

· 综述 ·

Progress of ultrasonic molecular imaging of hepatocellular carcinoma

LUO Jie, WANG Zhi-gang*

(Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

[Abstract] With the development of the ultrasonic molecular imaging, the invention of a variety of new ultrasound contrast agents can not only improve the sensitivity and specificity of the diagnosis, but also provide new ideas and means for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. The development and perspective of the relative researches were described in this article.

[Key words] Ultrasonic molecular imaging; Ultrasound contrast agents; Liver neoplasms

肝癌超声分子影像学的研究进展

骆 杰 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] 随着超声分子影像学的发展, 各种新型超声造影剂的出现提高了超声诊断肝癌的敏感性与特异性, 并为实现肝癌的早期诊治提供了新的思路和手段。本文就相关研究进展进行综述。

[关键词] 超声分子影像学; 超声造影剂; 肝肿瘤

[中图分类号] R445.1; R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-8475(2009)06-0575-04

肝癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤。许多患者初次就诊时肿瘤已转移, 无法手术切除, 因此, 肝癌的早期发现和治疗对于患者的生存十分重要。目前对肝癌的早期诊断能力较弱, 使很多患者错过了切除肿瘤的最佳时机。超声造影剂的出现和发展, 使肝癌的早期诊断和治疗成为可能。

1 超声分子影像学的研究进展

分子成像是指在细胞和分子水平特征性地显示和测定活体内的生物过程, 偏重于疾病的基础变化和分子水平的异常。目前, 分子成像技术主要包括核素成像、MR 和光学成像等。核素分子成像所用的放射性物质对人体有一定的伤害, 且设备价格昂贵; MR 分子成像的时间分辨率有限, 且检查探针的灵敏度较低; 光

学分子成像虽具有无创、非侵入性、高灵敏性等优点, 但也只能用于单一的诊断且大多还停留在实验阶段^[1]。超声分子成像技术除具有经济、便捷、实时显像等优点外, 其最大的特点是用于超声分子成像的造影剂可作为治疗药物或基因的载体, 达到靶向分子显影和靶向治疗的双重功效。

超声分子显像技术系将特异性配体连接到直径小于红细胞的超声微泡造影剂表面, 从静脉注入后, 通过血液循环特异地积聚于靶组织, 观察靶组织在分子或细胞水平的特异性显像, 可了解病变组织在分子基础上的变化^[2]。

自 Gramiak 等首次将超声造影剂用于临床以来, 超声造影剂取得了长足的发展, 先后经历了在血液循环中持续时间较短的以空气为内容物的超声微泡造影剂; 相对更加稳定, 内含氟碳气体或 SF₆ 等高分子惰性气体的超声微泡造影剂; 以白蛋白、脂质、表面活性剂为外壳, 内部注以弥散度低的氟碳气体, 能够用于靶向诊断与治疗的超声微泡造影剂。具有靶向作用的超声微泡造影剂的出现为超声分子影像的新生与发展奠定

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30770566, 30770565)。

[作者简介] 骆杰(1983-), 男, 重庆人, 在读硕士。研究方向: 影像医学与核医学。E-mail: jaysbor@yahoo.cn

[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] 2009-04-10 [修回日期] 2009-06-15

了基础,其原理为:将特异性配体连接到微泡造影剂表面,促使微泡特异性地与靶组织结合。目前主要的配体有抗体、多肽和多糖等,可将配体共轭结合于微泡表面或与微泡混为一体,也可将配体通过化学连接臂(如聚乙二醇)游移于微泡表面,某些单克隆抗体还可通过生物素-亲和素桥接法等与微泡连接。

靶向超声微泡能特异性地观察靶组织在分子或细胞水平的显像,反映病变组织在分子水平的变化,提高超声对疾病早期诊断的特异性和准确率。然而,由于微泡类造影剂的直径为微米级,不能穿过血管内皮间隙,只能停留于血管内产生血池显影,限制了其对血管外病变的探测能力。

近年来,纳米级超声造影剂应运而生,最常见的为氟烷乳剂造影剂。这类造影剂直径为纳米级,具有极强的穿透力,能够穿越肿瘤血管内皮间隙,有可能提高超声对血管外病变的早期诊断效能。朱叶峰等^[3]制备的纳米脂质微泡造影剂平均粒径为 415.8 nm,形态好,显影效果较理想。但由于纳米级造影剂的成像原理为聚集显像以及载药能力较低,在体内的显像与治疗效果还有待进一步提高。冉海涛等^[4]研制的高分子材料微泡造影剂,具有比脂质微泡更稳定、不易被吞噬细胞吞噬、能在体内产生缓释作用等优点,为肝癌的诊治提供了新的技术方法。

2 超声分子影像学在肝癌诊断中的研究进展

超声分子影像学的出现与发展,为肝癌的早期诊断提供了新的技术与思路。Gramiak 率先利用超声微泡造影剂对诊断肝脏非肿瘤性疾病进行了研究。1986 年,Matsuda 等首先应用超声微泡诊断肝脏肿瘤。20 世纪 90 年代后期,德国 Schering 公司研制出了以半乳糖为材料、在体内较为稳定的超声微泡造影剂 Levovist。此后,随着超声造影剂的不断发展,特别是靶向超声微泡造影剂的出现,超声诊断肿瘤达到了分子水平。

肝癌的生长与转移须依靠丰富的血供来提供充足的氧和各种营养物质。研究表明,多种受体靶点,如血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)、整合素 αvβ3、P-selectin 及血管细胞黏附分子 1(vascular cellular adhesion molecule-1, VCAM-1)等,在肝癌的新生血管内皮细胞表面高度表达,而在正常组织表达高度保守。Willmann 等^[5]报道其制备的靶向肿瘤血管超声造影剂在体外可与高表达 VEGFR2 的小鼠血管肉瘤细胞 SVR 特异性结合,在体内能特异性地增强小鼠移植瘤组织。然而,单克隆

抗体修饰的超声微泡造影剂体积过大,只能结合于肿瘤血管内的靶点上,不易穿过血管内皮细胞,限制了超声分子影像学实现血管外诊治肝癌及其他肿瘤。

纳米技术的出现,为连接了特异性配体的纳米造影剂穿透肿瘤血管扩大的内皮间隙与肿瘤细胞特异性结合显像提供了基础。Oeffinger 等^[6]研制的内含全氟丙烷的纳米级微泡平均粒径为 380~780 nm,而其中平均粒径为 450 nm 和 690 nm 的微泡最大增强效果分别达到了 25.5 dB 与 27.0 dB。肿瘤血管内皮间隙容许小于 700 nm 的颗粒通过。因此,纳米技术在超声造影上的应用,必将推动超声分子影像学的发展。

3 超声分子影像学在肝癌治疗中的研究进展

基因治疗和局部化疗是治疗肝癌的重要手段,目前尚缺乏一种安全、有效的基因或药物传递系统。超声微泡以及超声微泡介导技术可为肝癌的基因和药物治疗提供一种理想而高效的载体与传递途径。

单纯微泡在超声诱导下爆破可产生强大的生物学效应^[7],达到抑制肿瘤生长的目的。其机制可能为微泡破坏所产生的能量降低了肿瘤 VEGF 合成与分泌,破坏和减少肿瘤血管再生,杀灭肿瘤细胞,诱导肿瘤细胞的凋亡。翟光林等^[8]用超声辐照微泡对小鼠皮下 H22 肝癌移植瘤进行治疗,用免疫组织化学 SP 法检测血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白表达,发现与单纯使用超声治疗组相比,瘤体积缩小,VEGF 蛋白表达减低。石林等^[9]研究低频超声辐射微泡对裸鼠移植瘤增长抑制情况和组织病理学变化,并探讨其与局部氧自由基代谢产物 SOD 浓度改变的关系时,发现低频超声辐射微泡剂可抑制肝癌移植瘤裸小鼠肿瘤的增长,并增加局部氧自由基代谢产物 SOD 浓度;肿瘤增长率与 SOD 浓度呈负相关。Caruso 等^[10]用较高机械指数的超声辐照微泡对兔肝脏 VX2 肿瘤进行治疗,电镜下可见肿瘤新生毛细血管的超微结构明显破坏,线粒体肿胀,胞质空化等改变。

超声微泡造影剂可作为药物或基因的载体,且载药物量可控^[11]。超声造影剂靶向技术的出现有可能提高肝癌的疗效,现多以被动靶向为主,即在特定的部位施加超声辐照携带药物或基因的微泡,使其定位释放,可减少用药量及其不良反应,提高药物在靶组织中的浓度。其基本原理:将治疗性基因或药物携带在超声微泡上,用超声监测并用一定能量的超声波在特定的时间、空间击碎靶组织内的微泡,产生的超声空化效应可使靶区微血管通透性增加,声孔效应可导致细胞膜上出现可逆性小孔,从而使微泡携带的基因或药物

容易穿透内皮屏障,进入肿瘤组织和细胞内。杨春江等^[12]对载紫杉醇脂质微泡进行的体内外毒性实验研究,发现直接对小鼠注射紫杉醇均出现急性中毒反应;而注射携紫杉醇微泡时大部分小鼠无中毒反应,明显降低了紫杉醇的毒副作用。聂芳等^[13]将携单纯疱疹病毒-胸苷激酶(HSV-TK)自杀基因系统的微泡造影剂从尾静脉注入带有肝癌皮下移植瘤的小鼠体内,添加或不添加 SonoVue,发现超声辐照 SonoVue 能有效介导 HSK-TK 基因发挥抗瘤效应。

连接特异性配体的超声载药微泡能在体内特异性地与靶组织结合,使对肿瘤的主动靶向治疗成为可能。Reynolds 等^[14]研究以整合素 $\alpha v\beta 3$ 靶向的纳米粒子基因载体能选择性地作用于小鼠肿瘤血管内皮细胞,致肿瘤消退。Tartis 等^[15]发现以整合素 $\alpha v\beta 3$ 靶向的微泡与整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体位点的结合率为非靶向微泡的 26.5 倍。毒力分析证明,载紫杉醇微泡经超声辐照后比单独使用紫杉醇有更大的抑瘤作用。随着超声分子学的不断发展,靶向载药微泡将为肝癌的治疗提供一种新型、高效、可行的方法。

随着超声造影剂的发展,高分子材料微泡、纳米级造影剂及新型多功能纳米粒子的出现为肝癌治疗提供了新的技术支持。冉海涛等^[16]制备的包裹阿霉素的高分子材料微泡,在体内更加稳定,并具有缓释功能,能持续地在靶区释放药物。Rapoport 等^[17]制备的变相型多功能纳米粒子,最初以纳米级微球的形式携带抗癌药物穿过血管内皮,达到肿瘤组织,然后内部的全氟戊烷气化转变为载药微泡,在超声辐照下更加有效地杀伤肿瘤细胞。

4 问题与展望

超声分子影像学的兴起为肝癌的早期诊断和治疗提供了条件。超声微泡造影剂能明显提高超声诊断肝癌的敏感性和特异性^[18-20]。目前仍存在以下问题:①靶向超声微泡造影剂载药物或基因的效率问题:目前微泡载基因或药物方法,大部分系将基因与成膜材料混合制备微泡,使基因嵌入微泡外壳,或采用静电吸附方法将基因直接黏附到微泡外壳表面,这些方法载基因或药物量很低,进入体内后结合的稳定性差,往往难以实现有效的靶向治疗。选择合适的药物载体以及研制出适合的载药技术是解决问题的关键。②超声微泡定位释放基因或药物的机制、超声辐照参数和微泡剂量对细胞膜结构的影响及分子机制尚未明确。明确这些机制将有助于设计最优化的靶向超声微泡造影剂,并可对基因或药物的靶向释放过程进行精确控制,以

提高治疗的准确性、有效性。③超声纳米造影剂在体内的显影效果还有待提高。④靶向超声微泡在体内的靶向性较差。

随着纳米级超声造影剂、高分子材料超声造影剂等新型造影剂制备材料和方法的不断完善以及各种高灵敏度超声造影技术的发展,超声分子影像学必将会在肝癌等肿瘤的早期诊治中做出巨大贡献。

[参考文献]

- [1] Jiang XJ, Ren CP. Molecular imaging and its applications. Chinese Bulltin of Life Sciences, 2005, 17(5): 456-460.
蒋星军,任彩萍.分子成像及应用.生命科学,2005,17(5): 456-460.
- [2] Patel RM. Microbubble: a potential ultrasound tool in molecular imaging. Curr Pharm Biotechnol, 2008, 9(5): 406-410.
- [3] Zhu YF, Ran HT, Wang ZG, et al. Experimental study on preparation and enhancement effects of nano-lipid ultrasound-enhanced contrast agent. Chin J Ultrasonogr, 2008, 17(12): 1076-1078.
朱叶峰,冉海涛,王志刚,等.纳米脂质微泡超声造影剂制备及其显影效果的实验研究.中华超声影像学杂志,2008,17(12): 1076-1078.
- [4] Ran HT, Ren H, Wang ZG, et al. Production of a novel high molecular polymer ultrasound contrast agents and in vitro experiment. Chin J Ultrasonogr, 2005, 14(10): 774-776.
冉海涛,任红,王志刚,等.一种新型高分子聚合材料微泡超声造影剂的制备与体外显影实验.中华超声影像学杂志,2005,14(10): 774-776.
- [5] Willmann JK, Lutz AM, Paulmurugan R, et al. Dual-targeted contrast agent for US assessment of tumor angiogenesis in vivo. Radiology, 2008, 248(3): 936-944.
- [6] Oeffinger BE, Wheatley MA. Development and characterization of a nano-scale contrast agent. Ultrasonics, 2004, 42(1-9): 343-347.
- [7] Wang CX, Wang ZG. Treatment of ultrasound contrast agents for gene or drug delivery. Chin J Interv Imaging Ther, 2006, 3(4): 306-308.
汪朝霞,王志刚.超声微泡造影剂携基因或药物治疗研究.中国介入影像与治疗学,2006,3(4): 306-308.
- [8] Zhai GL, Jiang Z, Wu W, et al. The effects of ultrasound irradiation microbubble agent in angiogenesis and VEGF expression of subcutaneous H22 hepatoma of mice. Modern Medical Journal, 2006, 34(3): 157-160.
翟光林,姜藻,吴巍,等.超声辐射微泡对小鼠皮下 H22 肝癌移植瘤血管生成及 VEGF 表达的影响.现代医学,2006,34(3): 157-160.
- [9] Shi L, Jiang Z, Wu W, et al. Inhibition of SMMC-7721 transplantation tumor after low frequency ultrasound radiate microbubble and mechanism. Chin J Med Imaging Technol, 2006, 22(5): 8-11.
石林,姜藻,吴巍,等.超声辐照微泡抑制 SMMC-7721 移植瘤的实验研究及其作用机制探讨.中国医学影像技术,2006,22(5): 8-11.

- [10] Caruso G, Valentini B, Salvaggio G, et al. Ultrastructural biologic effects of sonography with pulse inversion and microbubble contrast in rabbit liver. *J Clin Ultrasound*, 2005, 33(3): 106-111.
- [11] Kheirolomoom A, Dayton PA, Lum AF, et al. Acoustically-active microbubbles conjugated to liposomes: characterization of a proposed drug delivery vehicle. *J Control Release*, 2007, 118(3): 275-284.
- [12] Yang CJ, Wang ZG, Lai TX, et al. Study on cytotoxic effect and acute toxicity of self-made paclitaxel-carrying lipospheres. *Chin J Ultrasound Med*, 2006, 22(7): 481-483.
杨春江, 王志刚, 赖天霞, 等. 载紫杉醇脂质微气泡体内外毒性实验研究. 中国超声医学杂志, 2006, 22(7): 481-483.
- [13] Nie F, Xu HX, Lv MD, et al. Murine transplanted hepatocarcinoma treated with HSV-TK plasmid delivered by microbubble ultrasound exposure: experimental study. *Chin J Ultrasound Med*, 2008, 24(5): 399-402.
聂芳, 徐辉雄, 吕明德, 等. 超声介导微泡造影剂促进 HSV-TK 基因转染抑制小鼠肝癌移植瘤的实验研究. 中国超声医学杂志, 2008, 24(5): 399-402.
- [14] Reynolds AR, Moein Moghimi S, Hodivala-Dilke K. Nanoparticle-mediated gene delivery to tumour neovasculature. *Trends Mol Med*, 2003, 9(1): 2-4.
- [15] Tartis MS, McCallan J, Lum AF, et al. Therapeutic effects of paclitaxel-containing ultrasound contrast agents. *Ultrasound Med Biol*, 2006, 32(11): 1771-1780.
- [16] Ran HT, Ren H, Wang ZG, et al. Research on fabrication of high molecular polymer ultrasound contrast agent for drug delivery. *J Ultrasound in Clin Med*, 2005, 7(4): 217-220.
冉海涛, 任红, 王志刚, 等. 包裹阿霉素的高分子材料微泡声学造影剂制备及显影效果实验研究. 临床超声医学杂志, 2005, 7(4): 217-220.
- [17] Rapoport N, Gao Z, Kennedy A. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(14): 1095-1106.
- [18] Bryant TH, Blomley MJ, Albrecht T, et al. Improved characterization of liver lesions with liver-phase uptake of liver-specific microbubbles: prospective multicenter study. *Radiology*, 2004, 232(3): 799-809.
- [19] Dietrich CF, Ignee A, Trojan J, et al. Improved characterization of histologically proven liver tumors by contrast enhanced ultrasonography during the portal venous and specific late phase of SHU 508A. *Gut*, 2004, 53(3): 401-405.
- [20] von Herbay A, Vogt C, Willers R, et al. Real-time imaging with the sonographic contrast agent SonoVue: differentiation between benign and malignant hepatic lesions. *J Ultrasound Med*, 2004, 23(12): 1557-1568.

《中华临床医师杂志(电子版)》征稿、征订启事

《中华临床医师杂志(电子版)》由国家卫生部主管, 中华医学会主办, 是中国科技论文统计源期刊, 中国科技核心期刊。月刊, 国内刊号 CN 11-9147/R, 邮发代号 80-728, 以电子版、纸版导读同时面向全国公开出版发行, 被万方数据、中国知网、美国化学文摘等数据库全文收录。

本刊辟有述评、专家笔谈、临床研究、实验研究、综述、短篇论著、临床经验、病例报告、视频讲座、疑难病例讨论等栏目, 欢迎全国医务工作者投稿。本刊审稿高效, 对国家重大项目、各基金项目、手术视频录像、专家讲座等, 优先录用刊登。本刊特别欢迎图片影像资料丰富的优秀稿件, 欢迎广大临床医师积极投稿并订阅杂志!

投稿信箱 北京市 100035-50 信箱 编辑部 收 邮编 100035

电子邮箱 Lcdoctor@163.com 网址 www.clinicmed.net

电话 010-62219211 传真 010-62234701