·实验研究·

靶向声敏纳泡的制备及其声动力效应观察

陈粤瑛 王 浩 胡玉刚 黄 鑫 陈金玲 邓 倾 曹 省 潘桔红 周 青

摘 要 **目的** 制备以动脉粥样硬化斑块A类清道夫受体(SR-A)为靶点的载二氢卟吩e6(Ce6)超声纳泡(NB),探讨其提高声敏剂的靶向性及声动力效应的能力。**方法** 以薄膜水化法制备载Ce6和SR-A靶向多肽PP1的纳泡(Ce6-PP1 NB),检测其理化性质和细胞毒性。将小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7细胞)分别与Ce6、Ce6-PP1 NB共同孵育,采用激光共聚焦扫描显微镜观察细胞内Ce6荧光强度以评估Ce6-PP1 NB的靶向性。将细胞按照不同处理方法分为:空白对照组(加入磷酸盐缓冲液)、低强度脉冲超声(LIPUS)组(加入磷酸盐缓冲液后予以超声辐照)、Ce6+LIPUS组(加入30 μg/ml Ce6后予以超声辐照)和Ce6-PP1 NB+LIPUS组(加入30 μg/ml Ce6-PP1 NB后予以超声辐照),超声辐照参数为:0.4 W/cm^2、2 MHz,辐照时间1 min。采用活性氧荧光探针法检测细胞内活性氧生成情况,流式细胞术检测M1型、M2型巨噬细胞的比例,酶联免疫吸附测定法检测细胞分泌肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)及白细胞介素-10(IL-10)浓度,评估Ce6-PP1 NB的声敏性和声动力效应。**结果** 制备的Ce6-PP1 NB呈圆形,形态规则,分散均匀,平均粒径为(504.25±149.13)nm,平均Zeta电位为-(8.67±0.78)mV,Ce6包封率为(85.63±4.39)%,PP1连接率为(92.78±4.57)%。0、5、10、20、30 μg/ml的Ce6-PP1 NB与RAW264.7细胞共孵育12 h后,细胞存活率均>90%;当Ce6-PP1 NB浓度达40 μg/ml时,细胞存活率明显下降(P<0.01)。体外寻靶实验结果显示,与Ce6-PP1 NB共同孵育细胞内Ce6红色荧光强度明显高于与Ce6共同孵育细胞。Ce6-PP1 NB+LIPUS组细胞内出现明显绿色荧光,M1型巨噬细胞的比例减少,M2型巨噬细胞的比例增加,TNF-α、IL-6浓度均减小,IL-10浓度增大,与其余各组比较差异均有统计学意义(均P<0.05)。**结论** Ce6-PP1 NB可提高声敏剂在动脉粥样硬化斑块的聚集和声动力效应。

关键词 声动力治疗;动脉粥样硬化;巨噬细胞极化;纳泡;靶向

[中图法分类号]R445.1 [文献标识码]A

Preparation and observation of sonodynamic effect of target sonosensitive nanobubbles

CHEN Yueying, WANG Hao, HU Yugang, HUANG Xin, CHEN Jinling, DENG Qing, CAO Sheng, PAN Juhong, ZHOU Qing

Department of Ultrasound Imaging, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

ABSTRACT **Objective** To prepare the chlorine e6 (Ce6)-loaded ultrasound nanobubbles (NB) targeting the atherosclerotic plaque scavenger receptor-A (SR-A), and to investigate their ability to improve the targetability and acoustodynamic effect of sonosensitizers. **Methods** Nanobubbles (Ce6-PP1 NB) loaded with Ce6 and SR-A-targeted peptides PP1 were prepared by thin film hydration method, and their physicochemical properties and cytotoxicity were assessed. Mouse monocyte macrophages (RAW264.7 cells) were co-incubated with Ce6 and Ce6-PP1 NB, respectively, the intracellular fluorescence intensity of Ce6 was observed by confocal laser scanning microscope to evaluate the targeting of Ce6-PP1 NB. RAW264.7 cells were divided into four groups: blank control group (addition of phosphate buffer), low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) group (addition of phosphate buffer followed by ultrasound irradiation), Ce6+LIPUS group (addition of 30 μg/ml Ce6 followed by ultrasound irradiation) and Ce6-PP1 NB+LIPUS group (addition of 30 μg/ml Ce6-PP1 NB followed by ultrasound irradiation) with the following ultrasound irradiation parameters of 0.4 W/cm^2, 2 MHz, and 1 min of irradiation time. The intracellular reactive oxygen species production was detected by reactive oxygen fluorescence probe, the ratio of M1 and M2 phenotype macrophages were determined by flow cytometry, and the concentrations of secreted tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay to assess

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81971624);国家自然科学基金青年基金项目(81901759、81901757)

作者单位:430060 武汉市,武汉大学人民医院超声影像科

通讯作者:周青,Email:qingzhou.wh.edu@hotmail.com

the sonosensitivity and sonodynamic effect of Ce6-PP1 NB. **Results** The prepared Ce6-PP1 NB presented a regular spherical shape and homogenized dispersion with an average particle size of (504.25±149.13) nm, a Zeta potential of -(8.67±0.78) mV, Ce6 encapsulation efficiency of (85.63±4.39)% and PP1 loaded capacity of (92.78±4.57)%. RAW264.7 cells were incubated with Ce6-PP1 NB at concentrations of 0, 5, 10, 20 and 30 μg/ml for 12 h, and the cell survival rate of RAW264.7 cells was >90%. When the concentration was 40 μg/ml, the cell survival rate decreased significantly (P<0.01). The results of in vitro targeting experiments showed that the intensity of red fluorescence of Ce6 in cells co-incubated with Ce6-PP1 NB was significantly higher than that in cells co-incubated with Ce6. Ce6-PP1 NB+LIPUS group manifested distinct intracellular green fluorescence in cells, the ratio of M1 phenotype macrophages decreased, the ratio of M2 phenotype macrophages increased, the concentrations of TNF-α and IL-6 decreased, and the concentration of IL-10 increased, and the differences were statistically significant compared with the rest of the groups (all P<0.05). **Conclusion** Ce6-PP1 NB can enhances the aggregation and sonodynamic effect of sonosensitizers in atherosclerotic plaques.

KEY WORDS Sonodynamic therapy; Atherosclerosis; Macrophage polarization; Nanobubbles; Target

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是冠状动脉粥样硬化性心脏病、脑梗死、外周血管病等心血管疾病发生的主要原因,目前临床主要通过药物调脂和针对心脑血管的靶器官损害展开综合治疗,但尚无有效干预重度病变的手段,也无法阻断和逆转AS进展。研究[1]表明,声动力治疗(sonodynamic therapy, SDT)能治疗AS斑块并抑制AS进展,可能弥补常规治疗方法的不足。SDT是利用超声仪器将声能聚焦于斑块部位,并激活聚集在斑块内的声敏剂,从而阻止病变增殖的靶向治疗方式,具有对正常组织影响小、体内穿透性强、能量无明显衰减等优点。其中,二氢卟吩e6(chlorine e6, Ce6)作为目前有代表性和发展前景的第2代声敏剂,具有无毒安全、代谢快等优点,但游离Ce6不能高浓度、选择性地聚集在AS病变部位,且受到超声激发后可能对邻近组织产生声毒副作用,故需要通过纳米技术改造游离Ce6,提高其组织选择性[2-3]。研究[4-5]发现,AS斑块内的巨噬细胞特异性表达A类清道夫受体(scavenger receptor-A, SR-A)可成为靶向斑块的位点,其靶向多肽PP1(氨基酸序列:LSLERFLRCWSDAPAK)可与SR-A共价结合,从而特异性识别斑块尤其是不稳定斑块。本实验将Ce6和PP1装载于脂质纳泡(nanobubbles, NB)上,制备载Ce6和SR-A靶向多肽PP1的纳泡(Ce6-PP1 NB),评价其靶向性和安全性,并通过体外实验初步探讨其增强SDT疗效的能力。

材料与方法

一、主要实验材料及仪器

1. 主要实验材料:Ce6(上海源叶生物科技有限公司);二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-PEG2000)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-生物素(DSPE-PEG2000-Biotin)均购于深圳市魅罗科技有限公司;全氟丙烷(辽宁奥斯福科技有限公司);三氯甲烷(武汉欣申试化工科技有限公司);链霉亲和素[翌圣生物科技(上海)股份有限公司];PP1、生物素化FITC标记的PP1(FITC-PP1-biotin)均购于吉尔生化(上海)有限公司;脂多糖(北京索莱宝科技有限公司);4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色液(上海碧云天生物技术有限公司);干扰素-γ(美国Bioworld technology公司)。小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7细胞)细胞株(批号:CL-0190)、细胞培养液均购于武汉普诺赛生命科技有限公司;CD206抗体、CD86抗体均购于美国Biolegend公司;肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-10(IL-10)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、活性氧检测试剂盒、CCK-8细胞计数试剂盒均购于合肥兰杰柯科技有限公司。

2. 主要实验仪器:旋转蒸发仪(RE-52AA,上海亚荣生化仪器厂);纳米粒度电位仪(Zetasizer Nano ZSP,英国Malvern公司);透射电子显微镜(JEM-2100,日本电子株式会社);酶联免疫检测仪(EnSight,美国Perkin Elmer公司);紫外可见分光光度计(DU730)、流式细胞仪(CFXconnect)均购于美国Beckman Coulter公司;激光共聚焦扫描显微镜(FV1200,日本Olympus公司);低强度脉冲超声波治疗仪(RS232,重庆医科大学超声影像研究所)。

二、实验方法

1. Ce6-PP1 NB的制备:采用薄膜水化法制备Ce6-PP1 NB。将DPPC、DSPE-PEG2000、DSPE-PEG2000-Biotin、Ce6按质量比5∶1∶1∶0.25溶解于三氯甲烷中,避光、40℃旋转蒸发60 min,待圆底烧瓶内形成墨绿色薄膜时,加入甘油与磷酸盐缓冲液(PBS)混合液(体积比1∶9),恒温振荡直至附壁薄膜充分溶解,将瓶内液体

分装至3 ml棕色西林瓶，全氟丙烷置换空气，高频振动60 s，静置后分层，下层墨绿色液体即为生物素化载Ce6纳泡（Ce6 NB）。取50 μl生物素化Ce6 NB加入3 μl链霉亲和素，37℃孵育1 h，然后加入6 μl FITC-PP1-biotin，37℃孵育2 h，即得到Ce6-PP1 NB。

2.Ce6-PP1 NB的理化性质、稳定性及细胞毒性检测：①检测理化性质及稳定性。应用普通光学显微镜观察其形状、大小；荧光显微镜观察Ce6、PP1在纳泡上的结合情况；透射电子显微镜观察其形态、结构；纳米粒度电位仪检测其粒径、多分散指数及Zeta电位；紫外可见分光光度计检测Ce6吸收光谱并绘制标准曲线，计算Ce6包封率；流式细胞仪检测PP1连接率。将Ce6-PP1 NB置于4℃冰箱内避光保存，于不同时刻（0、1、3、7 d）检测其粒径、Zeta电位、Ce6包封率及PP1连接率。②检测细胞毒性。将RAW264.7细胞接种于96孔板，孵育24 h，分为6组，每组3个复孔，分别加入不同浓度（0、5、10、20、30、40 μg/ml）Ce6-PP1 NB，孵育12 h，然后每孔加入10 μl CCK-8溶液，继续孵育1 h，应用酶联免疫检测仪检测并计算细胞存活率。

3.体外寻靶实验：将RAW264.7细胞接种于1 ml共聚焦培养皿中孵育24 h，分别加入浓度为30 μg/ml的Ce6和Ce6-PP1 NB共同孵育6 h，PBS洗涤3次，4%多聚甲醛固定细胞，加入100 μl DAPI染色液对细胞核进行染色，于激光共聚焦扫描显微镜下观察细胞内Ce6荧光强度（λ激发波长：630 nm，λ发射波长：680 nm）。

4.Ce6-PP1 NB的声敏性和声动力效应评估：将RAW264.7细胞接种至6孔板，每孔分别加入浓度为20 ng/ml干扰素γ和100 ng/ml脂多糖各500 μl，建立体外炎症模型。按照不同处理方法将细胞分为空白对照组、低强度脉冲超声（LIPUS）组、Ce6+LIPUS组和Ce6-PP1 NB+LIPUS组。其中，Ce6+LIPUS组加入浓度为30 μg/ml Ce6，Ce6-PP1 NB+LIPUS组加入浓度为30 μg/ml Ce6-PP1 NB，均孵育6 h；空白对照组、LIPUS组加入等量PBS，然后将LIPUS组、Ce6+LIPUS组和Ce6-PP1 NB+LIPUS组以0.4 W/cm^2、2 MHz超声辐照1 min，继续孵育6 h后进行检测。

（1）活性氧荧光探针（DCFH-DA）法检测细胞内活性氧生成情况：PBS洗涤细胞3次，加入DCFH-DA 37℃孵育30 min，再用PBS洗涤3次充分去除未进入细胞内的DCFH-DA，于激光共聚焦扫描显微镜下观察细胞内活性氧生成情况。

（2）流式细胞术检测M1型、M2型巨噬细胞的比例：收集细胞重悬于含1%牛血清白蛋白的PBS（BSA-PBS），加入5.0 μl流式抗体CD86混匀，于4℃避光孵育30 min；1000 r/min离心5 min弃上清，固定破膜后，加入2.5 μl流式抗体CD206混匀，于4℃避光孵育30 min；加入2.0 ml 1% BSA-PBS，1000 r/min离心5 min弃上清；加入0.5 ml 1% BSA-PBS重悬细胞，应用流式细胞仪检测并计算M1型、M2型巨噬细胞的比例。

（3）ELISA法检测TNF-α、IL-6、IL-10浓度：收集细胞上清液，2300 r/min离心10 min，严格按照试剂盒说明书测定TNF-α、IL-6、IL-10浓度。

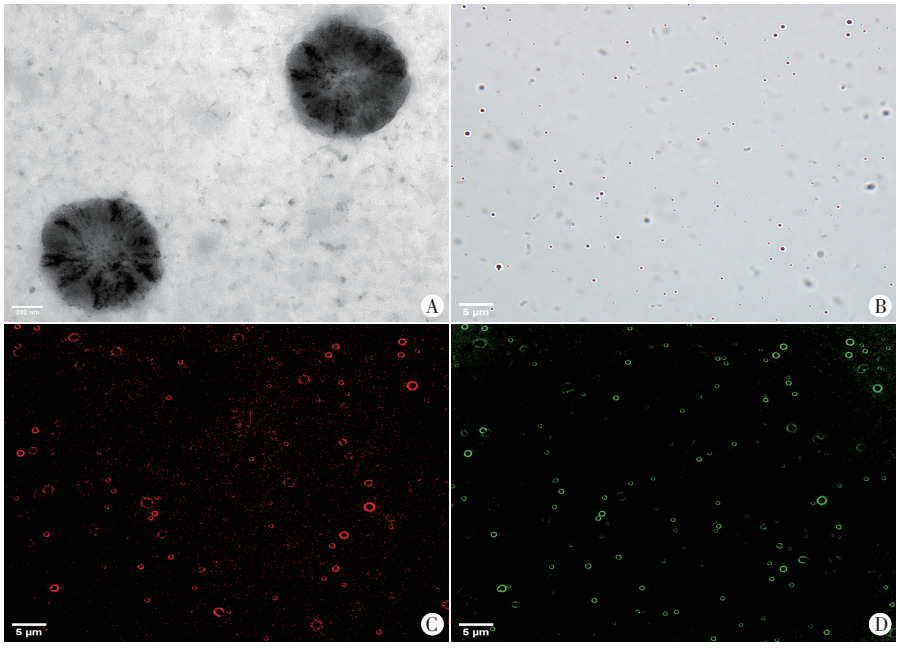
三、统计学处理

应用GraphPad Prism 8统计软件，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组比较采用单因素方差分析，两两比较采用t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

结　果

一、Ce6-PP1 NB的理化性质、稳定性及细胞毒性

光学显微镜及透射电子显微镜下，Ce6-PP1 NB呈圆形，形态规则，表面光滑，大小均一，分散均匀（图1A、B）；荧光显微镜下，Ce6-PP1 NB壳膜既能呈现红色荧光，也能呈现绿色荧光（图1C、D），提示Ce6和PP1均装载成功。



A：透射电子显微镜图；B：光学显微镜图；C、D：荧光显微镜图

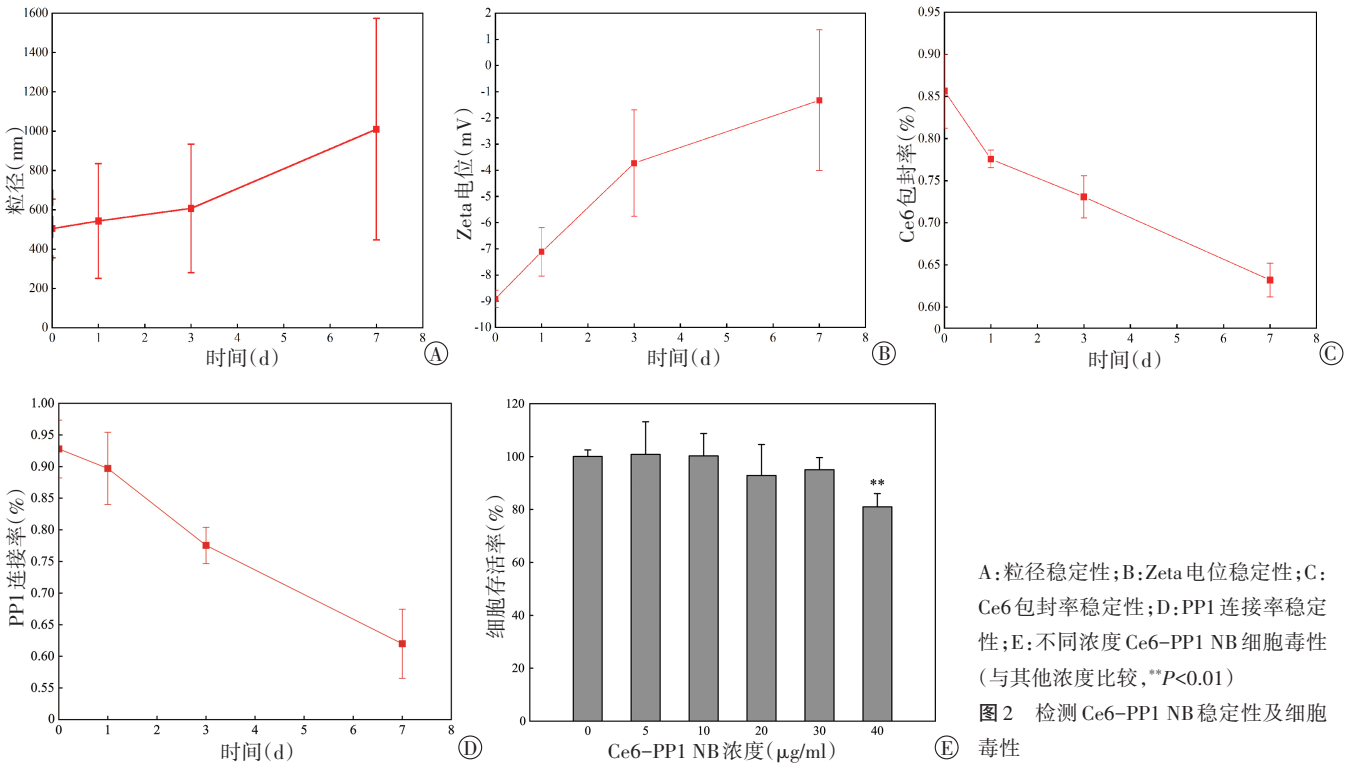
图1　Ce6-PP1 NB镜下观

Ce6-PP1 NB平均粒径为(504.25±149.13)nm，多分散指数为0.301±0.07，平均Zeta电位为(-8.67±0.78)mV。紫外可见吸收光谱显示Ce6分别在400 nm和660 nm处可见吸收峰，Ce6-PP1 NB吸收光谱与Ce6一致。Ce6标准回归方程为：$Y=0.0401X-0.0009$（$R^2=0.9979$），Ce6包封率为(85.63±4.39)%，PP1连接率为(92.78±4.57)%。放置0、1、3、7 d后，Ce6-PP1 NB粒径和Zeta电位均逐渐增大，Ce6包封率和PP1连接率均逐渐下降。CCK-8细胞毒性实验结果显示，0、5、10、20、30 μg/ml的Ce6-PP1 NB与RAW264.7细胞共孵育12 h后，细胞存活率均>90%；当Ce6-PP1 NB浓度达40 μg/ml时，细胞存活率明显下降（$P<0.01$）。见图2。

二、体外寻靶实验结果

RAW264.7细胞与Ce6-PP1 NB共同孵育后，细胞核周围和细胞膜内均可见明显红色荧光，提示大量Ce6-PP1 NB聚集；而细胞与Ce6共同孵育后，细胞核周围和细胞膜内红色荧光不明显。见图3。

三、Ce6-PP1 NB的声敏性和声动力效应



A：粒径稳定性；B：Zeta电位稳定性；C：Ce6包封率稳定性；D：PP1连接率稳定性；E：不同浓度Ce6-PP1 NB细胞毒性（与其他浓度比较，**$P<0.01$）

图2　检测Ce6-PP1 NB稳定性及细胞毒性

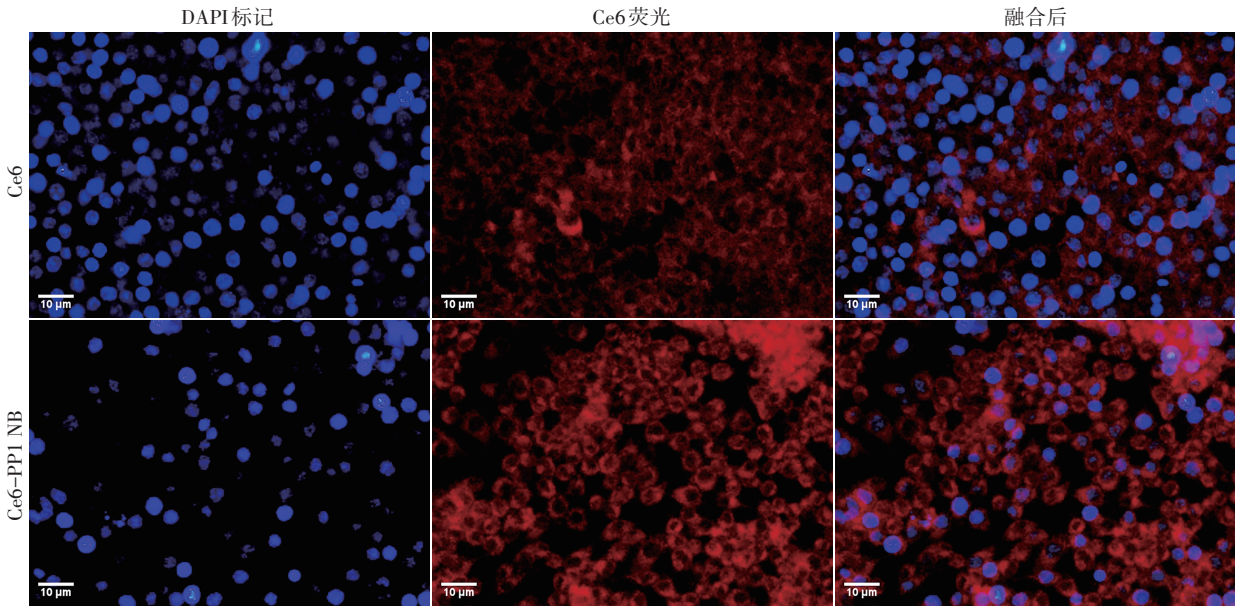
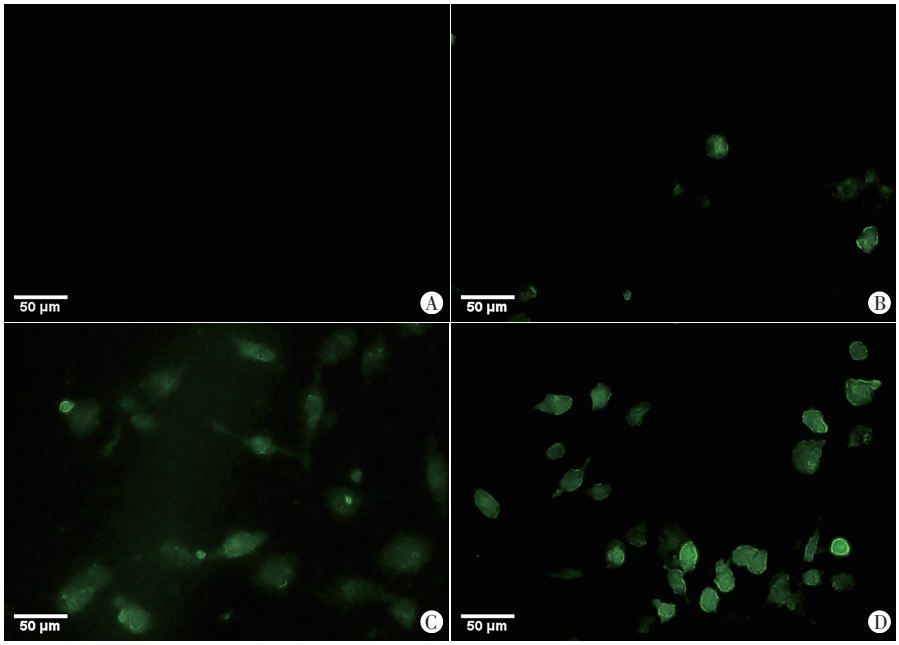


图3　体外寻靶实验观察Ce6-PP1 NB与RAW264.7细胞结合情况

1.DCFH-DA法检测结果显示，Ce6-PP1 NB+LIPUS组细胞内产生大量活性氧，表现为细胞内绿色荧光显著增加，其余各组细胞内绿色荧光不明显。见图4。

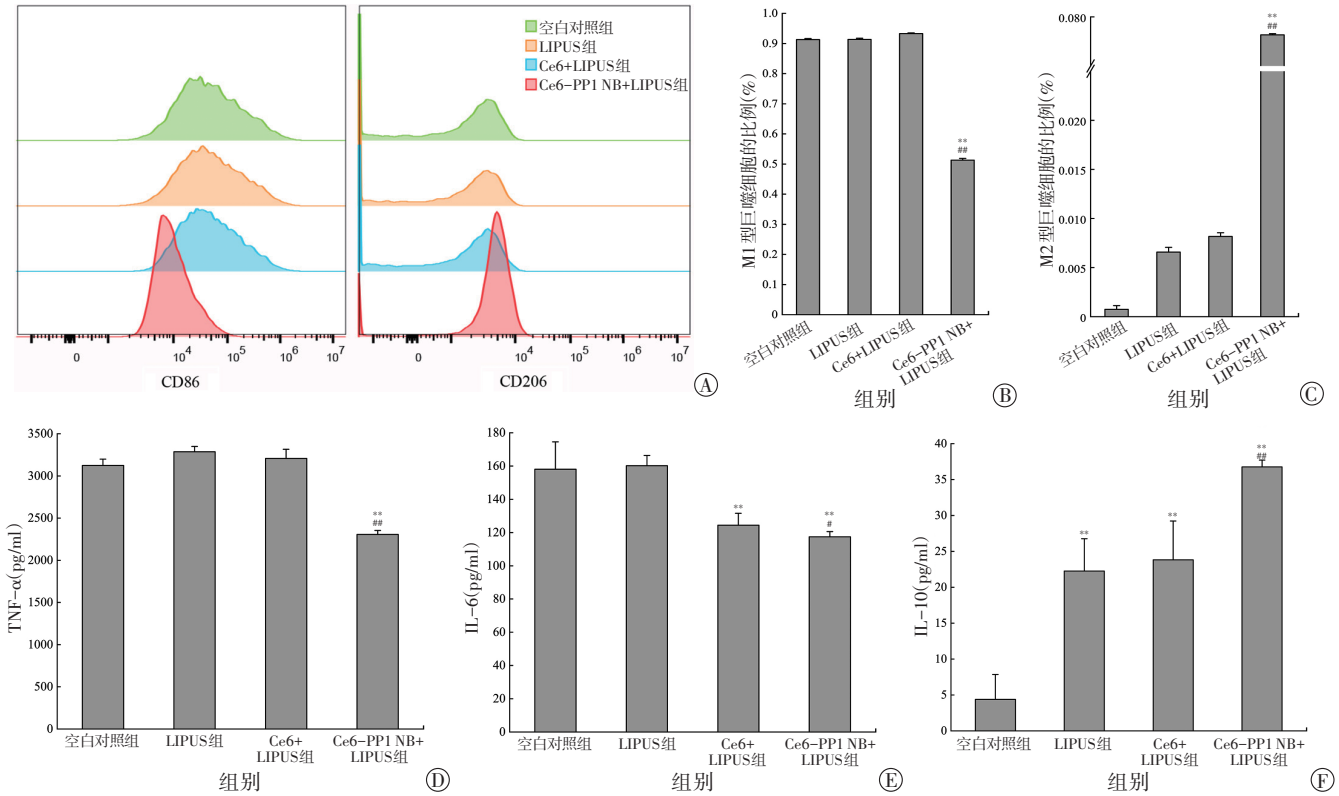
2.流式细胞术检测结果显示，与空白对照组比较，LIPUS组和Ce6+LIPUS组M1、M2型巨噬细胞的比例均未见明显变化，而Ce6-PP1 NB+LIPUS组M1型巨噬细胞的比例减少、M2型巨噬细胞的比例增加，差异均有统计学意义（均$P<0.05$）。见图5A~C。

3.ELISA法检测结果显示，Ce6-PP1 NB+LIPUS组细胞TNF-α、IL-6浓度均减小，而IL-10浓度增大，与其余各组比较，差异均有统计学意义（均$P<0.05$）。见图5D~F。



A：空白对照组；B：LIPUS组；C：Ce6+LIPUS组；D：Ce6-PP1 NB+LIPUS组

图4　各组细胞内活性氧生成情况



A：各组M1型、M2型巨噬细胞流式图；B：各组M1型巨噬细胞的比例；C：各组M2型巨噬细胞的比例；D~F：各组TNF-α、IL-6及IL-10浓度。与空白对照组比较，$^{**}P<0.01$；与Ce6+LIPUS组比较，$^{\#}P<0.05$；$^{\#\#}P<0.01$

图5　各组巨噬细胞极化情况

讨　论

AS是导致心脑血管疾病的主要病因，其发病率逐年增高，目前他汀类药物治疗和介入手术治疗虽可以延缓斑块形成，但并不能逆转AS病程和消除已形成的斑块。细胞免疫治疗已被开始尝试用于稳定斑块和消退AS病变[6]。巨噬细胞是AS发生和发展中最主要的免疫炎症细胞，主要分为M1型和M2型。其中M1型

巨噬细胞有促炎作用，能分泌TNF-α、IL-6、白细胞介素-12等炎症因子，导致慢性炎症和斑块不稳定；而M2型巨噬细胞有抑制炎症作用，能分泌IL-10、转化生长因子-β等，对AS有治疗作用。M1型与M2型巨噬细胞之间的平衡关系可能与血栓栓塞等斑块结局有关，因此干预巨噬细胞表型转化可能是治疗心血管疾病的一种新策略[6-7]。超声介导的SDT被证实能调控巨噬细胞极化，但在抗AS方面的研究刚起步[8-9]，面临着声敏剂靶向性差、疗效不理想等问题。微泡作为一种多功能载体，不仅可以载药，还可在超声刺激下激发超声靶向微泡破坏效应，从而提高细胞膜通透性，增强组织对外源性小分子的靶向摄取[10]，而纳泡的粒径较微泡更小，能穿过血管内皮细胞之间的孔隙，具有更强的渗透性和滞留效应[11]。本课题组前期实验研究[12]结果表明，将声敏剂Ce6与纳泡结合，能增加组织对声敏剂的摄取，增强SDT疗效，有望解决SDT在AS研究中的不足。基于此，本实验以斑块SR-A为靶点，构建一种靶向声敏纳泡——Ce6-PP1 NB，以期提高声敏剂在AS部位的聚集，调控巨噬细胞极化，达到增强SDT疗效的目的。

本实验制备的Ce6-PP1 NB本质是靶向纳米超声造影剂，其大体结构与目前临床上广泛应用的超声造影剂声诺维相似，由脂质外膜和气体内核组成。Ce6-PP1 NB的外膜成分为DPPC和DSPE-PEG，DPPC作为主要脂质时，其配体分布均匀、结合面积大、结合后呈圆顶状，有利于提高纳泡的靶向性；DSPE-PEG能显著增强纳泡抵抗气体损失、气泡溶解和气泡聚结的能力，从而提高纳泡的稳定性。Ce6-PP1 NB的内核成分为全氟丙烷，其是一种惰性气体，常温下无色、无味、无毒、无生理或药理活性。本实验结果显示，制备的Ce6-PP1 NB呈圆形，形态规则，大小均一，分散均匀，Ce6和PP1均成功装载至纳泡上，且Ce6包封率和PP1连接率均较高。制备0~1 d时，Ce6-PP1 NB的粒径、Zeta电位、Ce6包封率和PP1连接率均无明显变化；制备3 d以上，Ce6-PP1 NB的粒径增大，Zeta电位升高，Ce6包封率和PP1连接率均明显下降，表明Ce6-PP1 NB在制备1 d内稳定性良好，可以满足后续实验要求。本实验通过CCK-8细胞毒性实验检测其安全性，结果表明Ce6-PP1 NB浓度≤30 μg/ml时，不会对细胞的增殖及活性产生影响，而当其浓度达到40 μg/ml时，会导致细胞活性下降。因此，本实验后续采用浓度为30 μg/ml的Ce6-PP1 NB进行体外细胞实验。

单一的纳泡并不能高效、精准地输送至靶器官或靶组织，而经过功能化修饰如连接特异性抗体或配体的纳泡才具备主动靶向能力[11]。为了更高效地将纳泡输送至斑块，需在纳泡上装载一个可精准识别AS的靶点。SR-A是位于单核-巨噬细胞表面的三聚体跨膜糖蛋白，主要参与低密度脂蛋白的转运和利用，其在AS部位的表达水平随斑块内巨噬细胞数量的增加而升高[4,13]，因此可成为靶向斑块的位点[14]。SR-A能与氨基酸、多肽等多种配体结合，其中PP1（氨基酸序列：LSLERFLRCWSDAPAK）是16个氨基酸分子组成的多肽，其N端的亮氨酸能与SR-A C端的半胱氨酸共价结合，从而识别斑块[5]。基于此，本实验通过生物素-亲和素系统将生物素化PP1连接至生物素化处理后的纳泡表面，结果发现PP1连接率为（92.78±4.57）%。体外寻靶实验证明，Ce6-PP1 NB对RAW264.7细胞具备主动靶向能力，呈红色花环状分布于细胞核周围和细胞膜内。

SDT主要作用机制之一是活性氧生成，即声敏剂在超声作用下获得能量，从基态跃迁到激发态，由于激发态的声敏剂不稳定，当其恢复至基态时将释放部分能量，细胞内的基态三重态氧分子获得该能量进而变成活性氧如单线态氧、超氧自由基等[15]。活性氧是SDT治疗斑块最关键的声化学物，可引发线粒体膜电位降低、细胞骨架收缩、染色质浓缩、膜破裂及DNA断裂等一系列生物学反应从而导致细胞凋亡[16]。活性氧生成是声敏剂活化的结果，也是目前评价SDT疗效的主要指标[17-18]。本实验通过DCFH-DA法检测细胞内活性氧生成情况，结果显示Ce6-PP1 NB+LIPUS组细胞内绿色荧光最为明显，表明Ce6装载至纳泡后并不影响其被细胞摄取及活性氧生成。

以往调控巨噬细胞极化的研究主要涉及各种生物因素或化学药物[19-20]，关于物理刺激对巨噬细胞极化的调控所知有限。超声作为一种物理治疗方式，与化学治疗相比，其优势在于靶向性和生物安全性较好，因此治疗性超声越来越受到关注和重视。既往研究[21]表明，LIPUS能调控巨噬细胞极化，促进其从M1型向M2型转化。在骨关节炎小鼠模型中，LIPUS能减少滑膜中M1型巨噬细胞极化，并促进M2型巨噬细胞极化[22]；陈绩等[23]研究也发现LIPUS不仅能阻止巨噬细胞向M1型极化，还能减弱巨噬细胞的吞脂能力。Yang等[9]研究发现SDT处理的斑块中M1型巨噬细胞减少，M2型巨噬细胞增多，M2/M1值增大，表明LIPUS介导的SDT也具有调控巨噬细胞极化的作用。本实验结果发现，与空白对照组和Ce6+LIPUS组比较，

Ce6-PP1 NB+LIPUS组M1型巨噬细胞的比例减少，M2型巨噬细胞的比例增加；进一步通过ELISA法证实，Ce6-PP1 NB+LIPUS组中TNF-α、IL-6浓度均减小，IL-10浓度增大，提示Ce6装载至纳泡后能增强SDT疗效，促进M1型巨噬细胞向M2型转化，从而改善炎症。

综上所述，本实验成功制备AS靶向声敏纳泡Ce6-PP1 NB，其药物包封率高、细胞相容性好、组织靶向性高，在LIPUS作用下能增强SDT疗效，并促进M2型巨噬细胞极化，有望提高AS斑块的靶向精准治疗。后期将对SDT调控巨噬细胞极化的分子机制和不同LIPUS参数下SDT对巨噬细胞极化的效应进一步研究。

参考文献

[1] Yao J, Gao W, Wang Y, et al. Sonodynamic therapy suppresses neovascularization in atherosclerotic plaques via macrophage apoptosis-induced endothelial cell apoptosis[J]. JACC Basic Transl Sci, 2020, 5(1): 53-65.

[2] Chen W, Schilperoort M, Cao Y, et al. Macrophage-targeted nanomedicine for the diagnosis and treatment of atherosclerosis[J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 19(4): 228-249.

[3] Ahn JW, Kim JH, Park K. In vitro photodynamic effects of the inclusion nanocomplexes of glucan and chlorin E6 on atherogenic foam cells[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(1): 177.

[4] Liu J, Zhou B, Guo Y, et al. SR-A-targeted nanoplatform for sequential photothermal/photodynamic ablation of activated macrophages to alleviate atherosclerosis[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2021, 13(25): 29349-29362.

[5] Gao B, Xu J, Zhou J, et al. Multifunctional pathology-mapping theranostic nanoplatforms for US/MR imaging and ultrasound therapy of atherosclerosis[J]. Nanoscale, 2021, 13(18): 8623-8638.

[6] Engelen SE, Robinson AJB, Zurke YX, et al. Therapeutic strategies targeting inflammation and immunity in atherosclerosis: how to proceed?[J]. Nat Rev Cardiol, 2022, 19(8): 522-542.

[7] Patterson MT, Williams JW. Metabolic regulation of macrophage proliferation and function in atherosclerosis[J]. Curr Opin Lipidol, 2021, 32(5): 293-300.

[8] Jiang Y, Fan J, Li Y, et al. Rapid reduction in plaque inflammation by sonodynamic therapy inpatients with symptomatic femoropopliteal peripheral artery disease: a randomized controlled trial[J]. Int J Cardiol, 2021, 325(2): 132-139.

[9] Yang Y, Wang J, Guo S, et al. Non-lethal sonodynamic therapy facilitates the M1-to-M2 transition in advanced atherosclerotic plaques via activating the ROS-AMPK-mTORC1-autophagy pathway[J]. Redox Biol, 2020, 32(3): 101501.

[10] Li X, Guo S, Xu T, et al. Therapeutic ultrasound combined with microbubbles improves atherosclerotic plaque stability by selectively destroying the intraplaque neovasculature[J]. Theranostics, 2020, 10(6): 2522-2537.

[11] Sun L, Zhang J, Xu M, et al. Ultrasound microbubbles mediated sonosensitizer and antibody co-delivery for highly efficient synergistic therapy on Her2-positive gastric cancer[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2022, 14(1): 452-463.

[12] Liu Y, Jiang J, Liu C, et al. Synergistic anti-tumor effect of anti-PD-L1 antibody cationic microbubbles for delivery of the miR-34a gene combined with ultrasound on cervical carcinoma[J]. Am J Transl Res, 2021, 13(3): 988-1005.

[13] Ye M, Zhou J, Zhong Y, et al. SR-A-targeted phase-transition nanoparticles for the detection and treatment of atherosclerotic vulnerable plaques[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11(10): 9702-9715.

[14] Li L, Wang JH, Wu ML, et al. Macrophage-targeted and clearable glutathione-based MRI nanoprobes for atherosclerosis molecular imaging[J]. J Nanopart Res, 2019, 21(11): 231.

[15] Choi V, Rajora MA, Zheng G. Activating drugs with sound: mechanisms behind sonodynamic therapy and the role of nanomedicine[J]. Bioconjug Chem, 2020, 31(4): 967-989.

[16] 陈粤瑛，周青. 声动力疗法在动脉粥样硬化斑块治疗中的研究进展[J]. 中华超声影像学杂志, 2022, 31(6): 546-552.

[17] Wang H, Yang Y, Sun X, et al. Sonodynamic therapy-induced foam cells apoptosis activates the phagocytic PPARγ-LXRα-ABCA1/ABCG1 pathway and promotes cholesterol efflux in advanced plaque[J]. Theranostics, 2018, 8(18): 4969-4984.

[18] An J, Hu YG, Cheng K, et al. ROS-augmented and tumor-microenvironment responsive biodegradable nanoplatform for enhancing chemo-sonodynamic therapy[J]. Biomaterials, 2020, 234(3): 119761.

[19] Andrew D, Kamal P, Sarah B, et al. Modulation of macrophage polarization by carbon nanodots and elucidation of carbon nanodot uptake routes in macrophages[J]. Nanomaterials (Basel), 2021, 11(5): 1116.

[20] Yu S, Ge H, Li S, et al. Modulation of macrophage polarization by viruses: turning off/on host antiviral responses[J]. Front Microbiol, 2022, 13(2): 839585.

[21] Kong Y, Liu F, Ma BJ, et al. Wireless localized electrical stimulation generated by an ultrasound-driven piezoelectric discharge regulates proinflammatory macrophage polarization[J]. Adv Sci (Weinh), 2021, 8(13): 2100962.

[22] 张斌，倪振洪，杨鹏，等. 低强度脉冲超声调控滑膜巨噬细胞极化抑制关节滑膜炎[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(8): 747-756.

[23] 陈绩，杨传熙，徐天华，等. 低强度脉冲式超声波对小鼠骨髓来源巨噬细胞极化和吞脂能力的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2021, 41(4): 489-495.

(收稿日期：2022-08-15)