

应崇福院士 90 生辰学术报告会论文

超声微泡低频动力学特性及其生物效应*

钱梦騄[†] 程 茜

(同济大学声学研究所 上海 200092)

摘要 理论上利用有耗散函数的 Lagrange 方程,建立了有壳微泡的 $R(t)$ 运动方程,开展了自由空间中有壳微泡动力学特性的研究,表明微泡内外半径增量随声压的增大、超声频率的降低、初始内径的增大及壳厚的减薄而迅速增大。实验上,利用 Mie 散射技术在 80° 散射角和前向 Mie 散射检测新技术实验测量了微泡 $R(t)$ 曲线;利用体视显微镜,实时观察了超声微泡对动物活体微血管损伤,开展了超声微泡生物效应的动物和细胞试验研究。结果表明:(1)超声作用下,微泡引起肿瘤中微血管壁周期性膨胀收缩而发生管壁破裂,形成血栓和微血管栓塞,抑制了肿瘤生长;(2)超声联合微泡可以破坏微血管内皮生长因子(VEGF)和肝癌细胞,可以减少肿瘤血管和癌细胞再生,因此,低频超声联合微泡技术是一种值得探索抑制肿瘤生长的新技术。

关键词 超声,微泡,前向 Mie 散射,血管栓塞

Dynamic characteristics of ultrasonic microbubble at low frequency and its biological effects

QIAN Meng-Lu CHENG Qian

(Tongji University, Institute of Acoustics, Shanghai 200092)

Abstract Based on the Lagrangian equation with dissipation function, the motion equation of a microbubble with shell is obtained, and the dynamic characteristics of microbubble with shell in free space are studied. It shows that the inner and outer maximum radii of the microbubble increase when the acoustic pressure and its initial radius increase, as well as when the ultrasonic frequency decreases. A new forward Mie scattering technique for measuring the bubble radius with laser wavelength is developed. The injuries of micro-blood vessel in a tumor of a living animal were observed in real time by a stereo microscope system. It shows that: (1) The micro blood-vessel of tumor is embolized by thrombus which is formed when the vessel is injured by its periodical expanding and constricting under the action of a microbubble radiated with ultrasound, and the tumor growth is lowered. (2) The VEGF of the micro-blood vessel and the tumor cell can be damaged by microbubble combined with low frequency ultrasound, the regeneration of micro-blood vessel and tumor being reduced. Therefore it is necessary to develop the technique of microbubble combined with low frequency ultrasound.

Key words Ultrasound, Microbubble agents, Mie scattering, Embolize

2008-06-30 收稿; 2008-09-22 定稿

* 国家自然科学基金(No. 10474073 和 No. 10434070) 和教育部新教师博士点基金资助项目。

作者简介:钱梦騄(1942 -),男,同济大学声学研究所教授,博士生导师,研究方向:超声学。

程茜(1977 -),女,博士,讲师。

[†] 通信联系人 E-mail: mlqian@tongji.edu.cn

1 引言

近 30 年来,由于各种新的压电换能器材料和结构的不断涌现,换能器制作工艺的飞速发展,大规模集成电路(ASICs)的不断更新换代,波束合成,电子聚焦,相控阵等新成像技术以及数字信号处理技术的成功应用,极大地促进了医学超声的迅速发展。而超声微泡造影剂的发展和运用,使超声医学的诊断和治疗进入人体的微循环系统,开创了超声医学新的发展阶段^[1-5]。

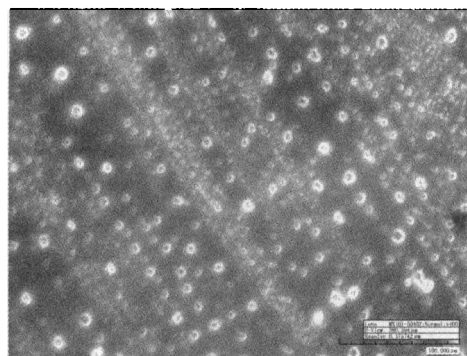


图 1 白蛋白壳全氟丙烷微泡造影剂的光学像(x400), 全氟丙烷微泡平均半径 $2.31 \pm 0.50 \mu\text{m}$

超声微泡造影剂是直径为 $2 \sim 10 \mu\text{m}$ 有壳或无壳气泡(图 1)。有壳微泡的壳厚为 $1 \sim 500 \text{nm}$,壳材料一般为:改性蛋白,磷脂,半乳糖,聚合物,或液膜(表面增强剂)等^[1]。泡内可充 CO_2 ,多氟碳气(C_3F_8 , C_4F_{10}), SF_6 和空气等各种气体,也可充入药物或基因。在壳体表面还可进行分子修饰,当微泡随血液循环流动时,可定向集聚到病灶附近,实现靶向传输。

微泡的非线性动态特性是造影剂的“指纹”。微泡对超声产生强的线性散射,极大地增强了超声成像回波信号;利用微泡的非线性声散射效应,又开发了谐波成像,脉冲翻转,失相关等新的超声诊断成像技术,大大提高了像的分辨率。而微泡声空化所产生的热效应,声孔效应,血管损伤等生物效应,为医学超声的治疗提供了新的有效手段。

由于液体在低频超声下有较低的空化阈,因此,开展微泡低频动力学特性及其生物效应

的研究,进一步探索超声微泡造影剂潜在的应用,是十分有意义的。

2 有壳微泡在自由空间的动力学特性^[6]

在相对无限的牛顿液体中,有一个薄的外壳包裹的微泡(图 2),它的壳厚为 ε ,内界面为半径 R_1 的气体-壳界面,外界面是半径 R_2 的壳-流体界面。两界面上的表面张力分别为 σ_1 和 σ_2 。在数十 kHz 的低频声场中,壳层的厚度远小于声波波长,因此壳层可近似为不可压缩各向同性粘滞液体层。

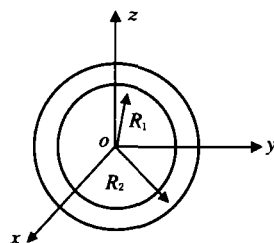


图 2 内外径分别为 R_1 和 R_2 的带壳层的超声微泡

设气泡做球对称振动,并忽略气泡与流体之间的质量和热交换、以及气泡内气体和蒸汽对运动的贡献。由壳层的质量守恒,得到:

$$\frac{4}{3}\pi(R_2^3 - R_1^3) = \frac{4}{3}\pi(R_{20}^3 - R_{10}^3)$$

$$\Rightarrow \begin{cases} R_2^2 \dot{R}_2 = R_1^2 \dot{R}_1 \Rightarrow \frac{\partial R_2}{\partial R_1} = \frac{R_1^2}{R_2^2} \\ R_2 = (R_1^3 + R_{20}^3 - R_{10}^3)^{1/3} \end{cases} \quad (1)$$

式中 R_{10} 和 R_{20} 分别为初始平衡半径。

带壳微泡的动能 T 由壳体动能 T_1 和流体动能 T_2 两部分组成。内外径分别为 R_1 和 R_2 的壳层的气泡的动能是:

$$T = T_1 + T_2 = 2\pi R_1^3 \dot{R}_1^2 \rho_1 \left(1 + \frac{\rho_2 - \rho_1 R_1}{\rho_1 R_2} \right) \quad (2)$$

式中 ρ_1 和 ρ_2 分别是壳体和壳外流体的密度。

带壳微泡振动时,壳体由于质量守恒而体积不变,所以其总势能为壳内气泡的势能和壳体两界面上表面能增量之和:

$$U = U_1 + U_2 = \frac{4}{3}\pi(R_1^3 - R_{10}^3) \left[P_0 + P(t) - P_v - P_{g0} \left(\frac{R_{10}}{R_1} \right)^{3\gamma} \right] + 4\pi(R_1^2\sigma_1 + R_2^2\sigma_2) + \text{const} \quad (3)$$

式中 P_0 , P_v 和 P_{g0} 分别是液体中静压, 泡内蒸气压和泡内初始平衡气压, 而 $P(t)$ 是驱动声压。

系统的耗散函数 F 可表示为^[7]:

$$F = \frac{1}{2} \mu \int_V \omega^2 \cdot dV + \mu \oint_S (\nu \cdot \nabla) \nu \cdot dS$$

对于微泡, 它的耗散函数 F 是由壳体的和流体的耗散函数 F_1 和 F_2 之和:

$$F + F_1 + F_2 = 8\pi R_1 \dot{R}_1^2 \mu_1 \left(1 + \frac{\mu_2 - \mu_1 R_1^3}{\mu_1 R_1^3} \right) \quad (4)$$

式(4)中 μ_1 和 μ_2 分别是壳体和壳外流体的切变粘滞系数。

选取 $R_1(t)$ 为广义坐标, 有耗散函数的气泡运动的 Lagrangian 方程为:

$$\frac{d}{dt} \frac{\partial L}{\partial \dot{R}_1} + \frac{\partial L}{\partial R_1} = - \frac{\partial F}{\partial \dot{R}_1} \quad (5)$$

式中 $L = T - U$ 是 Lagrangian 函数。

将式(2)~(4)代入式(5), 得到有壳微泡的 $R(t)$ 运动方程:

$$R_1 \ddot{R} \left(1 + \frac{\rho_2 - \rho_1 R_1}{\rho_1 R_2} \right) + \dot{R}^2 \left(\frac{3}{2} + \frac{\rho_2 - \rho_1 4R_2^3 - R_1^3 R_1}{2R_2^3 R_2} \right) + \frac{4\mu_1 \dot{R}_1}{\rho_1 R_1} \left(1 + \frac{\mu_2 - \mu_1 R_1^3}{\mu_1 R_2^3} \right) + \frac{1}{\rho_1} \left[P_a \sin \omega t - P_{g0} \left(\frac{R_{10}}{R_1} \right)^{3\gamma} \right] + \frac{\gamma P_{g0}}{\rho_1} \left(1 - \frac{R_{10}^3}{R_1^3} \right) \left(\frac{R_{10}}{R_1} \right)^{3\gamma} + \frac{2\pi\sigma_1}{\rho_1 R_1} + \frac{2\pi\sigma_2}{\rho_1 R_2} = 0 \quad (6)$$

式(6)称为类 Rayleigh-Plesset 方程, 它描述了一个在时变的外部压力场 $P(t)$ 作用下的带壳球状气泡的径向运动。利用龙格-库塔法, 可以对式(6)数值求解, 得到微泡的 $R(t)$ 曲线。图 3 分别给出了有壳微泡在一个声周

期中的 $R(t)$ 曲线随激励声压 P_a , 声波频率 f , 微泡初始平衡内径 R_{10} 和壳厚 ϵ 变化的关系。这些结果清楚表明, 在低频小声压情况下, 有壳微泡同样可以得到很大的膨胀, $R_{\max}$ 可达到几十 μm , 远大于微血管半径 $5\mu\text{m}$ 。

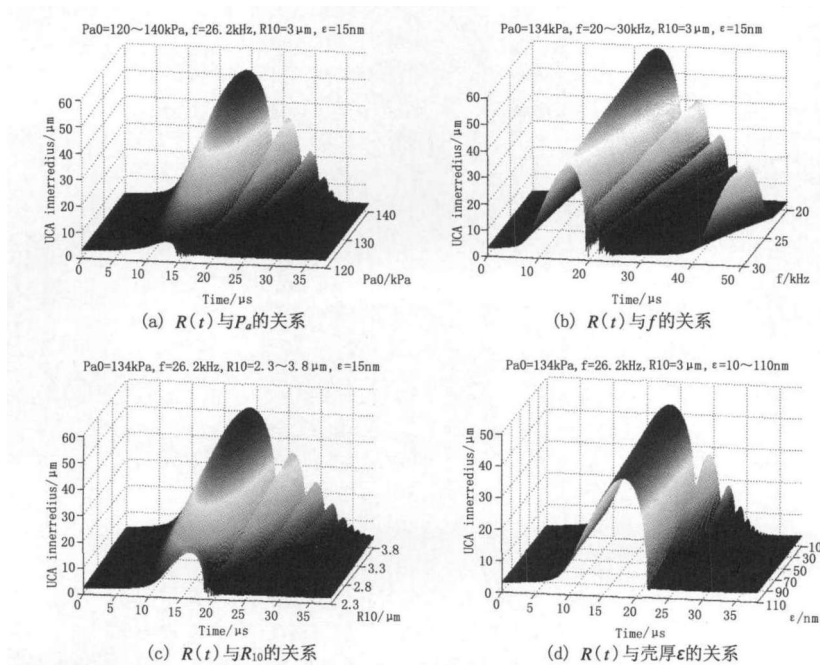


图 3 带壳微泡半径 $R(t)$ 随激励声压、激励频率、初始半径和壳层厚度的变化关系

3 微泡低频动力学特性的 Mie 散射测量

超声微泡低频动力学特性的实验测量系

统如图 4 所示。除了谐振声场激励系统和显示系统外,还有光干涉声压测量系统和 Mie 散射测量系统。

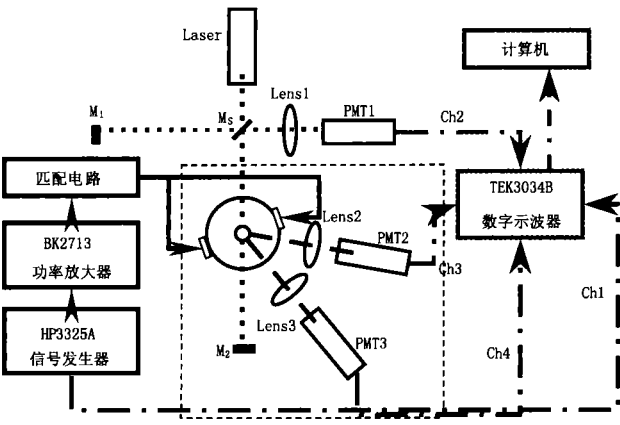
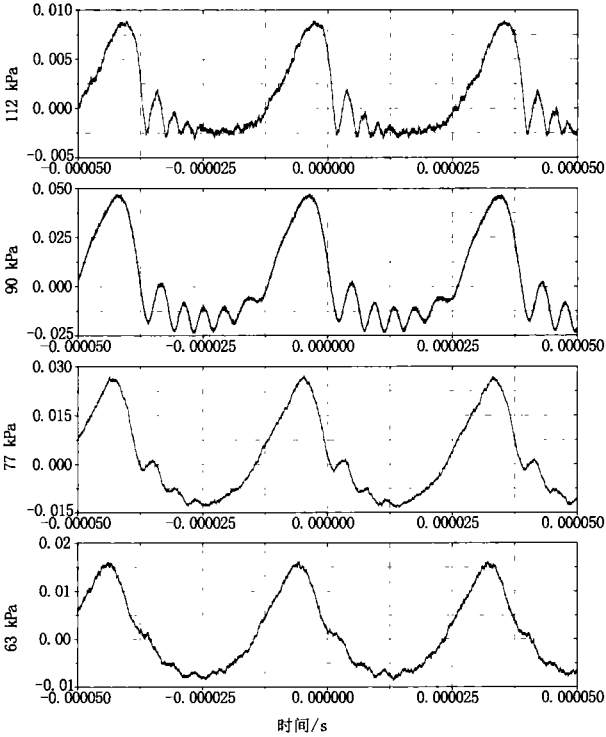


图 4 超声微泡低频动力学特性的实验测量系统

通常,均在散射角 80° 上测量微泡的散射光强,再利用式(6)与测量结果进行数值拟合,以确定微泡的 $R(t)$ 。对于白蛋白外壳的全氟丙烷超声造影剂微泡在不同激励声压下实测的 80° 散射角上 Mie 散射信号,如图 5(a)

所示(112kPa 的纵坐标值 $\times 10$)。由式(6)计算的 Mie 散射信号和数值拟合的 $R(t)$ 曲线如图 5(b)所示。结果表明白蛋白外壳的全氟丙烷超声造影剂微泡在 $f = 26.20\text{kHz}$, 90.4 kPa 声压激励下,微泡外半径 $R_{2\text{max}}$ 可大于 $20\mu\text{m}$ 。



(a) 散射角 80° 上测量的微泡 Mie 散射光强

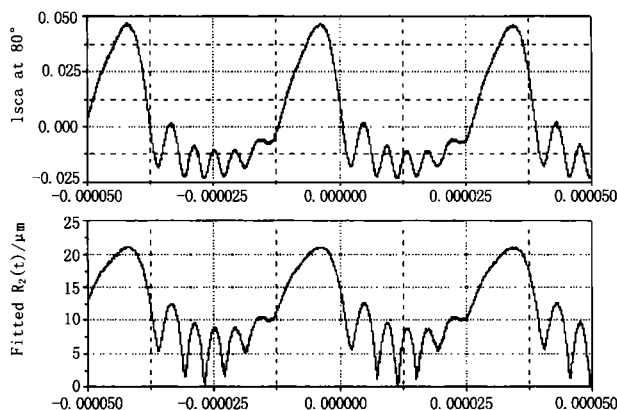
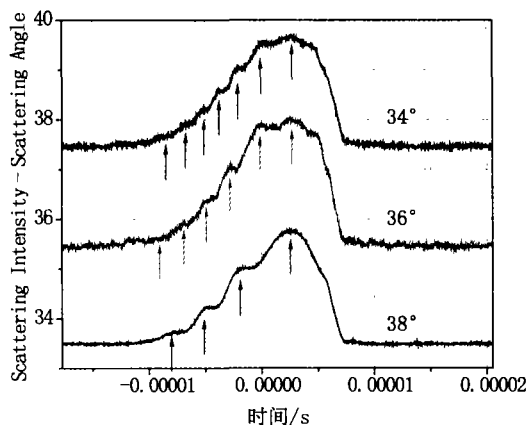
(b) 散射角 80° 上理论计算的微泡Mie散射光强(上)和拟合得到的微泡 $R(t)$ 曲线(下)图 5 散射角 80° 上测量有壳微泡 $R(t)$ 的实验与理论曲线($f = 26.20\text{kHz}$)

图 6 前向 Mie 散射技术测量有壳微泡散射光强的实验结果

图 6 是采用前向 Mie 散射技术^[8]测量有壳微泡散射光强的实验结果。白蛋白壳的全氟丙烷微泡外径 $R_2 = 2 \sim 4 \mu\text{m}$, 白蛋白壳层厚度 $\varepsilon \approx 15 \text{ nm}$ 。由于微泡的反射光与透射光之间的干涉效应, 形成了微泡散射光强的周期起伏, 而这些散射光干涉形成的尖峰位置, 与微泡的即时半径 R 是一一对应的。这尖峰组成了一组空间标尺, 使我们可用光波波长来度量微泡的半径 R 。当激励声压 108 kPa 时, 由白蛋白壳的全氟丙烷气泡在散射角为 34° 、 36° 和 38° 的光散射信号可以确定微泡外径 $R_{2\text{max}} = (22.5 \pm 3.9) \mu\text{m}$, 也证实了微泡的最大直径会远大于微血管的直径。

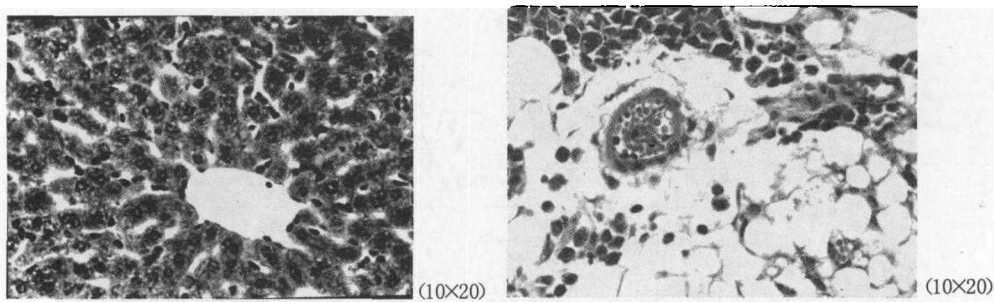
因此, 当处在肿瘤组织的微血管中的微泡, 受到低频小功率声波作用时, 微泡的剧烈膨胀可以使微血管膨胀破裂、出血, 形成血栓而使微血管栓塞, 结果抑制了肿瘤组织的生长。

4 生物效应^[9,10]

为了证实超声联合微泡产生的生物效应, 进一步开展了超声联合微泡技术的动物和细胞实验。

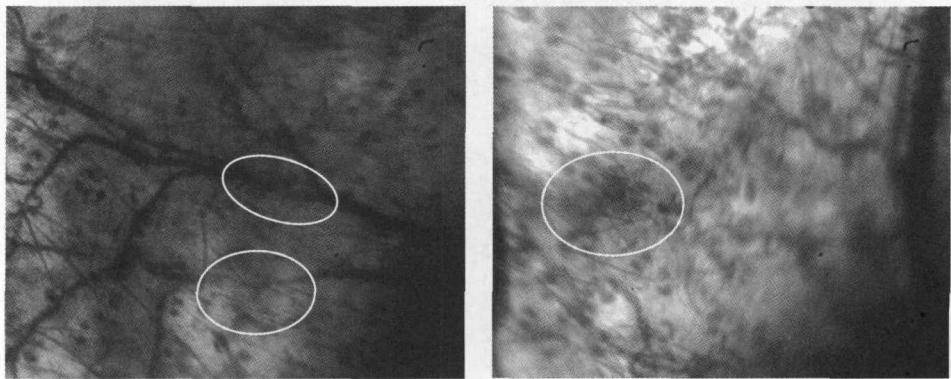
图 7 是单独使用低频超声 (20kHz) (图 7(a)) 和超声联合 CO_2 微泡处理一癌组织 (图 7(b)) 的切片像。处理后的组织中, 清楚地显示了有血栓形成和癌细胞死亡。

图 8 是用光学显微镜实时记录的超声联合微泡对小鼠耳朵中微血管的损伤结果。单独使用 20kHz 超声照射, 约 60s 后微血管出现损伤。而经小鼠尾静脉注入微泡后, 超声照射约 5s 就出现微血管损伤。这表明由于微泡在声波作用下, 使管径远小于微泡 R_{max} 的微血管经受多次的膨胀和急剧塌缩的非线性运动, 在管壁内产生大于血管损伤阈值的切向拉伸应力, 使微血管损伤, 产生血栓和微血管栓塞。如果肿瘤组织的微血管大量栓塞, 将会抑制肿瘤组织生长。



(a) 癌组织只用超声照射, 未形成血栓 (b) 用微泡联合超声照射, 出现血栓和癌细胞死亡

图 7 单独使用低频超声和超声联合 CO₂ 微泡处理一癌组织的实验结果



(a) 单独超声作用60s, 微血管出现损伤 (b) 超声联合微泡作用5s, 微血管出现损伤

图 8 超声联合微泡对小鼠耳朵中微血管的损伤

表 1 各组裸鼠 SMMC-7721 移植瘤肿瘤体积和体积增长率的比较

组别	N	瘤体积/cm ³	肿瘤生长率/%
肿瘤对照组	10	0.207 ± 0.081	121.24 ± 0.347
单纯微泡组	10	0.216 ± 0.019	123.13 ± 0.232
单纯超声组	10	0.180 ± 0.015	108.74 ± 0.221
超声微泡隔日组	10	0.139 ± 0.029	73.20 ± 0.138
超声微泡每日组	10	0.122 ± 0.025	57.24 ± 0.1653

表 2 各组小鼠肿瘤体积和体积增长率的比较

组别	N	治疗前瘤体积/cm ³	治疗后瘤体积 cm ³	肿瘤生长率/%
A 肿瘤对照组	10	0.44 ± 0.04	0.86 ± 0.18	95.45 ± 32
B 单纯 CO ₂ 微泡组	10	0.49 ± 0.05	0.87 ± 0.17	77.56 ± 26
C 脂声显微微泡组	10	0.46 ± 0.03	0.85 ± 0.19	84.78 ± 28
D 单纯超声组	10	0.45 ± 0.015	0.86 ± 0.16	91.11 ± 31
E 超声 + CO ₂ 微泡组	10	0.51 ± 0.04	0.59 ± 0.08	15.69 ± 3.8
F 超声 + 脂声显微微泡组	10	0.48 ± 0.025	0.55 ± 0.12	14.58 ± 5.3

表 1 是 5 组裸鼠(每组 10 只) SMMC-7721 移植瘤肿瘤体积和体积增长率比较的实验结果。结果证实了低频超声联合微泡技术可以使肿瘤生长减慢约 50%。表 2 是 6 组裸鼠(每组 10 只) SMMC-7721 移植瘤肿瘤体积和体积增长率的实验比较,结果不仅进一步证实低频超声联合微泡技术可以抑制肿瘤生长,而且表明使用不同的超

声微泡,该方法抑制肿瘤生长的效果基本上相同。低频超声联合微泡技术不仅可以损伤血管,使血管破裂,而且对血管内皮细胞也有破坏作用。图 9(b)是经低频超声联合微泡作用后血管内皮细胞 VEC-304 的透射电镜像,结果表明细胞中形成明显可见的凋亡小体,细胞凋亡,从而阻碍了微血管的修复和再生。

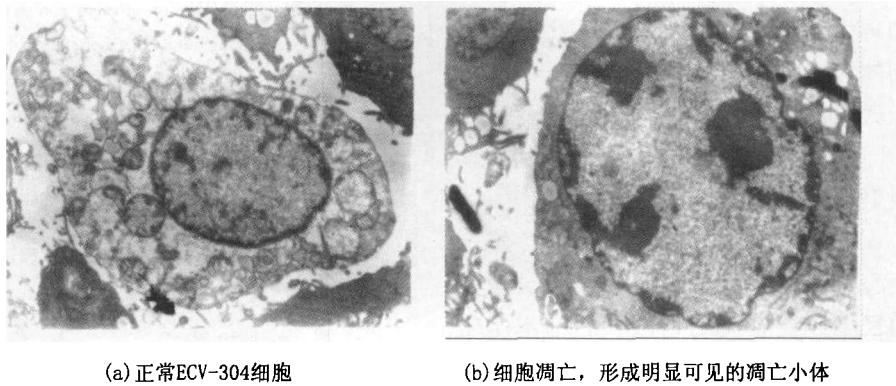


图 9 低频超声联合微泡对血管内皮细胞 VEC-304 的作用的透射电镜像(7000 倍)

低频超声联合微泡技术同样会对癌细胞产生损伤,诱发癌细胞产生一系列的程序化死亡。图 10 是 SMMC-7721 系肝癌细胞形态的

透射电镜像(6000 倍),结果同样清楚显示了处理后的 SMMC-7721 细胞发生细胞膜表面的绒毛消失,染色质浓集成凋亡小体。

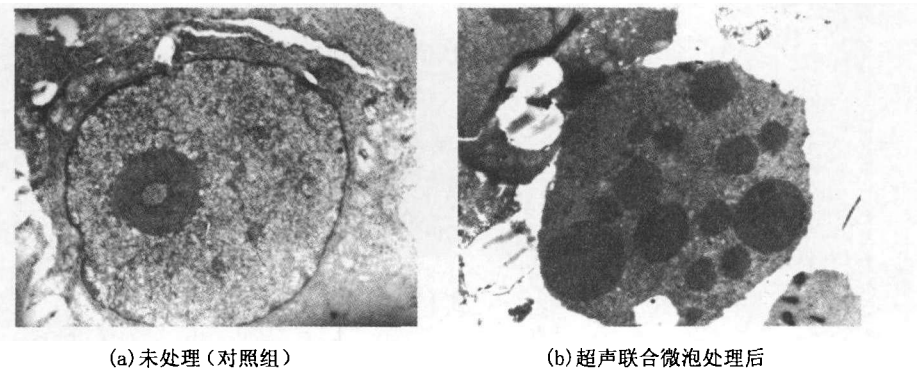


图 10 SMMC-7721 系肝癌细胞形态的透射电镜像(6000 倍)

5 结论

理论和实验都证明在声压约 10^5 Pa , 频率约 20 kHz 的超声作用下,初始半径约 $4\mu\text{m}$ 造

影剂微泡可以迅速膨胀,它的 R_{max} 可达到几十 μm 。由于微血管半径(约 $5\mu\text{m}$)远小于微泡 R_{max} ,所以在微血管内的微泡,将使微血管经受多次的膨胀和急剧塌缩的非线性运动,在管

壁内产生大于血管损伤阈值的切向拉伸应力,造成微血管损伤,产生血栓和微血管栓塞。由于肿瘤组织中的微血管是一种快速生长的病态微血管,它的管壁更簿,因此更容易损伤和大量栓塞,使肿瘤组织生长受抑制。

同时,细胞实验表明低频超声联合微泡也会对血管内皮细胞和肝癌细胞产生损伤,诱发细胞产生一系列的程序化死亡,阻碍了微血管的修复和再生,这些对抑制肿瘤组织生长都是十分有利的。

由于微泡是在微血管内作非线性振荡,因此,正在开展超声微泡在有界空间中的动力学特性和微射流的生物效应等研究。

致谢 衷心感谢东南大学姜藻教授和吴巍教授在本项目中开展有关动物试验和细胞实验等的研究。

参 考 文 献

- [1] Blomley MK, Cooke JC, Unger EC, Monaghan MJ, Cosgrove DO. Microbubble contrast agents: a new aera in ultrasound. *BMJ*, 2001, 322: 1222 - 1225.
- [2] Allen JS, May DJ, Ferrara KW. Dynamics of therapeutic ultrasound contrast agents. *Ultrasound Med. Biol.*, 2002, 28 (6): 805 - 816.
- [3] Bloch SH, Wan MX, Dayton PA, and Ferrara KW. Optical observation of lipid- and polymer-shelled ultrasound microbubble contrast agents. *Appl. Phys. Lett.*, 2004, 84(4): 631 - 633.
- [4] Prentice P. A., Cuschieril A., Dholakia K., et al. Membrane disruption by optically controlled microbubble cavitation. *Nature Physics*, 2005, 1: 107 - 110.
- [5] Prentice P. A., McLean D., Dholakia K., et al. Spatially controlled sonoporation of prostate cancer cells via ultrasound activated microbubble cavitation. *Proceedings of the 3th Annual International IEEE EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology*, 2005: 158 - 159.
- [6] 程茜, 超声造影剂微泡的动力学特性研究, 同济大学理学博士学位论文, 2006.
- [7] 朗道 Л. Д., 李弗席兹 E. M. 著, 彭旭麟译, 连续介质力学: 第一册, 高等教育出版社, 1958, Chap 2: 66 - 68.
- [8] 柯维娜, 程茜, 钱梦麟, 测量单泡声致发光中气泡 $R(t)$ 曲线的前向 Mie 散射技术, *物理学报*, 2008, 57(6): 3629 - 3635.
- [9] Zhong P., Zhou YF. and Zhu SL. Dynamics of bubble oscillation in constrained media and mechanisms of vessel rupture in SWL. *Ultrasound Med Biol*, 2001, 27(1): 119 - 134.
- [10] 张航, 姜藻, 吴巍, 等, 超声辐射微泡剂致肿瘤血管栓塞的实验研究, *东南大学学报(医学版)*, 2004, 26(3): 159 - 161.