

# 基于多功能超声造影剂的肿瘤分子成像和可视化联合精准治疗的专家共识

山东省中西医结合学会超声专业委员会

**[摘要]** 纳米级超声造影剂是超声分子影像学发展的重要方向,也是肿瘤靶向性、可视化精准治疗及实现诊疗一体化的新方向。如何制备生物安全性、超声显影能力和靶向负载能力更高的超声造影剂等问题,亟待进一步规范。为此制定了多功能纳米超声造影剂用于肿瘤分子成像和诊疗一体化的专家共识,以新型多功能壳聚糖纳米泡携带阿霉素,体内外实验证实其具有较好的稳定性、生物安全性、靶向性及较强的肿瘤杀伤能力,为规范多功能纳米超声造影剂的制备、安全性评价及诊疗一体化应用等奠定基础。

**[关键词]** 超声造影剂;分子成像;靶向治疗;诊疗一体化;专家共识

超声造影技术是现代超声领域研究的热点之一,其具有无电离辐射、低成本、可实时成像等优势,还能够超声辐照下产生声孔效应,使更多治疗药物进入细胞内发挥作用<sup>[1-2]</sup>。超声靶向微泡破坏技术已被用于溶栓治栓、药物递送、基因治疗、肿瘤耐药逆转等临床领域<sup>[3-6]</sup>。随着超声分子成像技术和生物纳米技术的迅猛发展,纳米级超声造影剂成为近年来分子影像学领域的研究热点之一,其可有效克服传统肿瘤药物治疗靶向性差、全身毒副作用大等缺点,具有很强的穿透力,能穿过肿瘤组织血管壁间隙,其开发和应用还有利于进一步发展靶向性、高效性、小型化且具有辅助治疗作用的新型超声造影剂。纳米级超声造影剂是超声分子影像学发展的重要方向,也是肿瘤靶向性、可视化精准治疗及实现诊疗一体化的新方向<sup>[7]</sup>。近年来,虽然纳米超声造影剂作为新型靶向给药系统及实现诊疗一体化的重要意义已取得共识,但如何制备具有更高生物安全性及稳定性的纳米超声造影剂等问题,亟待进一步规范,为此制定了多功能纳米超声造影剂用于肿瘤分子成像和诊疗一体化的专家共识,以规范多功能纳米超声造影剂的制备、安全性评价及诊疗一体化应用等问题。

## 1 新型纳米级超声造影剂的制备及表征

为了降低由于制作材料毒性带来的健康损害和安全隐患,用于组装超声纳米泡(nanobubbles, NBs)材料的生物相容性、可降解性和安全性至关重要<sup>[8-10]</sup>。多糖壳聚糖由于其天然来源、生物降解性、生物相容

性、极低的免疫原性、抗菌活性及实用性而备受关注<sup>[11-13]</sup>。本共识中设计的NBs以天然壳聚糖材料为外壳,加入卵磷脂和棕榈酸2种生物安全性高的天然物质作为辅助材料<sup>[14-16]</sup>。

**1.1 负载阿霉素的壳聚糖 NBs 的制备** 根据先前描述的方法<sup>[17-19]</sup>,以中等分子量壳聚糖(100~300 kD)作为壳材料,全氟丙烷用作NBs的核心,制备了新型负载阿霉素(doxorubicin, DOX)的壳聚糖NBs。先将适量DOX溶解在超纯水中,用涡旋混合器混合后,加入到壳聚糖水溶液中。将DOX-壳聚糖溶液放置在65℃温箱内温育1h。另将棕榈酸溶于超纯水中,再把含有Epikuron 200的乙醇溶液加入棕榈酸溶液里,加入适量超纯水,使用涡旋混合器将棕榈酸-Epikuron 200系统均化。随后,将棕榈酸-Epikuron 200溶液分装于数个1.5 mL eppendorf(EP)管中,用10 mL注射器把EP管中的空气替换为全氟丙烷。每个密封EP管在银汞调和器中振荡120 s。在冰浴状态下,将EP管中所有液体依次倒入盛有DOX-壳聚糖溶液的离心管中,轻轻上下晃动离心管混合均匀。最后,将制成的NBs在4℃下温育30 min。再在玻璃棒轻轻搅拌下将微量Pluronic F68(0.01%, w/w)水溶液作为稳定剂加入上述混合液中。以超滤离心方式进行透析提纯NBs,除去溶液中残留的游离DOX和其他材料。

**1.2 DOX-NBs 的物理化学表征** 制备的NBs显示出球形形态,在倒置显微镜下,呈离散且完整的球形轮廓(图1a),这与荧光显微镜成像一致(图1b)。DOX-NBs溶液的代表性透射电子显微镜图像见图1c。NBs的物理性质由粒度和zeta电位分析仪确定。DOX-NB的平均直径为641 nm,PI 0.256。DOX-NBs的zeta电位为(67.12±2.1) mV,足以使它们相互排斥,有助于预防NBs聚集以维持其长期稳定性。

**1.3 DOX-NBs 的稳定性和载药效率** DOX-NBs在

DOI: 10.3969/j.issn.1672-0512.2019.06.001

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(81771843);山东省重点研发计划项目(2017GSF18107)。

**[通信作者]** 李杰,山东大学齐鲁医院超声科,E-mail:23758753@qq.com。

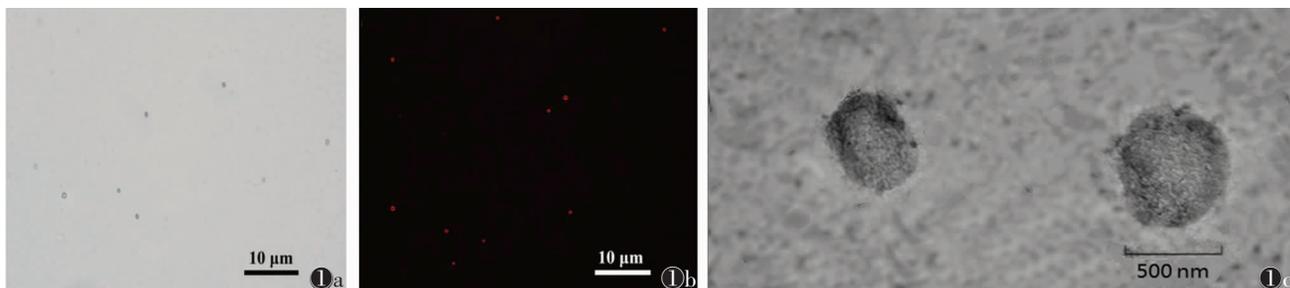


图 1 DOX-NBs 的物理表征 图 1a 光学显微镜下观察到的 NBs(放大倍数 1 000 倍) 图 1b DOX-NBs 的荧光显微镜图像 图 1c DOX-NBs 的透射电子显微镜图像

室温 4 ℃放置 24 h 及 48 h, 粒径大小无显著变化。在 25 ℃储存 6 h 后, 磷酸盐缓冲液和人血清中 DOX-NBs 的粒径均略增大。使用 UV 分光光度计(UV-2450, SHIMADZU)测量 DOX 的荧光强度, 测得 DOX-NBs 的最终 DOX 负载量为 64.12 mg/g DOX-NBs, 相当于药物包封效率为 54.18%。

1.4 DOX-NBs 的超声成像能力及稳定性检测 DOX-NBs 的超声增强显像效果和稳定性用超声诊断仪 GE Logiq E9 进行体外验证(图 2), 结果显示, DOX-NBs 获得了良好的超声增强效果; NBs 悬浮液中的超声衰减过程相对较慢, 表明 DOX-NBs 的超声信号可足够稳定以用于成像和对比度增强。

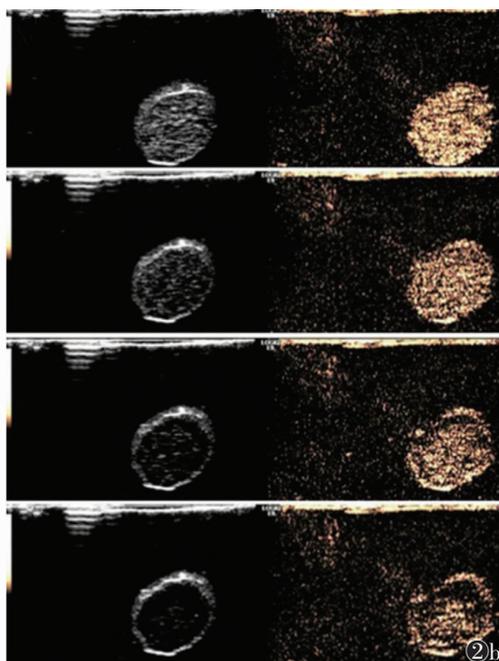
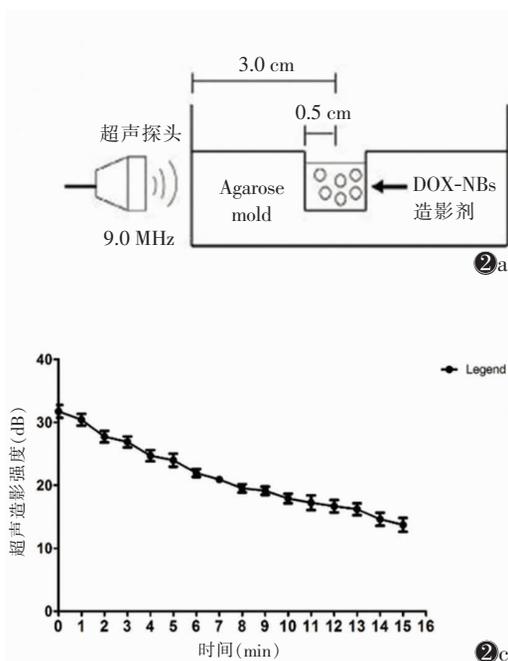


图 2 体外验证 图 2a 体外实验装置 图 2b 体外实验装置分别在 0、5、10 和 15 min 时 DOX-NBs 的超声增强显像 图 2c 15 min 内 DOX-NBs 的 TIC

## 2 新型纳米级超声造影剂的体内、外安全性评价

2.1 NBs 的细胞毒性测定 使用 70% 占空比和 100 Hz 脉冲率的低强度超声治疗仪以 1 MHz 的固定频率对加入不同浓度 NBs 的乳腺癌 MCF-7 细胞行超声刺激(表 1)<sup>[20]</sup>。使用八肽胆囊收缩素(CCK-8)试剂盒(Sigma-Aldrich, USA)测试空壳聚糖 NBs 的生物安全性。NBs 在一定的超声强度下几乎不影响细胞活力。当使用 0.5 W/cm<sup>2</sup> 的超声强度照射 30 s 后, 在含有 10% NBs 悬浮液的培养基中有 99.53% 的 MCF-7 细胞存活; 在含有 30% NBs 悬浮液的培养基中超过 80% 的细胞存活(图 3)。可见, MCF-7 细胞活力的降低与

NBs 的浓度具有剂量依赖性关系。此外, 超声强度和辐照时间也是影响 MCF-7 细胞活力的因素。为保证超声造影的生物安全性, 超声强度 0.5 W/cm<sup>2</sup> 和辐照时间 30、60 s 被用于细胞摄取实验。

表 1 CCK-8 试剂测定的不同组中的超声辐照条件

组别	辐照时间(t/s)	超声强度(W/cm <sup>2</sup> )
第 1 组	30	0.5
第 2 组	60	0.5
第 3 组	60	1.0

2.2 NBs 的体内安全性评价 选取健康清洁级小鼠按照给药方式和剂量的不同, 随机分为 a~f 共 6

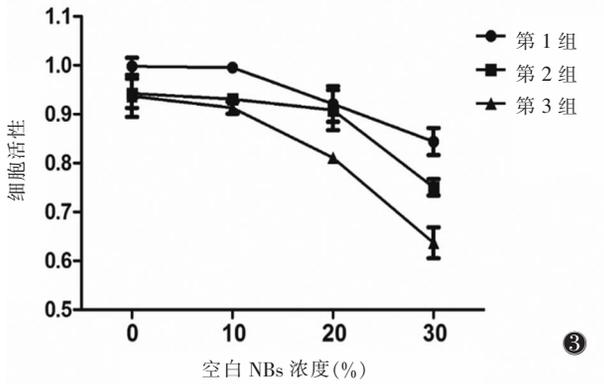


图 3 不同浓度的空白 NBs 和超声强度在 MCF-7 细胞中的体外细胞毒性

组, 每组 10 只(表 2)。参照文献<sup>[21-22]</sup>, 口服时按总剂量 2 100 mg/kg 体质量、给药容积 0.8 mL/只, 分 2 次进行, 为当日(8 时、16 时); 腹腔注射时, 一次性注入总剂量 240 mg/kg 体质量, 给药容积 0.5 mL/只; 静脉注射时, 小鼠尾静脉一次性注入总剂量 80 mg/kg 体质量, 给药容积 0.5 mL/只。阴性对照组给予等量的灭菌蒸馏水作为对照。

表 2 实验小鼠的分组

组别	口服	静脉注射	腹腔注射
NBs	a	c	e
阴性对照	b	d	f

注: NBs, 纳米泡。

给药后观察小鼠的一般情况, 饲养 14 d 后检测小鼠的生化指标(包括尿素氮、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、总蛋白、白蛋白、三酰甘油、胆固醇、血糖等)、各脏器的病理学变化(包括心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肺脏等)。结果显示, 给药后各组小鼠均未出现死亡、体质量增长情况(表 3), 组间比较差异均无统计学意义(均  $P>0.05$ )。静脉注射组给药当日部分小鼠出现短暂的站立不稳、食欲下降和饮水量增多情况。其余各组及对照组小鼠均未出现异常。各组小鼠生化指标均在正常范围; 大体标本组织颜色、形态均未见显著异常, 病理切片各脏器均未见异常改变(均  $P>0.05$ )。

表 3 各组小鼠体质量增长情况

组别	体质量(g, $\bar{x} \pm s$ )			最大耐受量(g/kg 体质量)
	初始	7 d	14 d	
a	20.61 ± 1.20	27.83 ± 1.25	32.52 ± 1.75	>20
b	20.79 ± 1.16	27.94 ± 1.19	32.93 ± 1.71	>20
c	20.79 ± 1.18	27.78 ± 1.04	33.34 ± 1.27	>20
d	21.13 ± 0.88	27.85 ± 1.78	33.25 ± 1.38	>20
e	20.31 ± 1.13	27.72 ± 1.98	33.23 ± 1.63	>20
f	20.60 ± 1.26	27.64 ± 1.83	33.28 ± 1.52	>20

### 3 新型纳米级超声造影剂的靶向递药能力

3.1 DOX-NBs 杀伤能力的体外研究 将 MCF-7 细胞分 6 组: DOX 组; DOX-NBs 组; DOX+ 超声 1 (0.5 W/cm<sup>2</sup>, 30 s) 组; DOX-NBs+ 超声 1 组; DOX+ 超声 2 (0.5 W/cm<sup>2</sup>, 60 s) 组; DOX-NBs+ 超声 2 组。

3.1.1 体外细胞内药物摄取 使用流式细胞技术测定 DOX 的细胞内摄取<sup>[23]</sup>。分别给予刺激后, 离心收集细胞, 重悬后放置于 FACS Calibur 流式细胞仪上分析。在无超声辐照状态下, 用 DOX-NBs 孵育的 MCF-7 细胞的平均荧光强度远低于用游离 DOX 孵育细胞的自发荧光强度(图 4)。说明在非超声辐照部位, NBs 能够减少细胞对其负载药物的摄取, 可通过降低化疗药物的摄取及其诱导的细胞损伤保护机体循环中的正常组织细胞。在超声辐照下, DOX-NBs 孵育的 MCF-7 细胞摄取 DOX 显著增加, 说明超声辐照 DOX-NBs 能够显著提高 MCF-7 细胞对 DOX 的摄取率。

3.1.2 DOX-NBs 和超声辐射介导的体外 DOX 递送及杀伤能力的增强 用 CCK-8 细胞毒性试验定量评估 DOX-NBs 及游离 DOX 对 MCF-7 细胞的杀伤能力<sup>[23]</sup>, 结果显示, 未经超声辐照时, DOX-NBs 组细胞存活率(21.0% ± 2.2%)明显高于游离 DOX 组(6.4% ± 0.7%) ( $P<0.01$ ), 说明以 NBs 作为药物传递载体, 能够显著改善 DOX 在机体循环中诱导的非病变部位(无辐照部位)的组织细胞损伤。此外, 与单独使用 DOX-NBs 治疗的细胞(21.0% ± 2.2%)相比, DOX-NBs+ 超声组(超声 1 组、超声 2 组)的细胞存活率(3.1% ± 0.8%, 2.2% ± 0.9%)显著降低( $P<0.01$ )。同时, DOX-NBs+ 超声组(超声 1 组、超声 2 组)的细胞存活率也小于游离 DOX 组(6.4% ± 0.7%)和游离 DOX+ 超声组(超声 1 组、超声 2 组)(4.1% ± 0.8%, 3.8% ± 0.6%) (图 5)。结果表明 DOX-NBs+ 超声显著增强了 DOX 在 MCF-7 细胞中的细胞毒性作用。

3.2 DOX-NBs 杀伤能力的体内研究 将小鼠分为对照组、DOX 组、DOX+ 超声组、DOX-NBs+ 超声组、2 × DOX-NBs+ 超声组, 每组 7 只, 分别在小鼠肿瘤后第 7 天、第 9 天、第 11 天进行 DOX-NBs 及等浓度的 DOX 水溶液局部注射治疗, 治疗剂量为 0.1 mL NBs 或相应浓度的 DOX 水溶液, 第 13 天处死各组小鼠, 取出肿瘤组织。体质量记录为肿瘤当天测量和治疗后处死前测量, 比较差值。瘤体变化为肿瘤后治疗时的大小与处死当天的瘤体大小差异。各组间体质量和瘤体体积变化差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。两两比较显示: DOX 组、DOX+ 超声组、DOX-NBs+

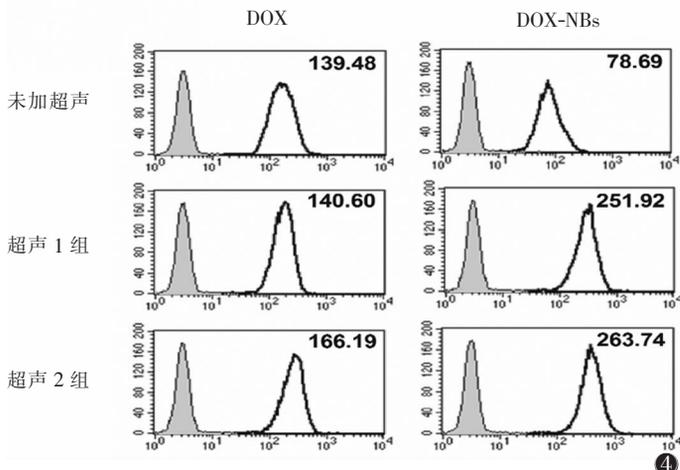
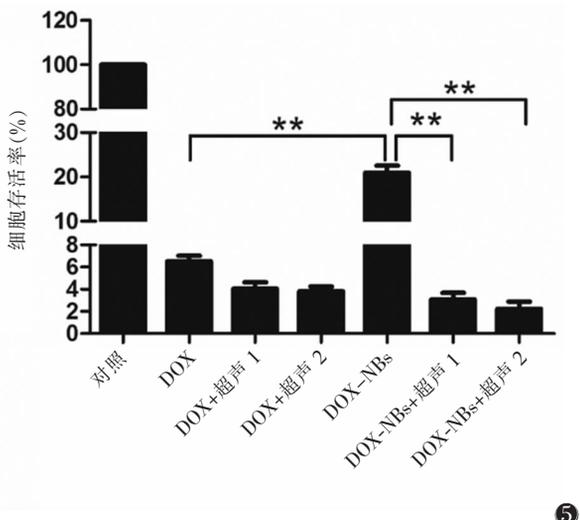


图 4 各组 MCF-7 细胞摄取 DOX 的荧光强度(超声 1 组:超声强度 0.5 W/cm<sup>2</sup>,辐照时间 30 s,超声 2 组:超声强度 0.5 W/cm<sup>2</sup>,辐照时间 60 s) 图 5 不同组中 MCF-7 细胞活力的比较



超声组体质量变化均大于对照组(均  $P < 0.05$ ),DOX-NBs+ 超声组体质量变化大于  $2 \times$ DOX-NBs+ 超声组 ( $P < 0.05$ ),其他组间体质量变化差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。DOX 组、DOX+ 超声组、DOX-NBs+ 超声组、 $2 \times$ DOX-NBs+ 超声组瘤体积变化明显小于对照组(均  $P < 0.05$ ),DOX-NBs+ 超声组、 $2 \times$ DOX-NBs+ 超声组瘤体积变化小于 DOX 组(均  $P < 0.05$ ),DOX-NBs+ 超声组瘤体积小于 DOX+ 超声组( $P < 0.05$ ),其他组间瘤体积变化差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ ) (表 4)。

表 4 各组间体质量和瘤体积变化的比较

组别	体质量变化(g)	瘤体积变化(cm <sup>3</sup> )
对照组	-1.30 ± 0.82	0.74 ± 0.35
DOX 组	0.60 ± 0.43♦	0.40 ± 0.17♦
DOX+超声组	0.12 ± 1.44♦	0.19 ± 0.36♦
DOX-NBs+超声组	1.30 ± 0.80♦	-0.24 ± 0.17♦▼
$2 \times$ DOX-NBs+超声组	-0.10 ± 1.89▲	-0.07 ± 0.14♦*
F 值	4.514	16.214
P 值	0.006	<0.001

注:♦与对照组相比, $P < 0.05$ ;\*与 DOX 组相比, $P < 0.05$ ;▼与 DOX+超声组相比, $P < 0.05$ ;▲与 DOX-NBs+超声组相比, $P < 0.05$ 。

综上所述,本共识制备的负载 DOX 的生物相容性壳聚糖 NBs,其具有良好的超声增强显像能力和极高的生物安全性,并能有效包载 DOX,实现靶向递送及增强其肿瘤杀伤能力。体内外研究结果均证明,DOX-NBs 是一种创新的药物递送系统,可用于获得有效的超声辅助 DOX 递送,为实现肿瘤诊疗一体化提供了新思路,为规范多功能纳米超声造影剂的制备、安全性评价及诊疗一体化应用等奠定基础。

本共识核心专家:李杰(山东大学齐鲁医院超声科),董磊(中国人民解放军第 960 医院超声科),姜忠强(山东大学齐鲁儿童医院超声科),丁红宇(山东第一医科大学第一附属医院超声科),李荔[山东大学齐鲁医院(青岛)超声科]。

致谢:本共识在撰写过程中还有 156 位专家提供了宝贵的修改意见,在此谨致以诚挚谢意。

[参考文献]

- [1] Qin J,Wang TY,Willmann JK,et al. Applications for cancer therapy[J]. Adv Exp Med Biol,2016,880:263-291.
- [2] Bouakaz A,Zeghimi A,Doimikov AA,et al. Concept and mechanisms[J]. Adv Exp Med Biol,2016,880:175-189.
- [3] Brozovic A. The relationship between platinum drug resistance and epithelial-mesenchymal transition[J]. Arch Toxicol,2017,91: 605-619.
- [4] Mezencev R,Matyunina LV,Jabbari N,et al. Snail-induced epithelial-to-mesenchymal transition of MCF-7 breast cancer cells: systems analysis of molecular changes and their effect on radiation and drug sensitivity[J]. BMC Cancer,2016,16:236.
- [5] Wu F,Shao ZY,Zhai BJ,et al. Ultrasound reverses multidrug resistance in human cancer cells by altering gene expression of ABC transporter proteins and Bax protein[J]. Ultrasound Med Biol,2011,37:151-159.
- [6] Wang D,Luo W,Wen G,et al. Synergistic effects of negative-charged nanoparticles assisted by ultrasound on the reversal multidrug resistance phenotype in breast cancer cells[J]. Ultrason Sonochem,2017,34:448-457.
- [7] 姚元志,王志刚. 多模态多功能超声造影剂的应用进展[J]. 临床超声医学杂志,2016,18(7):474-476.
- [8] Kam NW,Dai H. Carbon nanotubes as intracellular protein transporters:generality and biological functionality[J]. J Am Chem Soc,2005,127:6021-6026.

- [9] Shvedova AA, Kisin ER, Porter D, et al. Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: two faces of Janus? [J]. *Pharmacol Ther*, 2009, 121: 192-204.
- [10] 毕红, 余乐乐, 宋梦梦. 无机纳米载体在靶向药物输送中的应用研究进展[J]. *安徽大学学报(自然科学版)*, 2011, 35(3): 1-8.
- [11] Sakhrani NM, Padh H. Organelle targeting: third level of drug targeting [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2013, 7: 585-599.
- [12] Moreira AF, Dias DR, Costa EC, et al. Thermo- and pH-responsive nano-in-micro particles for combinatorial drug delivery to cancer cells [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 104: 42-51.
- [13] Ding Y, Zhang L, Shi G, et al. Preparations and doxorubicin controlled release of amino-acid based redox/pH dual-responsive nanomicelles [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 77: 920-926.
- [14] Moghimipour E, Rezaei M, Ramezani Z, et al. Folic acid modified liposomal drug delivery strategy for tumor targeting of 5-fluorouracil [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 114: 166-174.
- [15] Liu E, Zhang M, Cui H, et al. Tat-functionalized Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites as tissue-penetrating vehicles for tumor magnetic targeting and drug delivery [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8: 956-968.
- [16] 林静, 张瑞, 韩森, 等. 一种新型 CO<sub>2</sub> 响应型肿瘤靶向药物传递载体 [J]. *功能高分子学报*, 2017, 30(3): 327-332.
- [17] Rovers TAM, Sala G, Linden EVD, et al. Temperature is key to yield and stability of BSA stabilized microbubbles [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 52: 106-115.
- [18] Lin CY, Javadi M, Belnap DM, et al. Ultrasound sensitive eLiposomes containing doxorubicin for drug targeting therapy [J]. *Nanomedicine*, 2014, 10: 67-76.
- [19] Duan S, Guo L, Shi D, et al. Development of a novel folate-modified nanobubbles with improved targeting ability to tumor cells [J]. *Ultrason Sonochem*, 2017, 37: 235-243.
- [20] Shi D, Guo L, Duan S, et al. Influence of tumor cell lines derived from different tissue on sonoporation efficiency under ultrasound microbubble treatment [J]. *Ultrason Sonochem*, 2017, 38: 598-603.
- [21] Zhang C, Qu G, Sun Y, et al. Biological evaluation of N-octyl-O-sulfate chitosan as a new nano-carrier of intravenous drugs [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2008, 33: 415-423.
- [22] 文明, 宋琳, 柏玮, 等. 纳米级超顺磁性氧化铁的制备及其对小鼠急性毒性作用的观察 [J]. *第二军医大学学报*, 2007, 28(10): 1104-1108.
- [23] Zhou X, Guo L, Shi D, et al. Biocompatible chitosan nanobubbles for ultrasound-mediated targeted delivery of doxorubicin [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2019, 14: 24.

(收稿日期 2019-08-02)

## 信 息

# 《中国中西医结合影像学杂志》2020 年征订启事

《中国中西医结合影像学杂志》是中国中西医结合学会系列杂志之一,由中国科学技术协会主管、中国中西医结合学会和山东中医药大学附属医院主办,于 2003 年第 1 季度正式创刊。本刊已被知网、万方、维普等收录。

本刊以中西医结合影像学临床与实验研究为主要内容,重视影像学研究的新进展、新理论及新技术,以普及和提高相结合,促进中西医结合影像学的发展。主要栏目有专家论坛、针灸影像学、智能影像学、神经影像学、头颈部影像学、胸部影像学、乳腺影像学、腹部影像学、骨骼肌肉影像学、介入放射学、继续教育园地、信息等。读者对象为广大医学影像工作者及中医、西医临床医师。目前,杂志网站、微信公众号及维普网均已实现了文献的开放获取(OA)。

本刊为双月刊,105 g 铜版纸印刷,国内外公开发行;国

内统一连续出版物号 CN 11-4894/R,国际标准连续出版物号 ISSN 1672-0512;广告经营许可证号 3700004000190;每期定价 15 元,全年 90 元。

订阅方式:银行汇款,户名:中国中西医结合影像学杂志社;账户:632081629310001;开户行:招商银行济南分行营业部;附言注明“订阅 2020 年杂志”。

本刊地址:山东省济南市经十路 16369 号《中国中西医结合影像学杂志》编辑部;邮编:250014;电话:(0531) 68616919;传真:(0531) 82666651;E-mail: yxbjb@vip.163.com;网址: <http://jhyx.cbpt.cnki.net>;微信公众号: zgzxyjhyxzz。

《中国中西医结合影像学杂志》编辑部