

观测包膜微泡在超声场中的动力学行为*

梁金福¹⁾ 陈伟中^{1)†} 邵纬航¹⁾ 周超¹⁾ 杜联芳²⁾ 金利芳²⁾

1) (南京大学声学研究所, 近代声学国家重点实验室, 南京 210093)

2) (上海第一人民医院, 超声部, 上海 200089)

(2012年11月1日收到; 2012年12月16日收到修改稿)

运用长距离显微成像系统与锁相积分拍摄技术相结合的方法, 拍到了单个造影剂微泡在两种不同频率和不同声压下的周期性振动图像. 根据这些图像得到了微泡直径的实验数据, 并分别用 Hoff 模型和 Rayleigh-Plesset 模型对数据进行拟合, 并对数据进行了频谱分析. 结果表明: Hoff 模型对实验数据的拟合结果优于 Rayleigh-Plesset 模型的拟合结果; 二次谐波的相对强度随着声压幅度的升高而增大.

关键词: 包膜微泡, 锁相积分拍摄方法, 频谱

PACS: 47.55.dd, 47.80.Jk, 43.25.+y

DOI: 10.7498/aps.62.084708

1 引言

随着医学超声技术的发展, 包膜微泡在生物医学领域中的应用受到了广泛的关注. 除了作为临床超声影像中的造影剂微泡^[1]之外, 包膜微泡还在高次谐波成像^[2]、靶向药物传输^[3]和超声治疗^[4]等方面展示出诱人的应用前景. 目前典型的造影剂微泡是由包膜层(通常其材料为脂质, 清蛋白或者聚合物)包裹一些大分子气体(如六氟化硫气体: SF₆)而形成的微米量级气泡. 与无包膜的自由气泡相比, 造影剂微泡由于有包膜层的保护, 在参与血液循环时不会由于高渗透压的作用而很快溶解, 这为临床超声影像或靶向药物传输提供时间方面的保障. 当造影剂(含有包膜微泡的悬浮液)被置于超声场中时, 由于受到声场的作用, 微泡可能会经历线性或非线性的振动过程. 关于包膜微泡在超声场中的动力学行为, 声学界和医学界的一些专家学者一直在进行研究, 并取得了一些理论成果^[5-7]和实验成果^[8-12].

至今为止, 在实验方面, 研究造影剂微泡动力学的有效方法之一是用高速相机实时拍摄单个或多个微泡在超声场中的动力学行为. 这种方法能

直接观察到微泡在声场中的振动^[8]、破裂^[9]、并合^[10]以及与管壁^[11]或者细胞^[12]的相互作用. 但是, 相对于兆赫兹(MHz)振动的微泡而言, 目前先进的10 MHz高速相机(即速率为每秒10⁷帧)都难以获得满意的结果. 例如, 在中心频率为1 MHz超声场中振动的微泡, 使用10 MHz高速相机来抓拍, 一个振动周期内至多能拍到10帧图像. 用每周期10帧图像来描述微泡的振动细节是不够的, 即使能够提高高速相机的速率, 也难以提高一次拍摄的帧数, 因为单次拍摄帧数还与相机的内存有关. 除此之外, 相机速率的提高, 必将导致曝光时间缩短, 进光量减少. 为了获得清晰的图像, 需要提高照明光的强度. 但是, 当强光会聚在微泡上时, 可能会导致微泡的毁灭. 因此, 利用高速相机获得微泡在声场中高速振动的细节存在实质性的困难.

针对高速相机实时拍摄的困难和在连续超声波驱动下微泡振动的严格周期性, 我们发展了一种非实时的拍摄方法, 可以拍摄较多的图像以获取造影剂微泡的振动细节. 我们在每个振动周期内, 获得了数十帧微泡图像. 这种方法的基本原理与文献^[13,14]中的完全相同, 即把频闪激光照明技术和锁相积分拍摄技术相结合. 在文献^[13, 14]中拍摄的目标是无包膜的自由气泡, 由于自由气泡和液体的

* 国家自然科学基金(批准号: 10974095, 11174145)资助的课题.

† 通讯作者. E-mail: wzchen@nju.edu.cn

密度相差很大, 气泡的重力几乎可以忽略不计. 在驻波声场的作用下, 气泡主要受到声辐射力和浮力的作用, 当两者形成平衡力时, 气泡就会悬浮于液体中, 其位置一般在波腹处^[15]. 并且, 自由气泡的初始半径会随超声驱动频率的不同而自动发生变化, 频率越低, 对应的谐振半径越大. 在本文中, 我们拍摄的目标是包膜造影剂微泡, 由于有包膜层的存在, 微泡的平均密度值与液体的密度相当, 所以微泡本身的重力不能忽略. 此外, 微泡的平均初始半径在 $2.5 \mu\text{m}$ 左右, 并且该初始半径不会像自由气泡那样随驱动频率而自动形成, 因此想在相对空间较大的液体驻波声场中悬浮住微泡是很难的. 根据包膜造影剂微泡的特点, 我们设计制作了一个局域谐振腔, 并据此修改了相应的拍摄参数. 本文将在第 2 部分介绍我们的实验系统和控制技术; 然后, 在第 3 部分给出拍摄图像, 并对微泡直径的实验数据进行拟合; 在第 4 部分, 对微泡直径的时域数据进行频谱分析; 最后是小结和讨论.

2 声场中的包膜微泡和锁相积分拍摄技术

图 1 是实验系统框图, 主要由超声驱动系统和拍摄系统组成, 其中拍摄系统分为长距离显微成像系统和锁相脉冲照明系统.

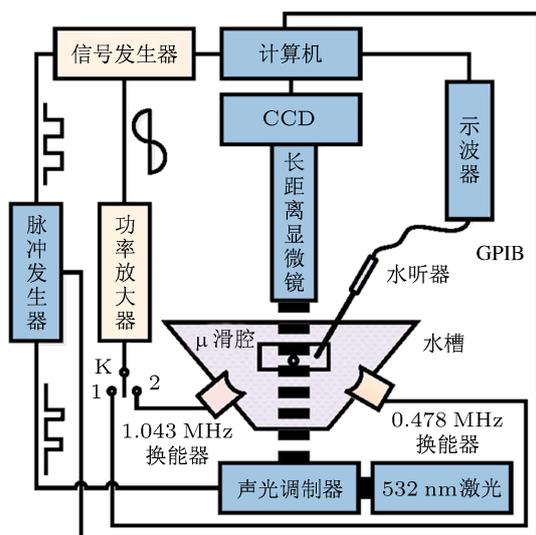


图 1 实验系统框图

2.1 声场中的包膜微泡

超声驱动系统是由函数发生器 (33250A, Agilent Technologies, USA)、功率放大器 (1140AL, EI,

Ltd. USA) 以及聚焦换能器组成. 实验中两个不同频率的换能器是独立使用的. 当开关 K 置于 1 位置时, 发射 0.478 MHz 超声波; 而置于 2 位置时, 发射 1.043 MHz 超声波.

水槽中注入含盐量为 1/1000 的去气生理盐水 (0.09% m/v). μ 滑腔 (80046, ibidi, GmbH, Munich, German) 内注入的是含 SonoVue® 微泡 (Bracco Imaging B. V., Switzerland) 的悬浮液 (一种造影剂), 浓度约为 10^5 个/mL. 形成微泡的过程是先用医用注射器, 把生理盐水注入密封的、装有造影剂粉末和 SF_6 气体的小瓶内; 然后振荡、稀释而成. 最后, 用注射器把含泡的悬浮液注入 μ 滑腔内, 也可以用注射器的针头把少量的造影剂粉末直接送入 μ 滑腔内, 然后注入适量的生理盐水; 再利用 μ 滑腔配套的细胶管通入 SF_6 气体; 最后在超声作用下形成微泡. 这样可以多次使用同一瓶内的造影剂粉末, 以节省实验成本. 由于 μ 滑腔是透光、透声的, 腔内的微泡在声场中受到了声辐射力、浮力和腔体边界约束力的共同作用, 一些受超声驱动的微泡会在某个平衡位置做空间固定的周期性振动.

2.2 锁相积分拍摄技术

长距离显微成像系统 (KH3000V, Hirox Co. Ltd., Japan) 是实验的观察和记录工具, 它由长距离显微镜头和电荷耦合元件 (CCD) 组成, 显微镜的最大放大倍数是 400, 工作距离为 6.5 cm. 照明系统由 532 nm 的连续激光器、脉冲发生器 (DG535, SRS, Inc., USA) 以及声光调制器 (AA. MT. 350, Quanta Tech, Inc., USA) 组成. 实验所用拍摄方法是在 CCD 快门开启时间里, 重复曝光锁相脉冲光照明下的包膜微泡, 获得该相位的微泡积分图像. 具体过程是, 在函数发生器的 TTL 端口获取一个同驱动超声信号同步的 TTL 信号, 经过 DG535 延时和处理^[13]后, 成为同步的窄脉冲. 当该窄脉冲触发声光调制器时, 入射的连续激光就转化为与驱动超声同步的窄脉冲激光. 由于 TTL 信号与驱动换能器的超声信号是同时的, 具有完全相同的频率和相位, 所以, 固定脉冲发生器的延迟时间, 就可以锁定脉冲光的相位.

调整脉冲激光的方向, 对准 μ 滑腔内的一个微泡, 再调整显微镜的视场范围, 捕捉被照明的包膜微泡. 设置 CCD 进入视频拍摄 (30 fps, 即每秒 30 帧) 状态, 并设置适当的曝光时间, 使得每帧图像曝光量正常. 设置每次锁相的持续时间等于视频拍摄

周期 (1/30 s). 改变锁相位置 (延时量), 拍摄下一个相位的积分图像. 依此重复, 完成所有相位的拍摄. 本文采用等步长相移, 每次移动相位 $\Delta\varphi$. 本小节中的所有参数设置过程均应用 HP VEE 程序语言在计算机上进行控制.

拍摄参数主要依赖于驱动超声的频率 f (或者周期 T), 我们对两个超声频率驱动下的包膜微泡进行了实验拍摄, 主要拍摄参数在表 1 中给出.

表 1 两组拍摄参数

f/MHz	$T/\mu\text{s}$	$\Delta\varphi/(\text{°})$	积分次数	周期帧数	总时间/s
0.478	2.09	4.3	1914	84	0.34
1.043	0.96	9.2	4166	39	0.16

由于锁相脉冲激光是从背面入射包膜微泡的, 因此我们获得的是微泡的背影像. 如果入射光被微泡反射越多, 进入相机的光强越弱, 图像就会越暗.

此外, 微泡所在处的声压用水听器 (TNU001, NTR System, Inc., USA) 来测量, 方法是拍摄完微泡的图像后, 移去 μ 滑腔, 照明光线不动, 然后把水听器的针形探头置于微泡原来所在的位置进行监测.

3 包膜微泡的直径时间曲线

3.1 包膜微泡的演化

图 2 给出了微泡在两种超声频率驱动下部分相位的图像. 从图 2 中可以看出: 1) 频率为 0.478 MHz 驱动下的微泡的初始直径稍大于在 1.043 MHz 驱动的微泡; 2) 微泡的时间演化规律是从平衡位置开始, 先上升到最大, 然后下降到最小, 再上升到平衡位置, 类似于正弦曲线的运动规律. 为了测量微泡的大小, 我们用 MATLAB 软件编写了一个识别微泡直径的测量程序, 其方法见文献 [13, 14]. 图 3 中的空心圆表示微泡在两种不同频率超声驱动下, 直径的演化规律. 当然, 由于微泡的移动和变形等因素, 可能会导致一定的测量误差.

3.2 Hoff 模型和 Rayleigh-Plesset 模型的拟合

为了进一步研究造影剂微泡的动力学, 我们分别用 Hoff 模型 [6] 和 Rayleigh-Plesset (RP) 模型 [16] 对实验数据进行拟合. Hoff 模型是 Hoff 本人在 Church 模型 [5] 的基础上修正得到的一个描述

单个包膜微泡在声场中振动的二阶常微分方程, 即

$$\rho_l \left(R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 \right) + P_0 + P_1 - \frac{R}{c}\dot{P}_1 + P_a(t) = 0, \quad (1)$$

其中 P_1 是微泡壁面上的平均压力, 其表达式为

$$P_1 = -4\eta_l \frac{\dot{R}}{R} - \Delta T_r + P_0 \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3\gamma}, \quad (2)$$

这里的 ΔT_r 是微泡内表面与外表面间的径向压力, 表示为

$$\Delta T_r = 12d_{se} \frac{R_0^2}{R^4} [G_s(R - R_0) + \eta_s \dot{R}], \quad (3)$$

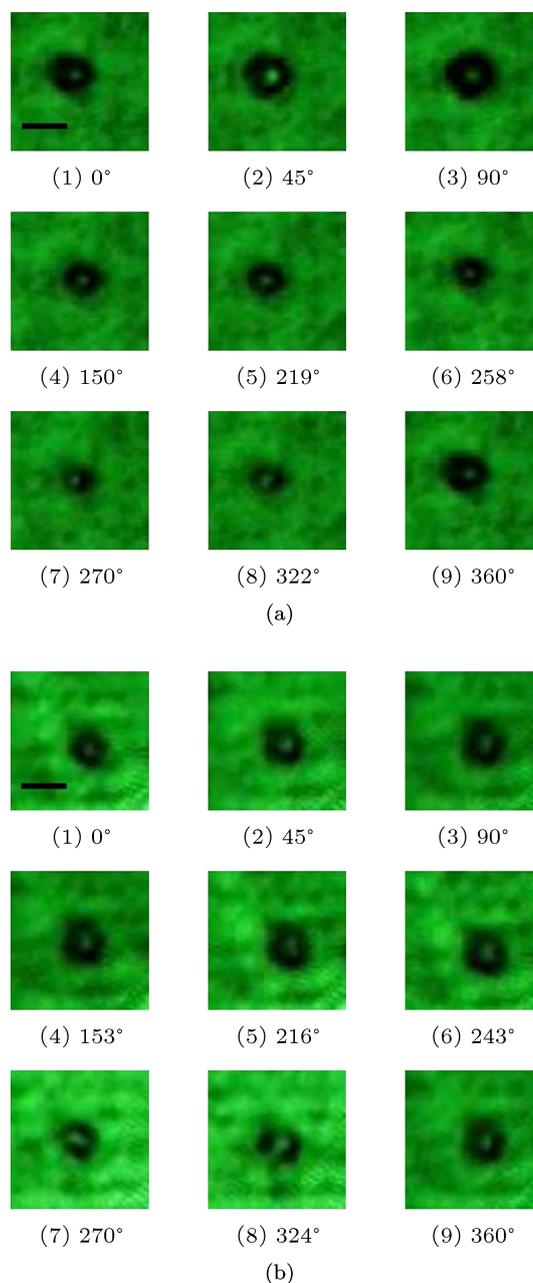


图 2 不同相位的微泡图像 (a) 和 (b) 分别在频率为 0.478 和 1.043 MHz 的超声场中拍摄

上式中的 \dot{R} 和 \ddot{R} 分别表示 R 对时间的一阶和二阶微分。 P_0 是环境大气压, c 是声波在液体中传播的速度, ρ_l 是液体的密度。 $P_a(t) = -P_a \sin(\omega t)$ 是驱动声压, $\omega = 2\pi f$ 是圆频率, η_l 是液体的黏度系数, R_0 是微泡的平衡半径, γ 是气体的多方指数, d_{se} 是微泡壳层的平均厚度, G_s 和 η_s 分别是壳的弹性模量和黏度系数。

$\times 10^5$ Pa), $\rho_l = 1.01 \times 10^3$ kg/m³, $c = 1500$ m/s, $\eta_l = 1 \times 10^{-3}$ m²/s, $\sigma = 7.6 \times 10^{-2}$ N/m, $\gamma = 1.4$, $\eta_s = 1$ Pa·s, $G_s = 60$ MPa, $d_{se} = 15$ nm, $\dot{R}(0) = 0$ 。图 3 是用方程 (1)—(5) 去拟合两组实验数据得到的直径演化曲线, 实线为 Hoff 模型拟合的结果, 虚线为 RP 模型拟合的结果。从图 3(a) 和 3(b) 中均可看出, Hoff 模型的拟合结果比 RP 模型的拟合结果好。

3.3 声压幅度与微泡振动的关系

为了描述微泡在超声场中振动的剧烈程度, 我们测量了微泡在不同声压下振动的最大直径和最小直径, 并计算出它们的比值, 即微泡的压缩比。压缩比越大, 说明微泡振动越激烈, 反之则弱。在本实验中, 当 $f = 0.478$ MHz, $P_a = 1.4$ atm 时, 微泡振动剧烈而不稳定, 或者破裂; 当 $f = 1.043$ MHz, $P_a = 2.1$ atm 时, 也出现类似现象。为了能重复拍摄到微泡的周期性振动, 并能比较两种频率下微泡的振动特性, 我们选择的声压幅度范围是: 0.42—1.28 atm。图 4 表示微泡在不同声压下振动时, 其直径的最大值 (实心正方形), 最小值 (实心三角形) 和它们的比值 (实心圆), 曲线表示在 Hoff 模型基础上

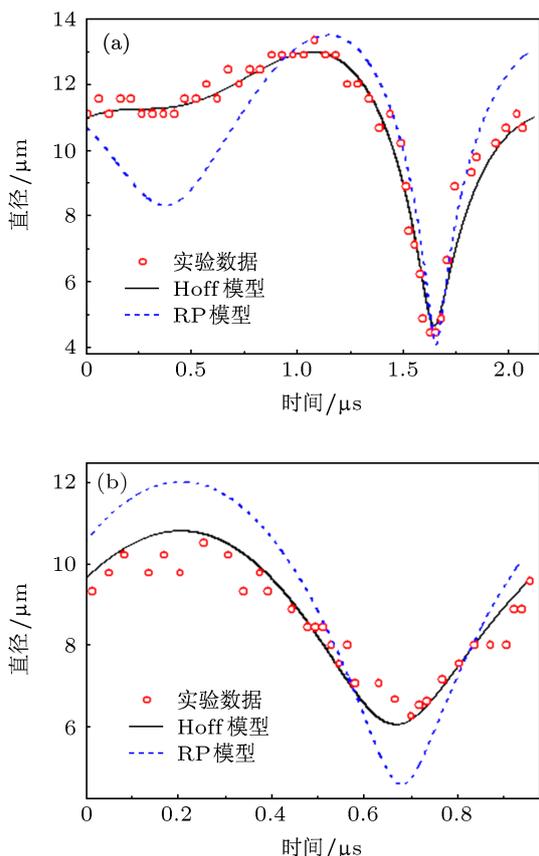


图 3 理论与实验的拟合曲线 (a) $f = 0.478$ MHz, $P_a = 1.05$ atm 和 $R_0 = 4.5$ μm 条件下拟合的结果; (b) $f = 1.043$ MHz, $P_a = 1.05$ atm 和 $R_0 = 4.1$ μm 条件下拟合的结果

本文中用来描述无包膜自由气泡在声场中振动的 RP 模型是

$$\rho_l \left(R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 \right) + P_0 - P_g - \frac{R}{c} [\dot{P}_g - \dot{P}_a(t)] + \frac{4\eta_l}{R}\dot{R} + \frac{2\sigma}{R} + P_a(t) = 0, \quad (4)$$

其中 P_g 是气泡内部的压强, 表示为

$$P_g = \left(P_0 + \frac{2\sigma}{R_0} \right) \left(\frac{R_0^3 - b^3}{R^3 - b^3} \right)^\gamma, \quad (5)$$

这里 \dot{P}_g 和 $\dot{P}_a(t)$ 分别表示 P_g 和 $P_a(t)$ 对时间的一阶导数; σ 是表面张力系数, $b = R_0/8.5$ 是气泡的范德瓦尔斯排斥半径。基于我们的实验条件, 取 $P_0 = 1$ atm (1 atm ≈ 1.013

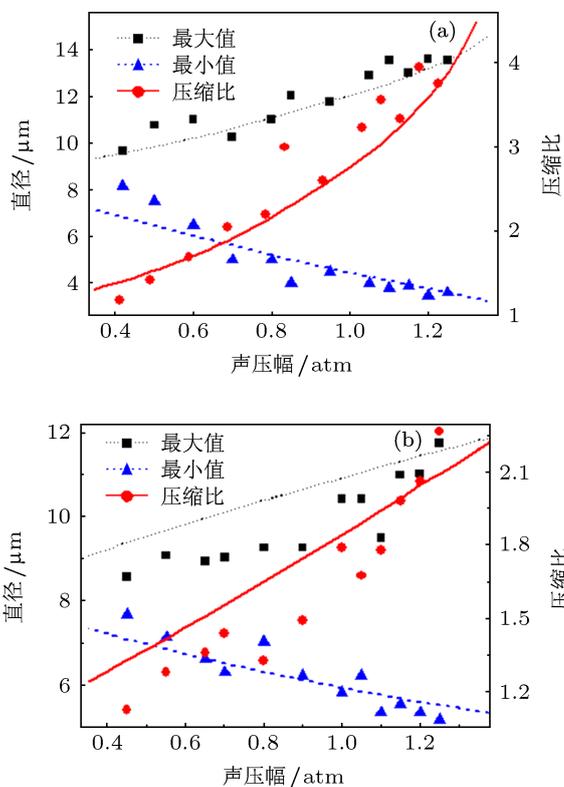


图 4 微泡直径及其压缩比随声压幅度的变化 (a) 和 (b) 分别是在频率为 0.478 和 1.043 MHz 超声条件下的结果

得到的相应理论值. 从图 4 中可以看出微泡直径的最大值随声压幅度的升高而增大, 最小值随声压幅度的升高而减小, 因此微泡的压缩比也随声压幅度的升高而增大, 这与相应的理论计算结果基本一致. 这些结论也说明了 Hoff 模型在一定的声压范围内对微泡的振动具有指导意义.

4 频谱分析

造影剂在超声医疗影像中的主要作用之一是能增强声波的背散射, 在声场中脉动的单个微泡就相当于一个散射源, 所以研究造影剂微泡在声场中因脉动而产生的谐波成分及其它们的强度具有重要意义.

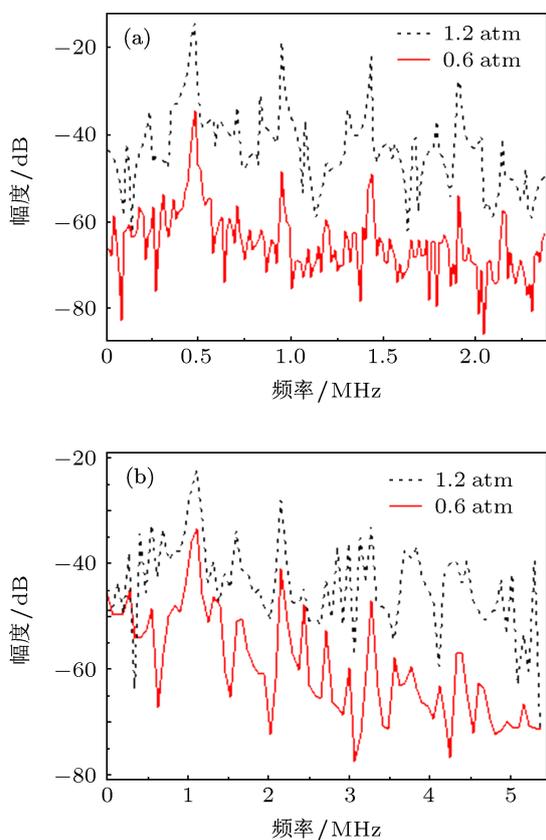


图 5 微泡归一化直径实验数据的频谱分析 实线和虚线分别表示在 $P_a = 0.60 \text{ atm}$ 和 $P_a = 1.20 \text{ atm}$ 的频谱. (a) 和 (b) 分别是在频率为 0.478 MHz 和 1.043 MHz 条件下的结果

根据采样定律, 高的采样率才能获得高频的信号信息. 使用锁相积分拍摄技术, 允许我们将周期拍摄帧数提高到数十帧的量级, 这样就可以对直径的时域信号进行频谱分析. 在 $f = 0.478 \text{ MHz}$ 的超声场中, 我们连续拍摄了微泡在 4 个周期内振动的图像, 总共 336 帧. 我们对这 336 个关于微泡直径的时域数据进行归一化和快速 Fourier 变换, 获得相

应的频谱. 图 5 为在 $P_a = 1.20 \text{ atm}$ 和 $P_a = 0.60 \text{ atm}$ 两种声压幅度下, 0.478 MHz 和 1.043 MHz 超声波驱动下的微泡直径的频谱. 从中明显看出, $P_a = 1.20 \text{ atm}$ 时的基波和谐波强度均比 $P_a = 0.60 \text{ atm}$ 时对应波的强度大.

此外, 从图 5(a) 中也能得到谐波的相对强度也随声压幅度的升高而增大. 例如, 二次谐波在 $P_a = 1.2 \text{ atm}$ 时, $A_2/A_1 \approx 0.62$, 而在 $P_a = 0.60 \text{ atm}$ 时, $A_2/A_1 \approx 0.20$. 这里的 A_1 和 A_2 分别表示基波和谐波的归一化幅度.

同理, 在 $f = 1.043 \text{ MHz}$ 的超声场中, 对微泡的归一化直径数据进行频谱分析也得到类似的结论. 如图 5(b) 所示, 这里, 微泡在 4 个周期内振动的图像共 156 帧. 对比图 5(a) 和 (b) 可以看出, 在相同的声压幅度 (如 $P_a = 1.2 \text{ atm}$) 下, 低频声场中微泡振动产生的谐波强度 (如二次谐波) 大于高频声场所对应的谐波强度, 这是由于我们测量的气泡较大, 共振频率较低, 高频声场的驱动效果不及低频声场.

此外, 我们还分别对 Hoff 模型和 RP 模型的最佳直径拟合结果进行了类似的频谱分析. 图 6 给出

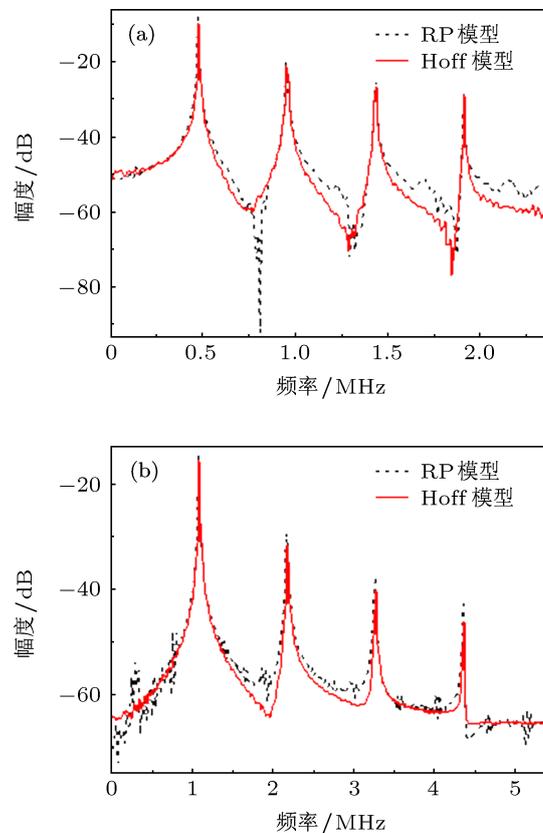


图 6 归一化直径理论值的频谱分析 实线和虚线分别表示当 $P_a = 1.2 \text{ atm}$ 时, Hoff 模型和 RP 模型在两种频率下得到的频谱; (a) 和 (b) 分别表示在频率为 0.478 MHz 和 1.043 MHz 条件下得到的结果

了驱动声压 $P_a = 1.2 \text{ atm}$ 时的两种不同的频率下的理论频谱. 从图 6 中可以看出, 自由气泡 (RP 模型) 产生的谐波强度略高于包膜微泡 (Hoff 模型) 对应的谐波强度. 我们认为, 这主要是由于包膜层的存在增加了微泡的刚度, 从而削弱了包膜微泡的非线性振动特性.

5 结论

我们针对包膜造影剂微泡的特点, 设计制作了谐振腔, 并运用锁相积分拍摄方法对单个 SonoVue® 微泡进行拍摄测量. 实验中采用的驱动超声参数为两个频率 (0.478 MHz 和 1.043 MHz) 分别与不同声压幅度的组合. 在频率 0.478 MHz 的超声场中, 每个周期可拍到 84 帧不同相位的图像,

即使在频率 1.043 MHz 下, 仍能获得 39 帧. 这对于分析微泡在超声场中的振动细节具有重要意义. 基于这些图像, 用 Hoff 模型和 RP 模型对测得的微泡直径实验数据进行拟合, 结果表明 Hoff 模型的拟合结果优于 RP 模型, 这说明包膜层的作用是不可或缺的. 更进一步, 我们分析了不同声压幅度下的微泡振动的最大直径、最小直径和压缩比. 结果显示, 最大直径和压缩比均随驱动声压幅度的升高而增大, 但最小直径则随声压幅度的升高而降低, 这给出了超声驱动下包膜微泡振动程度的物理图景. 此外, 我们还对微泡的归一化直径进行了频谱分析, 结果表明了谐波的强度与其相对基波的强度随声压幅度的升高而增大, 这对目前超声影像中应用谐波成像技术具有指导意义.

-
- [1] Goldberg B B, Raichlen J S, Forsberg F 2001 *Ultrasound Contrast Agents-Basic Principles and Clinical Applications* (2nd Ed.) (London: Martin Dunitz) p25
- [2] Shankar P M, Krishna P D, Newhouse V L 1998 *Ultrasound Med. Biol.* **24** 395
- [3] Bloch S H, Dayton P A, Ferrara K W 2004 *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* **23** 18
- [4] Robertson V J, Baker K G 2001 *Phys. Ther.* **81** 1339
- [5] Church C C 1995 *J. Acoust. Soc. Am.* **97** 1510
- [6] Hoff L, Sontum P C, Hovem J M 2000 *J. Acoust. Soc. Am.* **107** 2272
- [7] Marmottant P, van der Meer S, Emmer M, Versluis M, de Jong N, Hilgenfeldt S, Lohse D 2005 *J. Acoust. Soc. Am.* **118** 3499
- [8] de Jong N, Frinking P J A, Bouakaz A, Goorden M, Schourmans T, Jingping X, Mastik F 2000 *Ultrasound Med. Biol.* **26** 487
- [9] Chomas J E, Dayton P, May D, Ferrara K 2001 *J. Biomed. Opt.* **6** 41
- [10] Postema M, Bouakaz A, Chin C T, de Jong N 2003 *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelect. Freq. Contr.* **50** 523
- [11] Chen H, Kreider W, Brayman A A, Bailey M R, Matula T J 2011 *Phys. Rev. Lett.* **106** 034301
- [12] Wolfrum B, Mettin R, Lauterborn W 2002 *Appl. Phys. Lett.* **81** 5060
- [13] Liu Y N, Chen W Z, Huang W, Gao X X 2005 *Chin. Sci. Bull.* **50** 2458 (in Chinese) [刘亚楠, 陈伟中, 黄威, 高娴娴 2005 科学通报 **50** 2458]
- [14] Huang W, Chen W Z, Liu Y N, Gao X X 2006 *Ultrasonics* **44** e407
- [15] Matula T J 2000 *Ultrasonics* **38** 559
- [16] Keller J B, Miksis M 1980 *J. Acoust. Soc. Am.* **68** 628

Observation of encapsulated microbubble dynamics in ultrasound field*

Liang Jin-Fu¹⁾ Chen Wei-Zhong^{1)†} Shao Wei-Hang¹⁾ Zhou Chao¹⁾
Du Lian-Fang²⁾ Jin Li-Fang²⁾

1) (*The Key Laboratory of Modern Acoustics, Ministry of Education, Institution of Acoustics, Nanjing University, Nanjing 210093, China*)

2) (*Department of Ultrasound, Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200089, China*)

(Received 1 November 2012; revised manuscript received 16 December 2012)

Abstract

Using a long-distance microscope imaging system and a lock-in phase integrate technique, optical measurements demonstrate that the evolutionary behaviors of a phospholipid-shelled micro-bubble, a kind of ultrasound contrast agent, under two ultrasound frequencies and different pressures. Dozens of frames of an oscillating microbubble for one acoustic cycle are captured. The experimental data of micro-bubble diameter are fit by the numerical calculations of the Hoff model and the Rayleigh-Plesset model, respectively. The results show the good agreement between experimental data and the theoretical calculation in the Hoff model. In addition, the spectral analysis based on the experimental data indicates that the relative intensity of the second harmonic increases with the driving pressure amplitude.

Keywords: encapsulated microbubbles, lock-in integrate imaging method, spectra

PACS: 47.55.dd, 47.80.Jk, 43.25.+y

DOI: 10.7498/aps.62.084708

* Project supported the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 10974095, 11174145).

† Corresponding author. E-mail: wzchen@nju.edu.cn