

## ❖ 实验研究

## Effect of sonodynamic therapy on H22 tumor-bearing mice using hematoporphyrin-loaded PLGA ultrasound contrast agents

ZHANG Ya-ping<sup>1</sup>, RAN Hai-tao<sup>1\*</sup>, WANG Zhi-gang<sup>1</sup>, ZHANG Hui<sup>1</sup>, LI Pan<sup>1</sup>, LANG Qing<sup>2</sup>

(1. Institute of Ultrasonic Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China;

2. Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the treatment effect on H22 tumor-bearing mice using ultrasound (US) combined with hematoporphyrin-loaded PLGA ultrasound contrast agents (HP-PLGA). **Methods** Hematoporphyrin-loaded PLGA ultrasound contrast agents were prepared using the technique of double emulsion, and the properties of the contrast agents were detected. Then 30 H22 tumor-bearing mice were averagely divided into 5 groups for different treatment. The growth curve of H22 tumor was depicted within 15 days after treatment. The inhibition rate of tumor quality on the 15th day and the index about apoptosis and proliferation on tumor of each group were measured, respectively. **Results** Self-made hematoporphyrin-loaded PLGA ultrasound contrast agents had mean size of 602.3 nm with encapsulation efficiency of 63.50% and drug loading of 2.15%. After treatment, tumors of the E group (US+HP-PLGA) grew most slowly compared with other groups. The inhibition rate of tumor quality and the apoptotic index in E group were significantly higher than those in other four groups ( $P < 0.05$ ), while the proliferation index in E group was significantly lower than that in other groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Ultrasound combined with hematoporphyrin-loaded PLGA ultrasound contrast agents could inhibit growth and promote the apoptosis of H22 tumor in mice, providing a novel strategy for sonodynamic therapy on the tumor.

**[Key words]** Hematoporphyrin; Microbubbles; Sonodynamic therapy; H22 tumor

## 载血卟啉 PLGA 微泡用于声动力 治疗小鼠 H22 肝癌移植瘤

张亚萍<sup>1</sup>, 冉海涛<sup>1\*</sup>, 王志刚<sup>1</sup>, 张辉<sup>1</sup>, 李攀<sup>1</sup>, 郎清<sup>2</sup>

(1. 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学附属第二医院传染科, 重庆 400010)

**[摘要]** **目的** 研究超声联合载血卟啉 PLGA 造影剂对小鼠 H22 肝癌皮下移植瘤的声动力治疗作用。**方法** 自制载血卟啉高分子材料 PLGA 造影剂并检测其基本特性。选择 30 只荷 H22 肝癌皮下移植瘤小鼠, 随机平均分为 5 组进行治疗, 绘制治疗后 15 天内肿瘤体积生长曲线, 比较其质量抑瘤率, 并采用 TUNEL 和 PCNA 检测各组小鼠肿瘤细胞凋亡情况及增殖活性。**结果** 自制的载血卟啉 PLGA 微泡造影剂平均粒径为 602.3 nm, 分布均匀, 包封率 63.50%, 载药量 2.15%。治疗后, 与其他各组比较, 超声加载药微泡治疗组肿瘤生长曲线最平缓, 质量抑瘤率及凋亡指数均显著高于其他 4 组 ( $P < 0.05$ ), 而增殖指数明显低于其他各组 ( $P < 0.05$ )。**结论** 超声联合载血卟啉高分子纳米造影剂能够抑制小鼠 H22 肝癌移植瘤生长, 促进其凋亡。

**[关键词]** 血卟啉; 微泡; 声动力疗法; H22 肿瘤

**[中图分类号]** R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2010)04-0593-04

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30770565、30900370、30770566)、重庆市自然科学基金与科技攻关项目(CSTC, 2006BB5291)。

**[作者简介]** 张亚萍(1979—), 女, 四川乐山人, 在读硕士, 医师。研究方向: 超声医学诊断、治疗。E-mail: apple\_0606yp@yahoo.cn

**[通讯作者]** 冉海涛, 重庆医科大学超声影像学研究所, 400010。E-mail: rht66@163.com

**[收稿日期]** 2009-11-08 **[修回日期]** 2010-01-08

声动力疗法(sonodynamic therapy, SDT)是于 20 世纪 70 年代继光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)之后新兴的一种抗肿瘤技术。其基本原理是利用超声与声敏剂的协同作用杀灭肿瘤细胞<sup>[1]</sup>。血卟啉(hematoporphyrin, HP)是一种常用的声敏剂,但光毒性反应限制了其临床应用。近年来,超声微泡造影剂在肿瘤诊治中的研究不断取得进展<sup>[2-4]</sup>。本实验采用可生物降解的高分子材料乳酸/羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]制备出载血卟啉 PLGA 超声造影剂(HP-PLGA 微泡),通过建立小鼠 H22 肝癌皮下移植瘤模型,观察该新型造影剂用于声动力疗法对在体肿瘤的抑制效应,为采用声动力疗法治疗恶性肿瘤提供一种新的思路。

1 材料与方法

1.1 一般材料 清洁级昆明小鼠 35 只,雄性,6~8 周龄,体重(20±2)g(重庆医科大学实验动物中心提供);H22 小鼠肝癌细胞株(本实验室提供);血卟啉盐酸盐(美国 Alfa 公司)、PLGA(聚合比例为 65:35);YJT-银汞胶囊调合器(上海医疗器械股份有限公司)、CGZZ 型超声基因转染治疗仪(本研究所研制)。

1.2 实验方法

1.2.1 PLGA 超声微泡的制备 ①制备空白 PLGA 超声微泡:将适量 PLGA 溶于 1 ml 二氯甲烷中,加入 200 μl 双蒸水,机械振荡后倒入 5% 聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)溶液高速分散均质 5 min,加 2% 异丙醇溶液,常温下磁力搅拌 2~5 h,以 3500 r/min 离心、漂洗,真空冷冻干燥 48 h 后充入氟烷气体即得空白 PLGA 超声微泡冻干粉,于 4℃ 冰箱保存。光学显微镜观察其形态及分布。②制备载血卟啉 PLGA 超声微泡(HP-PLGA 微泡):HP 盐酸盐加双蒸水和少量 PBS 配成浓度为 10 mg/ml 的溶液。将①中的 200 μl 双蒸水替换成 200 μl HP 溶液,余过程相同,即得到 HP-PLGA 微泡。检测其粒径、包封率和载药量。

1.2.2 建立动物肿瘤模型 35 只昆明小鼠背臀部备毛。将培养中处于对数生长期的 H22 细胞株稀释成浓度约为 4.60 × 10<sup>7</sup>/ml 的细胞悬液。在每只昆明小鼠背臀部皮下注射细胞悬液 0.25 ml,密切观察肿瘤生长情况。

1.2.3 实验分组及处理 接种后 1 周,35 只小鼠背臀部均可见并触及肿瘤,选取其中直径约 1.0 cm 的 30 只小鼠进行实验。按随机分组的原则分为 5 组,每组 6 只,即空白对照组(A 组):经小鼠尾静脉推注生理盐水 0.2 ml;单纯超声辐照组(B 组):超声定位辐照肿瘤部位,超声频率 1 MHz,声强为 2 W/cm<sup>2</sup>,脉冲式辐照 180 s;超声加空白微泡组(C 组):超声联合不携带药物的空白 PLGA 微泡进行定位辐照治疗;超声加血卟啉组(D 组):每只小鼠按照 HP 剂量 20 mg/kg 于暗室内经尾静脉推注 0.20 ml HP 溶液,避光饲养 6 h 后给予超声定位辐照;超声加载血卟啉 PLGA 微泡组(E 组):每只小鼠经尾静脉推注 HP-PLGA 微泡 0.20 ml(含血卟啉 20 mg/kg),推注后立即给予超声辐照治疗。C、D、E 组超声辐照参数同 B 组。治疗每隔 1 天重复 1 次,共 3 次。

1.2.4 肿瘤体积和质量观察 治疗后每 2 天用游标卡尺测

量一次荷瘤鼠肿瘤的最大直径(a)和最小直径(b),绘制 15 天内肿瘤体积生长曲线。肿瘤体积(V) = a × b<sup>2</sup>/2。治疗后第 15 天以颈椎离断法处死小鼠,剥瘤称重,计算瘤体质量平均值,并计算质量抑瘤率。质量抑瘤率 = (1 - 实验组平均瘤体质量/对照组平均瘤体质量) × 100%。

1.2.5 TUNEL 和 PCNA 检测 称量后的肿瘤用 10% 甲醛固定,标本送检 TUNEL 和 PCNA。结果判定:光镜下观察,以细胞核内出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性标志。选择 10 个高倍视野(×400),计数至少 1000 个肿瘤细胞。评判指标:①凋亡指数(apoptosis index, AI):AI = TUNEL 阳性肿瘤细胞数/计数肿瘤细胞总数 × 100%;②增殖指数(proliferating index, PI):表示肿瘤细胞的增殖活性,PI = (PCNA 阳性细胞数/计数肿瘤细胞总数) × 100%。

1.2.6 统计学分析 应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,各指标多组均数比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 法, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PLGA 微泡特性 光镜下观察,两种微泡粒径均匀,分散度好,大小相似。HP-PLGA 微泡平均粒径为 602.3 nm,包封率 63.50%,载药量 2.15%。

2.2 肿瘤生长曲线及质量抑瘤率 ①各处理组小鼠 H22 肿瘤生长曲线见图 1。各处理组小鼠肿瘤体积随着时间延长均呈逐步增加的趋势。A 组生长曲线最陡直,B、C 组其次,D、E 组曲线较平缓,生长速度明显减慢。②各处理组肿瘤质量及质量抑瘤率见表 1。B、C 组与 A 组比较,差异无统计学意义(P > 0.05);而 D、E 两实验组均表现出明显的抑瘤效果,E 组质量抑瘤率最大,为 53.86%,D、E 两组与 A~C 组比较以及 D、E 两组之间比较差异均有统计学意义(P < 0.05)。

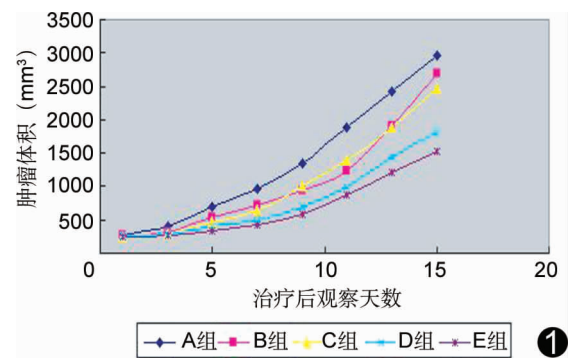


图 1 各处理组小鼠 H22 肿瘤生长曲线 生理盐水对照组 H22 肿瘤生长曲线最陡直,超声加 HP-PLGA 微泡治疗组 H22 肿瘤生长最缓慢

2.3 肿瘤细胞凋亡情况 TUNEL 染色结果显示,各处理组肿瘤中均可见到染成棕褐色的凋亡细胞核,E 组中凋亡细胞最多(图 2)。各组凋亡指数见表 2。与 A 组相比较,D、E 组凋亡指数升高,差异有统计学意义(P < 0.05)。E 组与其他各组间两两比较差异均有统计学意义(P < 0.05)。

2.4 肿瘤细胞增殖情况 免疫组化结果显示,各处理组肿瘤

表 1 各处理组平均瘤体质量及质量抑瘤率

指标	对照组 (A 组)	单纯超声组 (B 组)	超声+空白微泡组 (C 组)	超声+HP 组 (D 组)	超声+载药微泡组 (E 组)
平均瘤体质量(g)	1.48±0.23	1.38±0.20	1.36±0.30	0.97±0.19	0.68±0.23
质量抑瘤率(%)	0	6.51	7.89	34.36 <sup>*</sup>	53.86 <sup>*#</sup>

注: \* : 与 A、B、C 组比较,  $P < 0.01$ ; # : 与 D 组比较,  $P < 0.05$

表 2 各处理组 H22 肿瘤细胞凋亡指数及增殖指数

指标	对照组 (A 组)	单纯超声组 (B 组)	超声+空白微泡组 (C 组)	超声+HP 组 (D 组)	超声+载药微泡组 (E 组)
AI(%)	16.14±3.93	19.22±5.06	21.02±5.87	36.71±7.28 <sup>*</sup>	52.82±5.98 <sup>*#</sup>
PI(%)	90.09±3.95	86.94±4.92	84.79±6.28	54.33±7.80 <sup>+</sup>	37.83±6.34 <sup>+#</sup>

注: \* : 与 A 组比较,  $P < 0.01$ ; \* # : 与 B、C、D 组比较,  $P < 0.05$ ; + : 与 A、B、C 组比较,  $P < 0.01$ ; + # : 与 D 组比较,  $P < 0.05$

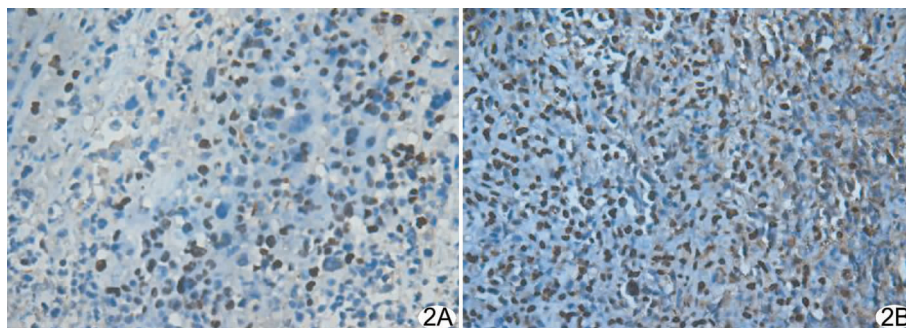


图 2 H22 肿瘤细胞凋亡 TUNEL 光镜图 A. 对照组肿瘤细胞凋亡光镜图(×400)凋亡细胞核被染成棕褐色,可见较少肿瘤细胞凋亡; B. 超声加载药微泡组凋亡光镜图(×400)凋亡的 H22 肿瘤细胞最多

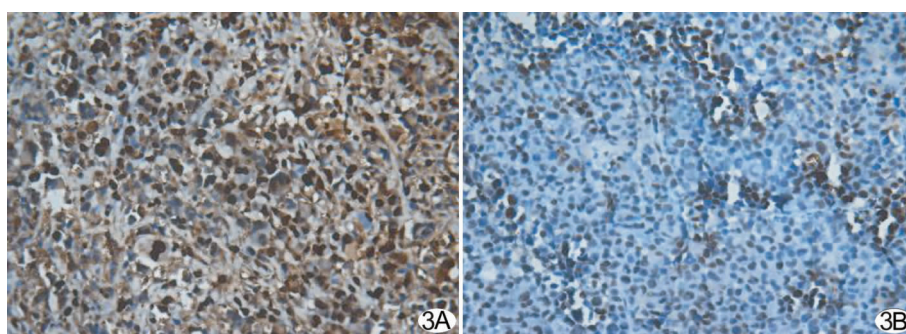


图 3 H22 肿瘤细胞 PCNA 表达光镜图 A. 对照组 PCNA 表达光镜图(×400),PCNA 表达阳性细胞核被染成棕褐色, H22 肿瘤细胞增殖最多; B. 超声加载药微泡组 PCNA 光镜图(×400), H22 肿瘤细胞增殖最少

内均可见到 PCNA 阳性表达。A~C 组可见大量肿瘤细胞核被染成棕褐色,而 D、E 两组仅可见到少量棕褐色颗粒,以 E 组最少(图 3)。各组增殖指数见表 2。D、E 两组 PCNA 阳性表达与其余三组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),而 D、E 两组之间比较, E 组 PI 小于 D 组,差异亦有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

SDT 的概念首先由日本学者 Umemura 提出。与 PDT 相比,SDT 具有无创、简便易行、造价低廉、可准确聚焦深部组织等优点<sup>[5]</sup>。SDT 作用机制为超声空化效应和产生的单线态氧等自由基直接杀伤肿瘤细胞及诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[6]</sup>,因而是一种极具前景的抗肿瘤新方法。但是,声敏剂存在选择性肿瘤细胞识别能力欠佳、单线态氧产量不高、某些声敏剂具有光毒性副反应等缺点,因而近年来众多学者一直致力于寻找高效低毒的声敏剂的研究。

超声微泡造影剂除了可以常规增强超声影像诊断信号之外,还可以靶向传递基因、药物进入超声辐照组织区域,具有安全、低毒、高效、靶向性好、可控性强等优点,是一种极具前景的肿瘤诊治工具。高分子材料 PLGA 具有生物相容性好、可降解的良好特性,已被美国 FDA 批准广泛应用于治疗领域,包括作为药物的控释载体<sup>[7]</sup>。国内冉海涛等<sup>[8]</sup>已成功制备出包载阿霉素的 PLGA 超声微泡造影剂。

本实验制得的载 HP 高分子微泡形态良好,分布均匀,粒径为纳米级,包封率较高。将其应用于声动力治疗小鼠肝癌皮下移植瘤过程中发现,超声联合载药 PLGA 微泡组小鼠 H22 肿瘤生长速度最慢,质量抑瘤率和凋亡指数最高,而增殖指数最低,说明两者联用能有效抑制肿瘤生长,促进其凋亡。超声联合单纯血卟啉组也对肿瘤生长起到了一定的抑制作用。单纯超声辐照组以及超声联合空白微泡组治疗效果与对照组相比无明显差异。

超声与高分子纳米粒相互作用的确切机制还不完全清楚。国外学者<sup>[9-13]</sup>认为,由于 PLGA 纳米粒的外壳具有一定的弹性,超声辐照体内高分子纳米粒后,纳米粒可发生振动,加上超声空化效应和微声流的协同作用,使得辐照区域细胞膜发生机械性的伸展,肿瘤血管和细胞膜的通透性发生改变,纳米粒更易于穿过血管内皮间隙进入组织细胞内,从而增强体内药物和基因在肿瘤细胞中的传递。另外,超声辐射力还可以促使纳米粒向血管壁边集,通过内皮细胞内吞作用活跃地进入周围组织,再进入肿瘤细胞中发挥作用。

结合本实验中超声联合载药微泡组治疗效果好于超声联

合单纯声敏剂组,考虑其原因在于相比单纯血卟啉优先聚集于肿瘤组织的特性,超声辐照载药纳米粒能使更多的药物传递进入辐照区域肿瘤组织甚至进入肿瘤细胞中发挥抗癌作用,且纳米粒具有缓释长效的特性,更延长了药物在肿瘤中滞留的时间。与其他文献<sup>[14]</sup>报道不同的是,本研究中超声联合空白微泡治疗组无明显效果,推测是由于 PLGA 纳米粒在超声场中的振动幅度及产生的空化效应相对其他较大微粒(如脂质微泡)小,因而更少引起组织损伤。

综上所述,本实验用超声联合自制的载声敏剂血卟啉 PLGA 纳米微泡治疗小鼠肝癌皮下移植瘤,能够抑制活体内 H22 肿瘤生长,促进其凋亡,为声动力抗恶性肿瘤提供了一种新的思路。

### [参考文献]

- [1] Milowska K. Ultrasound-mechanisms of action and application in sonodynamic therapy. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2007, 61: 338-349
- [2] Hernot S, Klibanov AL. Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(10):1153-1166.
- [3] 刘学兵,王志刚,许川山.载药脂质超声微泡造影剂的制备及应用研究. *中国介入影像与治疗学*, 2008, 5(2):156-159.
- [4] 伍星,王志刚,唐毅,等.携 VEGFR2 单抗靶向微泡评价小鼠肿瘤新生血管. *中国医学影像技术*, 2009, 25(6):932-934.
- [5] 张亚萍,冉海涛.超声激活卟啉类化合物治疗恶性肿瘤的研究进展. *临床超声医学杂志*, 2008, 10(11):758-760.
- [6] 王静,王志刚,许川山.声动力疗法医学应用及其生物学效应. *中国医学影像技术*, 2006, 22(12):1918-1921.
- [7] Chappell JC, Song J, Burke CW, et al. Targeted delivery of nanoparticles bearing fibroblast growth factor-2 by ultrasonic microbubble destruction for therapeutic arteriogenesis. *Small*, 2008, 4, (10):1769-1777.
- [8] 冉海涛,任红,王志刚,等.包裹阿霉素的高分子材料微泡声学造影剂制备及显影效果实验研究. *临床超声医学杂志*, 2005, 7(4):217-220.
- [9] Cuenca AG, Jiang H, Hochwald SN, et al. Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer*, 2006, 107(3):459-466.
- [10] El-Sherif DM, Lathia JD, Le NT, et al. Ultrasound degradation of novel polymer contrast agents. *J Biomed Mater Res A*, 2004, 68(1):71-78.
- [11] Pitt WG, Husseini GA, Staples BJ. Ultrasonic drug delivery—a general review. *Expert Opin Drug Deliv*, 2004, 1(1):37-56.
- [12] Chumakova OV, Liopo AV, Andreev VG, et al. Composition of PLGA and PEI/DNA nanoparticles improves ultrasound-mediated gene delivery in solid tumors in vivo. *Cancer Lett*, 2008, 261(2): 215-225.
- [13] Jeong JH, Kim SW, Park TG. Biodegradable triblock copolymer of PLGA-PEG-PLGA enhances gene transfection efficiency. *Pharm Res*, 2004, 21(1):50-54.
- [14] 伍星,王志刚,张勇,等.超声定位辐照载药微泡治疗卵巢癌移植瘤的实验研究. *中国超声医学杂志*, 2007, 23(3):179-181.

## 《中国医学影像技术》被数据库收录情况

《中国医学影像技术》杂志是由中国科学院主管,中国科学院声学研究所主办的国家级学术期刊,被以下数据库收录:

中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)

中国科学引文数据库核心期刊

《中文核心期刊要目总览》收录期刊

中国科技期刊精品数据库收录期刊

荷兰《医学文摘》收录源期刊

英国《科学文摘》收录源期刊

俄罗斯《文摘杂志》收录源期刊

波兰《哥白尼索引》收录源期刊