

## 低强度聚焦超声触发PLGA阿霉素在细胞内 空化增加乳腺癌细胞死亡

黄盘辉<sup>1</sup>, 罗琼<sup>2</sup>, 严飞<sup>3</sup>, 李绍林<sup>1</sup>

(1. 中山大学附属第五医院放射科, 广东 珠海 519000; 2. 华南理工大学医学院附属广州市第一人民医院超声科, 广东 广州 510180; 3. 中国科学院深圳先进技术研究所劳特伯生物医学成像研究中心, 广东 深圳 518055)

**摘要:**【目的】探讨低强度聚焦超声能否触发聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)包裹阿霉素在细胞内的空化作用以增加4T1肿瘤细胞的死亡。【方法】采用双乳化溶剂蒸发法制备了负载阿霉素的聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)纳米气泡。设立细胞内释药组, 细胞外释药组, 传统给药组, 单独超声组和对照组。用流式细胞仪检测各组细胞的死亡情况, 用细胞活力检测试剂盒(CCK8)检测各组的细胞增殖, 细胞划痕检测各组的侵袭情况。【结果】超声组细胞核的红色荧光平均强度高于对照组, 差异具有统计学意义( $t=16.627, P<0.001$ ); 聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)包裹阿霉素在3、5、7、24和48 h的累计释药量超声组均高于对照组, 差异都具有统计学意义( $P<0.001$ ); 细胞内释药组, 细胞外释药组及传统给药组的细胞存活率, 细胞增值率及划痕像素面积均低于对照组, 且细胞内释药组显著低于其他组, 差异具有统计学意义( $P<0.001$ )。【结论】低强度聚焦超声通过细胞内空化触发的细胞内药物释放比低强度聚焦超声触发的细胞外药物释放及传统的给药方式更有效地增加4T1肿瘤细胞的死亡。

**关键词:**低强度聚焦超声; 细胞内空化; 乳腺肿瘤; 细胞死亡

中图分类号: R73-36+1

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2021)02-0209-09

## Low-intensity Focused Ultrasound-triggered Intracellular Cavitation of Doxorubicin-loaded PLGA Nanoparticles Enhances Breast Cancer Cell Death

HUANG Pan-hui<sup>1</sup>, LUO Qiong<sup>2</sup>, YAN Fei<sup>3</sup>, LI Shao-lin<sup>1</sup>

(1. Department of Radiology, The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China; 2. Department of Ultrasound Medicine, Guangzhou First People's Hospital, School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510180, China; 3. Paul C. Lauterbur Research Center for Biomedical Imaging, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

Correspondence to: LI Shao-lin; E-mail: lishlin5@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:**【Objective】To investigate whether low-intensity focused ultrasound can trigger the intracellular cavitation of the doxorubicin-loaded polylactic acid-glycolic acid copolymer (PLGA) nanoparticles and then enhance the death of 4T1 breast cancer cells.【Methods】The doxorubicin-loaded PLGA nano-bubbles were prepared by double emulsification solvent evaporation method. 4T1 breast cancer cells were divided into intracellular drug release group, extracellular drug release group, traditional drug delivery group, ultrasound alone group and control group. In each group, flow cytometry, cell counting kit-8 (CCK8) and scratch assay were used to detect the cell death, proliferation and invasion, respectively.【Results】The average intensity of red fluorescence in the nuclei of the ultrasound group was higher than that of the control group and the difference was statistically significant ( $t=16.627, P<0.001$ ). The cumulative drug release of PLGA encapsu-

收稿日期: 2021-01-12

基金项目: 国家自然科学基金(81871376)

作者简介: 黄盘辉, 在读硕士生, 研究方向: 超声释药及间充质干细胞治疗软骨缺损, E-mail: 937945247@qq.com; 李绍林, 通信作者, 教授, 博士生导师, 研究方向: 间充质干细胞示踪治疗软骨损伤, E-mail: lishlin5@mail.sysu.edu.cn

lated doxorubicin at 3, 5, 7, 24 and 48 h in the ultrasound group were all higher than those in the control group and the differences were statistically significant ( $P < 0.001$ ). The cell viability, cell proliferation and 24 h scratch pixel area in the intracellular drug release group, extracellular drug release group and traditional drug delivery group were all lower than those in the control group, with the results in the intracellular drug release group significantly lower than those in other groups. All the differences were statistically significant ( $P < 0.001$ ).【Conclusions】The intracellular drug release triggered by low-intensity focused ultrasound through intracellular cavitation is more effective in enhancing the death of 4T1 tumor cells than the extracellular drug release triggered by low-intensity focused ultrasound and traditional drug delivery methods.

**Key words:** low-intensity focused ultrasound; intracellular cavitation; breast tumors; cell death

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2021, 42(2): 209-217]

乳腺癌是最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。常规化疗作为一种常用的非手术方法,副作用明显,患者生活质量和治疗依从性较低<sup>[2-3]</sup>。阿霉素是癌症的常用化疗药物之一<sup>[4]</sup>。然而,阿霉素诱导产生的自由基,在细胞膜水平产生的有害影响,同时将药物插入DNA中<sup>[5]</sup>,这些都可能导导致非靶器官毒性。因此,将阿霉素嵌入安全性的药物递送系统是一个很好的策略<sup>[6-7]</sup>。PLGA可通过双重乳化溶剂<sup>[8]</sup>、水-水乳状液<sup>[9-10]</sup>和乙醇中固体油<sup>[11]</sup>蒸发等方法制备。同时PLGA是美国食品和药物管理局(FDA)和欧洲药品管理局(EMA)批准的材料<sup>[12-13]</sup>。它可用于不同药物的持续靶向输送<sup>[14]</sup>,包括质粒DNA、蛋白质、肽和分子量化合物<sup>[15-16]</sup>。PLGA微泡还可以作为声敏剂,同时实现超声控制药物释放<sup>[17]</sup>。超声介导的微泡空化治疗肿瘤<sup>[18-19]</sup>,是通过加速固体颗粒间的碰撞<sup>[20-22]</sup>,直接或间接损伤微球或细胞<sup>[23-24]</sup>,使更多微泡进入肿瘤细胞中。需要注意的是,这些化疗药物在血管内释放也会损伤血管,从而导致治疗药物较少积聚在靶血管中<sup>[25]</sup>,积聚在非靶器官上造成毒性作用。细胞内药物释放是指药物载体进入细胞内,通过特异性刺激以增强细胞内药物释放<sup>[26]</sup>,提高病变部位的生物利用度以减少副作用。目前主要是通过刺激反应载体来传递药物,例如pH、氧化还原电位、活性氧、酶和温度<sup>[27-28]</sup>。低强度聚焦超声是指0.3~3 W/cm<sup>2</sup>声强的超声。低强度聚焦超声联合PLGA微泡细胞的空化通过声场与微泡相互作用下,微泡因急剧压缩、闭合破裂而形成微流、冲击波及射流等激烈过程,使细胞膜上出现可逆性或不可逆性小孔,提高了细胞膜的通透性<sup>[29]</sup>。细胞内空化是直接使超声介导的空化效应在细胞内产生,增加细胞核膜通透性,使药物进入细胞核内<sup>[30]</sup>。值得注意的是,超声联合PLGA微泡

在细胞内发生空化效应及其应用仍未有报道。因此本研究制备PLGA包裹的阿霉素声敏型纳米颗粒,联合低强度聚焦超声验证细胞内空化与细胞核的核膜变化关系,并对比胞内释药与胞外释药对4T1细胞的增殖能力及侵袭能力的影响,为后续肿瘤治疗提供有效治疗思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料、试剂与仪器

聚乳酸-羟基乙酸共聚物(polylactic acid-glycolic acid copolymer, PLGA; 中国大港生物材料有限公司),二硬脂酰基卵磷脂(1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC; 美国阿凡提极性脂质公司),二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DSPE; 美国阿凡提极性脂质公司),阿霉素(中国百灵威科技有限公司),细胞凋亡检测试剂盒(Annexin V-FITC/PI; 中国碧云天生物技术有限公司),细胞增殖(毒性)检测试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8; 中国碧云天生物技术有限公司),超声破碎仪(美国超声波材料公司),均质机(德国IKA集团),透射电子显微镜(日本Hitachi公司),纳米电径电势分析仪(英国Malvern公司),全自动超声系统(中国圣祥高科技有限公司),多功能酶标仪(美国Biotek公司),倒置荧光显微镜(日本Olympus公司),鼠源性4T1细胞及稳定表达绿色荧光蛋白的4T1细胞由中国科学院深圳先进技术研究院严飞研究员惠赠。

### 1.2 实验方法

1.2.1 PLGA-DOX的合成 PLGA-DOX纳米气泡是使用双乳化溶剂蒸发法合成的。将50 mg PLGA和2.5 mg DSPC溶解在1 mL二氯甲烷中。将1 mg

阿霉素添加到二氯甲烷中进行超声乳化2 min。乳化后,将5 mL 4%PVA加入溶液中,并用均质机将混合物均质(5档,5 min)。将10 mL超纯水添加到溶液中并再均质5 min。将其在室温搅拌4 h。然后将溶液转移到50 mL EP试管中进行3次高速离心( $2\ 500 \times g$ , 5 min)。最后用1 mL超纯水重悬沉淀物,并冷冻干燥24 h。

**1.2.2 PLGA-DOX的特征** 使用马尔文粒径分析仪对PLGA-DOX纳米气泡进行粒径及电位分析,用扫描电镜分析PLGA-DOX的表面情况。用酶标仪测量并算其载药量。

**1.2.3 PLGA-DOX的最佳超声参数及 $IC_{50}$**  将4T1细胞铺在96孔板中,并分别在1 MHz, 1 W/cm<sup>2</sup>, 1 min, 占空比20%、1 MHz, 2 W/cm<sup>2</sup>, 1 min, 占空比20%、1 MHz, 3 W/cm<sup>2</sup>, 1 min, 占空比20%以及1 MHz, 4 W/cm<sup>2</sup>, 1 min, 占空比20%这个4个不同声强下处理4T1细胞,24 h后用CCK 8检测细胞的增殖情况。另外将4T1细胞铺在96孔板中,将浓度为0、0.5、1.0、1.5和2.0 mg/mL PLGA-DOX的培养基加入,24 h后,用CCK 8检测细胞的生长抑制情况。

**1.2.4 细胞摄取率** 将乳腺癌细胞(4T1细胞)铺在12孔板中培养,并将适量PLGA-FITC样品溶解在RPMI 1640培养基中,并添加到孔板。温育1、3、6、12和24 h后,将细胞用PBS洗涤3次,在荧光显微镜下观察拍照。然后用胰蛋白酶(含0.25% EDTA)将细胞消化,并用400  $\mu$ L PBS重悬进行流式细胞分析。同时将乳腺癌细胞(4T1细胞)铺在96孔板中培养并设立对照组,并将适量PLGA-DOX样品溶解在RPMI 1640培养基中,并添加到孔板。温育1、3、6、12和24 h后,将细胞用PBS洗涤3次,用CCK 8检测各组的细胞活性。

**1.2.5 低强度聚焦超声触发的细胞内空化诱导细胞内药物释放** 将4T1细胞培养在24孔板中,并分为两组:对照组和细胞内药物释放组。将1 mg PLGA-DOX-FITC样品溶解在RPMI 1640培养基中,然后添加到孔板中。孵育6 h后,两组用PBS洗涤3次,并用新鲜的RPMI 1640培养基孵育。对照组不予处理。细胞内药物释放组用低强度聚焦超声处理(参数:1 MHz, 2 W/cm<sup>2</sup>, 1 min, 占空比20%)。两组均用Hoechst染色。然后在荧光显微镜上观察并拍照,并测量细胞核的红色荧光平均强度,并用电子显微镜观察核膜的情况。

**1.2.6 超声控制PLGA-DOX的药物释放** 将新制

备的PLGA-DOX纳米气泡稀释至含10 g/L血清的PBS中,将其分为等体积的对照组和超声处理组。超声处理组用低强度聚焦超声处理,对照组不处理。离心后,取1 mL上清液用酶标仪测量阿霉素的含量,并向每组补充1 mL含10 g/L血清的PBS并混合。然后,将它们置于37 °C的恒温振荡器中,并在0.5、1、3、5、7、24和48 h后使用相同的方法采集两组上清液,以测定阿霉素的含量。

**1.2.7 检测细胞内和细胞外药物释放中的细胞死亡情况** 将4T1细胞分为5组,并在12孔板中培养。①对照组:不作处理。②单独超声组:用低强度聚焦超声处理细胞。③传统给药组:将4T1细胞与PLGA-DOX孵育6 h。④细胞外药物释放组:低强度聚焦超声处理PLGA-DOX纳米气泡后,将4T1细胞与经预处理的PLGA-DOX一起培养6 h,用PBS洗3遍,加入培养基。⑤细胞内药物释放组:在用PLGA-DOX与细胞孵育6 h后,用PBS将4T1细胞洗涤3次,加入培养基,低强度聚焦超声处理。24 h后,用Annexin V-FITC/PI检测试剂盒在流式中检测5组4T1细胞的死亡情况。

**1.2.8 CCK 8检测细胞的增殖** 将4T1细胞分为5组,并在96孔板中培养。①对照组不作处理。②单独超声组:用低强度聚焦超声处理。③传统给药组:将4T1细胞与PLGA-DOX孵育6 h。④细胞外药物释放组:低强度聚焦超声处理PLGA-DOX纳米气泡后,将4T1细胞与经预处理的PLGA-DOX一起培养6 h,用PBS洗3遍,加入培养基。⑤细胞内药物释放组:在用PLGA-DOX与细胞孵育6 h后,用PBS将4T1细胞洗涤3次,加入培养基,用低强度聚焦超声处理。24 h后,用CCK 8试剂检测5组4T1细胞的增殖情况。

**1.2.9 细胞划痕实验** 将带荧光的4T1细胞分为5组。①对照组:不作处理。②单独超声组:用低强度聚焦超声处理。③传统给药组:将4T1细胞与PLGA-DOX孵育6 h。④细胞外释药组:低强度聚焦超声处理PLGA-DOX纳米气泡后,将4T1细胞与经预处理的PLGA-DOX一起培养6 h,用PBS洗3遍,加入培养基。⑤细胞内释药组:在用PLGA-DOX与细胞孵育6 h后,用PBS将4T1细胞洗涤3次,加入培养基,用低强度聚焦超声处理。24 h后,进行划痕拍照。实验独立重复3次。用ImageJ软件对0 h及24 h的图片进行如下操作:Process, Enhance Contrast, 勾选 Normalize, Saturated pixels:

0.3%, 点击 OK, 然后 Process, Smooth (平滑), Process, Find Edges (寻找边缘), Image, Adjust, Threshold, 阈值选定, 选中为红色, 调节阈值为 0-20。点击 Apply。然后选择魔棒工具选择划痕没有细胞覆盖的部分, Analyze, Measure, 并测出没有被细胞覆盖的划痕像素面积。

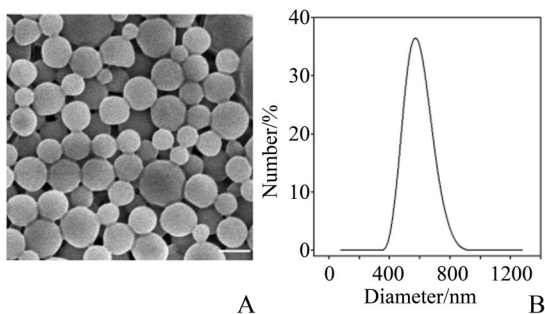
### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 超声最佳参数、流式检测细胞死亡的生存率以及划痕像素面积采用单因素方差分析 (one way ANOVA), 且行 Bonferroni 校正的  $t$  检验进行组间比较; CCK 8 细胞活力采用 Welch's ANOVA 分析; 体外释药用重复测量方差分析; 摄取的细胞活性及平均荧光强度采用两独立样本  $t$  检验。当  $P < 0.05$  时, 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PLGA-DOX 的表征

扫描电子显微镜显示 PLGA-DOX 是球形的, 大小相对均匀 (图 1 A), 测得 PLGA-DOX 颗粒的水合粒径为  $(565.40 \pm 8.00)$  nm (图 1 B), 电位为  $(-8.53 \pm 0.40)$  mV, 载药量为  $(4.41 \pm 0.13)\%$ 。



A: SEM image of PLGA-DOX, Scale bars = 500 nm; B: Average size distribution of PLGA-DOX particles,  $(565.40 \pm 8.00)$  nm,  $n=3$ .

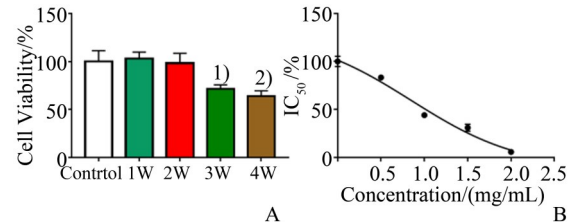
图1 PLGA-DOX 表征

Fig.1 Characterization of PLGA-DOX

### 2.2 PLGA-DOX 的最佳超声参数及 $IC_{50}$

数据正态分布且方差齐 ( $F=1.171, P=0.305$ ), 在 1 W ( $103.07 \pm 6.84$ )% 比  $(100.00 \pm 11.35)\%$ ,  $P=0.969$ , 和 2 W ( $98.42 \pm 10.13$ )% 比  $(100.00 \pm 11.35)\%$ ,  $P=0.997$  的声强下, 对细胞的增殖无影响, 在 3 W ( $71.48 \pm 4.17$ )% 比  $(100.00 \pm 11.35)\%$ ,  $P < 0.001$  及 4 W

( $64.11 \pm 5.47$ )% 比  $(100.00 \pm 11.35)\%$ ,  $P < 0.001$  的声强下, 对细胞的增殖有影响 ( $F=30.453, P < 0.001$ ), 因此选择 2 W 的声强为最优参数 (图 2 A)。通过 GraphPad 的曲线拟合, 得出了 PLGA-DOX 的  $IC_{50}$  浓度为  $0.85$  mg/mL (图 2 B)。



A: Percentage of viable 4T1 cells after treatment in each group,  $F=30.453$ , 1)  $P < 0.001$  vs. control group; 2)  $P < 0.001$  vs. control group;  $n=6$ . B:  $IC_{50}$  curve of PLGA-DOX,  $n=3$ .

图2 PLGA-DOX 的最佳超声参数及  $IC_{50}$

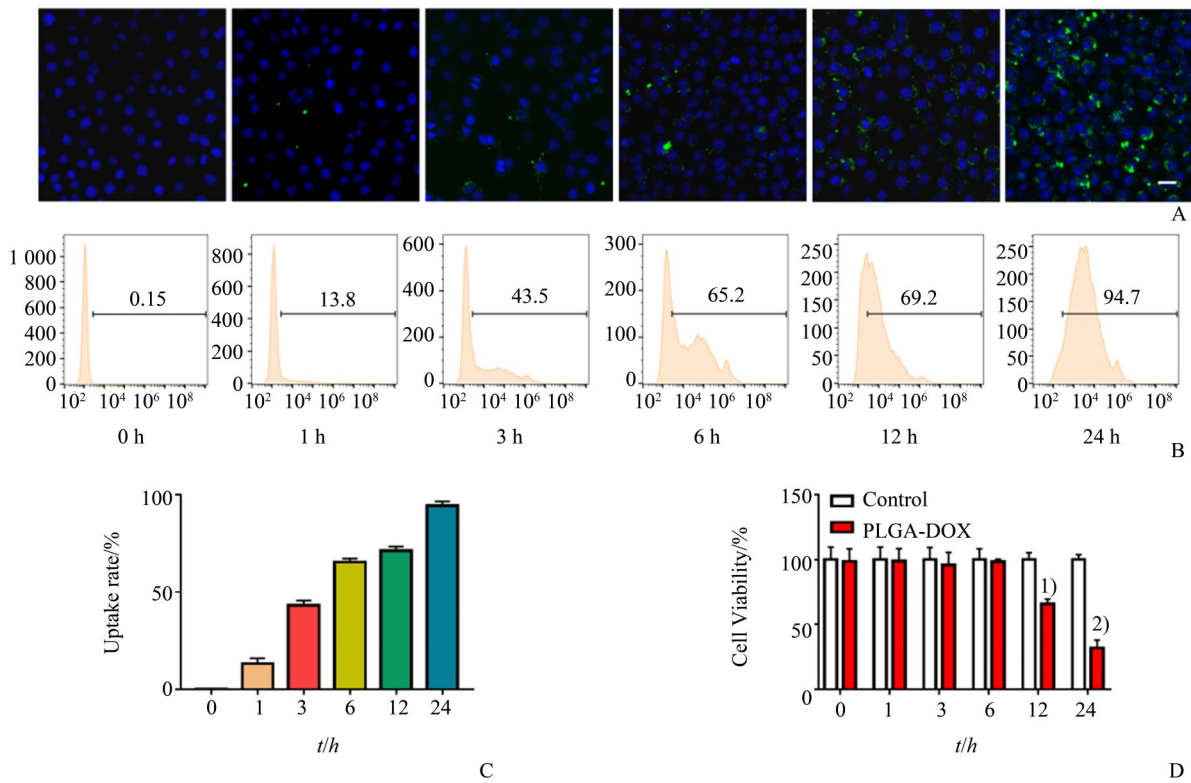
Fig.2 The best ultrasound parameters and  $IC_{50}$  of PLGA-DOX

### 2.3 4T1 细胞对 PLGA-DOX 的摄取率

如图所示, 在 0 h, 4T1 细胞基本不摄取 PLGA-FITC, 并且没有观察到绿色荧光。1 h 内摄取  $(13.30 \pm 2.70)\%$ , 开始出现荧光。3 h 的摄取量增加到  $(43.20 \pm 2.70)\%$ , 绿色荧光也增加了。在 6、12、24 h, 摄取量分别逐渐增加至  $(65.30 \pm 1.90)\%$ ,  $(71.20 \pm 2.20)\%$  和  $(94.40 \pm 2.20)\%$ 。4T1 细胞对纳米泡的摄取随时间增加而增加。在最初的 6 h 内, 4T1 细胞吞纳纳米气泡较快的。从 6~12 h, 4T1 细胞的摄取率没有显著变化。在 24 h 内, 4T1 细胞对纳米气泡的吸收基本达到饱和。而在 0、1、3、6、12 和 24 h 的细胞活性分别为  $(98.58 \pm 9.77)\%$ 、 $(98.87 \pm 9.55)\%$ 、 $(95.90 \pm 9.68)\%$ 、 $(98.46 \pm 1.91)\%$ 、 $(65.69 \pm 3.91)\%$ 、 $(32.09 \pm 6.02)\%$ , 数据正态分布且方差齐 ( $F=1.390, P=0.304$ )。其中在 12、24 h 的 PLGA-DOX 对细胞活性的影响是有统计学意义的分别为 ( $t=9.023, P < 0.001$ ;  $t=16.494, P < 0.001$ ; 图 3)。因此在 6 h 的时间点, 是对各组细胞处理比较好的时间点, 因为时间点比较短, 而这时细胞摄取了较多的纳米泡并且对细胞的活性没有明显影响, 不影响后续的处理。

### 2.4 低强度聚焦超声作用细胞内空化的结果

摄取 PLGA-DOX-FITC 后, 细胞显示绿色荧光。超声组细胞核的红色荧光平均强度高于对照组 ( $51.90 \pm 3.18$ ) 比  $(20.05 \pm 0.93)$ , 数据正态分布且



A: Fluorescence microscopy showed the time dependence of 4T1 cells uptake of PLGA-FITC: 0, 1, 3, 6, 12, and 24 h,  $\times 200$ . (Scale bars = 25  $\mu\text{m}$ ). B: Flow cytometry showed the time dependence of 4T1 cells uptake of PLGA-FITC: 0, 1, 3, 6, 12, and 24 h,  $n=3$ . C: The time dependence of 4T1 cells uptake of PLGA-FITC: 0, 1, 3, 6, 12, and 24 h,  $n=3$ . D: Cell viability after phagocytosis of PLGA-DOX in 0, 1, 3, 6, 12, and 24 h,  $t=9.023$ ,  $^{1)} P<0.001$  vs. control group;  $t=16.494$ ,  $^{2)} P<0.001$  vs. control group;  $n=3$ .

图3 4T1细胞摄取率

Fig.3 Uptake rate of PLGA-FITC by 4T1 cells

方差齐( $F=3.419, P=0.138$ ), ( $t=16.627, P<0.001$ ; 图4 A)。细胞内的PLGA-DOX-FITC在低强度聚焦超声作用下,细胞核的核膜出现破坏,而没有超声作用的条件下细胞核的核膜是正常的双层膜结构,说明低强度聚焦超声处理后,PLGA-DOX-FITC在细胞内空化,导致细胞核的核膜破坏,通透性增加,同时阿霉素更多地释放出来,进入细胞核内,进而细胞核内的阿霉素显示红色(图4 C、D)。Hoechst染色的细胞核呈蓝色。可以看出图中有更多的红色和蓝色重叠。相比之下,对照组释放的阿霉素较少,所以染色淡。结果表明,低强度聚焦超声处理可以使PLGA-DOX在细胞内空化增强细胞内药物的释放效果。

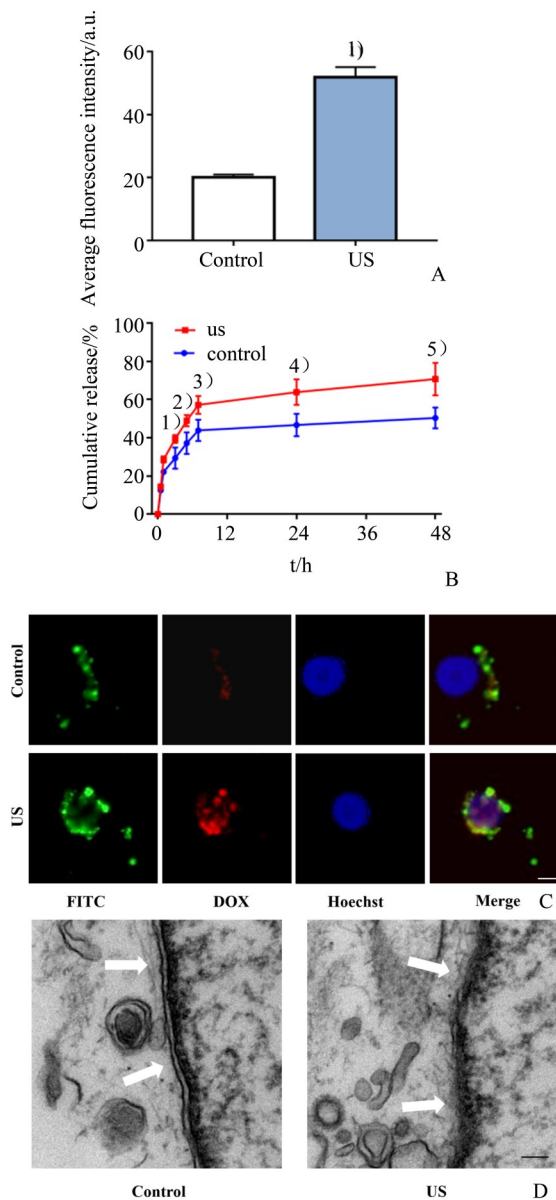
### 2.5 低强度聚焦超声作用PLGA-DOX的释药结果

PLGA-DOX在3、5、7、24和48 h的累计释药量超声组均高于对照组,分别为: [(39.36 $\pm$ 2.07)%比(29.41 $\pm$ 5.52)% ,  $P<0.001$ ]、[(48.99 $\pm$ 2.97)%比(37.31 $\pm$ 5.64)% ,  $P<0.001$ ]、[(57.24 $\pm$ 4.74)%比

(43.89 $\pm$ 5.61)% ,  $P<0.001$ ]、[(63.88 $\pm$ 6.68)%比(46.75 $\pm$ 5.84)% ,  $P<0.001$ ]、[(70.68 $\pm$ 8.51)%比(50.34 $\pm$ 5.49)% ,  $P<0.001$ ] (主体间效应:  $F=30.893, P<0.001$ ; 主体内效应:  $F=881.239, P<0.001$ ; 交互效应:  $F=23.058, P<0.05$ ; 图4 B)。说明,低强度聚焦超声作用可以增强PLGA-DOX的药物释放。随着时间的延长,其释药也会增加,并且低强度聚焦超声与时间因素有相互作用的效果,两者都有增强释药的效果。

### 2.6 流式检测细胞死亡的结果

流式分析细胞死亡:对照组,单纯超声组,传统给药组,细胞外释药组和细胞内释药组的细胞存活率分别为(93.90 $\pm$ 3.50)%、(93.50 $\pm$ 3.40)%、(77.37 $\pm$ 2.65)%、(73.73 $\pm$ 1.51)%、(59.90 $\pm$ 1.38)% , 数据正态分布且方差齐( $F=2.210, P=0.141$ ),其中单纯超声组与对照组差异无统计学意义,说明单独的低强度聚焦超声作用对细胞的死亡无影响。传统给药组,细胞外释药组和细胞内释药组均与对照组差异有



A: Average fluorescence intensity of DOX,  $t=16.627$ ,  $^{1)} P<0.001$  vs. control,  $n=3$ . B: Drug release profiles with and without ultrasound,  $F=30.893$ ,  $F=881.239$ ,  $F=23.058$ ,  $^{1)} P<0.001$  vs. control;  $^{2)} P<0.001$  vs. control;  $^{3)} P<0.001$  vs. control;  $^{4)} P<0.001$  vs. control;  $^{5)} P<0.001$  vs. control,  $n=6$ . C: Ultrasound-triggered intracellular drug release,  $\times 400$ , (green-FITC, red-DOX, blue-nucleus), Scale bars = 5  $\mu\text{m}$ . D: The effect of PLGA-DOX-FITC on the nuclear membrane of the nucleus with and without ultrasound,  $\times 600$ , Scale bars = 100 nm.

图4 超声触发的细胞内释药

Fig. 4 Ultrasound-triggered intracellular drug release

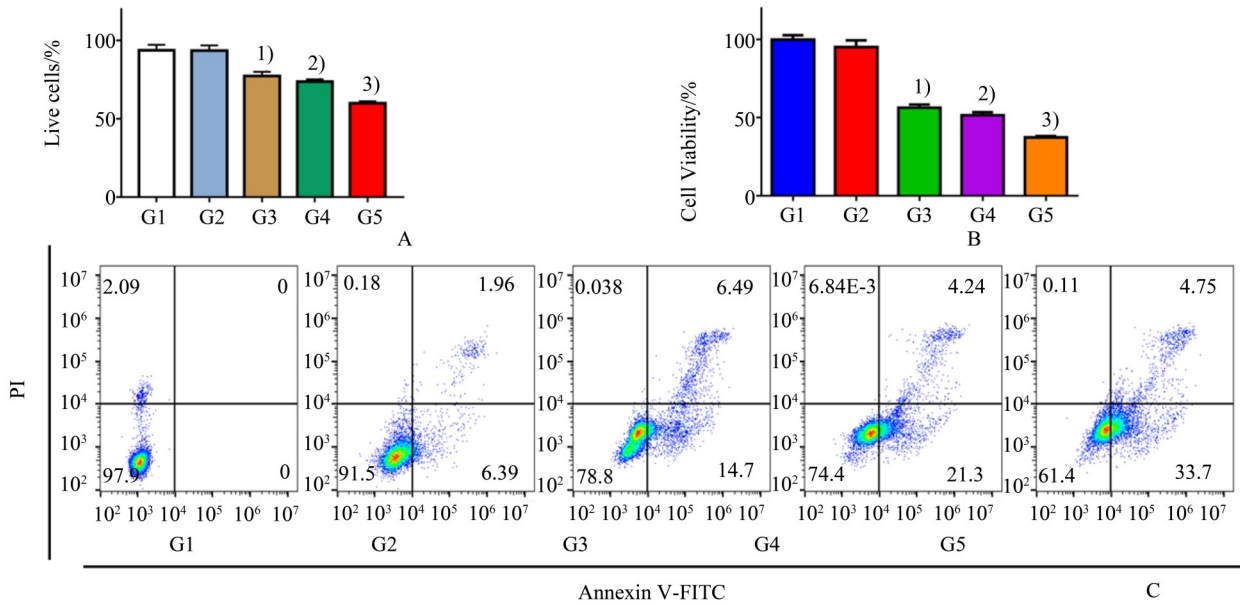
统计学意义,且细胞内释药组与其他各组差异也均有统计学差异, ( $F=239.175$ ,  $P<0.001$ )。这说明低强度聚焦超声触发的细胞内释药能够比低强度聚焦超声触发的细胞外释药及传统给药组更能杀伤4T1肿瘤细胞(图5 A、C)。

## 2.7 CCK 8检测细胞活力的结果

CCK 8检测4T1细胞的增殖活力:对照组,单纯超声组,传统给药组,细胞外释药组和细胞内释药组的细胞的细胞增殖活力分别为( $100.00\pm 7.03$ )%, ( $95.26\pm 10.41$ )%, ( $56.32\pm 5.18$ )%, ( $51.51\pm 4.65$ )%, ( $37.35\pm 1.90$ )%,数据正态分布但方差不齐( $F=3.751$ ,  $P=0.016$ )。单纯超声组与对照组差异无统计学意义,说明低强度聚焦超声单独作用对4T1乳腺癌肿瘤细胞的增殖活力没有影响,与流式检测细胞死亡的结果相符。传统给药组,细胞外释药组和细胞内释药组均与对照组的差异有统计学差异,并且细胞内释药组与其他组均有统计学差异( $F=2.992$ ,  $P<0.05$ ,图5 B),说明低强度聚焦超声触发的细胞内释药能够比低强度聚焦超声触发的细胞外释药及传统给药组更能杀伤4T1肿瘤细胞,这与流式检测细胞死亡的结果相符。

## 2.8 划痕实验的结果

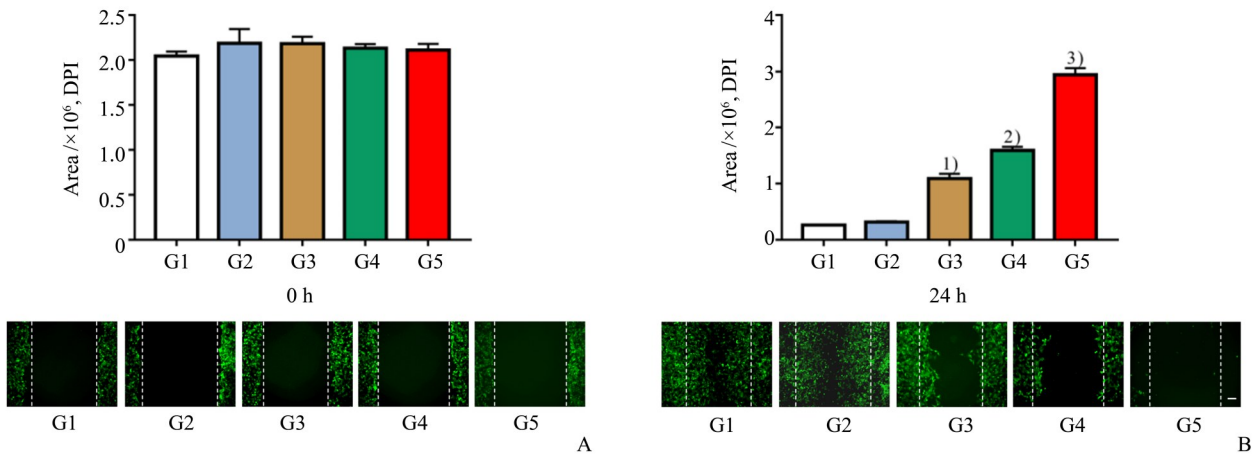
划痕的像素面积:在0 h,对照组、单纯超声组、传统给药组、细胞外释药组和细胞内释药组的划痕像素面积(单位为DPI)分别为:( $2\ 046\ 626.00 \pm 50\ 406.02$ )、( $2\ 188\ 029 \pm 159\ 023.95$ )、( $2\ 185\ 247.30 \pm 77\ 130.76$ )、( $2\ 133\ 802.70 \pm 45\ 970.91$ )、( $2\ 112\ 886.30 \pm 69\ 619.24$ ),数据正态分布且方差齐( $F=3.436$ ,  $P=0.052$ )。单纯超声组,传统给药组,细胞外释药组和细胞内释药组均与对照组无统计学差异。说明在处理前各组的划痕面积(单位为DPI)无差异( $F=1.254$ ,  $P=0.350$ )。在24 h,对照组、单纯超声组、传统给药组、细胞外释药组和细胞内释药组的划痕像素面积分别为:( $261\ 842.67 \pm 6\ 388.90$ )、( $317\ 079.33 \pm 15\ 607.32$ )、( $1\ 093\ 205.70 \pm 83\ 282.69$ )、( $1\ 592\ 005.70 \pm 64\ 333.96$ )、( $2\ 936\ 746.30 \pm 121\ 529.56$ ),数据正态分布且方差齐( $F=3.345$ ,  $P=0.055$ )。单纯超声组与对照组差异无统计学差异,说明单独的低强度聚焦超声对4T1细胞的侵袭能力无影响,与流式检测细胞死亡的结果及CCK8的结果相符。传统给药组,细胞外释药组和细胞内释药组均与对照组差异有统计学意义,细胞内释药组与其他各组差异均有统计学差异( $F=693.634$ ,  $P<0.001$ ;图6)。说明低强度聚焦超声触发的细胞内释药能够比低强度聚焦超声触发的细胞外释药及传统给药组更能杀伤4T1肿瘤细胞,这与流式检测细胞死亡的结果及CCK 8的结果相符。



A: Percentage of live cells after treatment in each group,  $F=239.175$ , <sup>1)</sup>  $P<0.001$  vs. control group; <sup>2)</sup>  $P<0.001$  vs. control group; <sup>3)</sup>  $P<0.001$  vs. control group; G1: The control group; G2: The ultrasound alone group; G3: The traditional drug delivery group; G4: The extracellular drug release group; G5: The intracellular drug release group;  $n=3$ . B: Percentage of viable 4T1 cells after treatment in each group,  $F=2.992$ , 1)  $P<0.001$  vs. control group; 2)  $P<0.001$  vs. control group; 3)  $P<0.001$  vs. control group; G1: The control group; G2: The ultrasound alone group; G3: The traditional drug delivery group; G4: The extracellular drug release group; G5: The intracellular drug release group;  $n=3$ . C: Flow cytometry apoptosis. G1: The control group; G2: The ultrasound alone group; G3: The traditional drug delivery group; G4: The extracellular drug release group; G5: The intracellular drug release group;  $n=3$ .

图5 细胞死亡评价

Fig. 5 Evaluation of cell death



A: Scratch pixel area and wound healing test results at 0 h,  $n=3$ . B: Scratch pixel area and wound healing test results at 24 h,  $F=693.634$ , <sup>1)</sup>  $P<0.001$  vs. control group; <sup>2)</sup>  $P<0.001$  vs. control group; <sup>3)</sup>  $P=0.001$  vs. control group;  $n=3$ . G1: The control group; G2: The ultrasound alone group; G3: The traditional drug delivery group; G4: The extracellular drug release group; G5: The intracellular drug release group. Scale bars = 100  $\mu\text{m}$ .

图6 不同处理对4T1细胞在体外迁移的影响

Fig. 6 Effect of different treatments on 4T1 cell migration in vitro

### 3 讨论

由于PLGA的声学特性取决于超声能量的动态变化,因此PLGA纳米气泡作为超声造影剂和靶

向药物输送载体已经进行广泛研究了<sup>[17-18]</sup>。同时,阿霉素是常用化疗药物之一,且效果肯定。我们选择PLGA作为阿霉素的载体,是因为它是最有希望的生物材料之一,它可以在体内自然降解和代谢,

并且毒性最小。同时,它也是控制和持续释放封装药物的良好载体。尽管普遍接受超声可以控制药物释放,但是关于超声如何控制细胞内药物释放的研究很少。因此,在本研究中,我们以PLGA为载体,将阿霉素包裹在PLGA纳米颗粒中,构建PLGA-DOX药物递送系统,并成功实现了药物的细胞外释放,同时实现了细胞内释放。在实验结果中,可以看出细胞内药物释放可以进一步增强4T1肿瘤细胞的死亡。

超声靶向微泡破坏技术所致的空化效应使细胞膜上出现可逆性或不可逆性小孔,提高了细胞膜的通透性,从而利于药物的递送<sup>[29]</sup>。通过超声将药物递送至肿瘤,并且用超声使静脉内微泡爆破治疗肿瘤,这些研究证明是可行的<sup>[31-33]</sup>。正如前所述,这些药物在血管内皮细胞中释放并损害肿瘤血管,这些血管的损伤可能减少药物的摄入并引起正常器官的毒性。在这项研究中,我们通过细胞内空化,使超声介导的空化效应在细胞内产生,使药物

进入细胞核内,通过制备PLGA-DOX纳米气泡,验证了低强度聚焦超声触发的细胞内药物释放比超声触发的细胞外药物释放更能诱导4T1细胞死亡,抑制4T1细胞侵袭。我们为低强度聚焦超声在细胞内空化增强细胞内药物释放和抗癌功效的应用提供概念验证。这种方式将对基于PLGA-DOX纳米气泡的乳腺癌靶向治疗进一步体内研究奠定基础。

本研究是在细胞水平上研究的。在动物水平上还没进行深入的研究,关于如何在动物体内的超声触发的细胞内释药还没进行尝试,这是本研究的一个局限性,后续将在实现动物体内超声触发的细胞内释药等方面进行深入的研究。综上所述,本研究成功制备了包裹DOX药物的PLGA的纳米颗粒,并实现了超声控制的细胞内药物释放。通过PLGA-DOX与超声控制的胞内释药结合,进一步增强了4T1细胞的死亡和抑制4T1细胞侵袭。

#### 参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] Li C, Yang XQ, Zhang MZ, et al. In vivo imaging-guided nanoplatform for tumor targeting delivery and combined chemo-, gene- and photothermal therapy [J]. *Theranostics*, 2018, 8(20): 5662-5675.
- [3] Chen HJ, Zhou XB, Wang AL, et al. Synthesis and biological characterization of novel rose bengal derivatives with improved amphiphilicity for sono-photodynamic therapy [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 145: 86-95.
- [4] Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(25): 3267-3285.
- [5] Speth PA, van Hoesel QG, Haanen C. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1988, 15(1): 15-31.
- [6] Iyer AK, Singh A, Ganta S, et al. Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(13-14): 1784-1802.
- [7] Kanwal U, Irfan Bukhari N, Ovais M, et al. Advances in nano-delivery systems for doxorubicin: an updated insight [J]. *J Drug Target*, 2018, 26(4): 296-310.
- [8] Joshi VB, Geary SM, Salem AK. Biodegradable particles as vaccine delivery systems: size matters [J]. *AAPS J*, 2013, 15(1): 85-94.
- [9] Kang J, Wu F, Cai Y, et al. Development of Recombinant Human Growth Hormone (rhGH) sustained-release microspheres by a low temperature aqueous phase/ aqueous phase emulsion method [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014, 62: 141-147.
- [10] Zhao H, Wu F, Cai Y, et al. Local antitumor effects of intratumoral delivery of rIL-2 loaded sustained-release dextran/PLGA-PLA core/shell microspheres [J]. *Int J Pharm*, 2013, 450(1-2): 235-240.
- [11] Yuan W, Zhang Y, Wu F, et al. Preparation of protein-loaded sustained-release microspheres via 'solid-in-oil-in-hydrophilic oil-in-ethanol (S/O/HO/E)' emulsification [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010, 79(2): 326-333.
- [12] Danhier F, Ansorena E, Silva JM, et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications [J]. *J Control Release*, 2012, 161(2): 505-522.
- [13] Lü JM, Wang X, Marin-Muller C, et al. Current advances in research and clinical applications of PLGA-

- based nanotechnology [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2009, 9(4): 325–341.
- [14] Zhu X, Braatz RD. A mechanistic model for drug release in PLGA biodegradable stent coatings coupled with polymer degradation and erosion [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2015, 103(7): 2269–2279.
- [15] Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier [J]. *Polymers (Basel)*, 2011, 3(3): 1377–1397.
- [16] Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(3): 329–347.
- [17] Figueiredo M, Esenaliev R. PLGA Nanoparticles for ultrasound-mediated gene delivery to solid tumors [J]. *J Drug Deliv*, 2012, 2012: 767839.
- [18] Chen H, Hwang JH. Ultrasound-targeted microbubble destruction for chemotherapeutic drug delivery to solid tumors [J]. *J Ther Ultrasound*, 2013, 1: 10.
- [19] Deng CX, Xu Q, Apfel RE, et al. Inertial cavitation produced by pulsed ultrasound in controlled host media [J]. *J Acoust Soc Am*, 1996, 100(2 Pt 1): 1199–1208.
- [20] Doktycz SJ, Suslick KS. Interparticle collisions driven by ultrasound [J]. *Science*, 1990, 247(4946): 1067–1069.
- [21] Gambuteanu C, Alexe P. Comparison of thawing assisted by low-intensity ultrasound on technological properties of pork Longissimus dorsi muscle [J]. *J Food Sci Technol*, 2015, 52(4): 2130–2138.
- [22] Suslick KS, Doktycz SJ, Flint EB. On the origin of sonoluminescence and sonochemistry [J]. *Ultrasonics*, 1990, 28(5): 280–290.
- [23] Frenkel V, Kimmel E, Iger Y. Ultrasound-induced cavitation damage to external epithelia of fish skin [J]. *Ultrasound Med Biol*, 1999, 25(8): 1295–1303.
- [24] Miller DL, Thomas RM. Ultrasound contrast agents nucleate inertial cavitation in vitro [J]. *Ultrasound Med Biol*, 1995, 21(8): 1059–1065.
- [25] Wood AK, Sehgal CM. A review of low-intensity ultrasound for cancer therapy [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2015, 41(4): 905–928.
- [26] Juliano RL. Intracellular trafficking and endosomal release of oligonucleotides: What we know and what we don't [J]. *Nucleic Acid Ther*, 2018, 28(3): 166–177.
- [27] Moradi Kashkooli F, Soltani M, Souri M. Controlled anti-cancer drug release through advanced nano-drug delivery systems: Static and dynamic targeting strategies [J]. *J Control Release*, 2020, 327: 316–349.
- [28] Raza A, Rasheed T, Nabeel F, et al. Endogenous and Exogenous Stimuli-Responsive Drug Delivery Systems for Programmed Site-Specific Release [J]. *Molecules*, 2019, 24(6): 1117.
- [29] Chowdhury SM, Abou-Elkacem L, Lee T, et al. Ultrasound and microbubble mediated therapeutic delivery: Underlying mechanisms and future outlook [J]. *J Control Release*, 2020, 326: 75–90.
- [30] 刘红梅,王宇,严飞.一种超声介导细胞内空化作用进行基因转染的新型生物纳泡-细胞体系及其制备方法和应用 [P]. 广东省: CN110791527A, 2020-02-14.
- Liu Hm, Wang Y, Yan F. A novel biological nanobubble-cell system for gene transfection through ultrasound-mediated intracellular cavitation and its preparation method and application [P]. Guangdong Province: CN110791527A, 2020-02-14.
- [31] Hermet S, Klivanov AL. Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(10): 1153–1166.
- [32] Pitt WG, Hussein GA, Staples BJ. Ultrasonic drug delivery—a general review [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2004, 1(1): 37–56.
- [33] Pu C, Chang S, Sun J, et al. Ultrasound-mediated destruction of LHRHa-targeted and paclitaxel-loaded lipid microbubbles for the treatment of intraperitoneal ovarian cancer xenografts [J]. *Mol Pharm*, 2014, 11(1): 49–58.