

◆综述

Advance of ultrasound microbubbles contrast agent in gene therapy of tumors

WANG Xing^{1,2}, RAN Hai-tao^{1,2*}

(1. Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Department of Ultrasonography, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] In recent years, gene therapy has become a hot spot in the treatment of tumors. The development of effective and targeted gene delivery system is the key to gene therapy of tumors. As a new type of gene carrier, ultrasound microbubbles have broad prospects in this field. The application and process of ultrasound microbubbles in gene therapy of tumor were reviewed in this article.

[Key words] Microbubbles; Contrast media; Neoplasms; Gene therapy

超声微泡造影剂在肿瘤基因治疗中的进展

王 星^{1,2} 综述, 冉海涛^{1,2*} 审校

(1. 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学附属第二医院超声科, 重庆 400010)

[摘 要] 基因治疗是近年来肿瘤治疗的热点, 高效且具有良好靶向性的基因运载系统则是肿瘤基因治疗的关键。作为一种新型基因运载工具, 超声微泡造影剂在基因治疗中具有广阔的发展前景。本文对超声微泡造影剂在肿瘤基因治疗中的应用及进展进行综述。

[关键词] 微泡; 造影剂; 肿瘤; 基因疗法

[中图分类号] R445.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-8475(2011)02-0137-04

肿瘤是严重威胁人类健康的疾病之一, 但传统治疗肿瘤的方法对人体均存在一定的不良反应。目前治疗肿瘤的方法有了较大改善, 基因治疗成为近年来肿瘤治疗的研究热点, 但其靶向转导、基因转导效率、基因表达的长效性、稳定性以及安全性能有待提高, 临床需要一种安全、无创、有效、靶向性的新型基因运载系统。近年来, 微泡造影剂联合超声辐照在解决这方面问题中显示出了一定的潜力^[1], 有望在肿瘤基因治疗

中发挥重要作用。

1 超声微泡造影剂在肿瘤基因治疗中的机制

肿瘤基因治疗通过将特定遗传物质转入患者特定的靶细胞, 达到治疗相应肿瘤的目的。基本的基因治疗包括: ①基因导入, 即将基因或含有基因的载体导入细胞内; ②靶向传递, 即使基因从导入部位进入靶细胞核内; ③基因表达, 即形成目的基因产物。要完成有效的基因治疗, 载体的选择以及基因的靶向传递尤为重要。目前常用的基因载体为病毒载体和非病毒载体。病毒载体转染效率较高, 但具有免疫原性和致突变性; 质粒、脂质体等非病毒载体安全性较高, 但转染效率低。寻找能兼顾转染效率和安全性能的新型基因载体成为迫切需要。Lawrie 等^[2]研究表明, 超声辐照可使裸露 DNA 对血管内皮细胞的转染率提高 10 倍; 若联合使用微泡造影剂, 又可再提高 300 倍, 表明微泡造影剂联合超声辐照可以实现有效的基因转化, 为肿瘤基

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30770565)、重庆市科技攻关项目(CSTC, 2009AB5216)。

[作者简介] 王星(1986—), 女, 四川达州人, 在读硕士。研究方向: 肿瘤分子显像与靶向基因治疗。E-mail: wangxing0624@yeah.net

[通讯作者] 冉海涛, 重庆医科大学超声影像学研究所, 400010; 重庆医科大学附属第二医院超声科, 400010。E-mail: rht@163.com

[收稿日期] 2010-10-27 [修回日期] 2011-01-05

因治疗开辟了新的思路。

相对于其他载体,超声微泡造影剂的一个重要优势在于基因表达和传输仅出现在超声辐照的区域,而不会出现在非靶向细胞、组织中^[3]。肿瘤基因治疗成功的关键是外源基因在细胞和组织内的有效转染与表达,而细胞膜通透性的改变是基因转染的前提。已证实单独使用超声辐照可以增加细胞膜的通透性,而联合使用微泡具有很重要的增强效应。1996 年,Miller 等报道,作为一种空化核,微泡在超声波的作用下发生压缩和膨胀,呈非线性背向散射;当声能达到一定强度时,微泡可被瞬间击碎,空化效应产生的休克波会使局部毛细血管和邻近组织细胞膜的通透性增高,细胞外大分子即可进入细胞,被细胞捕获。空化效应分两种:①稳态空化:可发生于低强度的超声声场,空化泡沿其平均半径做周期性、非线性振荡运动,在振动过程中引发辐射压力和微射流,影响其周围的细胞、生物大分子等,产生一定的生物学效应;②瞬态空化:在高强度超声作用下,空化泡急剧膨胀和收缩,引起气泡爆裂,使大量声能瞬间释放,引起细胞结构、微生物和机体等的损伤和破坏。Hallow 等^[4]的实验结果表明,瞬时空化在提高基因转染效率中起到主要作用,瞬态空化引起空化微泡破裂,释放出强大的能量,继而引发多种生物效应,促成声孔形成。细胞膜出现短暂的可逆的小孔,使细胞外大分子进入细胞并被细胞捕获的现象称为声孔效应(sonoporation)。基因疗法中,声孔效应可能成为成功注入基因的基础。作为一种新型基因载体,微泡造影剂在超声辐照下可增加细胞膜的通透性,提高局部基因的浓度,达到靶向基因治疗的目的。

2 超声微泡造影剂在肿瘤基因治疗中的进展

2.1 超声微泡造影剂与基因结合方法的进展 欲将微泡造影剂成功应用于肿瘤基因治疗,其与基因结合的方法十分重要。目前常用的方法有两种:一是将微泡与裸基因或基因载体直接混合;另一种是将基因包裹在微泡的内部,或使其与微气泡外壳相结合。将微泡制备成为基因载体后,既可经外周血管注入体内,又可在超声引导下将基因与微泡载体直接注入病变区,待其到达靶组织后,用超声照射靶区破坏微泡,使其内部及表面结合的基因物质在局部释放出来。带正电荷的微泡外壳(蛋白质或阳离子脂质体)可通过静电吸附作用而将带负电荷的质粒 DNA 吸附到微泡表面,微泡充当载体,可将部分基因带入到靶细胞或靶组织中。然而要达到治疗效果必须注入大剂量的微泡,而这种微泡携带基因的量相当有限。为克服这一问题,有学

者^[5]利用多层微泡,即采用层-层吸附(LbL)法将基因和多聚赖氨酸(PLL)分层吸附在自制的脂质超声微泡造影剂上,以期提高载基因的量。李巧等^[6]采用机械振荡法及分层吸附法制备出载重组腺病毒 Ad-EGFP/HIF-1 α 的脂质超声微泡造影剂,结合了腺病毒基因转染效率高和超声微泡靶向性的特点,是一种新的探索。Ren 等^[7]采用机械振荡法制备载基因及穿膜肽的脂质超声造影剂,载基因及穿膜肽的效率高,可作为携带基因等生物活性物质的载体材料,为超声靶向微泡破裂基因释放技术的发展开辟了新思路。Kheirrolomoom 等^[8]通过亲和素-生物素系统连接脂质体与微泡,有望达到高效、靶向载基因的目的。Hauff 等^[9]将质粒 DNA 包裹在可生物降解的微泡内,不仅可保护质粒 DNA,还可提高质粒 DNA 的携带量。以上研究对解决载基因量和转染效率低的问题进行了一些新的探索,但这些问题仍是微泡在基因治疗中的瓶颈,尚待进一步研究。

2.2 肿瘤基因治疗联合超声微泡造影剂的进展 基因的有效转染是肿瘤基因治疗成功的关键。大量研究表明,超声诱导下的微泡造影剂可提高基因转染率。张群霞等^[10]发现超声破坏微泡造影剂可促进报告基因 G-半乳糖苷酶质粒在 QGY 细胞的转染。聂芳等^[11]用微泡造影剂联合超声辐照介导的绿色荧光蛋白质粒转染小鼠肝癌细胞,转染效率较高且对组织无损害。Suzuki 等^[12]用一种新型的脂质微泡介导荧光素基因转染小鼠腹水瘤细胞,其效率有明显提高。Lentacker 等^[13]采用亲和素-生物素方法制作的微泡携带质粒 DNA 在人肝癌细胞的转染效率得到提高,并减缓了肝癌细胞的生长。

目前常用的并可与超声微泡造影剂联合的肿瘤基因治疗方法有以下几种。①自杀基因疗法:又称为基因介导的酶前药物治疗(gene-directed enzyme pro-drug therapy, GDEPT),即向肿瘤细胞内导入某些细菌、病毒和真菌的基因,可使低毒或无毒的药物前体转变为细胞毒性药物,从而选择性地杀伤肿瘤。Aoi 等^[14]的研究表明,超声定位辐照下的单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)自杀基因微泡对小鼠皮下肿瘤的抑瘤效果较好。朱元方等^[15]报道,载自杀基因 Fcy: Fur 的微泡在超声辐照下对卵巢癌皮下移植瘤有较好的抑瘤效果,提示以超声辐照下的微泡作为自杀基因载体在肿瘤治疗中有一定应用前景。②抗肿瘤新生血管形成疗法:新生血管形成在肿瘤的生成与转移中发挥重要的作用,该疗法通过抑制促进肿瘤血管生成的

因子(如 VEGF)达到抗肿瘤的目的。Kou 等^[16]给予针对 VEGF 受体的小分子干扰 RNA(siRNA)后发现 VEGF 受体表达减少,肿瘤血管生成减慢。可以运用超声联合微泡造影剂靶向到血管内皮因子受体,抑制肿瘤血管生长,从而达到抑制肿瘤生长的目的。③基因替代疗法:利用载体将缺失的抑癌基因转染肿瘤细胞,达到杀伤肿瘤细胞的目的。唐艳等^[17]报道超声联合微泡造影剂携 p53 基因转染宫颈癌 HeLa 细胞不仅产生 G1 期阻滞、抑制宫颈癌细胞生长,还可增强基因转染效率,表明微泡造影剂作为新载体可用于基因替代疗法,并有一定效果。④反义基因疗法:根据碱基互补的原则,用人工合成或生物体表达的特定 DNA 或 RNA 片段(反义核酸)来抑制或封闭特定靶基因的技术。Tong 等^[18]选择合适的 Survivin 反义位点,并转染入胃癌细胞株 MNK-45,结果显示实验组 Survivin RNA 和蛋白水平均明显下降,部分肿瘤细胞出现凋亡的特征性改变。Cao 等^[19]用超声微泡造影剂增强反义 mRNA 在神经胶质瘤细胞的转染,使表达蛋白水平显著降低,表明此法可在一定程度上抑制肿瘤细胞的生长。超声诱导下的微泡造影剂可穿过细胞膜屏障,提高基因的转染效率,在一定程度上为临床肿瘤基因治疗奠定了基础;但相对于目前运用较多的基因载体(腺病毒和脂质体),其转染效率仍较低。微泡造影剂的重要优势在于在超声辐照的区域进行基因转染,在靶区编码的蛋白有可能达到生物学效应,起到治疗作用^[20]。

3 问题与展望

目前研究^[21-22]表明微泡造影剂是一种极具潜力的基因载体,但这些研究基本停留在细胞和动物实验阶段,进入临床应用前尚需要解决许多问题。首先是载基因效率低,如何提高载基因的量是微泡运用于基因治疗待解决的关键问题;其次是靶向性与安全性需要提高,有待于新型低频脉冲聚焦超声定位缓释系统的改进与超声辐照参数的优化;再次为靶基因的筛选问题,肿瘤是多基因、多阶段的复杂过程,选择有效的靶基因非常重要,根据不同的肿瘤类型,选择适当的基因载体是肿瘤基因治疗成功的基础。随着以上问题的解决,超声微泡造影剂将在肿瘤基因治疗中发挥更大作用,有望改进肿瘤的临床治疗。

[参考文献]

[1] Hussein GA, Pitt WG. Micelles and nanoparticles for ultrasonic

- drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(10):1137-1152.
- [2] Lawrie A, Briskin AF, Francis SE, et al. Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery. *Gene Ther*, 2000, 7(23): 2023-2027.
- [3] Hernot S, Klibanov AL. Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(10):1153-1166.
- [4] Hallow DM, Mahajan AD, McCutchen TE, et al. Measurement and correlation of acoustic cavitation with cellular bioeffects. *Ultrasound Med Biol*, 2006, 32(7):1111-1122.
- [5] 汪朝霞, 王志刚, 许川山, 等. 一种载基因及多聚赖氨酸的脂质超声微泡造影剂制备的实验研究. *中国超声医学杂志*, 2009, 25(2): 101-104.
- [6] 李巧, 王志刚, 冉海涛, 等. 载重组腺病毒 Ad-EGFP/HIF-1 α 的超声造影剂的制备及其特性检测. *中国超声医学杂志*, 2009, 25(12):1105-1108.
- [7] Ren JL, Wang ZG, Zhang Y, et al. Transfection efficiency of TDL compound in HUVEC enhanced by ultrasound-targeted microbubble destruction. *Ultrasound Med Biol*, 2008, 34(11):1857-1867.
- [8] Kheirloom 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.
- [9] Hauff P, Seemann S, Reszka R, et al. Evaluation of gas-filled microparticles and sonoporation as gene delivery system: feasibility study in rodent tumor models. *Radiology*, 2005, 236(2):572-578.
- [10] 张群霞, 王志刚, 冉海涛, 等. 超声微泡促进肿瘤细胞报告基因转染. *临床超声医学杂志*, 2005, 7(2):78-80.
- [11] 聂芳, 徐辉雄, 吕明德, 等. 微泡造影剂联合超声辐照介导的绿色荧光蛋白质粒转染小鼠肝癌的实验研究. *中国超声医学杂志*, 2007, 23(2):95-97.
- [12] Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, et al. Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles. *J Control Release*, 2008, 125(2):137-144.
- [13] Lentacker I, Vandenbroucke RE, Lucas B, et al. New strategies for nucleic acid delivery to conquer cellular and nuclear membranes. *J Control Release*, 2008, 132(3):279-288.
- [14] Aoi A, Watanabe Y, Mori S, et al. Herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy using nano/microbubbles and ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, 2008, 34(3):425-434.
- [15] 朱元方, 张丽平, 汤雄文, 等. 超声辐照载 Fcy::Fur 自杀基因微泡治疗卵巢癌移植瘤的实验研究. *激光杂志*, 2009, 30(3):79-80.
- [16] Kou R, SenBanerjee S, Jain MK, et al. Differential regulation of vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR) revealed by RNA interference: interactions of VEGFR-1 and VEGFR-2 in endothelial cell signaling. *Biochemistry*, 2005, 44(45):15064-15073.

- [17] 唐艳,熊正爱,李攀,等.超声联合微泡造影剂携 p53 基因转染宫颈癌 HeLa 细胞的实验研究.第三军医大学学报,2009,31(23):2323-2326.
- [18] Tong QS, Zheng LD, Chen FM, et al. Selection of optimal anti-sense accessible sites of survivin and its application in treatment of gastric cancer. Ward J Gastroenterol, 2005,11(5):634-640.
- [19] Cao H, Cao Y, Wang Z, et al. Obstructive effects of ultrasonic microbubble intensifier on CHG-5 cell with survivin antisense oligonucleotides transfection. Chin J Cancer Res, 2008,20(2):85-89.
- [20] Leong-Poi H, Kuliszewski MA, Lekas M, et al. Therapeutic arteriogenesis by ultrasound-mediated vegf165 plasmid gene delivery to chronically ischemic skeletal muscle. Circ Res, 2007,101(3):295-303.
- [21] 刘佳,张萍,刘政,等.不同参数的超声辐射力对微泡造影剂的作用.中国医学影像技术,2010,26(2):225-227.
- [22] 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.中国医学影像技术,2004,20(3):356-358.

《中国医学影像技术》杂志 2011 年征订启事

《中国医学影像技术》杂志于 1985 年创刊,是由中国科学院主管,中国科学院声学研究所主办的国家级学术期刊,主编为李坤成教授、姜玉新教授。刊号:ISSN 1003-3289,CN 11-1881/R。是中国科技核心期刊、中国科学引文数据库核心期刊、《中文核心期刊要目总览》收录期刊、中国精品科技期刊、荷兰《医学文摘》收录源期刊、英国《科学文摘》收录源期刊、俄罗斯《文摘杂志》收录源期刊、波兰《哥白尼索引》收录源期刊。

《中国医学影像技术》杂志刊登放射、超声、核医学、介入治疗、影像技术学、医学物理与工程学等方面的基础研究及临床实验研究最新成果,信息量大、发刊周期短,注重医、理、工相结合,是影像医学发展和学术交流的良好平台,本刊论文是医学影像专业人员晋升中、高级职称和完成硕士、博士学业的重要依据,也是图书馆必备的学术刊物。

《中国医学影像技术》为月刊,160 页,大 16 开本,彩色印刷。单价 20 元,全年定价 240 元。订户可随时向当地邮局订阅,邮发代号 82-509;亦可向编辑部直接订阅,免邮寄费(欢迎通过银行转账,附言栏请注明订阅杂志名称)。

联系电话:010-82050373/4 传真:010-82050373/4-800

E-mail: cjmit@mail.ioa.ac.cn 网址: www.cjmit.com

编辑部地址:北京市海淀区罗庄南里宏嘉丽园 1-301 邮编:100191

银行账户名:《中国介入影像与治疗学》期刊社 账号:91170 1548 0000 0660

开户行:上海浦东发展银行北京知春路支行 联系人:孟辰凤

