

超声造影剂微泡非线性动力学响应的机理及相关应用

于洁 郭霞生 屠娟 章东

Mechanism and applications of the nonlinear dynamic response to ultrasound contrast agent microbubbles

Yu Jie Guo Xia-Sheng Tu Juan Zhang Dong

引用信息 Citation: [Acta Physica Sinica](#), 64, 094306 (2015) DOI: 10.7498/aps.64.094306

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.094306>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2015/V64/I9>

---

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

超声造影剂微气泡的包膜黏弹特性的定量表征研究

[Quantitative characterization of viscoelasticity of microbubbles in ultrasound contrast agent](#)

物理学报.2015, 64(11): 114301 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.114301>

微结构固体中的孤立波及其存在条件

[Solitary waves and their existence conditions in microstructured solids](#)

物理学报.2014, 63(19): 194301 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.63.194301>

专题: 庆祝南京大学物理学科成立100周年

# 超声造影剂微泡非线性动力学响应的机理及相关应用\*

于洁<sup>1)2)</sup> 郭霞生<sup>1)</sup> 屠娟<sup>1)†</sup> 章东<sup>1)</sup>

1) (近代声学教育部重点实验室, 南京大学物理学院, 南京 210093)

2) (江苏省中医院, 南京 210029)

(2015年1月5日收到; 2015年2月10日收到修改稿)

随着生命科学及现代医学的发展, 一体化无创精准诊疗已经日益成为人们关注的焦点问题, 而关于超声造影剂微泡的非线性效应的相关机理、动力学建模及其在超声医学领域中的应用研究也得到了极大的推动. 本文对下列课题进行了总结和讨论, 包括: 1) 基于 Mie 散射技术和流式细胞仪对造影剂微泡参数进行定征的一体化解决方案; 2) 通过对微泡包膜的黏弹特性进行非线性修正, 构建新的包膜微泡动力学模型; 3) 探索造影剂惯性空化阈值与其包膜参数之间的相关性; 4) 研究超声联合造影剂微泡促进基因/药物转染效率并有效降低其生物毒性的相关机理.

**关键词:** 超声造影剂微泡, 非线性动力学, 瞬态空化, 基因/药物转染

**PACS:** 43.35.Ei, 43.80.Vj

**DOI:** 10.7498/aps.64.094306

## 1 引言

尺度在微米量级的包膜微泡作为超声造影剂 (ultrasound contrast agent, UCA) 作用于临床已有 30 多年的历史. 通常所指的造影剂微泡是用白蛋白、脂质或聚合物等有助于防止气体溶解的薄层材料来包裹难溶的大分子气体内核 (如全氟化碳或六氟化硫) 构成的. 由于具有较强的声散射特性<sup>[1]</sup>, 造影剂微泡最初被注射到血液中, 用于增强与超声心动图或影像学特征有关的诊断超声图像的对比度<sup>[2]</sup>. 近年来, 人们对造影剂的关注点则更多集中在一些新的诊断和治疗应用上 (如果靶向分子成像、溶栓治疗, 基因/药物转染, 肿瘤治疗和止血等)<sup>[3-10]</sup>. 而这些应用中的大部分都得益于微泡的非线性动力学行为, 如谐波的生成和超声激发的声空化效应等.

大多数被批准用于临床的商业化造影剂都是

由脂质体或白蛋白包膜封装, 与较硬的包膜材料 (如聚合物) 相比, 弹性软包膜使得造影剂微泡能承受较大振幅的振荡. 最初关于造影剂微泡动力学的假设前提是微泡仅仅在小振幅超声驱动下做线性振动, 而造影剂的非线性响应直到 90 年代中期才得到足够的重视<sup>[11]</sup>. 最初, 通过对著名的 Rayleigh Plesset (RP) 方程中微泡包膜参数进行修正, 研究者们针对白蛋白包膜的 Alunex® 微泡开发出了多种包膜微泡动力学模型<sup>[12-19]</sup>. 而得益于更薄的包膜厚度<sup>[15,20,21]</sup> 和更大的弹性, 脂质体微泡近年来也得到了更为广泛的应用, 并有效推动了新型微泡动力学模型的发展. 在这些模型中, 辐射阻尼<sup>[22]</sup>、牛顿界面的流变性能或麦克斯韦定律<sup>[23,24]</sup> 都被用来描述薄层脂质体包膜的黏弹特性<sup>[25]</sup>.

除了数值模拟计算外, 一些新的实验技术也被用于探索造影剂微泡的物理特性的定征. 在高速成

\* 国家重点基础研究发展计划 (批准号: 2011CB707900)、国家自然科学基金 (批准号: 61072027, 81127901, 81227004, 11374155, 11174141, 11274170, 11474001 和 11474161) 和国家高技术研究发展计划 (批准号: 2012AA022702) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: juantu@nju.edu.cn

像技术的帮助下<sup>[22]</sup>, 微气泡的特殊行为, 如只压缩和剪切变薄等都被首次发现, 而这些发现可能会导致造影剂的超常非线性响应, 并促使微泡模型得到进一步修正和完善<sup>[26-38]</sup>. 在一项由Marmottant等完成的可以有效模拟造影剂微泡只压缩行为的建模工作中, 微泡包膜的表面张力被一个经验半径阈值和一个临界张力值所不完全表征, 低于前者微泡将皱缩坍塌, 而高于后者微泡外壳将会破裂<sup>[39]</sup>. Doinikov等提议, 剪切变薄的现象可以通过考虑黏性应力与包膜剪切速率之间的函数相关性来解释<sup>[40]</sup>. 然而, 上述建模工作总是受到包膜黏弹性参数和初始气泡半径之间依赖关系的影响, 这被认为是与自然材料的一般物理特性相冲突的. 因此, 有人提出, 应当寻求一个更加全面的模型, 同时考虑外壳弹性和黏度的非线性变化来描述造影剂微泡在动力学研究方面的复杂性.

同时, 为了验证包膜微气泡动力学模型的有效性, 我们需要对包膜的黏弹特性进行实验定征. 一般情况下, 包膜参数可以通过包膜微泡动力学模型拟合实验测量所得的微泡声学响应数据来获得. 测量微泡声学响应的现有技术包括微泡声学响应的测量、光学高速摄影法、Mie 散射技术和流式细胞术等<sup>[21,22,38,41-45]</sup>. 但是, 上述方法却都很难提供一种可以快速有效表征造影剂包膜物理特性的一体化系统方案.

在超声造影剂的应用领域, 一个最重要的跟超声非热效应相关的物理机理是声空化效应, 其中又分为瞬态空化和非瞬态空化(即稳态空化)<sup>[42]</sup>. 瞬态空化是指在超过一定阈值的声压下, 微泡体积先增大然后剧烈塌缩内爆的现象<sup>[46]</sup>. 与瞬态空化不同的是, 气泡受迫产生幅度较小的振动的过程被认为是稳态空化. 在实际的诊断和治疗过程中, 强烈的瞬态空化是要受到严格限制的, 以防产生的有害的副作用, 如血管内皮损伤, 毛细血管破裂导致出血, 不可逆的细胞损伤, 以及DNA断裂等<sup>[47-52]</sup>. 在超声驱动下, 微泡声空化效应可能在细胞或生物组织周围产生射流、剪切应力等机械作用, 导致细胞膜上短暂出现一定量的孔隙(即声穿孔现象), 并可由此增强细胞膜的通透性, 促进细胞内外介质之间的物质交换或基因/药物的传递<sup>[50,53-61]</sup>. 尽管声穿孔效应被认为在基因治疗和靶向给药的发展中很有应用前景, 但目前仍受到细胞靶向、声穿孔效率、微泡寿命、声参数优化等因素的制约. 尤为重要的是, 微泡动力学行为对声穿孔效应产生影响的

确切机理仍然没有获得共识.

因此, 我们如今面对的关于造影剂微泡的主要问题, 也是生物医学超声领域中的热点问题, 至少应当包括以下内容: 1) 以准确和可靠的方式对造影剂的参数进行表征; 2) 找到可以描述实验观察到的造影剂各种非线性行为的动力学模型; 3) 探索造影剂微泡在生物医学领域的新应用及其相关物理机理.

在这篇综述文章中, 我们首先对微泡的物理特性及其非线性响应的基本原理和动力学建模进行了介绍, 由此引申到超声联合造影剂微泡介导的基因/药物的相关机理研究, 并将所得到的结果与已发表的文献报道做了对比.

## 2 造影剂微泡物理特性的一体化定征

考虑到微泡包膜层对微泡稳定性、声散射特性和分子靶向特性等方面的重要性, 迅速而准确地对微泡物理特性进行一体化全面定征是研发者们关注的焦点. 诸如DEFINITY®(美国Lantheus Medical Imaging)和SonoVue®(瑞士Bracco Diagnostic Inc)公司都已经尝试通过在商业流式细胞仪中纳入Mie散射技术来实现对微泡物理特性的定征.

微泡定征实验装置的示意图如图1所示. 经过稀释的微泡溶液通过流式石英管中间位置时, Mie散射入射激光束照射到石英管中的微泡上, 被微泡散射的激光光束经过聚光镜后被光电倍增管探测并记录, 最终基于Mie散射理论对流式细胞仪的输出电压进行校准就可以得到微泡的瞬时半径. 经过改制的流式石英管通常内径为150  $\mu\text{m}$ , 其侧面贴合一个小型PZT超声换能器用于驱动微泡振动.

如果超声换能器处于关闭状态, 此装置基本类似普通的商用流式分析仪可用于测量微泡的尺寸分布特性. 把充分稀释的微泡溶液悬浮液注射到实验系统中, 当单个微泡进入激光束区域时, PMT输出的电压值会增大, 当这个微泡流出时, 电压值减弱. 图2(a)显示了单个微泡流经测试管时电压随时间变化的典型曲线. 电压的峰值与微泡的半径大小相关, 同时其脉冲宽度取决于微泡经过激光束所需的时间. 为了得到平衡半径 $R_0$ , 我们把测得的信号通过低通滤波器, 所得结果如图2(a)中虚线所示. 让2万个造影剂微泡通过光散射区后, 通过测量数据校准我们可以得到造影剂微泡的半径分布曲线(如图2(b)).

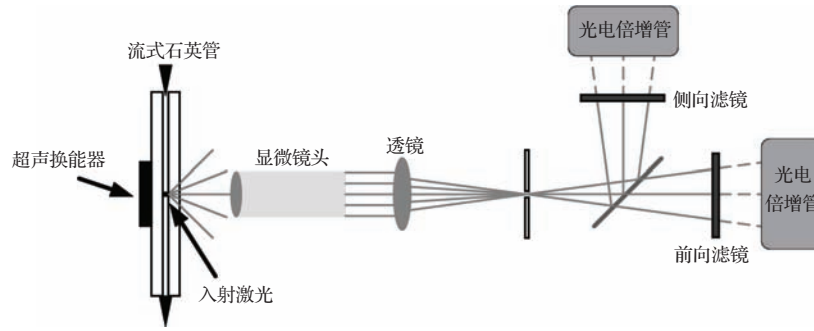


图1 结合 Mie 散射技术的流式分析系统示意图

Fig. 1. Diagram of the experimental setup.

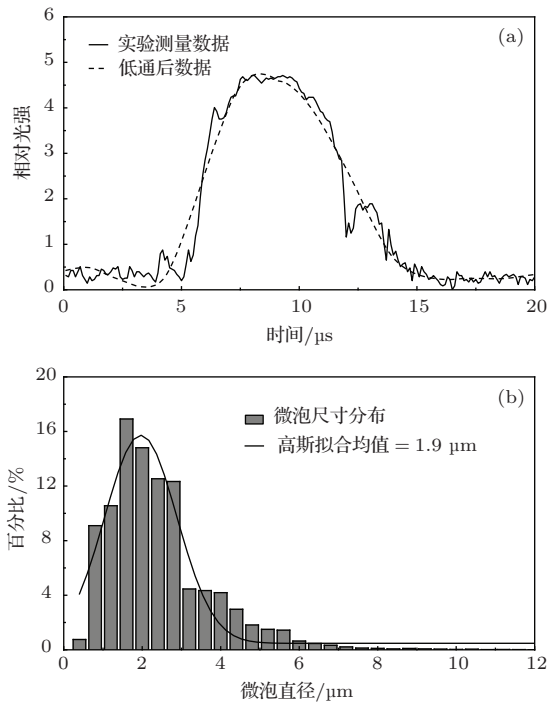


图2 造影剂微泡的尺寸分布测量 (a) 气泡通过流式细胞仪光散射区域是散射光强随时间变化曲线; (b) 20000 个 Definity 微泡的尺寸分布图

Fig. 2. Size distribution characterization of one sample UCA bubble. (a) The temporal evaluation of scattered light intensity as the bubble passing through the sampling tube. (b) Size distribution of 20000 Definity microbubbles.

而当超声换能器启动后, 微泡在通过激光照射区域的同时会受到声场作用, 此时将会有有一个动态高频振动信号叠加在低频散射信号上, 而高频散射信号的光强变化可以准确标准微泡半径随时间演变的瞬时特征 [21,45]. 图3中是采用上述系统对超声驱动下微泡振动行为进行定征的一个典型示例. 该图中的微泡半径随时间演化曲线实际上包含两重信息 [21,45,62,63]: 1) 单个微泡平衡半径所对应的低频输出部分 (图3中矩形框内虚线部分), 2) 在低

频信号上调制的对应于微泡振动行为的高频信号 (图3中矩形框内高频振动曲线部分). 将此信号进行低通滤波, 可以获得造影剂微泡大小分布和气泡浓度信息; 反之, 对信号进行高通滤波后可获得微泡振动的  $R-T$  曲线, 再选择某个恰当的包膜微泡动力学模型对此  $R-T$  曲线进行拟合则可以实现对微泡包膜黏弹参数的定征. 这种一体化解决方法的一个主要优点是可以根据需要在不同的声压水平上对数以千计的微泡进行测量和定征.

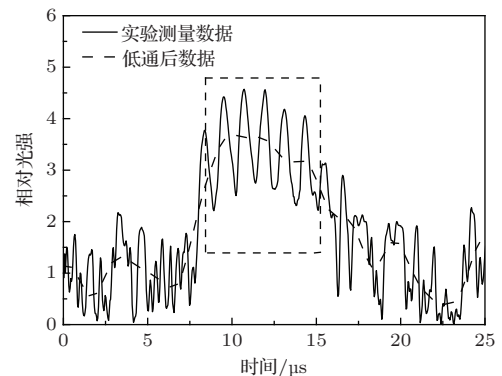


图3 1 MHz 超声波脉冲驱动下的单个微泡里的散射光强测量值

Fig. 3. Measured light intensity scattered from a Definity microbubble driven by a 1-MHz ultrasound pulse. The signal within the rectangle could be high-pass filtered and converted to a radius-time curve.

### 3 包膜微泡动力学模型的非线性修正

除了可以用于微泡物理特性的定征之外, 基于这一测量系统所获得的数据还可以为研究者们验证微泡动力学模型的正确性和有效性提供大量的实验依据. 我们选用 Marmottant 模型对所测得的 SonoVue 微泡的  $R-T$  曲线进行拟合时发现, SonoVue 微泡的脂类包膜的黏度随着微泡初始半径  $R_0$  的增加而增加, 这一结论与此前的



很多微泡动力学实验观测文献中报道的结果一致 [22,38,40,43,45]. 然而, 基于此模型拟合实验数据发现在整个测量过程中, 微泡包膜弹性模量基本保持不变, 而 Doinikov 等曾预测包膜弹性应当遵守应变软化的规则, 即随着  $R_0$  的增加而增加 [40]. 这种理论和实验结果的不一致是推动气泡模型进一步完善的动力, 研究者们一直希望可以建立一种更合适的非线性模型来解释造影剂包膜弹性和黏度的复杂流变特性. Paul 等建立的二阶指数弹性模型可以比 Marmottant 模型更好地解释包膜微泡的次谐波阈值 [64]. Tsiglifs 和 Pelekasis 则分别通过定义 Mooney-Rivlin 应变软化或 Skalak 应变硬化规律来解释包膜弹性随着微泡半径的改变 [11,65]. 但 Doinikov 等认为包膜弹性对气泡半径的依赖性可能是一个假象, 因为这与材料的基本物理特性相冲突 [40]. 因此, 微泡非线性动力学的建模工作仍然急需突破.

此前文献中多次提到的微泡包膜黏度和弹性对  $R_0$  的依赖性应该分别来自于所谓的剪切变薄和应变软化两种流变行为. Marmottant 模型中已经实现了对包膜弹性的非线性修正并有效抑制了包膜弹性对微泡半径的依赖性. 在此基础上, 我们课题组对 Marmottant 模型中的包膜黏度项进行了进一步的非线性修正, 使其可以更好地对剪切变薄现象进行描述 [66]. 通过拟合实验数据, 我们发现该非线性包膜动力学新模型 (NSEV 模型) 不仅可以很好地模拟大振幅驱动下微泡的非线性“仅压缩”行为, 还可以同时减低包膜弹性和黏度对  $R_0$  的依赖性, 使结果更符合自然材料的物理本质.

通常, 在微泡动力学模型中, 可以利用 Kelvin-Voigt 本构关系来描述包膜的黏弹特性 [15,19]. 当包膜厚度很小时, Kelvin-Voigt 本构关系可以简化为

$$S = S_{\text{elasticity}} + S_{\text{viscosity}} = 4\chi \frac{R_e}{R} \left( \frac{1}{R_e} - \frac{1}{R} \right) + 4\kappa_s \frac{\dot{R}}{R^2}, \quad (1)$$

其中  $R$  和  $\dot{R}$  分别表示瞬时气泡半径和它的时间导数,  $R_e$  是微泡的平衡半径,  $\chi$  和  $\kappa_s$  分别代表包膜弹性模量和黏度. 在早期的微泡动力学建模工作中,  $\chi$  和  $\kappa_s$  都被视为常数, 所以更适合描述气泡的小振幅振荡 (即线性振动). 在微泡线性模型基础上, 考虑到每个磷脂分子表面积都将随着磷脂包膜气泡的振荡而改变, Marmottant 等将气泡包膜当作一个二维黏弹性介质, 通过考虑特定条件下包膜的皱缩和破裂, 给出了包膜表面张力关于随半径变化的

分段表达式:

$$\sigma(R) = \begin{cases} 0, & R \leq R_{\text{buckling}} \approx R_0 \\ \chi \left( R^2/R_{\text{buckling}}^2 - 1 \right), & R_{\text{buckling}} < R \leq R_{\text{breakup}}, \\ \sigma_{\text{water}} = 0.072 N \cdot m^{-1}, & \\ R > R_{\text{breakup}}, & \end{cases} \quad (2)$$

其中  $R_{\text{buckling}}$  是气泡半径的最小值, 低于这个值气泡包膜将进行皱缩; 高于  $R_{\text{breakup}}$  气泡将破裂, 同时表面张力将等同于理想气-液界面模型. 此时, 方程 (1) 描述的包膜黏弹特性可以写为

$$S = S_{\text{elasticity}} + S_{\text{viscosity}} = \frac{2\sigma(R)}{R} + 4\kappa_s \frac{\dot{R}}{R^2}. \quad (3)$$

Marmottant 模型仅仅完成了包膜弹性的非线性修正, 而包膜黏度  $\kappa_s$  仍然被设定为常数. 考虑到脂类体的流变特性, 其黏度通常可以为是剪切速率 ( $\dot{R}/R$ ) 的函数, 而不是一个常数, 因此, 我们进一步对包膜材料的黏度参数进行了非线性修正:

$$4\kappa \left( \frac{\dot{R}}{R} \right) \frac{\dot{R}}{R^2} = \frac{4\kappa_0}{1 + \alpha|\dot{R}|/R} \frac{\dot{R}}{R^2}, \quad (4)$$

其中  $\kappa_0$  是外壳黏度参数,  $\alpha$  是一个特征时间常数. 最终包膜气泡非线性黏弹特性模型 NSEV 被写完如下形式:

$$\begin{aligned} & \rho_l \left( R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 \right) \\ & = \left[ P_0 + \frac{2\sigma(R_0)}{R_0} \right] \left( \frac{R_0}{R} \right)^{3\gamma} \left( 1 - \frac{3\gamma}{c}\dot{R} \right) \\ & \quad - \frac{2\sigma(R)}{R} - 4\eta_l \frac{\dot{R}}{R} - 4\kappa \left( \frac{\dot{R}}{R} \right) \frac{\dot{R}}{R^2} \\ & \quad - P_0 - P_{\text{ac}}(t). \end{aligned} \quad (5)$$

在方程 (5) 中,  $\rho_l$  和  $\eta_l$  是牛顿液体的密度和黏度,  $P_0$  是大气压,  $\gamma$  是气体多方指数,  $P_{\text{ac}}(t)$  则表示入射声压 [66].

我们利用 NSEV 模型对测量得到的脂类微泡的  $R$ - $T$  曲线进行拟合, 并将其结果与现有模型进行了比较. 如图 4(a) 所示, 与 Doinikov 模型相比, 我们所提出的 NSEV 模型可以更好地拟合微泡的只压缩行为. 图 4(b) 则给出了 NSEV 模型和 Marmottant 模型之间的比较结果, 从  $R$ - $T$  曲线和最小拟合均方根误差来看, NSEV 模型可以比 Marmottant 模型更好的拟合 Sonovue 微泡的非线性响应.

除了可以很好地拟合微泡的动力学响应曲线外, 建立NSEV模型的主要目的是解决以往大多数气泡动力学模型中的包膜参数对  $R_0$  的依赖性问题。

图5中显示, 基于NSEV模型拟合实验测量曲线获得的包膜黏弹参数几乎保持恒定, 有效地抑制了包膜参数对气泡初始半径的依赖性。

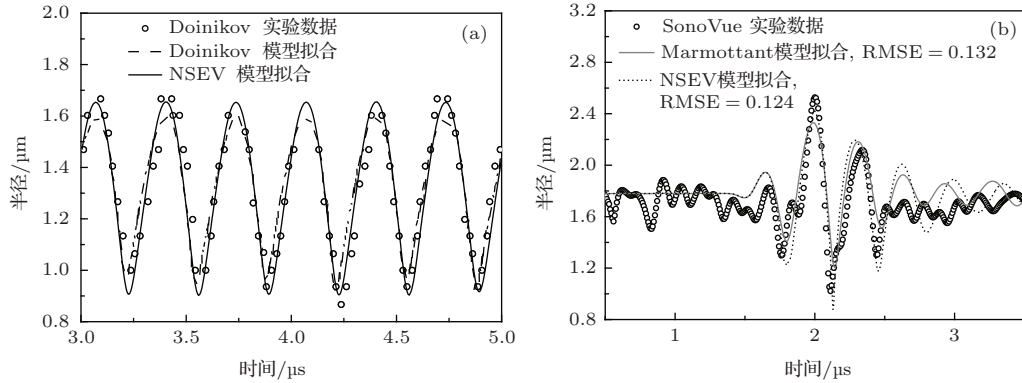


图4 基于实验测量的微泡  $R-T$  曲线, 分别对比NSEV模型与 (a) Doinikov模型和 (b) Marmottant模型的拟合效果  
Fig. 4. Validation of the proposed NSEV model by (a) fitting the bubble dynamic responses acquired with high-speed optical imaging system; (b) fitting the radius-time curve of a SonoVue microbubble measured with light scattering technology.

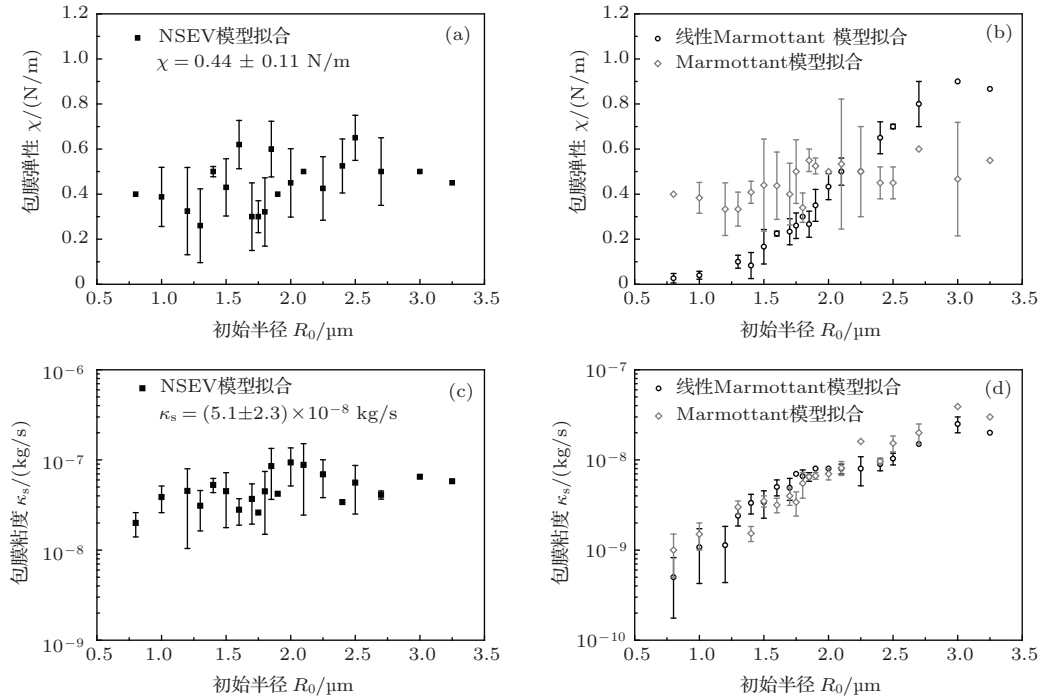


图5 基于微泡动力学模型拟合实验数据估算SonoVue微泡的包膜参数: (a) NSEV模型和 (b) 线性化和全Marmottant模型估算得到的弹性模量; (c) NSEV模型和 (d) 线性化和全Marmottant模型估算得到的黏度参数  
Fig. 5. Shell parameters of SonoVue bubbles: elastic modulus estimated using (a) the NSEV model; and (b) the linearized and full Marmottant models; viscosity parameter estimated through (c) the NSEV model; and (d) the linearized and full Marmottant models.

#### 4 造影剂微泡瞬态空化声压阈值

当入射波的声压大于某个阈值时, 造影剂微泡在超声驱动下将出现瞬态空化行为. 通常情况下,

被动的空化检测(PCD)系统由于灵敏度较高常被用来检测瞬态空化微泡发出的宽带噪声信号<sup>[67,68]</sup>. 所谓的瞬态空化剂量(ICD)通常被量化为一段超声辐照时间内累积的瞬态空化能量. 而当ICD突然跃变增强时刻对应的声压值即被定义为瞬态空

化阈值. 简言之, PCD检测到时域波形信号首先通过傅里叶变化(FFT)被转化为FFT频谱; 在两个相邻谐波之间的特定频率窗口内, 对每个被测波形都可以确定一个宽带噪声频谱的均方根(RMS)幅值; 而ICD则可以通过将所求得的均方根幅值在有效辐照时间内积分得到<sup>[42,68,69]</sup>. 在对每个驱动声压条件下测得的ICD进行统计分析, 得到相应的瞬态空化阈值.

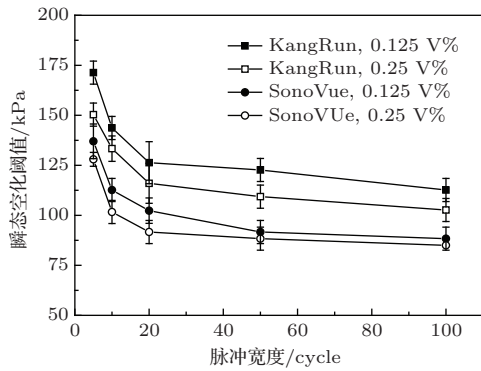


图6 不同体积浓度下 SonoVue 和 KangRun 微泡的瞬态空化阈值与超声脉冲宽度之间的关系  
Fig. 6. The IC thresholds as functions of pulse lengths measured for lipid-coated SonoVue and albumin-coated KangRun microbubbles at different volume concentrations.

我们已经通过上述方法研究过两种临床上使用的商业化造影剂微泡的瞬态空化阈值及其对超声驱动参数和微泡包膜参数的相关性<sup>[42]</sup>. 这两种微泡分别是脂质体包膜的 SonoVue 微泡和白蛋白包膜的 KangRun 微泡(湖南康润药业有限公司, 中国). 如图6所示, SonoVue 和 KangRun 微泡的瞬态空化阈值都随着微泡体积浓度和超声脉冲宽度的增加而降低<sup>[68-71]</sup>. 值得注意的是, 当超声脉冲宽度大于 20 cycle 时, 微泡的瞬态空化阈值将趋向饱和. 而对于不同的包膜材料而言, 白蛋白包膜的 KangRun 气泡较之脂质体包膜的 SonoVue 气泡具有较大的弹性和黏度, 因此前者的瞬态空化阈值比后者稍高, 意味着较大弹性和黏性参数引起的阻尼效应对微泡的瞬态空化行为将起到阻碍作用.

### 5 利用超声作用下微泡的声穿孔效应促进基因/药物转染

研究表明, 超声介导的微泡声穿孔行为无论在离体还是活体实验中都可以将基因/药物转染效率提高几个数量级, 而超声驱动下的微泡瞬态空化行为被认为是引发细胞膜声穿孔的重要物理机理

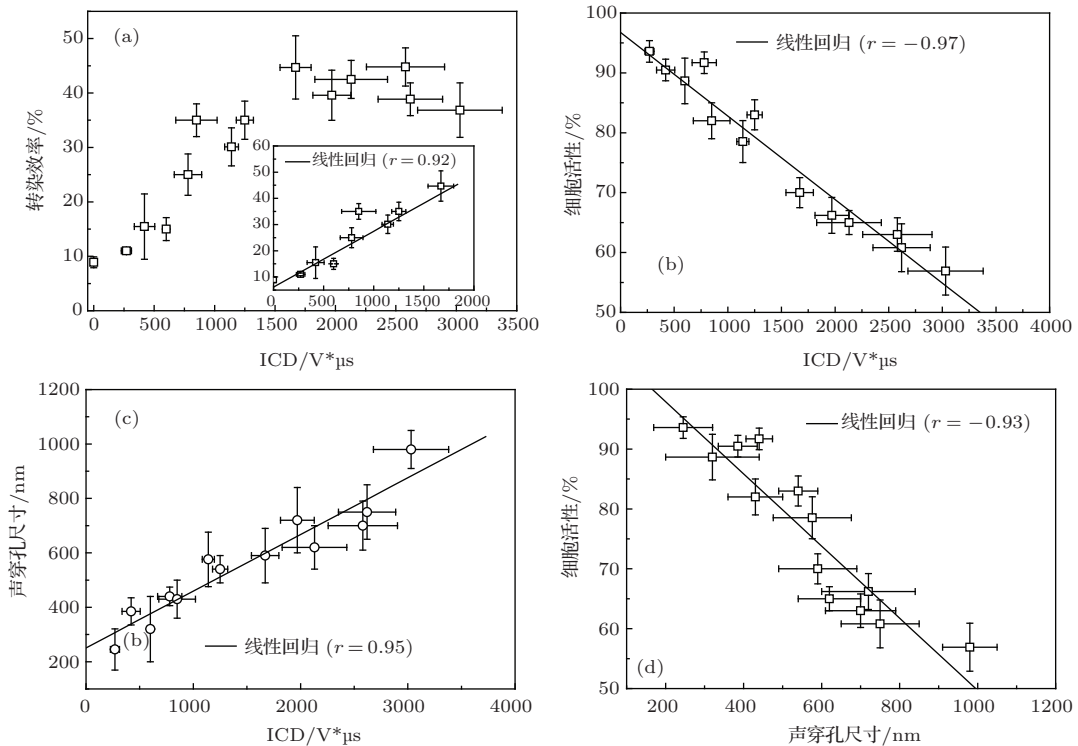


图7 (a) ICD 与 DNA 转染效率之间的关系; (b) ICD 与细胞活性之间的关系; (c) ICD 与细胞膜声穿孔尺寸之间的关系; (d) 细胞膜声穿孔尺寸与细胞活性之间的关系  
Fig. 7. The relationship between (a) the DNA transfection efficiency and ICD; (b) the cell viability and ICD; (c) ICD and sonopore size; and (d) the size of sonopores and cell viability.

之一<sup>[7,72-77]</sup>. 我们在之前的实验研究中<sup>[76]</sup>利用1 MHz的脉冲超声辐照MCF-7细胞(人乳腺癌细胞)与PEI: DNA以及造影剂微泡的混合溶液. 此后, 通过PCD系统量化其瞬态空化剂量, 利用流式细胞仪分析DNA转染效率和超声辐照后的细胞活性, 并利用扫描电子显微镜(SEM)的观察细胞膜声穿孔大小. 图7中的结果表明, 随着ICD的增强, DNA转染效率首先线性增加约50%, 并逐渐趋于饱和(图7(a)); 同时细胞膜声穿孔尺寸不断增大(图7(c)); 与此同时, 细胞活性将呈线性衰减趋势(图7(b)), 这意味着细胞活性与细胞膜声穿孔大小之间具有负相关性(图7(d)).

尽管众多的研究结果(如图7)为微泡瞬态空化行为促进超声介导DNA转染提供了重要的实验依据, 仍然有人认为, 小振幅振动微泡周围的声微流场产生的剪切应力也是声穿孔效应形成的原因之一<sup>[78,79]</sup>. 正如Tran等指出的, 微泡周围的声微流可以产生适度的剪切应力, 并由此刺激细胞的电生理活动, 并最终促进基因/药物转染效率的提升<sup>[79]</sup>. 然而, 由于低声压下声微流与高声压下微泡瞬态空化产生的DNA转染效率相比较低, 大多数研究者们仍然认为微泡瞬态空化产生的声穿孔效应应该在促进基因/药物转染中起主导作用.

## 6 结 论

鉴于越来越多的研究者对造影剂微泡的非线性行为产生了浓厚的兴趣, 因此我们在此针对这一主题将我们近期的一些相关研究工作进行了总结和讨论. 我们发现, 通过将流式细胞分析系统与Mie散射技术相结合可以构成一体化系统对造影剂微泡的物理特性尤其是其包膜参数进行快速方便的定征. 此外, 我们针对微泡包膜的黏弹特性对造影剂微泡的动力学模型进行了非线性修正, 使其不仅可以很好地对实验测量的微泡动力学响应曲线进行拟合, 还可以有效降低包膜黏弹特性对气泡平衡半径的依赖性, 更符合自然材料的固有物理特性. 我们还对不同包膜材料的造影剂微泡的瞬态空化阈值的参数相关性进行了研究. 结果表明, 微泡体积浓度和声脉冲宽度的增加或包膜黏弹参数的降低将有导致微泡瞬态空化阈值的下降. 最后, 我们基于被动空化测量系统对微泡的瞬态空化剂量进行了量化研究, 实验结果证实, 超声驱动下微泡瞬态空化引起的细胞膜声穿孔效应是促进基因/药物转染的重要机理, 同时可以通过调节声空

化剂量来优化超声联合微泡介导基因/药物转染的效应和细胞活性.

## 参考文献

- [1] Pace N G, Cowley A, Campbell A M 1997 *J. Acoust. Soc. Am.* **102** 1474
- [2] Goldberg B B, Raichlen J S, Forsberg F 2001 *Ultrasound contrast agents: basic principles and clinical applications* (2nd Ed.) (London: Martin Dunitz)
- [3] Hernot S, Klivanov A L 2008 *Adv. Drug Deliver. Rev.* **60** 1153
- [4] Lindner J R 2009 *Nat. Rev. Cardiol.* **6** 475
- [5] Stride E P, Coussios C C 2010 *P. I. Mech. Eng. H* **224** 171
- [6] Mitragotri S 2005 *Nat. Rev. Drug Discov.* **4** 255
- [7] Ferrara K, Pollard R, Borden M 2007 *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **9** 415
- [8] Kennedy J E 2005 *Nat. Rev. Cancer* **5** 321
- [9] Everbach E C, Francis C W 2000 *Ultrasound Med. Biol.* **26** 1153
- [10] Escoffre J M, Mannaris C, Geers B, Novell A, Lentacker I, Averkiou M, Bouakaz A 2013 *IEEE T. Ultrason. Ferr.* **60** 78
- [11] Faez T, Emmer M, Kooiman K, Versluis M, Van der Steen A, De Jong N 2013 *IEEE T. Ultrason. Ferr.* **60** 7
- [12] Dejong N, Hoff L 1993 *Ultrasonics* **31** 175
- [13] Dejong N, Cornet R, Lancee C T 1994 *Ultrasonics* **32** 455
- [14] Dejong N, Cornet R, Lancee C T 1994 *Ultrasonics* **32** 447
- [15] Church C C 1995 *J. Acoust. Soc. Am.* **97** 1510
- [16] Rayleigh 1917 *Philos. Mag.* **34** 94
- [17] Plesset M S 1949 *J. Appl. Mech.-T. Asme* **16** 277
- [18] Roy R A, Madanshetty S I, Apfel R E 1990 *J. Acoust. Soc. Am.* **87** 2451
- [19] Hoff L, Sontum P C, Hovem J M 2000 *J. Acoust. Soc. Am.* **107** 2272
- [20] Chomas J E, Dayton P, Allen J, Morgan K, Ferrara K W 2001 *IEEE Trans. Ultrason. Ferr.* **48** 232
- [21] Tu J, Swallow J E, Giraud D, Cui W C, Chen W Z, Matula T J 2011 *IEEE Trans. Ultrason. Ferr.* **58** 955
- [22] Morgan K E, Allen J S, Dayton P A, Chomas J E, Klivanov A L, Ferrara K W 2000 *IEEE Trans. Ultrason. Ferr.* **47** 1494
- [23] Chatterjee D, Sarkar K 2003 *Ultrasound Med. Biol.* **29** 1749
- [24] Sarkar K, Shi W T, Chatterjee D, Forsberg F 2005 *J. Acoust. Soc. Am.* **118** 539
- [25] Doynikov A A, Dayton P A 2007 *J. Acoust. Soc. Am.* **121** 3331
- [26] Sijl J, Dollet B, Ouwervelde M, Garbin V, Rozendal T, De Jong N, Lohse D, Versluis M 2010 *J. Acoust. Soc. Am.* **128** 3239
- [27] Emmer M, Van Wamel A, Goertz D E, De Jong N 2007 *Ultrasound Med. Biol.* **33** 941
- [28] Viti J, Mori R, Guidi F, Versluis M, De Jong N, Tortoile P 2012 *IEEE Trans. Ultrason. Ferr.* **59** 2818



- [29] Van der Meer S M, Marmottant P G, Hilgenfeldt S, Versluis M, Lohse D, Chin C T, Bouakaz A, Mastik F, Emmer M 2005 *2005 IEEE Ultrasonics Symposium* **1-4** 974
- [30] De Jong N, Emmer M, Chin C T, Bouakaz A, Mastik F, Lohse D, Versluis M 2007 *Ultrasound Med. Biol.* **33** 653
- [31] Sijl J, Overvelde M, Dollet B, Garbin V, De Jong N, Lohse D, Versluis M 2011 *J. Acoust. Soc. Am.* **129** 1729
- [32] Emmer M, Van Wamel A, Goertz D E, Versluis M, De Jong N 2006 *2006 IEEE Ultrasonics Symposium* **1-5** 1545
- [33] Overvelde M, Garbin V, Sijl J, Dollet B, De Jong N, Lohse D, Versluis M 2010 *Ultrasound Med. Biol.* **36** 2080
- [34] Hay T A, Ilinskii Y A, Zabolotskaya E A, Hamilton M F 2013 *J. Acoust. Soc. Am.* **134** 1454
- [35] Shams M M, Dong M Z, Mahinpey N 2014 *Aiche J.* **60** 2660
- [36] Shen Y Y, Longo M L, Powell R L 2008 *J. Colloid Interf. Sci.* **327** 204
- [37] Faez T, Emmer M, Docter M, Sijl J, Versluis M, De Jong N 2011 *Ultrasound Med. Biol.* **37** 958
- [38] Van der Meer S M, Dollet B, Voormolen M M, Chin C T, Bouakaz A, De Jong N, Versluis M, Lohse D 2007 *J. Acoust. Soc. Am.* **121** 648
- [39] Marmottant P, Van der Meer S, Emmer M, Versluis M, De Jong N, Hilgenfeldt S, Lohse D 2005 *J. Acoust. Soc. Am.* **118** 3499
- [40] Doinikov A A, Haac J F, Dayton P A 2009 *Ultrasonics* **49** 269
- [41] De Jong N, Emmer M, Van Wamel A, Versluis M 2009 *Med. Biol. Eng. Comput.* **47** 861
- [42] Guo X S, Li Q, Zhang Z, Zhang D, Tu J 2013 *J. Acoust. Soc. Am.* **134** 1622
- [43] Dayton P A, Morgan K E, Klibanov A L, Brandenburger G H, Ferrara K W 1999 *IEEE Trans. Ultrason. Ferr.* **46** 220
- [44] Matula T J, Swalwell J, Tu J, Cui W C, Chen W Z 2011 *IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)* Orlando, FL, USA, October 18–21, 2011 p156
- [45] Tu J, Guan J F, Qiu Y Y, Matula T J 2009 *J. Acoust. Soc. Am.* **126** 2954
- [46] Wu J, Nyborg W L 2008 *Adv. Drug Deliver. Rev.* **60** 1103
- [47] Kobayashi N, Yasu T, Yamada S, Kudo N, Kuroki M, Kawakami M, Miyatake K, Saito M 2002 *Ultrasound Med. Biol.* **28** 949
- [48] Maruvada S, Hynynen K 2004 *Ultrasound Med. Biol.* **30** 67
- [49] Feril L B, Kondo T, Zhao Q L, Ogawa R, Tachibana K, Kudo N, Fujimoto S, Nakamura S 2003 *Ultrasound Med. Biol.* **29** 331
- [50] Yu H, Xu L 2014 *J. Control. Release* **174** 151
- [51] Miller D L, Thomas R M 1995 *Ultrasound Med. Biol.* **21** 1059
- [52] Flynn H G, Church C C 1988 *J. Acoust. Soc.* **84** 985
- [53] Newman C, Bettinger T 2007 *Gene Ther.* **14** 465
- [54] Chen S Y, Shohet R V, Bekeredjian R, Frenkel P, Grayburn P A 2003 *J. Am. Coll. Cardiol.* **42** 301
- [55] Sheyn D, Kimelman-Bleich N, Pelled G, Zilberman Y, Gazit D, Gazit Z 2008 *Gene Ther.* **15** 257
- [56] Duvshani-Eshet M, Benny O, Morgenstern A, Machluf M 2007 *Mol. Cancer Ther.* **6** 2371
- [57] Duvshani-Eshet M, Machluf M 2007 *Cancer Gene Ther.* **14** 306
- [58] Collins C G, Tangney M, Larkin J O, Casey G, Whelan M C, Cashman J, Murphy J, Soden D, Vejda S, McKenna S, Kiely B, Collins J K, Barrett J, Aarons S, O'Sullivan G C 2006 *Cancer Gene Ther.* **13** 1061
- [59] Craig R, Cutrera J, Zhu S, Xia X, Lee Y H, Li S 2008 *Mol. Ther.* **16** 901
- [60] Marston P L 1991 *Appl. Optics* **30** 3479
- [61] Bohren C F, Huffman D R 1998 *Absorption and scattering of light by small particles* (Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH)
- [62] Paul S, Katiyar A, Sarkar K, Chatterjee D, Shi W T, Forsberg F 2010 *J. Acoust. Soc. Am.* **127** 3846
- [63] Tsigliris K, Pelekasis N A 2008 *J. Acoust. Soc. Am.* **123** 4059
- [64] Li Q, Matula T J, Tu J, Guo X S, Zhang D 2013 *Phys. Med. Biol.* **58** 985
- [65] Chang P P, Chen W S, Mourad P D, Poliachik S L, Crum L A 2001 *IEEE Trans. Ultrason. Ferr.* **48** 161
- [66] Chen W S, Matula T J, Brayman A A, Crum L A 2003 *J. Acoust. Soc. Am.* **113** 643
- [67] Tu J, Matula T J, Brayman A A, Crum L A 2006 *Ultrasound Med. Biol.* **32** 281
- [68] Apfel R E, Holland C K 1991 *Ultrasound Med. Biol.* **17** 179
- [69] Deng C X, Xu Q H, Apfel R E, Holland C K 1996 *Ultrasound Med. Biol.* **22** 939
- [70] Deshpande M C, Prausnitz M R 2007 *J. Control. Release* **118** 126
- [71] Mitrugotri S 2005 *Nat. Rev. Drug Discov.* **4** 255
- [72] Tsigvoulis G, Alexandrov A V 2007 *Neurotherapeutics* **4** 420
- [73] Miller D L, Pislaru S V, Greenleaf J E 2002 *Somat Cell Mol Genet* **27** 115
- [74] Qiu Y, Luo Y, Zhang Y, Cui W, Zhang D, Wu J, Zhang J, Tu J 2010 *J. Control. Release* **145** 40
- [75] Zhang C B, Cao H L, Li Q, Tu J, Guo X S, Liu Z, Zhang D 2013 *Ultrasound Med. Biol.* **39** 161
- [76] Park J, Fan Z Z, Deng C X 2011 *J. Biomech.* **44** 164
- [77] Ohl C D, Wolfrum B 2003 *Bba-Gen. Subjects* **1624** 131
- [78] Qiu Y Y, Zhang C B, Tu J, Zhang D 2012 *J. Biomech* **45** 1339
- [79] Tran T A, Roger S, Le Guennec J Y, Tranquart F, Bouakaz A 2007 *Ultrasound Med. Biol.* **33** 158

SPECIAL ISSUE — Celebrating 100 anniversary of physical science in Nanjing University

# Mechanism and applications of the nonlinear dynamic response to ultrasound contrast agent microbubbles\*

Yu Jie<sup>1)2)</sup> Guo Xia-Sheng<sup>1)</sup> Tu Juan<sup>1)†</sup> Zhang Dong<sup>1)</sup>

1) (*Institute of Acoustics, Key Laboratory of Modern Acoustics (MOE), School of Physics, Nanjing University, Nanjing 210093, China*)

2) (*Jiangsu Province Hospital of TCM, Nanjing 210029, China*)

( Received 5 January 2015; revised manuscript received 10 February 2015 )

## Abstract

Ultrasound contrast agent (UCA) refers to the agent that has specific acoustic properties to enhance the contrast in ultrasound imaging by composition of gas-filled microbubbles with micrometer-diameters. In a diagnostic ultrasound field, microbubbles in fluid create an acoustic impedance mismatch between fluid and surrounding tissue to increase the reflection of sound and achieve a better contrast. Ongoing developments improve diagnostic possibilities of UCA remarkably, whereas their potential therapeutic applications have also been investigated for a couple of decades. The nonlinear response of UCA microbubbles has clinical relevance from both diagnostic and therapeutic perspectives. The aim of this review is to introduce the latest research progress of our group regarding the mechanism and applications of the nonlinear dynamic response to UCA, which include (1) an all-in-one solution characterizing coated bubble parameters with the help of the light scattering technique and flow cytometry, which makes it possible to quickly integrate the size distribution with dynamic motions of thousands of microbubbles and easily verify the validities of different shelled bubble dynamic models; (2) the development of a new bubble dynamics model that takes into account both nonlinear shell elasticity and viscosity, which can not only be capable of simulating the “compression-only” behavior of microbubbles excited by large amplitude ultrasound but also eliminate the dependence of bubble shell parameters on bubble size; (3) the estimation of UCA inertial cavitation thresholds of two types of commercial UCA microbubbles (viz. , SonoVue microbubbles coated with lipid shells and KangRun microbubbles coated with albumin shells) and the evaluation of the relationship between microbubble inertial cavitation thresholds and their shell parameters; and (4) the researches of DNA transfection efficiency and the reduction of cytotoxicity in gene delivery facilitated by UCA excited by 1-MHz focused ultrasound pulses, and the results indicate that the measured DNA transfection efficiency and sonoporation pore size generally increase with the enhancement of inertial cavitation dose, while the cell viability decreases linearly with the increase of International Classification of Diseases (ICD). These studies are of significance for better understanding the mechanism of ultrasound-induced microbubble nonlinear dynamics and investigating the effective quantification technique for microbubble cavitation activity, which are important for further optimizing therapeutic ultrasound effects and avoiding the side-effects.

**Keywords:** ultrasound contrast agent microbubbles, nonlinear responses, inertial cavitation, gene/drug delivery

**PACS:** 43.35.Ei, 43.80.Vj

**DOI:** 10.7498/aps.64.094306

\* Project supported by the State Key Development Program for Basic Research of China (Grant No. 2011CB707900), the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 61072027, 81127901, 81227004, 11374155, 11174141, 11274170, 11474001, 11474161), and the National High Technology Research and Development Program of China (Grant No. 2012AA022702).

† Corresponding author. E-mail: [juantu@nju.edu.cn](mailto:juantu@nju.edu.cn)