

• 基础与实验研究 •

Impact of diagnostic ultrasound with different mechanical index enhanced by microbubbles on chemotherapy of nude mice bearing pancreatic tumor

FENG Shuang, QIAO Wei, YI Cuo, ZHU Qiong,
LI Peijing, LIU Zheng*

(Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of
Army Medical University, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the impact of diagnostic ultrasound (DUS) with different mechanical index (MI) combined with microbubbles on tumor blood flow and chemotherapeutic drug concentration in nude mice bearing human pancreatic cancer. **Methods** Pancreatic tumor models were established through injecting tumor cell suspension into bilateral hind limbs in 33 nude mice, which were divided into three groups (group A, B and C) randomly. Contrast-enhanced ultrasound (CEUS), chemotherapeutic agents injection and exposure/sham exposure with DUS were performed on all models in the three groups. For each model, one of the hind limb was chosen as therapeutic side (exposure), and the other hind limb as control side (sham exposure). CEUS was performed before and after ultrasonic exposure/sham to obtain the time-intensity curve (TIC), peak intensity (PI) and AUC. Doxorubicin was injected through the tail vein before ultrasonic exposure/sham exposure. And microbubbles were continuously injected during ultrasonic exposure/sham exposure. MI of therapeutic side for ultrasonic exposure in group A, B and C was 0.3, 0.7 and 1.1, respectively. After ultrasonic exposure/sham exposure, Doxorubicin concentration in vitro tumor tissue was detected, and then histological analysis was done. In addition, the range of peak negative pressure correspond with different MI were detected before ultrasonic exposure/sham exposure. **Results** Concentration of Doxorubicin of therapeutic side in group A was obviously higher than that of control side ($[1.45 \pm 0.53] \mu\text{g/g}$ vs $[1.07 \pm 0.46] \mu\text{g/g}$; $t = -5.163$, $P = 0.001$). In group B and C, there was no statistically significant difference of Doxorubicin concentration between therapeutic side and control side in the drug concentration ($Z = -0.297$, -0.357 , $P = 0.766$, 0.721). Quantitative analysis of CEUS showed that both PI and AUC increased obviously after ultrasonic exposure/sham exposure compared with those before exposure/sham exposure (all $P < 0.05$), except for PI of control side in group B and AUC of control side in group B and C. Neither hemorrhage nor swelling was observed in tumor tissue of both sides in any group. The range of peak negative pressure correspond with MI of 0.3 (group A), 0.7 (group B) and 1.1 (group C) was 0.81—0.83 MPa, 0.96—1.32 MPa and 2.29—2.53 MPa, respectively. **Conclusion** DUS (MI = 0.3) combined with microbubbles can enhance blood perfusion and improve the chemotherapeutic drug concentration of tumor tissues in nude mice bearing human pancreatic cancer.

[Keywords] pancreatic neoplasms; drug therapy; ultrasonography; microbubbles; mice; models, animal

DOI:10.13929/j.1672-8475.201809054

[基金项目] 国家重点研发计划数字诊疗装备研发重点专项(2017YFC0107300)。

[第一作者] 冯爽(1993—),男,贵州遵义人,在读硕士,医师。研究方向:超声联合微泡对胰腺癌化疗的基础研究。E-mail: 13102389256@163.com

[通信作者] 刘政,陆军军医大学第二附属医院超声科,400037。E-mail: liuzhengsh@hotmail.com

[收稿日期] 2018-09-29 **[修回日期]** 2018-12-28

不同机械指数诊断超声联合微泡对裸鼠胰腺癌移植瘤化疗的影响

冯 爽, 乔 伟, 益 磋, 朱 琮,

李佩惊, 刘 政*

(陆军军医大学第二附属医院超声科, 重庆 400037)

[摘要] **目的** 探讨不同机械指数(MI)诊断超声联合微泡对裸鼠人胰腺癌荷瘤模型肿瘤局部血流及化疗药物浓度的影响。**方法** 经裸鼠双侧后腿注射肿瘤细胞,建立裸鼠人胰腺癌荷瘤模型 33 只,随机分为 A、B、C 组,行超声造影、化疗药物注射及超声辐照/假照。随机选取荷瘤裸鼠一侧后腿为治疗侧(超声辐照),另一侧为对照侧(超声假照)。辐照/假照前后均行超声造影,获得时间-强度曲线,峰值强度(PD)及 AUC。于超声辐照/假照前经尾静脉注射阿霉素(DOX),并于超声辐照/假照过程中实时推注微泡;A、B、C 组治疗侧超声辐照的 MI 分别为 0.3、0.7、1.1。超声辐照/假照后,行 DOX 药物浓度检测及组织病理检查。并于超声辐照/假照前,测定不同 MI 对应的峰值负压范围。**结果** A 组治疗侧 DOX 药物浓度明显高于对照侧[(1.45±0.53)μg/g vs (1.07±0.46)μg/g; $t=-5.163$, $P=0.001$]。B 组及 C 组中,治疗侧与对照侧药物浓度差异均无统计学意义($Z=-0.297$ 、 -0.357 , $P=0.766$ 、 0.721)。超声造影定量分析显示,除 B 组对照侧 PI、B 组及 C 组对照侧 AUC 外,超声辐照/假照后各组中治疗侧及对照侧均较超声辐照/假照前 PI 均升高、AUC 均增大(P 均 <0.05)。各组对照侧与治疗侧肿瘤组织病理表现相似,未见明显出血及细胞肿胀。MI 为 0.3(A 组)、0.7(B 组)、1.1(C 组)时,对应的实测峰值负压范围分别为 0.81~0.83 MPa、0.96~1.32 MPa 和 2.29~2.53 MPa。**结论** MI 为 0.3 的诊断超声联合微泡可增强肿瘤局部血流灌注,促进人胰腺癌荷瘤裸鼠肿瘤局部化疗药物释放。

[关键词] 胰腺肿瘤;药物治疗;超声检查;微泡;小鼠;模型;动物

[中图分类号] R735.9; R445.1; R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-8475(2019)02-0107-05

超声化疗通过低强度超声激励造影剂微泡空化,暂时性开放血管壁、增加细胞膜通透性(声孔效应),提高肿瘤局部化疗药物浓度,因有望逆转部分化疗抵抗而成为目前相关领域研究的热点^[1-3]。利用诊断超声实施肿瘤超声化疗,兼具实时影像定位、能量低、安全性高、临床转化快等优点^[4-5]。诊断超声调控微泡空化的最主要参数为机械指数(mechanical index, MI)。本研究建立裸鼠人胰腺癌荷瘤模型,分析不同 MI 条件下诊断超声联合微泡对肿瘤局部血流及化疗药物释放的影响。

1 材料与方法

1.1 模型建立及分组 选取 4 周龄雄性裸鼠 45 只[由陆军军医大学第二附属医院动物实验中心提供,许可证号:SYXK(渝)20170002],体质量 10~12 g。将人源胰腺癌细胞系 PANC-1 细胞置于 37℃、5% CO₂ 孵化箱内,待细胞长至 70%~80%融合面积时行胰酶消化处理。以 1 000 rot/min 转速离心 5 min 后,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)重悬,调整细胞浓度为 $6 \times 10^7 \sim 8 \times 10^7$ /ml。采用无菌注射器分

别于裸鼠双侧后腿内侧注射 0.1 ml 细胞悬液,成功建立裸鼠人胰腺癌荷瘤模型 33 只,约 20 天后触诊评估肿瘤大小,待肿瘤最大径 0.5~1.0 cm 时将其随机分为 A、B、C 组,每组 11 只。

1.2 化疗及超声处理 将荷瘤裸鼠按 0.007 ml/g 体质量腹腔注射 1%戊巴比妥钠进行麻醉后,仰卧位保定于操作台,建立尾静脉通道。采用飞依诺 VINNO 70 彩色多普勒超声诊疗一体机, X4-12L 浅表高频线阵探头,静脉团注 0.02 ml 脂氟显微泡造影剂(由陆军军医大学第二附属医院超声科自行研发,外层为磷脂外膜,核心气体为全氟丙烷,粒径 2.0 μm,浓度 $2 \times 10^9 \sim 9 \times 10^9$ /ml)行超声造影。造影结束后,按 0.010 ml/g 体质量静脉缓慢推注 1 mg/ml 阿霉素(doxorubicin, DOX)。之后随机选取荷瘤裸鼠一侧后腿为治疗侧,行超声辐照;另一侧为对照侧,行超声假照。超声诊疗设备具有调控微泡空化的 Vflash 模式,可调节与微泡空化相关参数,主要包括 MI、中心频率、脉冲宽度(pulse length, PL)、脉冲重复频率(pulse repetition frequency, PRF)和脉冲/间歇时间。对 3

组荷瘤裸鼠治疗侧均采用中心频率 4 MHz、PL 18 个周期、PRF 50 Hz, 脉冲/间歇时间 0.48 s/2 s 进行辐照; A 组 MI 0.3, B 组 MI 0.7, C 组 MI 1.1。超声辐照时, 探头距肿瘤表面 1 cm, 调整治疗 ROI, 使其包括肿瘤及周边 0.5 cm 范围组织(图 1)后开始辐照, 共辐照 10 min。辐照/假照过程中, 实时推注微泡(0.02 ml 脂氟显微泡造影剂稀释于 1 ml 生理盐水, 整个辐照过程共推注 0.4 ml)。辐照后约 10 min, 待造影剂基本廓清后, 再次行荷瘤裸鼠双侧后腿肿瘤超声造影。

1.3 DOX 药物浓度检测 每组中任意选取 10 只荷瘤裸鼠, 于超声辐照/假照结束后 1 h, 在充分麻醉情况下剪开裸鼠胸腔, 充分暴露心脏, 经左心室插入 8 号平头针至主动脉, 缓慢灌注生理盐水, 同时剪开右心房引流出灌注液, 直至流出液变清亮后剪取裸鼠双侧后腿肿瘤组织。将肿瘤组织标本置于 1 ml 高氯酸溶液中(浓度 0.1 mmol/L), 采用 Bertin Precellys 24 型研磨细胞破碎仪, 以 6 000 rot/min 速率匀浆 5 s, 间歇 20 s, 循环 3 次。于 4℃ 条件下静放置 30 min 后, 以 14 000 rot/min 高速离心 5 min, 取上清液, 萃取肿瘤内 DOX。采用 Waters 2475 高效液相色谱仪测定肿瘤组织内的 DOX 药物浓度。

1.4 超声造影定量分析 分析超声辐照/假照前后造影图像, 勾画包含整个肿瘤组织的 ROI, 通过时间-强度曲线获得峰值强度(peak intensity, PI)及 AUC。

1.5 组织病理检查 对每组中 DOX 药物浓度检测后剩余的 1 只荷瘤裸鼠肿瘤组织标本进行取材, 方法同前。将肿瘤组织标本固定于 4% 多聚甲醛, 石蜡包埋、切片、HE 染色后, 采用 Olympus BX63 正置荧光显微镜观察肿瘤组织结构改变。

1.6 MI 对应峰值负压测定 超声辐照/假照前, 采用 ONDA 薄膜水听器测量不同 MI 对应的峰值负压范围(探头单根线测量, 取幅值最大的线)。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计分析软件。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用配对 t 检验对各组治疗侧与对照侧、超声辐照/假照前与超声辐照/假照后进行比较; 不符合正态分布则以中位数(上下四分位数)表示, 采用 Wilcoxon 符号秩和检验进行比较。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤组织 DOX 药物浓度 A、B、C 组治疗侧肿瘤组织 DOX 药物浓度分别为 $(1.45 \pm 0.53) \mu\text{g/g}$ 、 $1.75(1.60, 1.80) \mu\text{g/g}$ 和 $1.13(0.65, 1.33) \mu\text{g/g}$, 对照侧分别为 $(1.07 \pm 0.46) \mu\text{g/g}$ 、 $1.76(1.72, 1.78) \mu\text{g/g}$ 和 $1.04(0.71, 1.33) \mu\text{g/g}$ 。A 组治疗侧药物浓度明显高于对照侧($t = -5.163$, $P = 0.001$); B 组及 C 组治疗侧与对照侧药物浓度差异均无统计学意义($Z = -0.297$ 、 -0.357 , $P = 0.766$ 、 0.721)。

2.2 超声造影定量指标 与超声辐照/假照前比较, A、B、C 组辐照后治疗侧 PI 均升高、AUC 均增大(图 1), A、C 组假照后对照侧 PI 均升高, A 组假照后对照侧 AUC 增大(P 均 ≤ 0.05), 见表 1。

2.3 肿瘤组织病理表现 大体观察, A、B、C 组肿瘤组织超声辐照/假照后均未见明显改变, 瘤块呈淡黄色, 质地坚韧, 肿瘤中心未见明显坏死区域。HE 染色后镜下观察见肿瘤组织主要由胰腺癌细胞和结缔组织构成, 肿瘤细胞呈索状排列, 核大、深染, 呈明显异型性, 未见明显出血及细胞肿胀(图 2)。

2.4 实测峰值负压 A 组(MI 0.3)实测峰值负压 0.81~0.83 MPa, B 组(MI 0.7)为 0.96~1.32 MPa, C 组(MI 1.1)为 2.29~2.53 MPa。

3 讨论

目前已有动物实验^[6]及临床研究^[7]证实低强度超声联合微泡可有效增强肿瘤化疗疗效, 空化效应在其中起到关键作用。调控空化效应的目的是在提高肿瘤

表 1 各组裸鼠人胰腺癌荷瘤模型辐照前后超声造影定量指标比较($n=10$)

组别	PI		t/Z 值	P 值	AUC		t/Z 值	P 值
	辐照/假照前	辐照/假照后			辐照/假照前	辐照/假照后		
A 组								
治疗侧	53.46 $\pm$ 10.18	67.99 $\pm$ 9.02	-6.539	<0.001	2 961.31 $\pm$ 544.49	3 780.82 $\pm$ 499.45	-5.528	<0.001
对照侧	59.11 $\pm$ 12.10	70.11 $\pm$ 10.35	-2.957	0.016	3 252.64 $\pm$ 654.95	3 881.93 $\pm$ 574.20	-3.112	0.012
B 组								
治疗侧	50.58 $\pm$ 9.37	68.24 $\pm$ 9.48	-4.676	0.001	2 774.86(2 300.96, 3 137.51)	3 990.85(3 486.36, 4 248.06)	-2.701	0.007
对照侧	54.86 $\pm$ 11.83	65.82 $\pm$ 14.14	-1.802	0.105	2 844.22(2 156.48, 3 438.15)	3 303.21(3 072.66, 5 000.03)	-1.580	0.114
C 组								
治疗侧	59.57 $\pm$ 14.33	74.74 $\pm$ 15.49	-5.734	<0.001	3 417.73 $\pm$ 931.04	4 138.24 $\pm$ 853.07	-4.240	0.002
对照侧	67.17 $\pm$ 13.32	76.27 $\pm$ 11.58	-2.592	0.029	3 844.82 $\pm$ 769.71	4 179.25 $\pm$ 582.17	-1.443	0.183

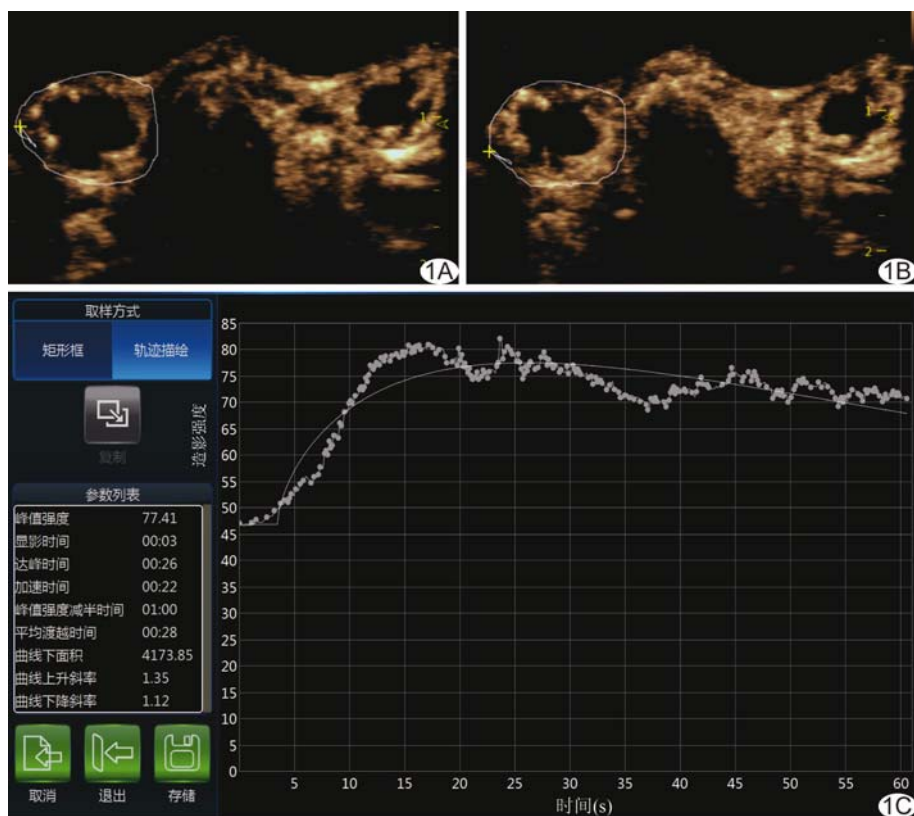


图1 裸鼠人胰腺癌荷瘤模型超声造影表现, A组(MI 0.3) A. 超声辐照/假照前裸鼠双侧后腿移植瘤超声造影图像, 左侧为治疗侧, 右侧为对照侧, 白色圆形区域为 ROI; B. 超声辐照后超声造影显示治疗侧(左侧)微泡灌注量较超声辐照前明显增多; C. ROI 的时间-强度曲线

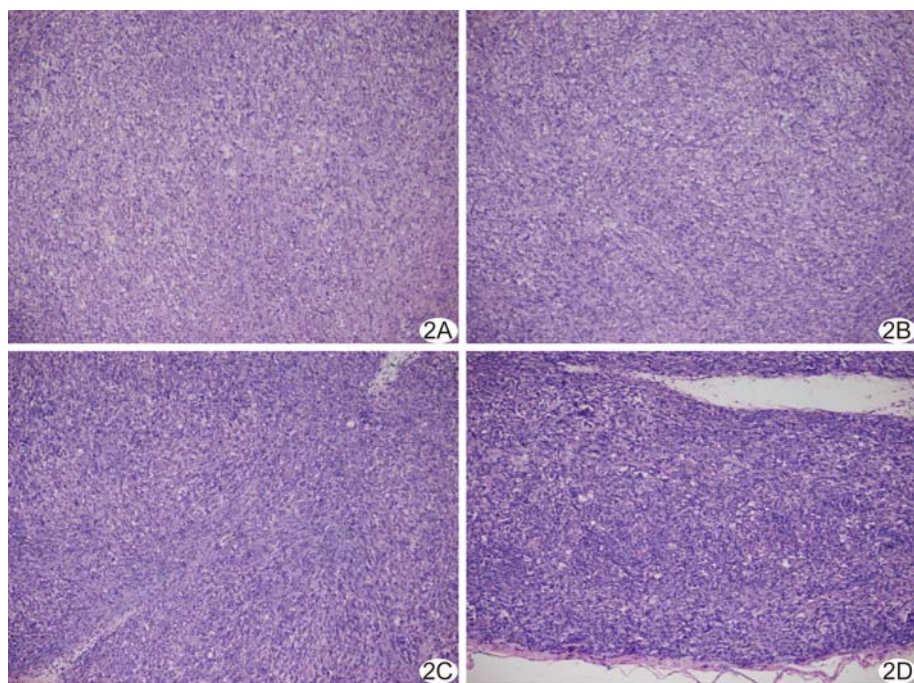


图2 裸鼠人胰腺癌荷瘤模型组织病理图(HE, ×100) A、B. A组(MI 0.3)对照侧(A)及治疗侧(B); C. B组(MI 0.7)治疗侧; D. C组(MI 1.1)治疗侧

局部化疗药物浓度的同时, 避免由其造成的不良反应, 其中调节峰值负压尤为重要。峰值负压在诊断超声中主要以 MI 的形式呈现。Dimceviski 等^[8] 利用 MI 为 0.2 的诊断超声联合微泡增强胰腺癌的化疗效果, 使患者中位生存期延长 8.9 个月。Lin 等^[9] 利用 1.2 MPa 低强度超声联合微泡增益荷瘤裸鼠化疗的实验结果也表明其有效提高了肿瘤局部药物浓度。

超声化疗虽能增强肿瘤局部药物浓度, 从而提高化疗疗效, 但目前对超声辐照 MI 的选择缺乏统一标准。本研究中, 选取 3 种不同 MI 的诊断超声联合微泡作用于裸鼠人胰腺癌荷瘤模型, 发现当 MI 为 0.3 时, 治疗侧肿瘤组织内 DOX 药物浓度较对照侧明显升高, 提示在此条件下利用诊断超声联合微泡可显著提高化疗效果; MI 取 0.7 和 1.1 时, 治疗侧与对照侧 DOX 药物浓度差异均无统计学意义。既往研究^[10-12] 报道, 微泡在血管内发生瞬态空化所对应的峰值负压阈值为 0.5~1.0 MPa, 峰值负压 > 2.0 MPa 时, 高强度的瞬态空化可使微血管壁发生机械毁损, 导致肿瘤组织发生暂时性水肿, 从而压迫阻断肿瘤血液循环, 产生抑制肿瘤血流效应, 反而不能促进肿瘤局部化疗药物释放。本研究中 MI 为 0.3 时对应实测峰值负压为 0.81~0.83 MPa, 此时超声能量已可使微泡在血管内发生瞬态空化, 且不会引发因峰值负压高而产生的不良反应; MI 为 0.7 时对应实测峰值负压为 0.96~1.32 MPa, 同样处于可激发瞬态空化的范围内, 但在此条件下 DOX 药物靶向释放浓度较

超声辐照/假照前并无显著提高,提示随峰值负压逐渐增高,瞬态空化所产生的生物学效应在空化效应中所占比例逐渐升高,稳态空化所占比例逐渐下降,肿瘤血流抑制效应逐渐增强;MI 为 1.1 时对应的实测峰值负压为 2.29~2.53 MPa,符合以瞬态空化为主的肿瘤血管抑制效应的发生条件。

肿瘤血管的异质性可能是影响肿瘤血管局部药物浓度的另一重要因素,主要体现在肿瘤血管结构和相关血流动力学方面^[13-15]。肿瘤血管发育缺损时,较正常血管的组织结构更为薄弱。MI 为 0.3 时,超声联合微泡作用于肿瘤血管,脆弱的血管可能产生更显著的声孔效应,从而提高肿瘤局部药物浓度。肿瘤血管血流动力学的异质性体现在肿瘤周边部位的血管与肿瘤中心的血管相比,血流量更大、流速更快,微泡浓度也更高,可产生更为显著的空化效应。随着超声能量升高,当 $MI \geq 0.7$ 时,肿瘤周边部位血管内微泡迅速空化,造成局部组织水肿,对管壁更薄的肿瘤中心血管产生挤压,导致肿瘤中心血管内微泡空化更为困难,局部药物释放受到抑制,而这样的抑制作用可能是一过性或功能性的^[16]。

本研究超声造影定量分析显示,治疗侧超声辐照后 PI 及 AUC 均较辐照前明显提升;对照侧超声假照后亦有一定提升,其中 A、C 组 PI 及 A 组 AUC 与超声假照前比较差异均有统计学意义。分析原因,可能是由于裸鼠体质量过低,实验中微泡及生理盐水推注量约 0.6 ml,接近循环血量的 60%(裸鼠循环血量约 0.8~1.0 ml),使得循环负荷显著增加,具体机制尚待进一步研究。

综上所述,MI=0.3 的诊断超声联合微泡能促进人胰腺癌荷瘤裸鼠肿瘤局部化疗药物释放;MI ≥ 0.7 时无法有效提高肿瘤局部药物浓度。本研究未对峰值负压 <0.5 MPa(对应 MI <0.2)的超声联合微泡进行肿瘤局部化疗药物释放分析,将在今后进一步研究。

[参考文献]

- [1] Gu Y, Chen C, Tu J, et al. Harmonic responses and cavitation activity of encapsulated microbubbles coupled with magnetic nanoparticles. *Ultrason Sonochem*, 2016, 29:309-316.
- [2] Lammertink BH, Bos C, Deckers R, et al. Sonochemotherapy: From bench to bedside. *Front Pharmacol*, 2015, 6:138.
- [3] Yousefian B, Firoozabadi SM, Mokhtari-Dizaji M. Sonochemotherapy of breast adenocarcinoma: An experimental in vivo model. *J Ultrasound*, 2014, 18(2):165-171.
- [4] Cavalieri F, Zhou M, Ashokkumar M. The design of multifunctional microbubbles for ultrasound image-guided cancer therapy. *Curr Top Med Chem*, 2010, 10(12):1198-1210.
- [5] Castle J, Butts M, Healey A, et al. Ultrasound-mediated targeted drug delivery: Recent success and remaining challenges. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 304(3):H350-H357.
- [6] 朱梅,刘政,何利平,等.紫杉醇微泡超声空化增强乳腺癌化疗的实验研究. *中国医学影像技术*, 2011, 27(2):217-221.
- [7] Dijkmans PA, Juffermans LJ, Musters RJ, et al. Microbubbles and ultrasound: From diagnosis to therapy. *Eur J Echocardiogr*, 2004, 5(4):245-256.
- [8] Dimceviski G, Kotopoulos S, Bjanes T, et al. A human clinical trial using ultrasound and microbubbles to enhance gemcitabine treatment of inoperable pancreatic cancer. *J Control Release*, 2016, 243:172-181.
- [9] Lin CY, Li JR, Tseng HC, et al. Enhancement of focused ultrasound with microbubbles on the treatments of anticancer nanodrug in mouse tumors. *Nanomedicine*, 2012, 8(6):900-907.
- [10] Chen WS, Brayman AA, Matula TJ, et al. Inertial cavitation dose and hemolysis produced in vitro with or without Optison. *Ultrasound Med Biol*, 2003, 29(5):725-737.
- [11] Tu J, Matula TJ, Brayman AA, et al. Inertial cavitation dose produced in ex vivo rabbit ear arteries with Optison by 1-MHz pulsed ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, 2006, 32(2):281-288.
- [12] Liu Z, Gao S, Zhao Y, et al. Disruption of tumor neovasculature by microbubble enhanced ultrasound: A potential new physical therapy of anti-angiogenesis. *Ultrasound Med Biol*, 2012, 38(2):253-261.
- [13] Ho YJ, Wang TC, Fan CH, et al. Current progress in antivasculature tumor therapy. *Drug Discov Today*, 2017, 22(10):1503-1515.
- [14] Primeau AJ, Rendon A, Hedley D, et al. The distribution of the anticancer drug Doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(24):8782-8788.
- [15] Shen ZY, Shen E, Zhang JZ, et al. Effects of low-frequency ultrasound and microbubbles on angiogenesis-associated proteins in subcutaneous tumors of nude mice. *Oncol Rep*, 2013, 30(2):842-850.
- [16] Li P, Zhu M, Xu Y, et al. Impact of microbubble enhanced, pulsed, focused ultrasound on tumor circulation of subcutaneous VX2 cancer. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127(14):2605-2611.