

## • 论著 •

# 载声敏剂的高分子超声造影剂体内抑瘤效应及其副反应考察

张亚萍 罗进 冉海涛

**【摘要】 目的** 通过对比观察载声敏剂血卟啉(HP)的高分子聚合材料聚乳酸羟基乙酸共聚物(PLGA)超声微泡造影剂(HP-PLGA)的光敏副反应,并观察超声联合该载药微泡对小鼠H22肝癌皮下移植瘤的声动力治疗效果。**方法** 将35只Balb/c小鼠分为5组,分别将不同浓度的HP-PLGA与单纯HP溶液经尾静脉注入各组小鼠体内,阳光辐照后比较观察不同组小鼠眼睛、背部皮肤、尾巴及肝脏产生的副反应。另建立小鼠H22肝癌皮下移植瘤模型,将荷瘤鼠随机分为A、B两大组进行处理,每组30只。A、B组又分为空白对照(C)组、单纯超声辐照(US)组、超声加空白微泡(US+MB)组、超声加单纯HP(US+HP)组和超声加载HP-PLGA微泡(US+HP-PLGA)组,隔天处理一次,连续处理3次。A组荷瘤小鼠治疗后15d,比较各组荷瘤小鼠的质量抑瘤率;B组荷瘤小鼠治疗处理后继续喂养,观察各处理组小鼠的生存期。**结果** 注射40 mg/ml与20 mg/ml单纯HP组小鼠背部皮肤出现明显的红斑焦痂,眼睛红肿,尾巴肿胀,肝脏出现损伤性病理改变,而其他各组无明显反应。与其他各处理组相比较,超声联合载声敏剂PLGA微泡组质量抑瘤率最大,平均生存天数最长,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 将声敏剂包裹进高分子造影剂内可以大大降低声敏剂的光敏毒性副反应,且该载声敏剂的高分子造影剂具有明显的体内抑瘤作用,为寻求一种安全、有效、靶向性高、毒副作用小的声动力抗肿瘤方法提供了新的思路 and 依据。

**【关键词】** 血卟啉类; 造影剂; 肝肿瘤; 高分子超声造影剂

**Detecting on effect of anti-tumor and the side reaction of sonosensitizer-loaded high polymer ultrasound contrast agents** ZHANG Ya-ping, LUO Jin, RAN Hai-tao. Department of Specific Diagnosis, Neijiang First People's Hospital, Neijiang 641000, China

Corresponding author: RAN Hai-tao, Email: rht66@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the phototoxicities of hematoporphyrin-loaded PLGA ultrasound contrast agents(HP-PLGA) and to detect the effect of sonodynamic therapy on H22 tumor-bearing mice using HP-PLGA. **Methods** 35 Balb/c mice were divided into 5 groups, then different concentration of HP-PLGA microbubbles and hematoporphyrin solution were injected into each group of mice; after 15 minutes of sun irradiation, the phototoxicity of the eye, back skin, tail and liver of mice were observed, and the side reaction of liver was detected by HE stain. In addition, 60 H22 tumor-bearing mice were divided into two groups (group A and group B). Then the two groups were again divided into five groups for different treatment evenly. The inhibition rate of tumor quality on the 15th day of group A and the life time of group B were detected, respectively. **Results** In mice injected into hematoporphyrin of 40 mg/ml and 20 mg/ml, the skin of the back reacted by forming a large area of eschar, swelling were observed in eyes and tails, and liver damage were seen in HE staining slice. **Conclusions** Hematoporphyrin-loaded PLGA ultrasound contrast agents used in sonodynamic therapy could inhibit growth of H22 tumor in mice and significantly reduce the phototoxicity side-effect of hematoporphyrin, which may provided a novel strategy for therapy on tumor.

**【Key words】** Hematoporphyrins; Contrast media; Liver neoplasms; High polymer ultrasound contrast agents

恶性肿瘤是严重威胁人类生命健康的重大疾病。

早期诊断与治疗恶性肿瘤对提高患者的生存率和生活质量具有至关重要的作用<sup>[1]</sup>。目前使用的化疗药物大多为细胞毒性药物,对肿瘤和正常组织缺乏靶向性,具有较大的毒副作用。因此,寻求一种安全、有效、靶向性高、毒副作用小的治疗手段迫在眉睫。声动力学疗法是在光动力学疗法的基础上发展起来的一种抗肿瘤

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.09.077

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30770565)

作者单位:641000 四川省,内江市第一人民医院特检科(张亚萍),呼吸科(罗进);重庆医科大学附属第二医院超声影像学研究所(冉海涛)

通讯作者:冉海涛,Email:rht66@163.com

新方法。作为一种常用的光敏剂皆声敏剂,血卟啉(hematoporphyrin, HP)由于其靶向性不高,且具有光毒性副作用,部分限制了其临床应用<sup>[2]</sup>。近年来,靶向超声造影剂在疾病诊治中的作用越来越受到重视。本实验旨在对比观察自制的载 HP 高分子超声微泡造影剂的光敏副作用,并将其与超声靶向辐照载药微泡定位释放技术相结合,寻求一种简便、安全、有效、毒副作用小的局部化疗技术。

## 材料与方 法

### 一、材料

雌性 Balb/c 小鼠,6~8 周龄,体质量(20±2)g,由重庆医科大学实验动物中心提供;包裹声敏剂 HP 的高分子聚材料聚乳酸羟基乙酸共聚物(PLGA)纳米微泡及未载药空白 PLGA 纳米微泡,由重庆医科大学超声影像学研究所自制<sup>[3]</sup>;盐酸 HP 购自美国 Alfa 公司;CGZZ 型超声基因转染治疗仪由重庆医科大学超声影像学研究所研制。

### 二、载 HP 的高分子微泡毒副反应考察

将 35 只备毛后的 Balb/c 小鼠随机进行如下分组处理:经尾静脉推注单纯 HP 溶液 5 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg 以及载 HP 的高分子微泡造影剂(按载药量计算分别含 HP 5 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg),空白对照组经小鼠尾静脉推注生理盐水,每种剂量 5 只。7 组小鼠给药后均避光喂养。24 h 后将小鼠置于阳光直射处接受强光辐照 15 min,然后继续避光喂养。照光后比较观察小鼠眼睛、尾巴及背部皮肤的光敏反应情况。照光过程中观察小鼠全身情况,照光 3 d 以背部皮肤、眼、尾巴为主要观察区域,比较单纯 HP 和载 HP PLGA 微泡的光敏副作用。3 d 后取小鼠肝脏组织,10% 甲醛固定,送检 HE 染色。

### 三、载 HP 的高分子造影剂抑瘤效果观察

1. 动物肿瘤模型的建立及分组处理:将培养中处于对数生长期的 H22 细胞株,以无血清的 1640 培养液稀释成浓度为  $4.60 \times 10^7$ /ml 的细胞悬液。在每只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。皮下接种后 1 周,70 只小鼠背臀部均可观察和触及肿瘤。选取肿瘤直径约 1.0 cm 的 60 只小鼠进行实验,按随机分组的原则分为 A、B 两组,每组 30 只。A、B 组又分别随机分为 5 组进行不同处理,每组 6 只:空白对照(C)组;经小鼠尾静脉推注生理盐水 0.20 ml;单纯超声辐照(US)组;超声定位辐照肿瘤部位,超声频率 1 MHz,声强为  $2 \text{ W/cm}^2$ ,脉冲式辐照 180 s;超声加空白微泡(US+MB)组;超声联合不携带药物的空白 PLGA 纳米粒生理盐水溶液 0.2 ml 进行定位辐照治疗;

超声加单纯 HP(US+HP)组;每只小鼠按照 HP 剂量 20 mg/kg 于暗室内经尾静脉推注 HP 溶液 0.2 ml,避光饲养 6 h 后给予超声定位辐照;超声加载 HP 微泡(US+HP-PLGA)组;暗室内每只小鼠经尾静脉推注 PLGA-HP 微泡生理盐水溶液 0.2 ml(含 HP 20 mg/kg),推注后立即给予超声辐照治疗。US+MB、US+HP、US+HP-PLGA 组超声辐照参数同 US 组。治疗每间隔 1 d 重复 1 次,共 3 次。

2. 抑瘤效果观察:治疗 15 d 后颈椎离断法处死 A 组小鼠,剥取肿瘤,用电子天平称重,计算质量抑瘤率。质量抑瘤率 =  $(1 - \text{实验组平均瘤体质量} / \text{对照组平均瘤体质量}) \times 100\%$ 。将 B 组 30 只小鼠常规饲养直至死亡,记录 B 组中各处理组小鼠从接种日到死亡日的生存天数。

### 四、统计学分析

所得数据用 SPSS 13.0 统计分析软件进行分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组均数比较用 One-Way ANOVA,两两比较用 LSD 法,显著性水准为  $\alpha = 0.05$ 。

## 结 果

1. 皮肤等处光敏副反应:照光 1 min 时,注射 20 mg/ml HP 和 40 mg/ml HP 组小鼠均出现躁狂,全身瘙痒,拼命躲避阳光表现,而注射 5 mg/ml HP 组小鼠呼吸稍快,躲避阳光,其余各组照光过程中无异常表现。照光后第 3 天,注射 20 mg/ml HP 和 40 mg/ml HP 组小鼠背部皮肤出现明显的红斑焦痂,眼睛红肿,尾巴肿胀明显,而注射含 40 mg/ml HP 微泡组小鼠仅背部出现轻微皮肤肿胀,其余各组小鼠背部皮肤、眼睛及尾巴无明显反应。小鼠背部皮肤、眼睛、尾巴光敏毒性见图 1~4。

2. 肝脏病理改变:注射 20 mg/ml HP 和 40 mg/ml HP 组小鼠可见肝淤血肿大的病理改变,表现为血管腔内大量红细胞,血管周围可见炎症细胞浸润,肝细胞肿胀,胞质内空泡样变,且可见到点状坏死和灶状坏死的肝细胞。低剂量组仅有少量炎细胞浸润。HP-PLGA 微泡组肝脏未见明显改变,见图 5。

3. 质量抑瘤率:各处理组质量抑瘤率见图 6。US 组、US+MB 组与对照组 C 组相比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );而 US+HP、US+HP-PLGA 两实验组均表现出明显的抑瘤效果,US+HP-PLGA 组质量抑瘤率最大,为 53.86%,US+HP、US+HP-PLGA 两组与对照组 C 组比较以及 US+HP、US+HP-PLGA 两组之间比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

4. 生存期:各处理组小鼠生存天数见表 1。US+HP





图1 注射40 mg/kg单纯HP组小鼠照光后背部皮肤反应 图2 注射含40 mg/kg载HP微泡组小鼠照光后背部皮肤表现  
图3 注射40 mg/kg单纯HP组小鼠照光后眼睛改变 图4 注射40 mg/kg单纯HP组小鼠照光后尾巴改变

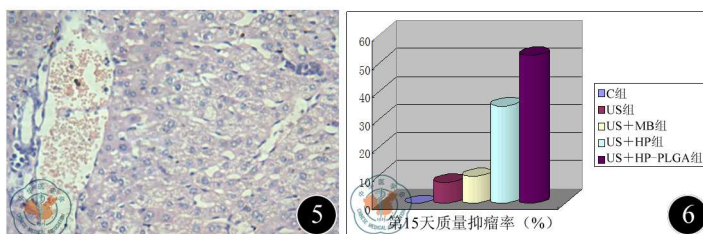


图5 注射40 mg/kg单纯HP组小鼠照光后肝脏病理改变 (HE ×200) 图6 各处理组质量抑瘤率

-PLGA组(47.83 d)和US + HP组(42.33 d)小鼠平均生存天数较对照组C组(34.17 d)明显延长( $P < 0.01$ ),且两者之间的差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),US组、US + MB组小鼠生存期(35.50 d、36.00 d)与对照组C组比较无明显改变,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表1 各组小鼠生存天数(d)

组别	范围	$\bar{x} \pm s$
C组	29 ~ 40	34.17 ± 4.54 <sup>b</sup>
US组	30 ~ 42	35.50 ± 4.89 <sup>b</sup>
US + MB组	29 ~ 44	36.00 ± 5.14 <sup>b</sup>
US + HP组	38 ~ 51	42.33 ± 4.50 <sup>ab</sup>
US + HP-PLGA组	44 ~ 52	47.83 ± 3.06 <sup>a</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与US + HP-PLGA组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

## 讨 论

近年来,声动力学疗法作为一种新兴的抗肿瘤方法越来越受到医学研究者的关注。其理论基础是超声作为一种机械波,对生物组织有较强的穿透力,聚焦超声可将声能聚集于深层组织,激活滞留在肿瘤组织中的声敏剂从而杀伤肿瘤细胞。声动力学疗法用于治疗肿瘤,其优点在于无创伤、设备简单、操作方便,并且可用于不同深度、不同部位的肿瘤治疗<sup>[4-5]</sup>。

研究者已经通过各种动物实验证实,低频超声辐照循环中的微泡造影剂后,能够选择性的增加微血管的通透性,使得循环中的物质能够进入组织中。因此,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,是一种极具前景的疾病诊治工具。因而近年来靶向超声微泡在疾病诊断和治疗领域中得到不断地发展<sup>[6-9]</sup>。

PLGA具备无毒、可生物降解和良好的生物相容性等特征,其内包载药物可伴随PLGA的降解过程逐步释放,降解产物乳酸和羟基乙酸可参与人体的新陈代谢,最终形成二氧化碳和水被排出体外,且无明显的崩解现象,现已广泛用作控释和缓释给药系统的载体材料<sup>[10]</sup>。

声动力疗法多采用光敏剂作为传统的声敏剂,由于声敏剂肿瘤特异性聚集低、正常组织清除慢及光毒副作用高等缺点,且目前临床上尚无安全合适的声动力装置,因此从一定程度上限制了声动力疗法的临床应用<sup>[11-12]</sup>。而在本实验中,将声敏剂包裹进高分子微泡后,可以降低声敏剂的光敏毒副作用,大大减轻对小鼠皮肤、尾巴、眼睛及肝脏的损伤。同时,载声敏剂的高分子超声微泡剂为纳米级,纳米粒是大小10 ~ 1000 nm的固体胶体颗粒,可作为传导或输送药物的载体。将药物包封于纳米粒中,可达到调节释药速度、增加生物膜的通透性、改变药物在体内的分布、提高药物生物利用度、保护其内包载药物在体内血液循环中免受酶的不利影响等目的。而超声辐照纳米粒可使纳米粒发生振动以及促使其向血管壁边集,加之小尺寸,黏附于内皮细胞膜的纳米粒更易于穿透内皮组织细胞进入肿瘤组织中传递药物、发挥作用<sup>[13-16]</sup>。将该载声敏剂的微泡用于体内治疗小鼠肝癌皮下移植瘤,发现其可以明显抑制肿瘤生长,延长小鼠生存期。综上,超声联合载声敏剂的高分子纳米微泡剂不仅增强了单纯声敏剂的肿瘤靶向性,提高了声敏剂的药物疗效,而且降低了其固有的光敏副反应,为寻求一种安全、有效、靶

向性高、毒副作用小的声动力抗肿瘤方法提供了新的思路 and 依据。

### 参 考 文 献

- [1] Toneatto J, Garcia PF, Argüello GA. Advances on the interaction of polypyridyl Cr(III) complexes with transporting proteins and its potential relevance in photodynamic therapy. *J Inorg Biochem*, 2011, 105: 1299-1305.
- [2] Milowska K. Ultrasound-mechanisms of action and application in sonodynamic therapy. *Postepy Hig Med Dosw*, 2007, 61: 338-349.
- [3] 张亚萍, 冉海涛, 王志刚, 等. 载血卟啉的 PLGA 超声微泡造影剂制备及工艺优化. *中华超声影像学杂志*, 2010, 19: 258-261.
- [4] Tang W, Liu Q, Wang X, et al. Ultrasound exposure in the presence of hematoporphyrin induced loss of membrane integral proteins and inactivity of cell proliferation associated enzymes in sarcoma 180 cells in vitro. *Ultrason Sonochem*, 2008, 15: 747-754.
- [5] 陈志强, 岳武. 声动力学疗法机制的研究. *航空航天医药*, 2010, 21: 135-138.
- [6] 康娟, 吴小翎, 张勇, 等. 载多西紫杉醇脂质超声微泡造影剂对兔 VX2 肝癌增殖和凋亡的作用. *中国超声医学杂志*, 2009, 25: 642-645.
- [7] Hernot S, Klibanov AL. Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60: 1153-1166.
- [8] Xing W, Gang WZ, Yong Z, et al. Treatment of xenografted ovarian carcinoma using paclitaxel-loaded ultrasound microbubbles. *Academic Radiology*, 2008, 15: 1574-1579.
- [9] 吴作辉, 胡兵. 超声微泡造影剂在前列腺癌诊疗中的研究进展[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5: 1664-1666.
- [10] Pamujula S, Hazari S, Bolden G, et al. Preparation and in-vitro/in-vivo evaluation of surface-modified poly ( lactide-co-glycolide ) fluorescent nanoparticles. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 62: 422-429.
- [11] 黄雪琴, 周娟, 张为民, 等. 声敏剂联合超声聚焦刀治疗肝胆管细胞癌 1 例. *临床肿瘤学杂志*, 2011, 16: 767-768.
- [12] 田泽丹, 许川山, 全学模, 等. 声敏剂与光敏剂的研究进展. *临床超声医学杂志*, 2008, 10: 39-42.
- [13] Pitt WG, Hussein GA, Staples BJ, et al. Ultrasonic drug delivery-a general review. *Expert Opin Drug Deliv*, 2004, 1: 37-56.
- [14] 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: 215-225.
- [15] Cuenca AG, Jiang H, Hochwald SN, et al. Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer*, 2006, 107: 459-466.
- [16] Van Wamel A, Bouakaz A, Versluis M, et al. Micromanipulation of endothelial cells: ultrasound-microbubble-cell interaction. *Ultrasound Med Biol*, 2004, 30: 1255-1258.

(收稿日期: 2011-12-24)

(本文编辑: 马超)

张亚萍, 罗进, 冉海涛. 载声敏剂的高分子超声造影剂体内抑瘤效应及其副反应考察[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(9): 2399-2402.

中 华 临 床 医 师 杂 志