

Targeted microbubbles and ultrasonic molecular imaging

WU Xing, WANG Zhi-gang*

(Institute of Ultrasonic Image, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

[Abstract] Ultrasonic molecular imaging is a newly developing imaging approach, which is able to detect and monitor many microcosmic fields diseases in vivo on molecular level by using targeted microbubbles as its agent. This review describes the current research situation of targeted microbubbles and ultrasonic molecular imaging, as well as their developing trends.

[Key words] Ultrasound contrast agent, microbubble; Targeted; Molecular imaging

靶向超声微泡造影剂与超声分子显像

伍星 综述, 王志刚* 审校

(重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010)

[摘要] 超声分子显像是一门新兴发展的, 以靶向超声微泡造影剂为显像剂, 能够对体内组织器官微观病变进行分子水平的探测与显像的方法。本文对靶向超声微泡造影剂与超声分子显像的研究现状及发展方向进行了综述。

[关键词] 超声造影剂, 微泡; 靶向; 分子显像

[中图分类号] R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2005)08-1299-03

分子显像研究是指借助分子显像剂在体外观察活体内部分子水平的生物学变化。经典的分子显像剂与显像方法主要为放射性同位素与 SPECT/PET、顺磁性造影剂与 MRI 以及荧光剂与荧光染色。近年来随着新型超声造影技术的不断革新, 超声分子显像逐渐成为现实, 即经静脉注入带有特定配体的靶向微泡造影剂, 在体内通过配体与受体结合的方式, 使微泡选择性聚集并较长时间停留于靶组织或靶器官而产生分子水平的显影^[1,2], 其分子显像剂——靶向微泡造影剂具有很大的研究、应用价值。超声分子显像的实现, 将极大提高超声对疾病的早期诊断能力。本文将就靶向微泡造影剂及在超声分子显像中的应用进展作

一简要综述。

1 靶向微泡造影剂的独特优势与制备

自 Gramiak 等首先将超声造影技术应用于临床以来, 超声造影剂的研究开发取得突飞猛进的进展。尤其是第三代微泡造影剂的出现, 因采用脂质、白蛋白、表面活性剂或高分子多聚物为膜, 内部注以弥散度低的氟碳气体, 稳定性大大提高; 同时, 配合谐波显像、触发成像、剪影技术等新兴显像技术的应用, 有效地提高了超声对疾病的诊断和鉴别诊断能力, 被誉为超声影像技术的第三次革命。然而, 实践发现, 普通超声造影剂因缺乏对病变组织的特殊亲和力, 不能有效驻留靶组织, 只能在短暂的动脉相中使靶器官血管显影, 故对疾病诊断的特异性欠佳。为解决这一问题, 人们开始着眼于研究靶向微泡造影剂。它是将特异性配体(多为抗体、多肽等)连接到微泡造影剂表面, 使其能主动结合到靶组织或靶器官上相应的受体, 产生特异性靶向显影。与普通微泡相比, 靶向微泡造影剂由于能够从分子水平识别并结合于病灶, 从而在靶点产生特异性显影, 因此能更加显著地提高超声对早期病变的诊断能力。

所有的靶向分子显像方法不仅要求显像剂能以尽可能的高浓度聚集于靶点, 低浓度分布于正常区域, 同时在循环中保持低水平游离显像剂也相当关键。对 SPECT 或 MRI 分子显像中所使用的靶向显像剂, 如抗体、长循环脂质或高分子多聚物等而言, 多需要 24 h 才能完全清除循环中游离的显像剂, 因而限制了诊断性显像即时进行及多次重复显像以评估临床治疗效果。而超声靶向微泡造影剂由于微泡的特性, 不可能多次通过肺循环, 故血中游离微泡在 1 h 内甚至更短时间便能完全清除掉; 同时, 体外试验显示靶向微泡能牢固结合、停留在具有相应特异性抗原的组织表面, 持续至少一天不破灭, 而且靶点高浓度聚集的微泡影像极易被仪器所探测^[2,3]。因此, 对超声分子显像而言, 可望在注射靶向微泡造影剂后的 10~15 min 内达到高靶/血流增强比^[4], 从而即时获得高度清晰的造影图像。

靶向超声微泡的应用是进行超声分子显像的物质基础, 而制备靶向微泡的关键技术在于微泡的表面修饰, 即如何将特异性好、活性高的配体牢固结合到微泡表面。目前连接方法总的分为两

[基金项目] 本研究受国家自然科学基金重点(30430230)及面上项目(30370402)资助。

[作者简介] 伍星(1980—), 女, 重庆人, 在读硕士。研究方向: 超声微泡造影剂携基因或药物治疗。E-mail: Xing_apple@163.com

[通讯作者] 王志刚, 重庆医科大学超声影像学研究所, 400010。E-mail: wzg62942443@163.com

[收稿日期] 2005-05-26

[修回日期] 2005-07-25

种:第一种是针对小分子配体,如肽类、激素等,可事先将其直接或间接结合到成膜材料的前体或分子上,然后按照普通微泡的制备方法,即可获得较为稳定的黏附有配体的靶向微泡;第二种方法适合用于稳定性不高、不能耐受微泡制备过程中所需经历的严峻条件,如高速声振、离心或高温,易变性失活的配体,如大分子抗体,对此是采取共价或非共价的方式将配体连接到已制备好的微泡表面。其中,非共价结合多通过生物素-亲和素连接技术;而共价结合多采用羧酸酯类衍生物介导配体与微泡外壳连接。Kim等^[5]建议,在脂质微泡的单层外壳与配体之间采用多聚物隔离臂,如聚乙二醇(PEG)作为连接子,这样微泡的靶向性显著优越于将配体直接连接到外壳的方式。因为PEG隔离臂如同系绳一样,其系着配体的游离端活动度大,在靶区域能提供配体与受体结合所需的相对较长的接触时间与更多的接触机会;再者,有了连接子后,配体能充分暴露微泡表面,而直接连接时部分配体可能掩埋在微泡外壳材料之中,造成配体的浪费。另就微泡成膜材料而言,以高分子材料制备微泡相对最具发展潜力,因为高分子材料膜韧性高,抗压性能突出,均一度高,显影时间长,而且尤其在携基因或药物治疗中具有极大应用优势^[6]。

2 靶向微泡造影剂在超声分子显像中的应用

超声分子显像研究较多的首先为肿瘤靶向显像。Ellegala等^[7]把在转移性肿瘤和内皮源性肿瘤的新生血管中高度表达的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的抗体与微泡相连接,制得抗 $\alpha_v\beta_3$ 靶向微泡,用以显像大鼠恶性神经胶质瘤模型,结果显示胶质瘤明显强化,尤以其外围 $\alpha_v\beta_3$ 高表达区域为甚;随后,Dayton^[8]在体外试验中用三种不同膜材料的抗 $\alpha_v\beta_3$ 靶向微泡造影剂,与普通微泡对比显像表达 $\alpha_v\beta_3$ 的单层培养细胞,发现靶向造影剂的增强效果显著优于普通微泡,说明抗 $\alpha_v\beta_3$ 靶向微泡造影剂对探测新生血管具有更高的敏感性;而Weller^[9]利用能与肿瘤新生血管内皮细胞高度结合的三肽精氨酸-精氨酸-亮氨酸(arginine-arginine-leucine, RRL),作为配体与微泡连接,显像小鼠

PC3肿瘤,同样发现肿瘤新生血管区域相对正常组织血管区明显增强。上述研究总的说明通过选择对肿瘤新生血管具有高度亲和力的特异性配体修饰微泡造影剂,可以从对肿瘤新生血管功能性显像的角度,实现超声对恶性肿瘤及转移灶的早期诊断;并有利于超声引导下活检时对瘤组织生长活跃区的准确选择。国内卞爱娜等^[10]也有报道,将单抗HAb18结合到自制的脂质体微泡上,在体外试验中能与人肝癌细胞高效特异结合,可望下一步研究实现肝细胞癌靶向显影。

其次是研究对某些特殊的病变组织,如缺血、炎症、血栓、移植术后的排异区域进行靶向监测。最初人们在实践中观察到,普通微泡易较长时间附着于损伤的血管内皮。Lindner等^[11]进一步实验证实,该现象是由于损伤所致的炎症反应激活了整合素 β_2 、补体,激活的二者能介导微泡与体内活化的白细胞黏附,而白细胞本身对炎性组织有强烈趋化作用,故出现微泡在炎性区域持久集聚。受此启示,有学者开始尝试在微泡外壳层加入磷脂酰丝氨酸(PS),由于PS的加入能放大补体活性,增强微泡与白细胞黏附,从而制成了靶向白细胞造影剂,并已在诸多实验性应用中初见潜力。Lindner^[12]报道,应用靶向白细胞微泡造影剂分别显像大鼠的经TNF- α 处理造成的炎性提睾肌和缺血后再灌注损伤的肾模型,与普通微泡造影对比,结果均显示靶向白细胞微泡造影剂对病变组织具有更明显的增强效果;Christiansen^[13]应用靶向白细胞微泡造影剂显像犬缺血再灌注损伤心肌模型,以 $^{99}\text{Tc}^m$ 显像作为评估标准,结果证明靶向微泡显像与 $^{99}\text{Tc}^m$ 显像的结果吻合良好,可较准确地判断缺血后心肌炎症的范围与严重程度;Konodo^[14]将靶向白细胞微泡造影剂应用于大鼠同种异体心脏移植术后急性排斥模型的显像,证实靶向微泡可通过直接显示心肌内所渗透的巨噬细胞与T淋巴细胞的数量,无创性评估排斥反应的严重程度。而利用内皮细胞黏附因子P-selectin、ICAM-I等在炎性组织新生血管的活化内皮层表达上调的原理,采用它们的单克隆抗体作配体,同样可制得炎症靶向性造影剂。Lindner^[4]用抗P-selec-

tin靶向微泡显像大鼠炎性提睾肌组织和肾缺血再灌注损伤模型;Weller^[15]制备抗ICAM-I靶向微泡显像大鼠心脏移植术后急性排斥反应模型,结果均表明这两种抗炎症黏附因子的靶向微泡造影剂亦对炎症组织具有较高检出率。Schumann等^[16]报道,用能选择性结合血小板性血栓GP IIb/IIIa受体的靶向造影剂可显著提高对血栓的检出率。

3 靶向性微泡造影剂存在的问题与展望

目前的研究结果表明,靶向微泡造影剂的开发将直接促进超声分子显像的开展,有助于提高超声对疾病的早期定性、定位诊断。理想的靶向微泡造影剂应具备高效、小型化、穿透力强、安全等特点。但由于当前微泡制备技术及某些机制研究尚不成熟,在实践中还存在较多的问题。主要有:

(1)潜在安全性问题:包括机体对微泡的反应和微泡协同超声辐照下可能引发的生物学效应两方面。就前一点而言,曾有少数病人注射脂质微泡后发生变态反应的报道,Szebeni等^[17]经实验证明,原因可能为微泡表面的静电荷引起补体活化所致。因此应尽量选择不带静电荷的配体及配体与微泡外壳之间的连接子。配体如果是异源性抗体或分子量较大时,也可能引发机体免疫反应,故应尽可能使用人源性抗体的小分子活性片段及其他小分子物质。

超声辐照微泡所致的生物学效应近年来也开始倍受关注^[18]。体外实验中诊断用超声加微泡造影剂可引发溶血反应^[19];体内研究显示,微泡造影剂在超声作用下所产生的“声孔效应”可使毛细血管破坏,引起出血,瘀点形成^[20]。但是由于临床实践中诊断用量远小于实验剂量,而大剂量使用时本来就要利用其生物学效应达到治疗目的,故临床上对超声造影剂所致不良生物学效应的报道甚为罕见。大量实践表明,低频(如1~2 MHz)、高机械指数(MI $\geq$ 1.0)超声照射易引发生物学效应;同时,Wible等^[21]通过小鼠实验证实使用间断脉冲(1 F/S)超声波照射微泡可致瘀点形成,而连续显像模式甚为安全。故在临床诊断中,只要能避免采用低频高机械指数的间断超声显像模式,微泡造影基本上是安全

的。

(2)制备过程中存在的问题:如配体与微泡表面连接过紧,使得在微泡路径病变的短暂时间内不能充分与受体进行识别、结合等。

未来靶向超声造影剂的发展方向不仅是为了诊断,还需要载药进行治疗。因此,期待从以下几方面改进:①选择稳定的成膜材料,尤应重视高分子材料微泡的研发;②小型化(直径微米级或更小),以提高游离微泡的血液清除率,减少图像背景干扰;③使用特异性强的不带或少带静电荷的小分子配体,如果配体是抗体,使用人源性单抗的小分子活性片段较为理想;④配体与微泡外壳间最好有如 PEG 的多聚物连接子,可增大配体与靶组织受体的接触机会并延长接触时间,以便微泡高浓度聚集于靶点;⑤造影剂贮存稳定性好,使用前配制简便。

“超声分子影像学”这一概念已明确提出^[6],是将分子生物学、物理、化学及材料学(包括纳米技术)等与超声结合的一门学科。靶向微泡造影剂与超声分子显像的深入研究,十分有利于这一学科的发展。

【参考文献】

[1] Zhao S, Borden M, Bloch SH, et al. Radiation-force assisted targeting facilitates ultrasonic molecular imaging[J]. *Mol Imaging*, 2004, 3(3):135-148.

[2] Klibanov AL. Ligand-carrying gas-filled microbubbles: ultrasound contrast agents for targeted molecular imaging[J]. *Bioconjug Chem*, 2005, 16(1):9-17.

[3] Jing XX, Wang ZG. Progress on targeted mechanism of ultrasound contrast agents[J]. *J Ultrasound Clin Med*, 2003, 5(6):359-360.

景香香,王志刚.超声造影剂靶向性作用机制的研究进展[J]. *临床超声医学杂志*, 2003, 5(6):359-360.

[4] Lindner JR, Song J, Christiansen J, et al. Ultrasound assessment of inflammation and renal tissue injury with microbubbles targeted to P-Selectin[J]. *Circulation*, 2001, 104(17):2107-2112.

[5] Kim DH, Klibanov AL, Needham D. The influence of tiered layers of surface-grafted

poly (ethylene glycol) on receptor-ligand-mediated adhesion between phospholipid monolayer-stabilized microbubbles and coated glass beads[J]. *Langmuir*, 2000, 16(6):2808-2817.

[6] Zheng YY, Wang ZG, Ran HT, et al. Preliminary experimental study of a new self-made high molecular ultrasound contrast agent[J]. *Chinese J Ultrasound Med*, 2004, 20(12):888-890.

郑元义,王志刚,冉海涛,等.自制高分子材料超声造影剂及初步实验研究[J]. *中国超声医学杂志*, 2004, 20(12):888-890.

[7] Ellegala DB, Leong-Poi H, Carpenter JE, et al. Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to $\alpha(\nu)\beta 3$ [J]. *Circulation*, 2003, 108(3):336-341.

[8] Dayton PA, Pearson D, Clark J, et al. Ultrasonic analysis of peptide and antibody-targeted microbubble contrast agents for molecular imaging of $\alpha\nu\beta 3$ -expressing cells[J]. *Mol Imaging*, 2004, 3(2):125-134.

[9] Weller GE, Wong MK, Modzelewski RA, et al. Ultrasonic imaging of tumor angiogenesis using contrast microbubbles targeted via the tumor-binding peptide arginine-arginine-leucine[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(2):533-539.

[10] Bian AN, Gao YH, Tan KB, et al. Preparation and targeting study in vitro of immunoliposome contrast agent[J]. *Chin J Med Imaging Technol*, 2004, 20(3):356-358.

卞爱娜,高云华,谭开彬,等.免疫脂质体微泡造影剂的制备及体外靶向研究[J]. *中国医学影像技术*, 2004, 20(3):356-358.

[11] Lindner JR, Coggins MP, Kaul S, et al. Microbubble persistence in the microcirculation during ischemia/reperfusion and inflammation is caused by integrin and complement-mediated adherence to activated leukocytes[J]. *Circulation*, 2000, 101(6):668-675.

[12] Lindner JR, Song J, Xu F, et al. Noninvasive ultrasound imaging of inflammation using microbubbles targeted to activated leukocytes[J]. *Circulation*, 2000, 102(22):2745-2750.

[13] Christiansen JP, Leong-Poi H, Klibanov AL, et al. Noninvasive imaging of myo-

cardial reperfusion injury using leukocyte-targeted contrast echocardiography[J]. *Circulation*, 2002, 105(15):1764-1767.

[14] Kondo I, Ohmori K, Oshita A, et al. Leukocyte-targeted myocardial contrast echocardiography can assess the degree of acute allograft rejection in a rat cardiac transplantation model[J]. *Circulation*, 2004, 109(8):1056-1061.

[15] Weller GE, Lu E, Csikari MM, et al. Ultrasound imaging of acute cardiac transplant rejection with microbubbles targeted to intercellular adhesion[J]. *Circulation*, 2003, 108(2):218-224.

[16] Schumann PA, Christiansen JP, Quigley RM, et al. Targeted-microbubble binding selectively to GPIIb/IIIa receptors of platelet thrombi[J]. *Invest Radiol*, 2002, 37(11):587-593.

[17] Szebeni J, Baranyi L, Savay S, et al. Role of complement activation in hypersensitivity reactions to doxil and hynic PEG liposomes: experimental and clinical studies[J]. *J Liposome Res*, 2002, 12(1-2):165-172.

[18] Ding CF, Xing D, Guo H. Detection of imaging difference in different tissues with sonoluminescence of focusing ultrasound[J]. *Chin J Med Imaging Technol*, 2005, 21(4):504-506.

丁春峰,邢达,郭洪.利用聚焦超声的声致发光技术检测不同组织的成像差异[J]. *中国医学影像技术*, 2005, 21(4):504-506.

[19] Guzman HR, McNamara AJ, Nguyen DX, et al. Bioeffects caused by changes in acoustic cavitation bubble density and cell concentration: a united explanation based on cell-to-bubble ratio and blast radius[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2003, 29(8):1211-1222.

[20] Miller DL, Pislaru SV, Greenleaf JE. Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation[J]. *Somat Cell Mol Genet*, 2002, 27(1-6):115-134.

[21] Wible JH Jr, Galen KP, Wojdyla JK, et al. Microbubbles induce renal hemorrhage when exposed to diagnostic ultrasound in anesthetized rats[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2002, 28(11-12):1535-1546.