

近红外光介导的尺寸可逆转变超声造影剂的制备及其性质

侯婉晴^{1,2}, 郭晓萌¹, 罗利华¹, 范玉玲^{2*}, 游 剑^{1*}

(1. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058;

2. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150028)

摘要: 制备一种纳米级的载药超声造影剂, 该纳米粒可有效累积分布至肿瘤深层部位, 且体外实验证明, 在升高温度或近红外光辐照下可实现纳米粒尺寸的纳米-微米转变: 评价其体外粒径变化规律、体外超声显像效果及体内分布情况。所制备的纳米粒呈球形, 脂质膜中可见中空金纳米球 (hollow gold nanoparticle, HAuNS) 的负载, 粒径为 302 ± 5 nm, 分散性指数为 0.195 ± 0.018 , 分布较均匀。在近红外光辐照 (1 或 $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$) 下导致含有该纳米粒的溶液 (以 HAuNS 计, 0.2 、 0.04 和 $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 升温迅速, 利用激光粒度仪的控温功能, 发现升温至 $52 \text{ }^\circ\text{C}$ 左右时即可检测到一定量的微米级粒子产生; 在体外超声显像实验中, 纳米粒经近红外光辐照后超声诊断仪检测到大量上扬的微泡, 可增强体外超声显像的效果; 体内分布实验表明, 该纳米粒可因肿瘤的高渗透及滞留效应 (EPR 效应) 在肿瘤中大量累积。本研究制备了可在肿瘤内部大量累积的纳米-微米可逆转变的超声显像纳米粒, 为实现肿瘤病灶部位的超声显像同时结合光热-化学治疗提供了一种可行的方案。

关键词: 超声造影剂; 体外超声成像; 全氟己烷; 中空金纳米球; 光热转化; 相转变

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 09-1458-08

The formulation and characterization of near infrared-mediated size reversible ultrasound contrast agent

HOU Wan-qing^{1,2}, GUO Xiao-meng¹, LUO Li-hua¹, FAN Yu-ling^{2*}, YOU Jian^{1*}

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2. Research Center of Life Science and Environmental Science, Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China)

Abstract: The drug-loaded ultrasound (US) contrast nanoparticles, which can effectively accumulate in the tumor to penetrate into its deep section, were prepared. After being heated or under the near infrared (NIR) light irradiation, the size of nanoparticles would transform from nanometer-scale to micrometer-scale *in vitro*, which can vastly enhance the effect of US imaging. We evaluated the size changes of the nanoparticles *in vitro*, investigating their effect in ultrasound imaging and distribution *in vivo*. Liposomes containing hydrophobic modified hollow gold nanospheres (HAuNS), doxorubicin (DOX) and perfluorohexane (PFH), which were referred to DOX and HAuNS loaded PFH liposome (DHPL), were prepared by thin film evaporation and ultrasonic technique. The morphology and size of DHPL were measured by transmission electron microscopy and particle size analyzer with dynamic light scattering (DLS) method. The agar gel pore model was used to investigate the enhanced effect of nanoparticles *in vitro* US imaging under the NIR light irradiation. The biodistribution of DHPL in 4T1 tumor-bearing mice after intravenous injection was measured by the *in vivo*

收稿日期: 2017-02-22; 修回日期: 2017-03-21.

*通讯作者 Tel: 86-571-88981651, Fax: 86-571-88208439, E-mail: youjiandoc@zju.edu.cn;

Tel: 86-451-84844242, E-mail: 429776474@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0161

imaging system. The DHPL were spherical at a particle size of 302 ± 5 nm and polydispersity index of 0.195 ± 0.018 . The HAuNS loaded on phospholipid membrane was observed in transmission electron microscope (TEM) image. Under the NIR light irradiation (1 or $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$), the temperature of the solution containing the DHPL ($0.2, 0.04, 0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in terms of HAuNS) rose rapidly. And a certain amount of micrometer-sized particles could be detected by the particle size analyzer when the temperature of the analyzer was raised to $52 \text{ }^\circ\text{C}$. The abundant microbubbles, which would enhance the effect of US imaging, were detected by ultrasonic diagnostic apparatus when the nanoparticles were irradiated by NIR light in the *in vitro* US imaging experiment. The *in vivo* distribution experiment showed that the DHPL could effectively accumulate in the tumor due to the enhanced permeability and retention effect (EPR effect) of the tumor. In this study, we successfully made a nanometer-micrometer reversible nanoparticles that can accumulate inside the tumor to provide a feasible scheme for US imaging in the tumor site and the combinational photothermal-chemotherapy simultaneously.

Key words: ultrasound contrast agent; *in vitro* ultrasound imaging; perfluorohexane; hollow gold nanoparticle; photo-thermal conversion; phase shift

超声作为一种成熟的无创检查技术, 已应用到临床多种疾病的诊断^[1-5], 为增强超声造影效果, 目前临床上常用超声微泡造影剂^[6, 7], 如 SonoVue[®]。当超声造影时, 接收到的超声强度是入射强度和反射体的散射截面的函数, 而散射截面与超声频率的 4 次方和散射体半径的 6 次方成正比^[8]。因此, 临床上为获得较高的超声显像效果, 微泡造影剂的粒径一般控制在 $1 \sim 10 \mu\text{m}$ ^[9]。这种微泡可随血流到达检测部位, 实现血池造影; 但这类造影剂由于尺寸较大, 无法穿过血管屏障, 无法到达病灶组织深层, 且很快会随血流被清除, 因此超声成像时间仅几分钟^[10, 11]。这些缺陷限制了此类造影剂对血管外病变的探测能力, 更不适合于实现药物病灶部位 (如肿瘤) 的定向输送。为了解决上述问题, 近年纳米尺寸的液态氟碳造影剂成为研究的热门^[12-15]。并且由于纳米级造影剂尺寸较小, 可以利用实体瘤的高渗透及滞留效应 (EPR 效应), 使其累积到肿瘤部位^[16], 但其自身回声性能较弱, 无法获得满意的造影效果, 如何解决造影剂的组织渗透能力与回声信号之间的矛盾是目前研究的热点及难点。

基于此, 本研究制备出一种粒径可变的超声成像纳米粒: 采用磷脂包裹沸点 $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 的全氟己烷 (perfluorohexane, PFH), 将近红外光 (NIR) 热转化材料中空金纳米球 (hollow gold nanoparticle, HAuNS) 及化疗药物多柔比星共同装载到纳米粒脂质膜层; 利用 HAuNS 的光热转化特性, 即经近红外光辐照后可以将光能高效转化成热能, 一方面实现肿瘤的光热消融治疗^[17]; 另一方面通过升高纳米粒的温度使包裹的 PFH 气化以得到粒径达微米级的微泡, 实现增强的超声成像效果。

材料与方法

试剂 柠檬酸钠 (sodium citrate, Acros Organics, USA); 硼氢化钠 (sodium borohydride, NaBH_4)、氯化钴 (II) 六水合物 (cobalt (II) chloride hexahydrate) (Sigma Aldrich Co., USA); 高纯氩气 (argon, Ar, 浙江今工特种气体有限公司); 3-巯基丙酸十八烷酯 (octadecyl 3-mercaptopionate, OMP, Tokyo Chemical Industry Co., Japan); 盐酸多柔比星 (doxorubicin hydrochloride, $\text{DOX} \cdot \text{HCl}$, 浙江海正药业有限公司); 硬脂酸 (stearic acid, SA, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 氯金酸 (chloroauric acid, HAuCl_4)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) (Thermo Fisher Scientific, USA); 大豆卵磷脂 (S100)、DSPE-PEG2000 (德国 Lipoid 公司); 葡聚糖凝胶 G50 (Sephadex G50, 北京天恩泽生物技术公司); 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide (DiR, Carlsbad, USA); 细胞培养基 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640)、DMEM 高糖细胞培养基 (Dulbecco's modified eagle high glucose medium)、胰蛋白酶 (trypsin) (Gibco BRL, USA); 胎牛血清、新生牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司); 琼脂粉 (国药集团化学试剂有限公司); 其余试剂均为分析纯。

仪器 冷冻高速离心机 (ST16R, ThermoFisher scientific CO., Germany); 超声波细胞粉碎仪 (92-IIDN, 宁波新芝生物科技股份有限公司); Milli-Q 超纯水仪 (Milli-Q, Millipore Co., USA); 激光粒度仪 (ZS90, Malvern Co., UK); 透射电子显微镜 (JEOLJEM-1230, Japan); 激光治疗仪 (Diomed 15 plus 01810, No: 1592651, 英国迪马公司); 共聚焦显微镜 (Nikon A1

Ti, Nikon Co., Japan), 超声诊断仪 (IU22 型, 荷兰飞利浦公司); 小动物活体成像仪 (Maestro EX, CRI Inc., USA)。

细胞及实验动物 选择人源乳腺癌细胞 MCF-7 和鼠源乳腺癌细胞 4T1 (上海中国科学院细胞库), 分别使用含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 细胞培养基和 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖细胞培养基 (青霉素、链霉素各 $100 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$), 置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养, 常规胰酶/EDTA 消化传代。BALB/c 雌性小鼠 ($20 \pm 2 \text{ g}$, 上海斯莱克公司, SPF 级, 合格证号: SCXK (沪) 2012-0002)。

中空金纳米球的合成 在 26°C 水浴环境及氩气的保护下, 向 1 L 去离子水中加入 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸钠 2.8 mL 作为稳定剂, 再依次加入硼氢化钠 (NaBH_3) 0.168 g 及 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钴溶液 (CoCl_2) 1 mL, 快速搅拌下, 硼氢化钠将 Co^{2+} 还原成钴原子, 30 min 后形成较稳定均匀的钴纳米粒模板; 在氩气保护及搅拌的条件下, 以得到的钴纳米粒为模板, 加入氯金酸 (HAuCl_4) 200~300 μL , 钴纳米粒表面发生氧化还原反应, 30 min 后得到表面为金壳、内部为钴粒子的纳米粒。此时, 撤去氩气保护装置, 利用空气将上述得到的纳米粒缓慢氧化, 内部的 Co 被逐渐氧化为 Co^{2+} , 最终得到内部中空的金纳米球。

中空金纳米球的表面疏水性修饰 上述样品 (5 mg) 经高速离心的方式除去反应介质水, 沉淀即得 HAuNS。将其均匀分散到少量的 *N,N*-二甲基甲酰胺 (*N,N*-dimethylformamide, DMF) 中, 备用, 快速称取 OMP 50 mg 溶于 10 mL DMF 中, 氩气保护下加入 HAuNS, 密闭条件下, 温和搅拌反应过夜。反应结束后, 高速离心, 弃上清, 除去 DMF 及未反应的 OMP, 得到的沉淀即为 OMP 修饰的 HAuNS (OMP modified HAuNS, OMP-HAuNS), 可均匀分散到氯仿中。

硬脂酸结合的多柔比星的制备 向 10 mL 二甲亚砜 (dimethylsulfoxide, DMSO) 中加入 HCl (pH 2) 500 μL , 得到 pH 约为 5 的混合液。称取 SA 5.4 mg 和 EDC 36.4 mg 分别溶于 2 mL 酸化后 DMSO 中, 60°C 水浴中将 EDC 溶液加入到 SA 溶液中, 磁力搅拌反应 30 min 后, 用三乙胺将反应液调节到 pH 8 左右, 加入 $\text{DOX}\cdot\text{HCl}$ 10 mg, 60°C 水浴下, 温和搅拌反应 24 h。以上得到的反应液采用透析方法纯化, 于透析袋 (3400 Da) 中, 用纯净水透析 48 h, 除去 DMSO 及未反应的反应物, 得到的产物硬脂酸结合的多柔比星 (stearic acid bound doxorubicin, SA-DOX), 并

采用冻干法收集。

载药和中空金纳米球超声造影脂质体的制备 称取 15 mg S100、5.58 mg DSPE-PEG2000 和 2 mg SA-DOX, 置于 100 mL 茄型瓶中, 加入约 5 mL 氯仿溶解, 待完全溶解后, 加入约 0.4 mg OMP-HAuNS, 采用薄膜水化法得到载药脂质体, 然后利用探头超声的方法得到粒径均匀的载药脂质体; 冰浴下加入 PFH 60 μL , 并在冰浴下利用探头超声将其包载到脂质体内, 得到载 SA-DOX 和 HAuNS 的超声造影脂质体 (DOX and HAuNS loaded PFH liposome, DHPL)。按上述方法制备不含 HAuNS 仅负载 SA-DOX 的脂质体 (DOX loaded PFH liposome, DPL)。得到的 DHPL 通过 G50 凝胶柱法进行纯化, 除去未包载的药物, 整个制备过程在避光下进行。应用激光粒度仪检测载药脂质体的粒径, 应用透射电子显微镜观察载体形态及 OMP-HAuNS 的包载情况。

为了进行后续体内分布的研究, 进一步制备了近红外荧光染料 DiR 标记的 DHPL (DiR labeled DHPL, DiR@DHPL): 取 DiR、S100、DSPE-PEG 2000、SA-DOX 和 OMP-HAuNS 参照上述操作进行制备。

光热转化 取稀释不同倍数的 DHPL 溶液各 0.5 mL 加入到 4 mL 玻璃比色皿中, 采用 808 nm 的近红外激光对其持续照射, 功率为 $2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 辐照时间 5 min, 每隔 20 s 记录 1 次溶液温度, 绘制光热转换曲线。

体外粒径随温度变化的规律 DHPL 用 pH 7.4 磷酸缓冲液 (phosphate buffer, PBS) 稀释 50 倍, 置于冰浴环境中, 分别于 4°C 、 25°C 、 37°C 、 42°C 、 47°C 、 52°C 、 57°C 、 62°C 、 67°C 、 72°C 、 77°C 、 82°C 、 87°C 和 92°C 下采用激光粒度仪测试 DHPL 的粒径, 同时检测 DHPL 在 37°C 、 42°C 、 62°C 和 92°C 时经历 3 次升温-降温循环过程中的粒径变化规律。

细胞摄取 将 MCF-7 细胞接种到直径约 10 mm 的小圆玻璃片上, 置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养 24 h, 待细胞贴壁后, 分别加入 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 DOX 计) 的 SA-DOX、DPL 及 DHPL, 每种样品设 3 个复孔。于加药后 2 h 时收集上述玻璃片, 核染后固定到载玻片上, 利用共聚焦显微镜观察摄取情况, 并用 Image J 软件进行半定量分析比较 3 种样品的摄取。

体外超声成像实验设计 将 DPL 和 DHPL 置于 4°C 冰箱中储存备用。选用 1% 琼脂糖凝胶作为成像基质, 制作孔径约 1 cm 的孔洞模型。取 DPL 与 HAuNS (0.04 mg) 物理混合 200 μL , 放置于孔洞模型内, 以

PBS 作为阴性对照, 采用不同条件的 NIR 光对样品进行照射, 同时超声成像仪检测样品的超声信号变化。另取 DHPL 参照上述操作, 进行相同实验, 考察近红外光介导下的超声成像规律。整个实验在冰浴环境下完成, 并用 Image J 软件分析超声图像兴趣区的灰度值。

DHPL 在 4T1 荷瘤小鼠体内的经时分布 待接种细胞采用胰酶/EDTA 消化收集后, $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃去上清液用适量无血清 DMEM 培养基稀释, 并将上述细胞悬液以细胞数 2×10^6 个接种到 BALB/c 雌性小鼠腹部乳房脂肪垫, 获得 4T1 荷瘤小鼠模型。选取肿瘤大小适中的 4T1 荷瘤小鼠, 尾静脉注射 DiR 标记的 DHPL 溶液 ($500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 以 SA-DOX 计) 0.2 mL, 于注射后 6、24 和 48 h 时, 用 10% 水合氯醛麻醉小鼠, 活体成像仪拍摄 DiR 在荷瘤小鼠体内的分布情况, 并于 48 h 处死小鼠, 剖出肿瘤及主要脏器, 称重并用活体成像仪拍摄脏器的荧光照片, 以 5% 注射剂量为对照, 采用荧光半定量的方式计算每克组织中 DHPL 的大致含量。

结果及讨论

1 HAuNS 的基本特性

HAuNS 的光谱吸收如图 1A 所示, 其在近红外光

808 nm 左右有最大吸收, 表明合成的 HAuNS 在近红外光区域具备良好的表面等离子共振光学特性, 图 1B 是 HAuNS 的透射电镜图, 其平均粒径为 $35.8\pm 1.2\text{ nm}$, 平均分散性指数 (polydispersed index, PDI) 为 0.007 ± 0.004 ($n=3$), 是一种粒径较小、分布均匀的优良的光热转换材料。如图 1C 所示, 经 OMP 疏水修饰后的 HAuNS 在氯仿中有良好的分散性, 在乙醇中分散不良, 说明疏水性修饰效果较好。

2 DHPL 基本特性及其形态

透射电镜图可以看到脂质体膜上有少量的 HAuNS (图 2A)。所制备的 DHPL 粒径为 $302\pm 5\text{ nm}$, PDI 为 0.195 ± 0.018 , 放置 1 周粒径无明显变化 (图 2B)。升温曲线可以看出, 升温速度及所能达到的最高温度与 HAuNS 浓度、近红外光照射功率及辐照时间有直接的关系 (图 3)。以质量浓度为 $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ HAuNS 的 DHPL 为例, 经输出功率为 2 W 的近红外光辐照时升温速度极快, 160 s 内制剂溶液温度从室温升至 $94\text{ }^\circ\text{C}$ 以上, 且局部有沸腾情况发生, 但当 NIR 光功率率降至 1 W 时, 制剂升温速度明显减慢, 照射 320 s 时制剂温度达到最高值 ($68.4\text{ }^\circ\text{C}$); 同等功率下, 降低制剂中 HAuNS 浓度, 近红外光照射引起的升温速度减慢: 近红外光 1 W 功率照射 600 s 后, 对于质量浓度为 0.04 和 $0.02\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ HAuNS 的 DHPL 溶液最终

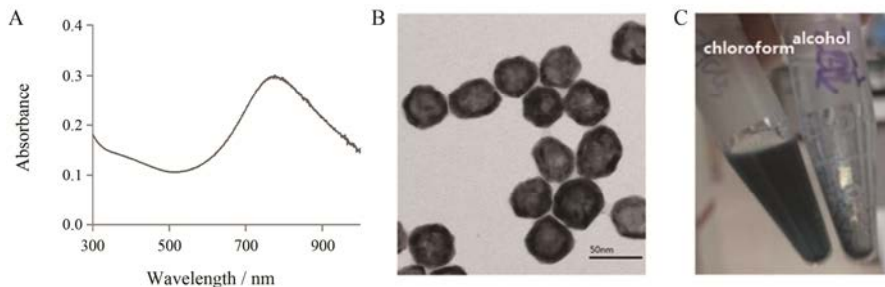


Figure 1 The basic characteristics of DOX and HAuNS loaded PFH liposome (DHPL). A: Ultraviolet and visible spectrophotometry (UV-Vis) scan of HAuNS; B: The transmission electron microscope (TEM) image of HAuNS; C: The dissolution capability of OMP-HAuNS in absolute ethanol and chloroform. DOX: Doxorubicin; PFH: Perfluorohexane; HAuNS: Hollow gold nanospheres; OMP: Octadecyl 3-mercaptopionate

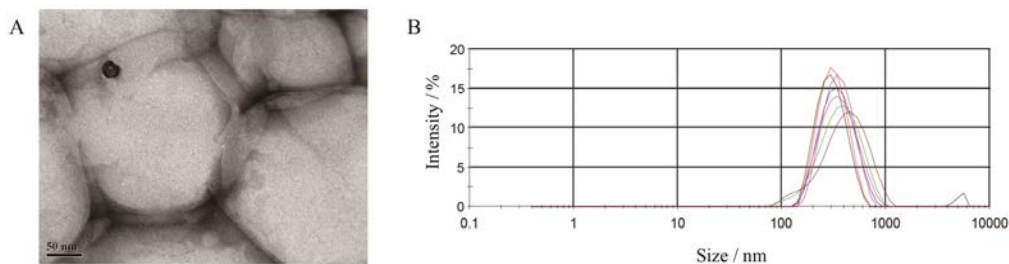


Figure 2 The morphology and particle size stability of DHPL. A: The TEM image of DHPL; B: The size stability of DHPL stored in $4\text{ }^\circ\text{C}$ freezer

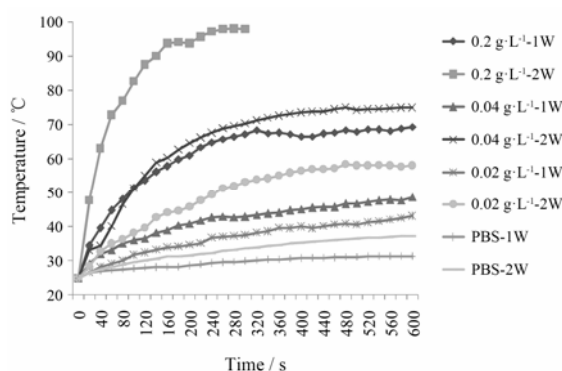


Figure 3 The temperature-rising curve of DHPL under near infrared (NIR) light irradiation. The change of solution temperature of DHPL preparation (0.2, 0.04, 0.02 g·L⁻¹ of HAuNS) when it was irradiated by different sets of NIR light

温度仅分别升高至 48 和 43 °C。而 PBS 样品光照后溶液升温最小。

3 粒径随温度升高变化的规律

根据 DHPL 在近红外光辐照下温度的升高情况, 利用激光粒度仪的升温功能, 模拟光热带来的升温效应, 检测温度升高时 DHPL 的粒径变化情况。图 4A 为不同温度下 DHPL 的粒径, 随着温度升高粒径由小到大的变化。激光粒度仪温度在 4 °C、42 °C、72 °C 和 92 °C 时, DHPL 的粒径分别为 180.2、380、702.1 及 906 nm, 且在外界温度高于 52 °C 时, 就开始有微米级的粒子出现; 如图 4B, 揭示了 DHPL 粒径纳米-微米可逆转变的可能性: 待测制剂温度经历了 3 次反复升温和降温过程, DHPL 粒径也随之出现了 3 次由小到大的变化, 但随着升温次数的增加, 粒子粒径增大的幅度稍有减弱, 且升高的温度越高, 粒径减弱的幅度越大, 推测是温度反复升降导致 DHPL 中 PFH 有少量损失所致; 图 4C 显示的是图 4B 中升温为 62 °C 时, 经历升温-降温过程时 DHPL 粒径的具体分布情况, 在反复的升温-降温过程中, DHPL 的粒径也会反复地由小到大再变小。以上说明, 所制备的超声显像纳米粒的粒径有温度依赖性, 且随着温度的反复升降, 而发生纳米-微米可逆的转变。

4 载药脂质体的细胞摄取

SA-DOX、DPL 和 DHPL 以 1 μmol·L⁻¹ (按 DOX 计) 浓度与 MCF-7 细胞共同孵育 2 h 后, 细胞的共聚焦显微镜照片如图 5A, 红色荧光代表 DOX, 蓝色荧光代表细胞核, 孵育 2 h 时, 3 个样品组均可见较强的红色荧光, 细胞对 3 种样品的摄取均较快。荧光半定量分析见图 5B: SA-DOX、DPL 和 DHPL 组的荧光强度分别为 15.2±1.0、16.86±0.26 和 11.4±0.6 (*n*=3), 且 SA-DOX 组与 DPL 组的荧光强度比较没有明显差异

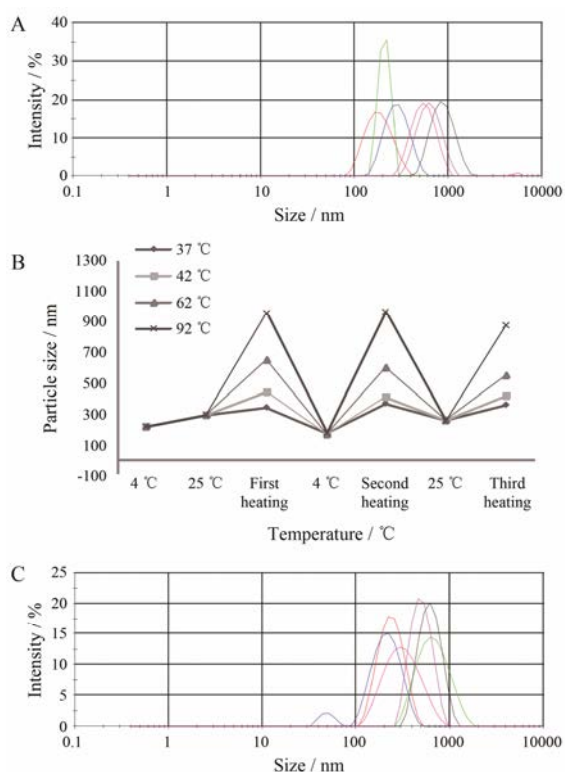


Figure 4 The variation of particle size of DHPL in various temperature by particle size analyzer. A: The particle size of DHPL at different temperatures; B: The change of particle size of DHPL through the three cycles of heating and cooling at four different temperatures; C: The specific distribution of size when DHPL was through the three cycles of heating and cooling at 62 °C

(*P* > 0.05), 但 DHPL 组与 SA-DOX 组和 DPL 组的荧光强度比较均有明显差异 (*P* < 0.05), 可能是 HAuNS 对 DOX 荧光淬灭所致^[18]。

5 琼脂糖凝胶模型的超声显像

自制琼脂糖凝胶孔洞模型注入制剂 200 μL 后, 体外超声显像的图像如图 6 所示, 不论是物理混合 (DPL+HAuNS) 组还是 DHPL 组, 经 NIR 辐照后超声信号均明显增加, 其中 DHPL 组在冰浴下冷却后超声信号又重新降低到辐照前的水平, 说明所制备的 DHPL 可以在 NIR 辐照下, 粒径增大, 导致超声信号的增强; 关闭照射后, 粒径减小, 引起超声信号的下降。NIR 辐照后, DPL 和 DHPL 会逐渐膨胀, 当包载的 PFH 完全气化时会产生上扬的微泡。因此, 选定 NIR 辐照后微泡产生的部位作为兴趣区 (region of interest, ROI), 利用 Image J 软件分析 ROI 区域的灰度值, 比较辐照 NIR 前后的灰度值变化, 灰度值越高说明超声信号越强, 生成的微泡越多。图 6 中每组图像右侧的折线图对应相应图像中 ROI 区域的灰度值, 4 组实验组辐照过程中, 灰度值变化的大致趋势基本一致。

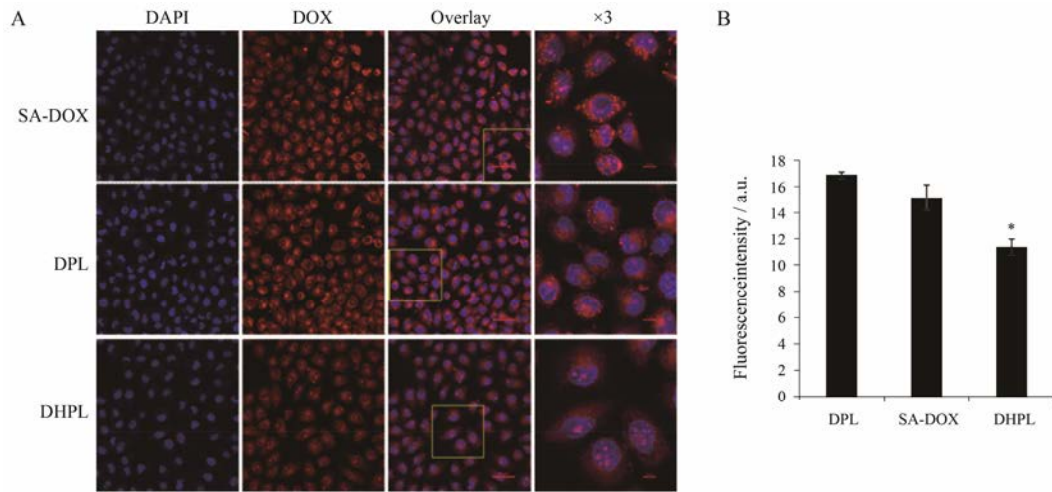


Figure 5 The uptake in MCF-7. A: After administration of 2 h, the uptake of SA-DOX, DPL, DHPL by MCF-7 cells was observed. The red fluorescence was DOX, and the blue fluorescence was nuclear fluorescence signal. B: The histogram shows the results of fluorescence semi-quantitative analysis of three samples. SA-DOX: Stearic acid bound doxorubicin; DPL: DOX loaded PFH liposome. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs SA-DOX or DPL group

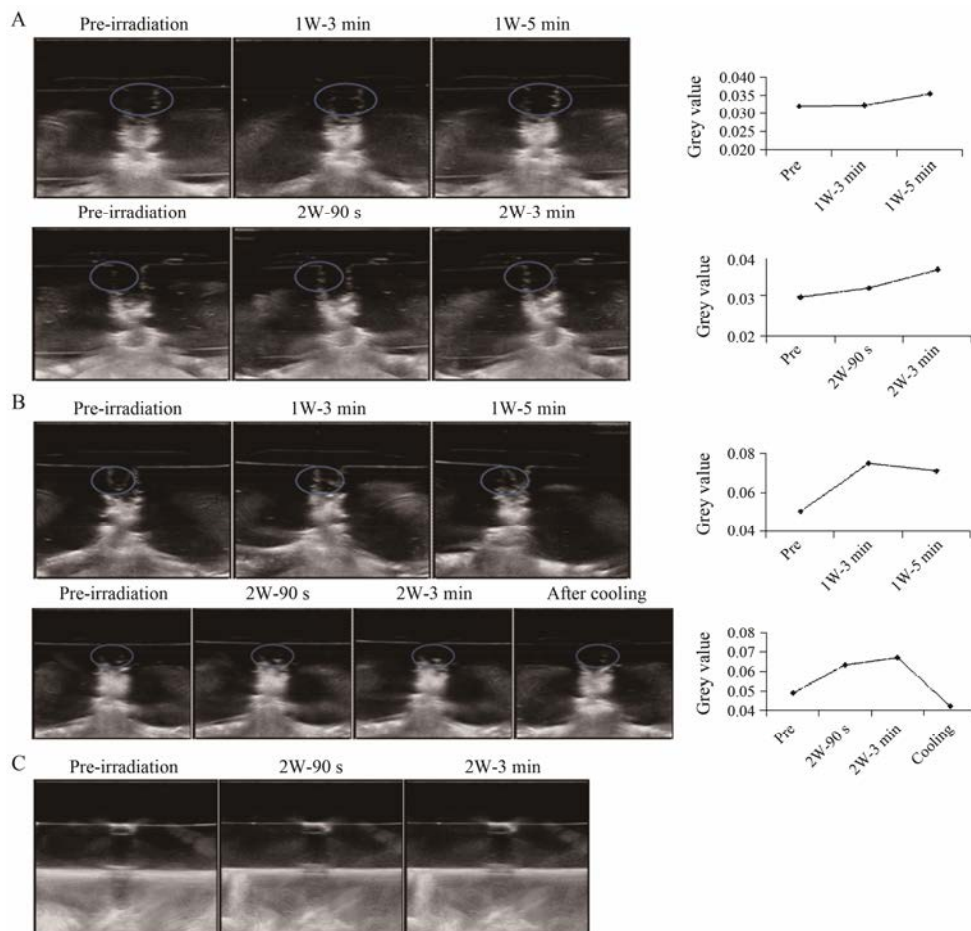


Figure 6 The *in vitro* ultrasound (US) imaging images. A: The *in vitro* US images of the DPL + HAuNS group when the agar gel model was irradiated with $1 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ of NIR light for 5 min (upper) or $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ of NIR light for 3 min (lower). B: The *in vitro* US images of the DHPL group when the agar gel model was irradiated with $1 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ of NIR light for 5 min (upper) or $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ of NIR light for 3 min (lower). C: US images of PBS group as negative control group with $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ of NIR light radiation for 3 min. The circle region was the location of microbubbles produced after irradiation with NIR, and also as the region of interest (ROI). The corresponding line graph below the images is the grey value of ROI region of each image

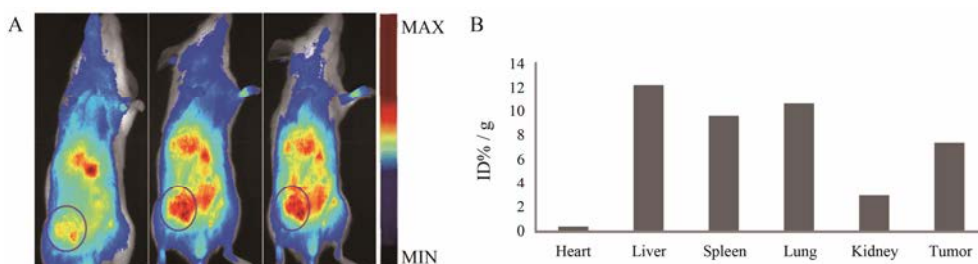


Figure 7 The *in vivo* distribution of 4T1 tumor bearing mice after injection with DiR@DHPL. A: *in vivo* imaging of 4T1 tumor bearing mice at 6, 24, and 48 h after intravenous injection with DiR@DHPL. B: At 48 h after administration, the result of fluorescence semi-quantitative analysis of DiR@DHPL in heart, liver, spleen, lung, kidney and tumor (ID%/g). DiR: 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide

值得注意的是, DHPL 组 ROI 区域灰度值增加的幅度比 DPL 组稍大; 当停止辐照后, 超声图像又恢复到辐照前的状态。以上进一步说明, DHPL 可以在 NIR 辐照时通过 H AuNS 的光热转化, 实现粒径由小至大的转变, 从而增加超声显像效果, 而停止辐照后, 纳米粒又会逐渐恢复到辐照前的纳米状态。

6 DHPL 在 4T1 皮下荷瘤小鼠模型中的分布情况

以尾静脉注射的方式, 给予 4T1 皮下荷瘤小鼠 DIR 标记的 DHPL, 考察 DHPL 在荷瘤 BALB/c 小鼠体内的分布情况。如图 7A 所示, 给药 6 h 后, 在肿瘤部位可以明显检测到 DHPL 的荧光信号, 但制剂在肝脏累积最多, 随着时间的推移, 给药 24 和 48 h 后, 制剂在肝脏中的累积有所减少, 在肿瘤部位的累积明显增加; 在 48 h 时, 处死并解剖小鼠, 利用活体荧光成像仪对心、肝、脾、肺、肾及肿瘤进行荧光半定量分析, 计算各组织器官中制剂的累积量 (图 7B), 从荧光半定量的结果可以看出制剂在肝、脾、肺中分布较多, 可能是粒子粒径稍大所致, 在肿瘤中同样存在大量 DiR 的荧光信号, 说明所制备的超声显像纳米粒在体内可以借助肿瘤的 EPR 效应, 在肿瘤部位达到满意的分布量。

结论

本研究制备了一种粒径可变的超声显像纳米粒, 这种纳米粒在温度较低时包裹的 PFH 会保持液态, 同时显像剂保持纳米状态, 升温时 PFH 会慢慢气化, 粒子也会随之膨胀, 52 °C 左右时检测到一定量的微米级粒子。在脂质膜表面负载高光热转化效率的 H AuNS, 经 NIR 辐照后可以高效地将光能转化成热能, 使纳米粒膨胀。体外粒径转变实验及超声显像实验证明了本研究的可行性。体内分布实验说明纳米粒可以在肿瘤部位达到一定的累积量, 为后续体内研究奠定了基础。

References

- [1] Fu WX, Wang Q, Zhang YS, et al. Application of ultrasound technology in the diagnosis and treatment of digestive tract diseases [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19: 602–606.
- [2] Sorensen MD, Harper JD, Hsi RS, et al. B-mode ultrasound versus color doppler twinkling artifact in detecting kidney stones [J]. *J Endourol*, 2013, 27: 149–153.
- [3] Selbekk T, Jakola AS, Solheim O, et al. Ultrasound imaging in neurosurgery: approaches to minimize surgically induced image artefacts for improved resection control [J]. *Acta Neurochir*, 2013, 155: 973–980.
- [4] Dimcevski G, Erchinger FG, Havre R, et al. Ultrasonography in diagnosing chronic pancreatitis: new aspects [J]. *World J Gastroentero*, 2013, 19: 7247–7257.
- [5] Fan J, Tang J, Fang JB, et al. Ultrasound imaging in the diagnosis of benign and suspicious adrenal lesions [J]. *Med Sci Monit*, 2014, 20: 2132–2141.
- [6] Gramiak R, Shah PM. Echocardiography of the aortic root [J]. *Invest Radiol*, 1968, 3: 356–366.
- [7] Blomley MJ, Cooke JC, Unger EC, et al. Science, medicine, and the future: microbubble contrast agents: a new era in ultrasound [J]. *Br Med J*, 2001, 322: 1222–1225.
- [8] Sirsi S, Feshitan J, Kwan J, et al. Effect of microbubble size on fundamental mode high frequency ultrasound imaging in mice [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2010, 36: 935–948.
- [9] Tu J, Swalwell JE, Giraud D, et al. Microbubble sizing and shell characterization using flow cytometry [J]. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 2011, 58: 955–963.
- [10] Martin KH, Dayton PA. Current status and prospects for microbubbles in ultrasound theranostics [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2013, 5: 329–345.
- [11] Qin S, Caskey CF, Ferrara KW. Ultrasound contrast microbubbles in imaging and therapy: physical principles and engineering [J]. *Phys Med Biol*, 2009, 54: R27–R57.

- [12] Luo B, Liang H, Zhang S, et al. Novel lactoferrin-conjugated amphiphilic poly (aminoethyl ethylene phosphate)/poly(*L*-lactide) copolymer nanobubbles for tumor-targeting ultrasonic imaging [J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 5805–5817.
- [13] Kiessling F, Fokong S, Bzyl J, et al. Recent advances in molecular, multimodal and theranostic ultrasound imaging [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 72: 15–27.
- [14] Foroutan F, Jokerst JV, Gambhir SS, et al. Sol-gel synthesis and electrospraying of biodegradable $(P_2O_5)_{55}-(CaO)_{30}-(Na_2O)_{15}$ glass nanospheres as a transient contrast agent for ultrasound stem cell imaging [J]. *ACS nano*, 2015, 9: 1868–1877.
- [15] Yin T, Wang P, Zheng R, et al. Nanobubbles for enhanced ultrasound imaging of tumors [J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 895–904.
- [16] Gao HL, Jiang XG. The development of novel tumor targeting delivery strategy [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 272–280.
- [17] O'Neal DP, Hirsch LR, Halas NJ, et al. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles [J]. *Cancer Lett*, 2004, 209: 171–176.
- [18] Jahan S, Mansoor F, Kanwal S. Polymers effects on synthesis of AuNPs, and Au/Ag nanoalloys: indirectly generated AuNPs and versatile sensing applications including anti-leukemic agent [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 53: 51–57.