

## ◆ 实验研究

## Treatment of breast cancer with adriamycin hydrochloride-loaded liquid fluorocarbon liposomes

SU Lin<sup>1</sup>, JIA Dan<sup>1</sup>, XU Xiaohua<sup>1\*</sup>, HU Cong<sup>2</sup>, HUANG Ju<sup>2</sup>, TAN Xiaolin<sup>1</sup>,  
JIA Yizhen<sup>1</sup>, WANG Zhigang<sup>2</sup>, REN Jianli<sup>2</sup>

(1. Department of Ultrasonography, the University of Hong Kong-Shenzhen Hospital,  
Shenzhen 518053, China; 2. Institute of Ultrasonic Imaging, Chongqing  
Medical University, Chongqing 400010, China)

**[Abstract]** **Objective** To prepare the liposomes carrying doxorubicin hydrochloride (DOX) and liquid fluorocarbon (PFH) in liquid form based liposomes (Lip-PFH-DOX), and to investigate the Lip-PFH-DOX nanoparticle enhanced ultrasound imaging and its therapeutic effect on human breast cancer MAD-MB-231 cells. **Methods** Lip-PFH-DOX nanoparticles were prepared by using biocompatible phospholipid mixture as film-forming material and lipophilic DOX as additive. The morphology, particle size, potential and encapsulation efficiency of Lip-PFH-DOX nanoparticles were tested. Low intensity focused ultrasound was used to induce phase transition and rupture of nanoparticles. High performance liquid chromatography was used to detect drug release at different time points. The cytotoxic effect of the nanoparticles on human breast cancer MDA-MB-231 cells was detected and the apoptosis was observed. A nude mouse breast cancer mda-mb-231 model was established, and an appropriate amount of nanoparticles were injected into the tail vein to observe the enhanced ultrasound at the tumor site. **Results** The liposomes loaded with DOX and PFH were successfully prepared. The particle size was  $(340.81 \pm 68.54)$  nm, the potential was  $(-17.72 \pm 7.66)$  mV, and the drug encapsulation rate was  $(86.80 \pm 2.55)\%$ . Under transmission electron microscopy, the drug was successfully encapsulated in the liposomes. Under light microscopy, the liposomes were uniform in size, and the phase transition was occurred. In vitro, the release rate of DOX of Lip-PFH-DOX reached  $40.05 \pm 3.22$  at 48 h. After 48 h, when the concentration was  $100 \mu\text{g/ml}$  of Lip-PFH-DOX, the survival rate decreased to  $45.00\%$ . Lip-PFH-DOX and the nanoparticles can significantly enhance ultrasound development in vivo after low intensity ultrasound irradiation. **Conclusion** The nanoparticles of DOX and PFH was successfully prepared, which can achieve ultrasound development in vivo and in vitro, and DOX can kill MAD-MB-231 cells.

**[Keywords]** breast neoplasms; liquid fluorocarbon; liposomes; ultrasonography

DOI:10.13929/j.1003-3289.201812144

## 载盐酸阿霉素液态氟碳脂质体对乳腺癌治疗效果

苏琳<sup>1</sup>, 贾丹<sup>1</sup>, 许晓华<sup>1\*</sup>, 胡聪<sup>2</sup>, 黄菊<sup>2</sup>, 谭筱林<sup>1</sup>, 贾亦真<sup>1</sup>, 王志刚<sup>2</sup>, 任建丽<sup>2</sup>

(1. 香港大学深圳医院超声科, 广东 深圳 518053; 2. 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010)

**[摘要]** **目的** 制备一种载盐酸阿霉素(DOX)和液态氟碳(PFH)脂质体(Lip-PFH-DOX), 探讨 Lip-PFH-DOX 纳米粒增强超声显影及对人乳腺癌 MAD-MB-231 细胞治疗效果。**方法** 采用薄膜水化法及声振法技术制备 Lip-PFH-DOX 纳米粒。检测 Lip-PFH-DOX 纳米粒的形态、粒径、电位、包封率。通过低强度聚焦超声促使纳米粒发生相变并使其破裂, 通过高效液相色谱法检测不同时间点药物释放情况。检测该纳米粒对人乳腺癌 MDA-MB-231 的细胞毒性作用, 观察细胞

**[基金项目]** 深圳市科创委基金(JCYJ20160429185900035)、深圳市卫生计生系统科研项目(201607032)。

**[第一作者]** 苏琳(1981—), 女, 重庆人, 硕士, 副主任医师。研究方向: 腹部及浅表器官超声诊断学及超声分子影像学。E-mail: sulin100@163.com

**[通信作者]** 许晓华, 香港大学深圳医院超声科, 518053。E-mail: xuxh@hku-szh.org; sulin100@163.com

**[收稿日期]** 2018-12-26 **[修回日期]** 2019-09-19

凋亡情况。建立裸鼠人乳腺癌 MDA-MB-231 模型,经尾静脉注射适量纳米粒,以低强度聚焦超声辐照,观察肿瘤部位增强超声表现。**结果** 成功制备载 DOX 和 PFH 的脂质体,其粒径(340.81±68.54)nm,电位(-17.72±7.66)mV,药物包封率(86.80±2.55)%。透射电镜下可观察其内部成功包载药物,光镜下可见脂质体大小均匀,可发生相变。Lip-PFH-DOX 在 48 h 时 DOX 释放率达 40.05±3.22,当 Lip-PFH-DOX 纳米粒浓度为 100 μg/ml,孵育 48 h 时,细胞存活率为 45.00%,且出现大量凋亡细胞。Lip-PFH-DOX 纳米粒在低强度超声辐照后可以明显增强体内超声显影。**结论** 本研究成功制备了包裹 DOX 和 PFH 纳米粒,可实现体内外超声显影,同时可对 MAD-MB-231 细胞产生杀伤作用。

**[关键词]** 乳腺肿瘤;液态氟碳;脂质体;超声检查

**[中图分类号]** R737.9; R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2019)11-1627-05

超声分子成像作为分子影像技术之一,具有无创、无毒、无辐射、实时、可重复应用等优势,且以靶向超声造影剂为示踪剂,可在分子水平对体内组织器官进行探查、显像<sup>[1-2]</sup>。液态氟碳(fluorocarbon, PFH)作为一种可相变材料,在体外超声辐照下,可发生液气相变,增强超声造影。阿霉素(hydrochloride, DOX)为两亲性蒽环类抗生素,抗肿瘤适应证较广,在血浆中消失迅速<sup>[3-4]</sup>,广泛分布于心、肝、脾、肺、肾脏中,但其心脏毒性较大<sup>[5-7]</sup>。脂质体包封抗肿瘤药物可望提高药物的靶向性、降低毒性。提高脂质体靶向性,需延长脂质体在血液中的循环时间<sup>[8-9]</sup>。对脂质体膜进行改性修饰,可达到延长血液循环时间的作用,增强对肿瘤的治疗作用<sup>[10-12]</sup>。本实验采用薄膜振荡法制备载 DOX 的脂质体,观察该纳米粒不同时间增强超声显影情况以及对人乳腺癌 MAD-MB-231 细胞治疗效果。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 氢化大豆卵磷脂(hydrogenated soybean phosphatidylcholine, HSPC)、胆固醇、聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(PEG2000-DSPE)(油脂株式会社),DOX(Sigma 公司),cck-8 试剂盒、Annexin-V/PI 凋亡试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。二棕榈酰磷脂酰甘油(dipalmitoyl phosphatidyl glycerol, DPPG)、PFH(ElfAtochem 公司),人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞(购自中国科学院上海细胞生物研究所)。

RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),低强度聚焦超声(low intensity focused ultrasound, LIFU)诊断仪(重庆医科大学影像研究所),Zetasizer Nano ZS90 光粒径测量仪(Malvern),UV2500 UV-VIS 紫外可见分光光度计(岛津公司),高效液相色谱仪(TSP),百胜 Mylab90 型彩色超声诊断仪(探头频率 5~9 MHz)。

## 1.2 方法

**1.2.1 脂质体的制备** 将 DOX、HSPC、DPPG、PEG2000-DSPE、胆固醇以一定的质量比例(1.0:5.0:

2.0:1.5:1.5)溶于 10 ml 氯仿,装入圆底烧瓶,密封;完全溶解后,将烧瓶置于旋转蒸发器减压蒸发 2 h,蒸干氯仿,转速 80 rpm;待圆底烧瓶底部形成均匀脂膜后加入 PBS 溶液,将其置于恒温箱内缓慢振荡直至水化完全;在冰浴条件下进行声振乳化(100 W, 8 min),乳化过程中同时逐滴加 PFH,最后获得乳白色混悬液,即为载药液态氟碳 Lip-PFH 纳米粒。通过低温离心机(5 min, 80 rpm),采用不同质量配比的 DOX 和磷脂(DOX:磷脂为 1:3、1:5、1:8、1:10、1:12、1:15、1:20)制备 Lip-PFH-DOX 纳米粒,并于冰箱保存。

**1.2.2 基本特征观察** 将制备的 Lip-PFH-DOX 纳米粒置于 10 ml 离心管,观察其颜色,有无聚集和沉淀。透射电镜下观察纳米粒的形态,并用马尔文粒径仪测量该纳米粒的粒径和电位。光镜下观察其形态并采用加热板促使其相变,检测相变温度。

**1.2.3 包封率和体外药物释放** 将不同质量配比的 DOX 和磷脂溶液以紫外分光光度计测量其吸光度并绘制标准曲线,计算包封率:药物包封率=(Lip-PFH-DOX 纳米粒中包封的 DOX 质量/Lip-PFH-DOX 纳米粒中加入 DOX 的总量)×100%。取适量载 DOX 脂质体置于透析袋中,并随机分为 Lip-PFH-DOX 组和 Lip-PFH-DOX+LIFU 组,分别取 100 ml 葡萄糖溶液为透析外液,Lip-PFH-DOX+LIFU 组给予超声辐照(功率 1 W/cm<sup>2</sup>,频率 1 MHz,占空比 50%,时间 30 s)。分别于 5 h、24 h、48 h、72 h 取 2 ml 透析外液,通过高效液相色谱法测定药物在不同时间点的释放率。

**1.2.4 细胞毒性及增殖实验** 体外培养人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,取对数生长期细胞接种于 96 孔板。随机分为 Lip-PFH 组、Lip-PFH-DOX 组,每组 5 个孔。次日加入不同浓度(1、5、25、50、100 μg/ml)纳米粒,分别培养 24 h 和 48 h。PBS 冲洗 96 孔板 3 次后,加入 CCK-8 试剂 10 μl,继续培养 1 h 后于酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。计算细胞存活率:细胞存活率=[(实验孔吸光度-空白孔吸光度)/(对照孔吸光度-空白孔吸光度)]×100%。

1.2.5 细胞凋亡实验 取对数生长期细胞,以  $1 \times 10^5$ /孔接种于 6 孔板孵育,随机分为 Lip-PFH 组、Lip-PFH-DOX 组,并加入 200  $\mu$ l(浓度 0.01 mg/ml)纳米粒。分别于孵育 24 h 和 48 h 后,PBS 洗去未连接纳米粒,胰酶消化细胞后使用 Annexin-V/PI 凋亡试剂盒进行染色。流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3 体内外增强超声显像 称取一定量琼脂,加入适量脱水水,微波炉加热,搅拌至气泡消失,将 EP 管底部插入凝胶并固定,待其冷却凝固后取出制得带孔的凝胶模型。向凝胶孔内加入 200  $\mu$ l(浓度 0.01 mg/ml) Lip-PFH-DOX 纳米粒,采用不同能量的 LIFU(3、5、10 W)辐照 10 min(工作 5 s,间停 5 s);采集辐照后声像图。建立裸鼠人乳腺癌 MDA-MB-231 模型,经裸鼠尾静脉注射适量纳米粒,采用不同能量的 LIFU(3、5、10 W)辐照 10 min(工作 5 s,间停 5 s)肿瘤部位使纳米粒发生相变,观察肿瘤部位增强超声表现。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计分析软件。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,药物释放率的比较采用配对 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计意义。

2 结果

2.1 Lip-PFH-DOX 纳米粒的制备及表征 Lip-PFH-DOX 纳米粒呈红色悬浊液,分散性好,在透射电镜下观察大小均一,壳层可见黑色颗粒分布(图 1A)。Lip-PFH-DOX 纳米粒的粒径( $340.81 \pm 68.54$ )nm(图 1B),电位( $-17.72 \pm 7.66$ )mV(图 1C)。

2.2 包封率和体外药物释放 当 DOX 和磷脂质量比例为 1:10 时,DOX 的包封率最大( $86.80 \pm 2.55$ )%。Lip-PFH-DOX 纳米粒在超声辐照下,可发生液气相变,并破裂。Lip-PFH-DOX 组在 48 h 时 DOX 释放达高峰。与 Lip-PFH-DOX 组相比,Lip-PFH-DOX+LIFU 组药物释放率明显增高(表 1)。

2.3 细胞毒性及增殖实验 当 Lip-PFH 纳米粒的最大浓度达 100  $\mu$ g/ml 时,细胞存活率仍可达 95.18%。

表 1 2 组不同时间 DOX 的释放率( $\bar{x} \pm s$ )

组别	5 h	24 h	48 h	72 h
Lip-PFH-DOX+LIFU 组	14.51 $\pm$ 1.23	29.43 $\pm$ 2.44	52.71 $\pm$ 4.23	52.74 $\pm$ 4.03
Lip-PFH-DOX 组	8.12 $\pm$ 0.74	20.41 $\pm$ 1.65	40.05 $\pm$ 3.22	41.71 $\pm$ 3.36
<i>t</i> 值	-12.04	-5.74	-4.33	-5.34
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01	0.01	0.06

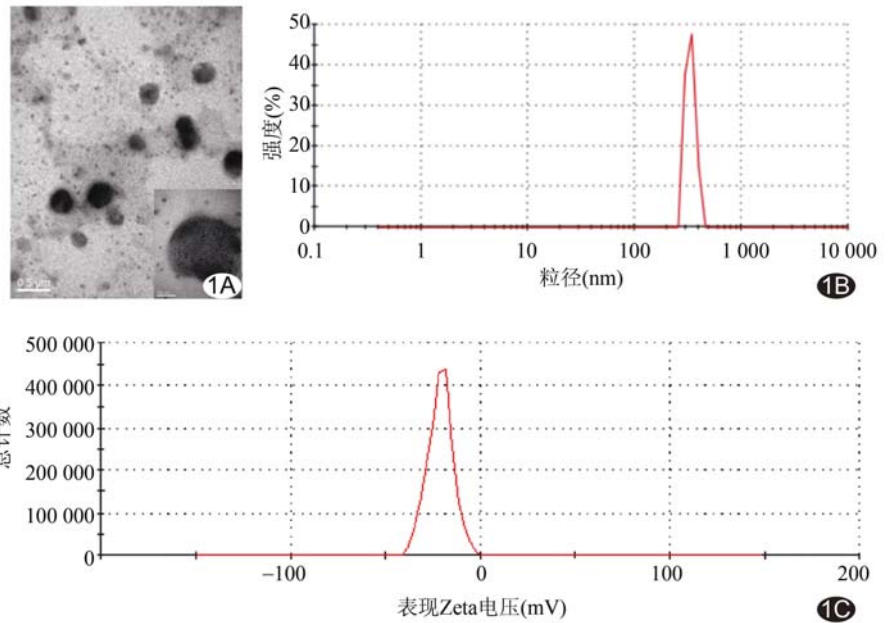


图 1 Lip-PFH-DOX 纳米粒表征 A. 透射电镜下观察; B. 粒径分布图; C. 电位分布图

当与不同浓度的 Lip-PFH-DOX 纳米粒细胞孵育 24 h,细胞存活率逐渐下降;孵育 48 h,当浓度为 100  $\mu$ g/ml 时,存活率降低至 45.00%(表 2)。

表 2 2 组不同浓度纳米粒孵育 24 h 和 48 h 的细胞存活率(%)

组别	24 h	48 h
Lip-PFH-DOX 组		
1 $\mu$ g/ml	98.01	95.12
5 $\mu$ g/ml	90.25	90.46
25 $\mu$ g/ml	88.67	80.62
50 $\mu$ g/ml	86.53	75.41
100 $\mu$ g/ml	75.39	45.00
Lip-PFH 组		
1 $\mu$ g/ml	98.22	97.36
5 $\mu$ g/ml	97.46	96.51
25 $\mu$ g/ml	95.26	96.43
50 $\mu$ g/ml	95.64	95.27
100 $\mu$ g/ml	95.34	95.18

2.4 细胞凋亡实验 Lip-PFH 组在孵育 24 h 和 48 h 后,细胞凋亡数量极少,Lip-PFH-DOX 组在孵育 48 h 时细胞发生大量凋亡(图 2)。

2.5 体内外增强超声显像 超声辐照功率为 3 W 时,

辐照 10 min 时 Lip-PFH-DOX 未发生变化;5 W 时,有微弱信号产生;10 W 时,大量纳米粒发生相变,产生明显的超声信号(图 3)。在体内也验证了这一结果。相同条件下,通过裸鼠尾静脉注射该纳米粒后,在肿瘤上方采用超声刺激,同时观察肿瘤内部超声信号的变化(图 4)。结果表明,注射进入体内的纳米粒在 EPR 作用下聚集于肿瘤区域,通过超声辐照,瘤内超声信号可明显增强。

### 3 讨论

研究<sup>[13]</sup>发现,制备所得 Lip-PFH 纳米粒粒径小,可穿过肿瘤血管内皮间隙靶向结合肿瘤细胞,一定条件下发生相变形成微泡,既可提高超声分子成像质量,又能定位释放药物进行靶向治疗。PFH 纳米粒生物相容性好,在体内通过肺部呼吸的方式清除。因此,液气相变 PFH 纳米粒能较好地解决微泡粒径与增强超声成像之间的矛盾,有望成为一种理想的新型超声分子探针<sup>[14-15]</sup>。为实现理想超声分子成像与靶向治疗,除研制新型超声分子探针外,还需结合超声分子成像设备、超声微泡触发装置以及后处理技术<sup>[16]</sup>。

本研究采用已成熟掌握的薄膜水化法和声振法制备的 Lip-PFH-DOX 纳米粒大小均一,分散性好<sup>[17-18]</sup>;在透射电镜下纳米粒表面有细小颗粒,提示 DOX 可被成功包裹;采用不同配比的药脂比获得 DOX 的最大包封率(86.80±2.55)%,提示 DOX 可被大量包裹进入脂质体,为靶向肿瘤药物治疗提供了基础,且随时

间的延长,DOX 的释放量逐渐增加,在 48 h 后达到最高值,并稳定释放,可促进 DOX 的治疗效果。通过 CCK-8 实验<sup>[19]</sup>和流式细胞检测结果发现,Lip-PFH-DOX 纳米粒对细胞的杀伤作用,证实脂质体的包裹不仅对 DOX 的细胞毒性作用无影响,还可缓慢释放杀伤肿瘤细胞。超声监测对药物的治疗作用至关重要,包裹 PFH 的纳米粒可在超声激发下发生相变,促进药物靶向释放,实时监测纳米粒在肿瘤的聚集情况。

本研究体外、体内超声成像实验结果显示注射 Lip-PFH-DOX 纳米粒后,在裸鼠肿瘤部位具有更明显的显影效果,证实该超声造影剂具有一定的超声成像的功能和在肿瘤组织中积累的效应,提示其在肿瘤

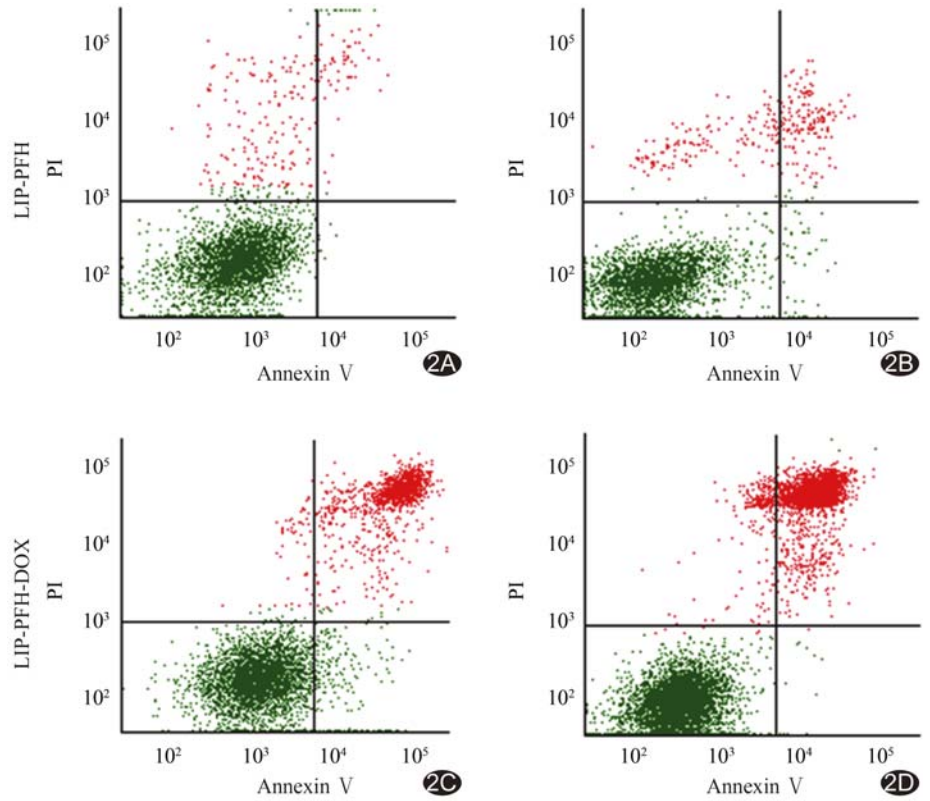


图 2 流式细胞仪检测 2 组细胞凋亡情况 A. Lip-PFH 组孵育 24 h; B. Lip-PFH 组孵育 48 h; C. Lip-PFH-DOX 组孵育 24 h; D. Lip-PFH-DOX 组孵育 48 h



图 3 Lip-PFH-DOX 纳米粒体外增强超声显影 A. 辐照功率 3 W,辐照时间 10 min; B. 辐照功率 5 W,辐照时间 10 min; C. 辐照功率 10 W,辐照时间 10 min

的早期诊断与治疗方面有潜在的应用价值,并证实包裹 DOX 和 PFH 的脂质体在超声实时监测药物聚集情况的同时可定点释放药物,减少药物对正常器官的毒副作用,为乳腺癌的体内治疗奠定基础,有望成为一种新型的诊疗一体化分子探针。

总之,本研究成功制备了包裹 DOX 和 PFH 纳米粒,可实现体内外超声显影,同时该纳米粒可对 MAD-MB-231 细胞产生杀伤作用。

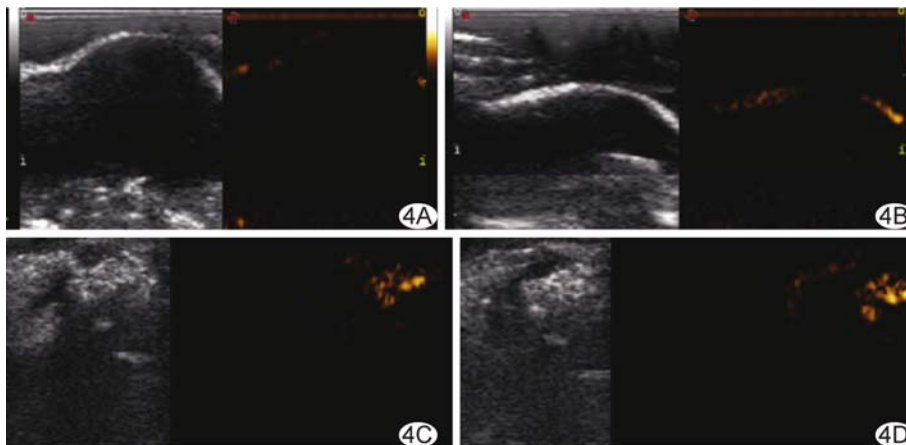


图 4 Lip-PFH-DOX 纳米粒体内增强超声显影 A. 注射纳米粒前声像图; B. 辐照功率 3 W, 辐照时间 10 min; C. 辐照功率 5 W, 辐照时间 10 min; D. 辐照功率 10 W, 辐照时间 10 min

### [参考文献]

- [1] McEwan C, Kamila S, Owen J, et al. Combined sonodynamic and antimetabolite therapy for the improved treatment of pancreatic cancer using oxygen loaded microbubbles as a delivery vehicle. *Biomaterials*, 2016, 80:20-32.
- [2] McEwan C, Owen J, Stride E, et al. Oxygen carrying microbubbles for enhanced sonodynamic therapy of hypoxic tumours. *J Control Release*, 2015, 203:51-56.
- [3] Zhang X, Zheng Y, Wang Z, et al. Methotrexate-loaded PLGA nanobubbles for ultrasound imaging and Synergistic Targeted therapy of residual tumor during HIFU ablation. *Biomaterials*, 2014, 35(19):5148-5161.
- [4] Maiti D, Chao Y, Dong Z, et al. Development of a thermosensitive protein conjugated nanogel for enhanced radio-chemotherapy of cancer. *Nanoscale*, 2018, 10(29):13976-13985.
- [5] Polgár L, Lajkó E, Soós P, et al. Drug targeting to decrease cardiotoxicity-determination of the cytotoxic effect of GnRH-based conjugates containing doxorubicin, daunorubicin and methotrexate on human cardiomyocytes and endothelial cells. *Beilstein J Org Chem*, 2018, 14:1583-1594.
- [6] 唐玉婷, 刘艳娟, 童中艺, 等. MicroRNA-126-5p 在阿霉素所致损伤心肌中的表达及作用. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(4): 637-642.
- [7] 车菲菲, 刘瑜, 徐才刚. 右丙亚胺对阿霉素引起的心脏毒性防治效果及其机制研究. *四川大学学报(医学版)*, 2010, 41(1):24-28.
- [8] Lanza GM, Wallace KD, Scott MJ, et al. A novel site-targeted ultrasonic contrast agent with broad biomedical application. *Circulation*, 1996, 94(12): 3334-3340.
- [9] Lanza GM, Winter PM, Caruthers SD, et al. Magnetic resonance molecular imaging with nanoparticles. *J Nucl Cardiol*, 2004, 11(6):733-743.
- [10] 周洋, 郑元义, 冉海涛, 等. 叶酸受体靶向液态氟碳纳米粒造影剂的制备及体外寻靶. *中国医学影像技术*, 2012, 28(1):52-54.
- [11] 李奥, 王志刚. 液态氟碳纳米粒——一种多功能影像学造影剂. *临床超声医学杂志*, 2008, 10(12):830-832.
- [12] 沈红霞, 郑元义, 王志刚. 包裹液态氟碳的高分子超声造影剂的研究进展. *中国介入影像与治疗学*, 2010, 7(6):684-687.
- [13] 王敏, 冉海涛. 液态氟碳纳米粒作为药物载体在肿瘤治疗方面的研究进展. *临床超声医学杂志*, 2013, 15(10):704-706
- [14] 曹众, 张春阳, 朱文健, 等. 包裹液态氟碳超声造影剂的研究进展. *医学诊断*, 2013, 3(1):15-20
- [15] 何燕琼, 刘双, 景坤, 等. 靶向 EGFRv III 包裹液态氟碳的高分子纳米球的制备及其体外靶向能力的评价. *中国介入影像与治疗学*, 2017, 14(1):39-44.
- [16] 刘明珠, 张萍, 王志刚, 等. 携 IR780 碘化物液态氟碳纳米粒造影剂的制备及体外双模态成像. *中国医学影像技术*, 2018, 34(12): 1767-1771.
- [17] Díaz-López R, Tsapis N, Libong D, et al. Phospholipid decoration of microcapsules containing perfluorooctyl bromide used as ultrasound contrast agents. *Biomaterials*, 2009, 30(8):1462-1472.
- [18] Pisani E, Tsapis N, Galaz B, et al. Per-fluorooctyl bromide polymeric capsules as dual contrast agents for ultrasonography and magnetic resonance imaging. *Advanced Functional Materials*, 2008, 18(19):2963-2971.
- [19] Zhang LW, Baumer W, Monteiriviere NA. Cellular up-take mechanisms and toxicity of quantum dots in dendritic cells. *Nanomedicine*, 2011, 6(5):777-791.