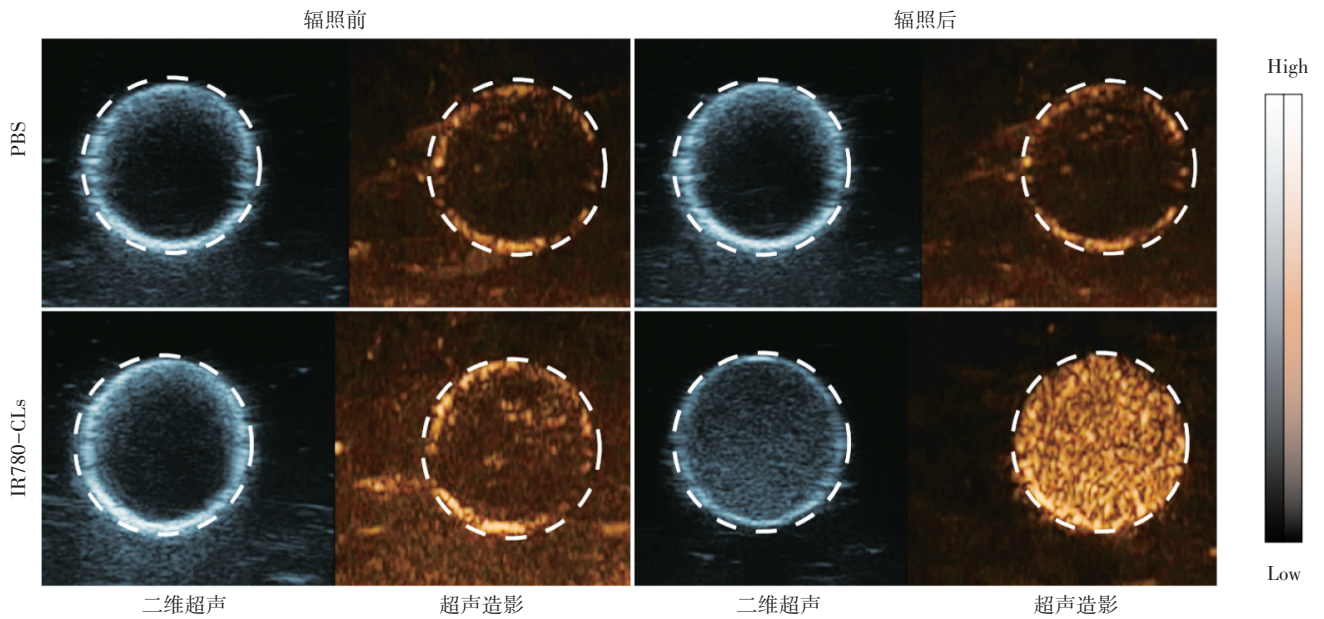
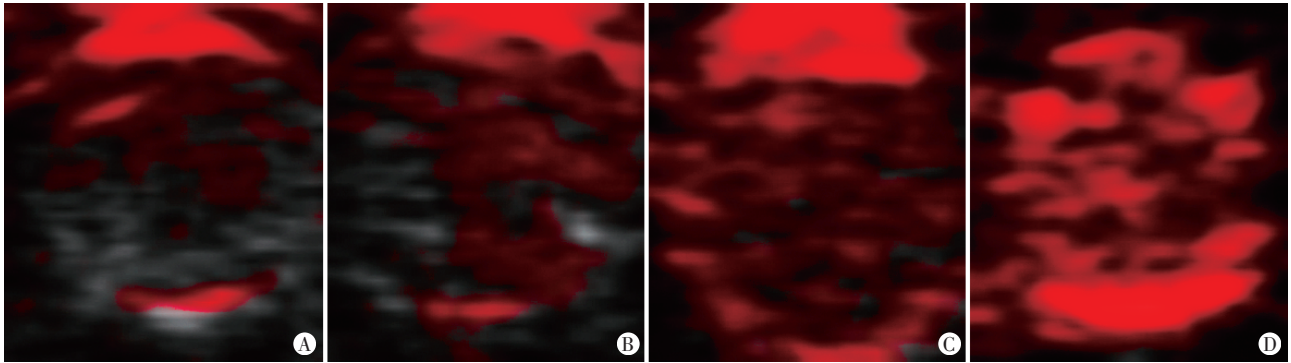


图3 PBS和IR780-CLs辐照前后二维超声和超声造影图





A:浓度为20 µg/ml;B:浓度为40 µg/ml;C:浓度为60 µg/ml;D:浓度为80 µg/ml

图4 不同浓度IR780-CLS溶液的体外光声成像图

加,EEF均减小,两组比较差异均有统计学意义(均  $P<0.001$ )。见表1。

### 五、被动空化检测结果

被动空化检测结果显示,随着HIFU辐照能量的增加,IR780-CLS组和PBS组RMS均增加,在同一HIFU辐照能量下,IR780-CLS组的RMS均高于PBS组。见图6。

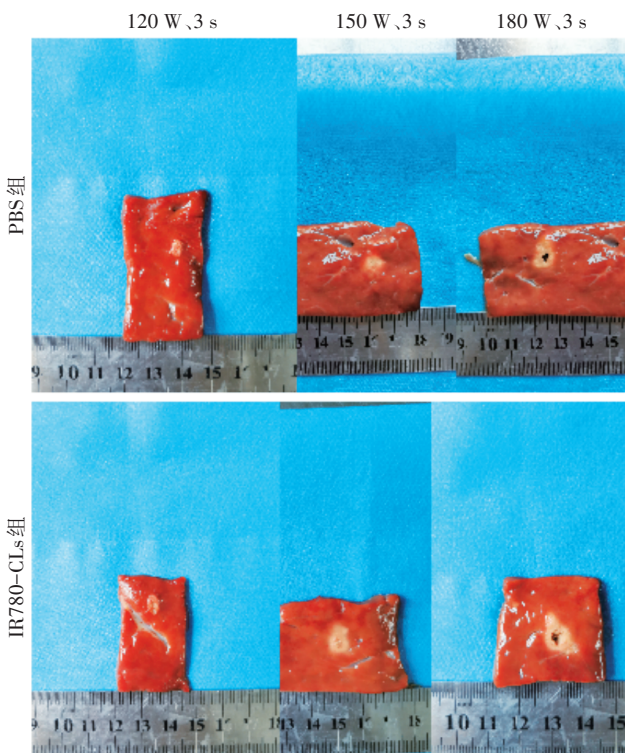


图5 两组不同HIFU辐照能量下离体牛肝凝固性坏死区大体图

表1 两组不同HIFU辐照能量下离体牛肝凝固性坏死区体积及EEF比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	120 W, 3 s		150 W, 3 s		180 W, 3 s	
	凝固性坏死区 体积(mm <sup>3</sup> )	EEF (J/mm <sup>3</sup> )	凝固性坏死区 体积(mm <sup>3</sup> )	EEF (J/mm <sup>3</sup> )	凝固性坏死区 体积(mm <sup>3</sup> )	EEF (J/mm <sup>3</sup> )
PBS组	38.98±0.53	6.47±0.09	88.03±1.58	2.86±0.05	145.95±1.99	1.73±0.02
IR780-CLS组	81.17±1.53 <sup>#</sup>	3.11±0.06 <sup>#</sup>	164.36±3.75 <sup>#</sup>	1.54±0.04 <sup>#</sup>	512.05±3.19 <sup>#</sup>	0.49±0.01 <sup>#</sup>

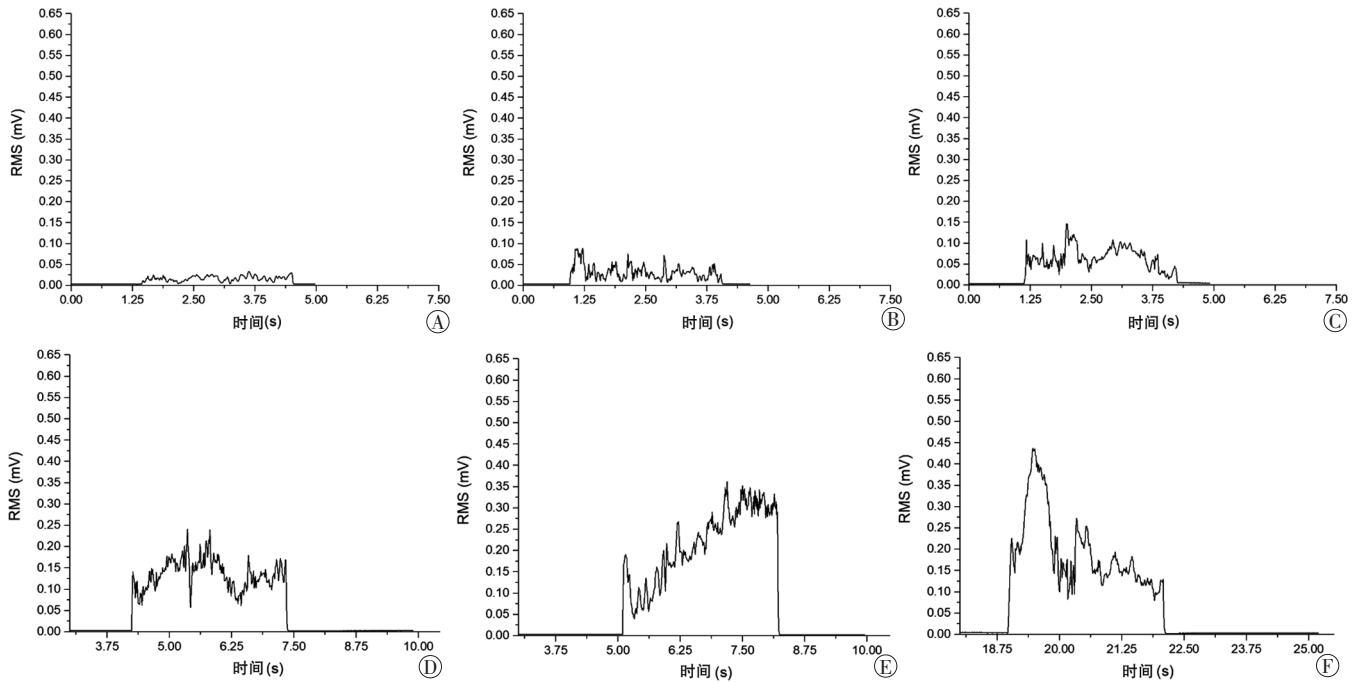
与PBS组同一辐照能量下比较,<sup>#</sup> $P<0.001$ 。EEF:能效因子

### 讨 论

HIFU是一种微创治疗肿瘤的新技术,现已广泛应用于各种实体肿瘤的临床治疗<sup>[4]</sup>,但如何提高HIFU对形态不规则、边界不清晰、体积较大及血供丰富肿瘤的消融效率一直是临床亟需解决的问题<sup>[5]</sup>。纳米粒能改善肿瘤靶区的微环境,有研究<sup>[6-7]</sup>表明将其作为HIFU增效剂能提高消融效率;孙廷宇等<sup>[8]</sup>使用脂质纳米氟碳液滴(L-PFP)协同HIFU消融兔肝的实验研究发现,L-PFP通过增强空化效应能有效提高HIFU消融效率。但单一成像模式的纳米粒在HIFU消融肿瘤的同时不能提供全面的诊断信息,而包裹光热材料的纳米粒能在实现有效显像的同时对肿瘤进行治疗,可以极大地增强肿瘤的诊疗效果。本实验应用薄膜水化法成功制备同时包裹IR780与PFH的多功能纳米粒IR780-CLS,旨在评估其体外超声、光声双模态成像能力及其协同HIFU增效体外消融牛肝的效果,并初步探讨其增效机制。

本实验体外超声成像结果显示,IR780-CLS辐照后二维超声及超声造影回声信号的灰度变化值均较辐照前增加,差异均有统计学意义(均  $P<0.001$ ),分析原因主要为IR780-CLS包裹PFH,PFH作为一种相变材料,常温下为液态,性质稳定<sup>[9]</sup>,HIFU辐照靶区产生的热效应能激发PFH发生液气相变产生微泡,增强靶区空化效应,从而提高HIFU消融肿瘤的效率<sup>[10]</sup>。体外光声成像实验结果显示,IR780-CLS具有良好的光声成像能力,光声信号值随纳米粒溶液浓度增加呈线性增加。IR780是一种近红外荧光染料,除了具有良好的近红外荧光性能外,纳米粒体外靶向检测也表明IR780-CLS能很好地与4T1乳腺癌细胞结合。与既往研究<sup>[11-12]</sup>报道IR780具有肿瘤线粒体靶向能力,可特异性聚集于肿瘤区域的结论相符,为进一步开展体内精准诊疗提供了可行性依据。

离体牛肝实验结果表明,随辐照能量的增加,IR780-CLS组和PBS组靶区凝固性坏死区体积均增



A~C: PBS 组, 辐照能量依次为 120 W、3 s, 150 W、3 s, 180 W、3 s; D~F: IR780-CLs 纳米粒组, 辐照能量依次为 120 W、3 s, 150 W、3 s, 180 W、3 s

图 6 两组不同 HIFU 辐照能量下离体牛肝靶区内 RMS 随时间变化规律

加, EEF 均减小, 两组比较差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ )。分析原因为 IR780-CLs 中的 PFH 在 HIFU 辐照时发生液气相变产生微泡, 明显增加了靶区空化核的数量, 有效增加 HIFU 辐照时的空化效应。本实验被动空化检测结果显示, 在 HIFU 辐照过程中 PBS 组产生的 RMS 较低, 而 IR780-CLs 组 RMS 较高, 说明空化效应在 IR780-CLs 协同增效 HIFU 过程中发挥了主要的作用, 为体内抗肿瘤研究奠定了基础。

综上所述, 本实验成功制备 IR780-CLs, 体外实验表明其具有良好的超声、光声双模态成像能力, 并能显著提高 HIFU 消融牛肝的效率, 空化效应可能为其增效 HIFU 的主要机制, 但其在体内的效果及作用尚需今后进一步探讨。

参考文献

[1] 张奕, 罗远利, 刘当, 等. 载锰卟啉/紫杉醇的相变纳米粒多模态成像及靶向治疗肿瘤的体外实验研究[J]. 临床超声医学杂志, 2021, 23(10): 721-726.  
 [2] Yeo W, Pang E, Liem GS, et al. Menopausal symptoms in relationship to breast cancer-specific quality of life after adjuvant cytotoxic treatment in young breast cancer survivors[J]. Health Qual Life Outcomes, 2020, 18(1): 24.  
 [3] Choi JW, Moon BI, Lee JW, et al. Use of CA15-3 for screening breast cancer: an antibody-lectin sandwich assay for detecting glycosylation of CA15-3 in sera[J]. Oncol Rep, 2018, 40(1): 145-154.  
 [4] Xu D, Zou W, Luo Y, et al. Feasibility between Bifidobacteria targeting and changes in the acoustic environment of tumor tissue for

synergistic HIFU[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 7772.  
 [5] Wang Y, Chen C, Luo Y, et al. Experimental study of tumor therapy mediated by multimodal imaging based on a biological targeting synergistic agent[J]. Int J Nanomedicine, 2020, 15(3): 1871-1888.  
 [6] Zhong X, Zhang M, Tian Z, et al. The study of enhanced high-intensity focused ultrasound therapy by sonodynamic  $N_2O$  microbubbles[J]. Nanoscale Res Lett, 2019, 14(1): 381.  
 [7] Wu D, Jin X, Wang X, et al. Engineering temperature-sensitive platelets as a tailored chemotherapy platform in combination with HIFU ablation for cancer treatment[J]. Theranostics, 2019, 9(13): 3966-3979.  
 [8] 孙廷宇, 王琦, 叶合敏, 等. 高强度聚焦超声联合脂质纳米氟碳液滴消融兔肝的实验研究[J]. 临床超声医学杂志, 2022, 24(3): 161-165.  
 [9] Guo X, Mei J, Jing Y, et al. Curcumin-loaded nanoparticles with low-intensity focused ultrasound-induced phase transformation as tumor-targeted and pH-sensitive theranostic nanoplatfrom of ovarian cancer [J]. Nanoscale Res Lett, 2020, 15(1): 73.  
 [10] Zhang N, Cai X, Gao W, et al. A multifunctional theranostic nanoagent for dual-mode image-guided HIFU/Chemo-synergistic cancer therapy[J]. Theranostics, 2016, 6(3): 404-417.  
 [11] Zhang L, Yi H, Song J, et al. Mitochondria-targeted and ultrasound-activated nanodroplets for enhanced deep-penetration sonodynamic cancer therapy[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11(9): 9355-9366.  
 [12] Ma B, Sheng J, Wang P, et al. Combinational phototherapy and hypoxia-activated chemotherapy favoring antitumor immune responses[J]. Int J Nanomedicine, 2019, 14(1): 4541-4558.

(收稿日期: 2023-02-05)