

UTMD 技术的研究进展及其在糖尿病治疗中的应用

姜思屹 冷晓萍 胡程程 纪欢

摘 要 超声靶向微泡破坏技术(UTMD)作为最新的物理性质靶向基因递送系统,其与病毒载体相比,更具有无毒性、安全性,具有非常广阔的应用前景。近年来,越来越多的研究证实,在血管、骨骼肌、心脏、肺、肝脏等多组织多脏器中,UTMD 技术能够成功的介导基因的转染。本文从 UTMD 技术通过将指定基因转染到胰腺组织及相关受累靶器官中从而达到靶向治疗的效果,对其在糖尿病治疗中的最新研究进展及治疗潜力进行综述。

关键词 UTMD 技术 糖尿病 基因治疗 微泡

中图分类号 R4 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.03.041

近年来随着对特定组织、器官进行局部治疗的研究日益深入,目前已有多种不同递送技术可进行分子水平治疗^[1]。超声微泡作为最新的递送载体,与病毒载体相比,具有无毒、安全、靶向等特征。UTMD 技术指将载基因的靶向微泡注入体内,用超声探头定位于靶向组织,用不同声强的超声波定时爆破,释放载基因质粒,使基因局部高表达,从而发挥治疗作用。大量相关研究肯定了 UTMD 作为无创靶向递送方法的价值^[1,2]。UTMD 可向靶组织、靶器官定向递送并释放药物或基因等相关物质,从而可以改善局部微环境、促进干细胞归巢^[3-5]。近来,越来越多研究者认为在血管、骨骼肌、心脏、肺、肝脏及其他组织中,UTMD 技术是成功的递送物质方法。

糖尿病是由于体内胰岛素绝对或相对缺乏导致持续高血糖而引起的代谢性疾病,其发生率高,终身患病,难治愈,疾病进展到终末期会累及全身多个脏器甚至衰竭,严重影响患者的生活质量^[6]。对于糖尿病治疗的研究从传统药物治疗到胰岛素替代治疗,再到胰腺移植、胰岛再生,不断经历革新与换代。近年来也有相关研究证明 UTMD 介导药物或基因转染治疗糖尿病及糖尿病并发症。现就 UTMD 技术介导基因转染治疗糖尿病及其并发症的研究进展进行综述。

一、UTMD 技术的研究进展

基因载体目前常用的有病毒载体与非病毒载体,

与病毒载体相比,微泡作为一种新型的非病毒载体,因其制备过程简单、无免疫原性、载基因量大、目的基因转染率高等众多优点,成为装载转染基因的最佳非病毒载体选择。微泡发展初期仅用于超声造影对疾病进行的诊断进行辅助补充,但随着对超声微泡应用研究的进展,涉猎的方向与范围逐步扩大,而参与到治疗领域更是广泛关注与研究。

因 UTMD 可提高外源性基因转染到靶组织及靶器官的效率,且无毒性、无免疫原性,是基因转染的理想载体选择。无论体内还是体外,与裸质粒转染基因相比,UTMD 与质粒联合可以显著提高转染率。现已成功应用于多项体内、外实验研究中。UTMD 技术处于迅速发展阶段,目前主要应用于心脏、肾脏、血管、肝脏、肿瘤等方面的研究,无论体内、体外实验都呈现出良好的生物学性质,降低了系统给药的风险性。

近年来,随着分子水平治疗方法的进展,通过促进血管再生、血管重建、恢复心功,逐渐成为治疗缺血性心肌病的研究热点。肿瘤生长的畸形生长往往依赖其周围小动脉,目前介入治疗只限于针对管径较大的血管,对肿瘤微循环效果有效。在抗肿瘤的治疗中,UTMD 可提高基因或者药物的靶向性,提高局部浓度,增加局部疗效,减少全身反应^[2]。

在其他方面,Shen 等^[7]通过门静脉注射,成功完成了超声微泡介导基因在肝脏的表达。在眼角膜细胞实验中,Sonoda 等也得出了联合 UTMD 与单纯质粒 DNA 基因转染至离体培养的角膜细胞相比,明显 UTMD 介导基因转染效率更高的结论。视网膜的检查数据显示,UTMD 联合 rAAV2-EGFP 治疗组蛋白表达最强,转染的视网膜神经节细胞数目显著升高。

基金项目:黑龙江省教育厅海外学人科研基金资助项目(1252HD015)

作者单位:150086 哈尔滨医科大学(姜思屹、胡程程、纪欢);
150086 哈尔滨医科大学附属第二医院(冷晓萍)

通讯作者:冷晓萍,教授,博士生导师,电子信箱:lengxiaoping@hotmail.com

Takahashi 等报道使用声学微泡传递基因到脊椎。Suzuki 等报道了新型含全氟丙烷惰性气体的纳米级微泡,同样具备载体的生物学特性。Negishi 等报道联合超声纳米微泡,siRNA 可直接进入细胞质,还可转染 siRNA 到胫骨肌肉导致基因沉默。此外,超声微泡介导转染 siRNA 还可应用于骨髓间充质干细胞,继而用于转基因干细胞治疗中。

二、糖尿病治疗的研究现状

现如今糖尿病的治疗主要是抗糖尿病药物以及胰岛素替代治疗,主流一线药物有磺脲类、格列酮类、二甲双胍类等,而胰岛素替代治疗是传统药物治疗的重要补充。经过数年的研究,各类降糖药物的不良反应也比较明确,如磺脲类引起体重增加现象,格列酮类药物心血管事件发生率升高,而胰岛素只能注射,不能口服,患者比较痛苦与不便,价格较贵,易引起患者血糖过低。而诱发急性心脑血管突发事件,加快糖尿病慢性并发症进程,诱发或加重患者自主神经功能障碍等。由于不能重建正常的血糖调控,反而加重病情进展,导致各种严重并发症的出现。随着 DPP-4 抑制剂西格列汀、GLP-1 类似物靶点药物利拉鲁肽、G 蛋白偶联受体激动剂、钠-葡萄糖共转运蛋白 2 (SGLT2)、蛋白酪氨酸磷酸酶-1B (PTP-1B)、葡萄糖激酶 (GK) 等新型靶向药物不断被发现,相应靶向药物逐渐从实验阶段走入临床应用,给糖尿病治疗带来了希望^[8]。

2014 年引发糖尿病的关键基因 Tpcn2 被发现,相继出现了胰腺、胰岛移植等替代疗法,虽然体外、体内实验有一定疗效,但由于供体受体来源不足,外科手术、麻醉、预防感染等技术难度、及免疫排斥和长期免疫抑制疗法的限制,限制了其在临床应用中的发展^[9]。

基因治疗是将外源基因转染到质粒中通过媒介导入靶细胞内,在靶细胞中表达,来弥补、纠正靶细胞的基因缺陷或附加一个新生物学特性。基因治疗是否成功取决于外源基因能否安全有效的导入靶细胞、靶组织,整合到细胞内,参与调控和表达。

三、UTMD 技术在促进胰岛素分泌中的应用

尽管药物治疗能够对糖尿病治疗取得一定疗效,但最新疗法胰腺移植或 β 细胞再生致力于补充 β 细胞的绝对或相对的不足。此前有研究针对分子水平治疗法进行过许多研究,发现 ANGPTL8 是源于肝脏和脂肪组织的一种可促进胰腺 β 细胞增生的内分泌激素,但体内实验发现它可导致严重高甘油三酯代

谢。Chen 等^[10]通过 UTMD 技术在大鼠胰腺内靶向转染 ANGPTL8 的基因,1 个月后观察发现大鼠体内胰腺 β 细胞明显增生,而且并未引起高甘油三酯血症。而最新研究在正常大鼠中应用 UTMD 技术进行基因治疗可以促进胰腺胰岛增生。结合前文,UTMD 技术应用于糖尿病治疗是行之有效且具有广阔前景的。UTMD 技术在不应用病毒载体的情况下,使基因靶向转染进入代谢障碍的胰腺组织中。UTMD 还可以靶向递送各种生物低分子,如 GLP-1 递送至心脏和肝脏^[11]。

在此前研究中,将人类胰岛通过门静脉移植如肝脏,通过 UTMD 技术,使人类血管内皮生长因子 (VEGF) 这才肝组织中过度表达,导致新血管形成的增加,改善移植胰岛的功能。这提供了胰岛细胞移植可能是治疗糖尿病有效疗法的线索,其中 UTMD 可以无害的靶向递送基因至胰腺胰岛起到类似调节 β 细胞功能的作用。

为了改善 β 功能,Chen 等做了大量相关实验,证实通过 UTMD 技术可以成功递送含有大鼠胰岛素启动子 (RIP) 基因的质粒至胰岛 β 细胞。在接受 RIP 荧光素酶标记质粒的动物中,利用 UTMD 破坏技术递送质粒过程中,可以通过血糖有效地调控基因的暴露。另外,该研究组向成年大鼠递送人-RIP-胰岛素质粒导致循环系统中人-C 反应蛋白增高、血糖水平降低。递送 RIP-己糖激酶-I 质粒导致己糖激酶 I 蛋白在胰岛中表达增高,血糖水平增高。他们的研究报道经静脉静进入的携带质粒 DNA 的微泡利用超声能量在胰腺组织内被破坏,可以使携带改良大鼠胰岛素启动因子 RIP3.1 基因的质粒在 β 细胞中完成局部表达。

四、UTMD 技术在糖尿病并发症中的应用

1. 糖尿病心肌病:糖尿病心肌病是在糖尿病疾病进展过程中引起心肌代谢和结构异常病理改变,是常见慢性并发症。Zhao 等应用 UTMD 技术靶向递送成纤维细胞生长因子 (aFGF) 至大鼠心肌组织,有效的改善了糖尿病心肌病大鼠左心室舒张功能。Liu 等^[12]研究表明, Nox2 可以改善 PI_3K/AKT 和 PKC/Rho 信号转导途径的 COL I 和 III 合成,改善糖尿病心肌病大鼠心肌纤维化。Chen 等采用 UTMD 技术利用携带 NeuroD1 基因的靶向微泡治疗糖尿病大鼠,可使体内胰岛再生,血糖水平、胰岛素、C 蛋白得到调节。

2. 糖尿病肾病:目前超声靶向治疗已经成为糖尿病肾病的研究热点。Leong-Poi 等^[13]认为 UTMD 技

术不仅可以早期诊断糖尿病肾病,还可以监测糖尿病肾病发病机制。Wu 等^[14]将 SDF-1 基因共价偶联至绿色荧光标记的微泡上,经静脉注射,超声靶向爆破释放,24h 时检测骨髓外源性间充质干细胞归巢数量,来评价归巢效果,结果证实 UTMD 介导 SDF-1 可促进糖尿病肾病大鼠的间充质细胞归巢。Chen 等观察由 STZ 引起肾脏损伤的 DM 大鼠,一组敲除 Smad7 基因,一组采用 UTMD 介导 Smad7 基因释放,发现基因缺失组大鼠的蛋白尿、肾脏纤维化及炎症反应更明显、肾脏损伤更重,其机制是 TGF- β /Smad2/3 和细胞核 κ B 因子信号转导途径活跃所致,得出结论:超声介导 Smad8 基因可以通过阻断 TGF- β /Smad2/3 和细胞核 κ B 因子信号转导途径达到治疗糖尿病肾病的效果。

3. 糖尿病骨骼肌缺血: Sanches 等^[15]曾在非糖尿病鼠缺血骨骼肌进行基因转染研究,结果显示 UTMD 技术可明显提高骨骼肌内基因转染水平。对糖尿病鼠缺血骨骼肌的研究也在进行中,但目前还未见国外权威杂志报道。

4. 糖尿病鼠生殖功能障碍(ED): ED 在糖尿病患者中发生率较高,目前治疗 ED 首选药物治疗,但在糖尿病患者中,西地那非等治疗效果很差。Gou 等在 STZ 诱导糖尿病大鼠模型中,通过 UTMD 技术介导内皮祖细胞(EPCs)增加其转染率和靶向性可以提高 EPCs 治疗大鼠 ED 的疗效。

五、展 望

已有的 UTMD 技术相关实验均证明了其提高基因转染效率,能满足作为基因载体的生物学特性需求,但是超声靶向微泡仍有不足之处。有研究报道,超声和微泡可引起心率慢、肾脏损伤,且基因转染效率与微泡浓度、超声强度、DNA 微泡比值、辐照参数的选择有关,而这些参数的最优值也正在摸索中,以期能获得最优参数来取得更高转染率和更低的细胞死亡率^[16,17]。

总之,UTMD 可增强细胞膜通透性,增加对高分子的摄取,可靶向递送寡核苷酸、蛋白质及质粒等,且具有无创、可重复性好、操作简单等优点,通过 UTMD 技术,可降低系统给药的药物毒性,增强基因转染的同时,减少全身反应。UTMD 介导的各类细胞及组织基因转染的研究中,转染率差异很大,影响转染率的因素很复杂,除基因种类、细胞种类、细胞状态的影响外,超声声能、微泡种类、微泡浓度、微泡所含气体种类、超声辐照时间等多种因素均可影响转染率。空化

效应是 UTMD 主要机制之一,但它同时能产生负面的生物学效应,只有在适宜的超声参数和微泡剂量下才能完成基因转染的同时,降低对细胞的损伤。目前大量动物实验已经证实微泡可以作为基因转染的载体进行基因治疗,但要应用到人体内,仍需要开展大量实验和研究来评估其效率和安全性。

参考文献

- Wan C, Qian J, Li F, *et al.* Ultrasound - targeted microbubble destruction enhances polyethylenimine - mediated gene transfection in vitro in human retinal pigment epithelial cells and in vivo in rat retina [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2):1246 - 1253
- Kopechek JA, Carson AR, Mctiernan CF, *et al.* Ultrasound targeted microbubble destruction - mediated delivery of a transcription factor decoy inhibits STAT3 signaling and tumor growth [J]. *Theranostics*, 2015, 5(12):1378 - 1387
- Xiang X, Tang Y, Leng Q, *et al.* Targeted gene delivery to the synovial pannus in antigen - induced arthritis by ultrasound - targeted microbubble destruction in vivo [J]. *Ultrasonics*, 2016, 65:304 - 314
- Xue Y, Yang G, Wang C, *et al.* Effects of shRNA - Mediated SOX9 inhibition on cell proliferation and apoptosis in human HCC cell line Hep3B mediated by ultrasound - targeted microbubble destruction (UTMD) [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 73(2):1 - 6
- Ginter E, Simko V. Type 2 diabetes mellitus, pandemic in 21st century [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 771:42 - 50
- Herman WH. The economic costs of diabetes: is it time for a new treatment paradigm? [J]. *Diabetes Care*, 2013, 36(4):775 - 776
- Chen S, Bastarrachea R A, Roberts B J, *et al.* Successful β cells islet regeneration in streptozotocin - induced diabetic baboons using ultrasound - targeted microbubble gene therapy with cyclinD2/CDK4/GLP1 [J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(7):1145 - 1151
- 康银花. 国外 2 型糖尿病治疗部分新药的临床研发动态 [J]. *中国新药杂志*, 2013(19):2262 - 2267
- Tsaih SW, Holl K, Jia S, *et al.* Identification of a novel gene for diabetic traits in rats, mice, and humans [J]. *Genetics*, 2014, 198(1):17 - 29
- Chen J, Chen S, Huang P, *et al.* In vivo targeted delivery of AN-GPTL8 gene for beta cell regeneration in rats [J]. *Diabetologia*, 2015, 58(5):1036 - 1044
- Chen S, Chen J, Huang P, *et al.* Myocardial regeneration in adriamycin cardiomyopathy by nuclear expression of GLP1 using ultrasound targeted microbubble destruction [J]. *Biochemi Biophys Res Commun*, 2015, 458(4):823 - 829
- Liu Y, Zhang J. Nox2 contributes to cardiac fibrosis in diabetic cardiomyopathy in a transforming growth factor - β dependent manner [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9):10908 - 10914
- Leong Poi H. Contrast ultrasound and targeted microbubbles: diagnostic and therapeutic applications in progressive diabetic nephropathy [J]. *Semin Nephrol*, 2012, 32(5):494 - 504
- Wu S, Li L, Wang G, *et al.* Ultrasound - targeted stromal cell - derived factor - 1 - loaded microbubble destruction promotes mesenchy-

- mal stem cell homing to kidneys in diabetic nephropathy rats[J]. *Int J Nanomed*, 2014, 9(1):5639–5651
- 15 Sanches P G, Mühlmeister M, Seip R, *et al.* Ultrasound – mediated gene delivery of naked plasmid DNA in skeletal muscles: a case for bolus injections[J]. *J Control Release*, 2014, 195:130–137
- 16 Buiocchi EB, Miller RJ, Hartman E, *et al.* Transthoracic cardiac ultrasonic stimulation induces a negative chronotropic effect[J]. *IEEE Transactions on Ultrasonics Ferroelectrics & Frequency Control*, 2012, 59(12):2655–2661
- 17 Zhang CB, Cao HL, Li Q, *et al.* Enhancement effect of ultrasound – induced microbubble cavitation on branched polyethylenimine – mediated VEGF(165) transfection with varied N/P ratio[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2013, 39(1):161–171
- (收稿日期:2017–02–23)
(修回日期:2017–03–13)

盘点 2017 年糖尿病治疗的临床营养实践及研究进展

李融融 肖新华

摘 要 随着糖尿病诊治水平的显著提高,营养治疗的观念和临床实践也在不断进步和更新。本文将总结 2017 年糖尿病治疗的临床营养实践及研究进展。美国糖尿病学会、美国膳食与营养学会均在不断更新糖尿病领域营养干预的实践指导。妊娠期糖尿病的合理营养处置也在学术界不断得到认识的更新。营养研究方面,良好的生活方式干预对于糖尿病人群治疗的重大社会经济学意义仍是研究的关切。此外,更多的研究基于多学科交叉,与表观遗传学、精准医学相结合、关注营养在疾病早期病理机制中的意义。

关键词 糖尿病 妊娠期糖尿病 营养 研究 进展

中图分类号 R587.1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.03.042

医学营养治疗(medical nutritional therapy, MNT)是糖尿病治疗的重要措施,包括个体化营养评估、营养诊断和营养计划制定。这个概念由美国糖尿病学会(American Diabetes Association, ADA)于 1994 年率先提出,明确了糖尿病临床治疗过程中营养治疗的重要性与其工作流程^[1]。此后随着药物治疗在不断推陈出新,营养治疗的观念和临床实践也在不断进步和更新。MNT 在糖尿病预防、治疗及并发症防治的重要地位,日益为大家所认识。笔者将盘点 2017 年糖尿病治疗领域临床营养的相关实践及研究进展。

一、糖尿病医学营养治疗的实践进展

2017 年 ADA 再次更新及发布了糖尿病诊疗标准指南(Standards of Medical Care in Diabetes——2017),进一步强调并重申了合理营养干预对于糖尿病患者治疗的重要性^[2]。指南强调并推荐所有糖尿病患者都应接受由营养(医)师、内分泌医生、护士、药师、心理学家等在内的医疗团队给予的综合照顾及管理,膳食指导及生活方式改善也是患者长期自我教育(diabetes self management education, DSME)不可或

缺的部分,应始终贯穿于治疗的所有阶段^[3–5]。在饮食方式和宏量营养素分配方面,指南认为,地中海饮食、DASH 饮食、低血糖指数饮食、低碳水化合物饮食等多种膳食模式可能都适用于糖尿病,且碳水化合物、蛋白质和脂肪的供能比例并非固定不变,宏量营养素的分配应根据总热量摄入和代谢目标进行个体化调整。

指南建议对处方胰岛素治疗或使用胰岛素泵的 1 型糖尿病和 2 型糖尿病患者,应教育患者使用碳水化合物计数法,并估计脂肪和蛋白质的克数,以决定餐时胰岛素的剂量,改善血糖控制^[2]。对于每天应用固定胰岛素剂量或胰岛素促泌剂的患者,应保持稳定的碳水化合物摄入规律可以减少低血糖风险。建议碳水化合物来自于全谷类、蔬菜、水果、豆类和奶制品,特别是纤维较高和血糖指数/负荷较低的食物^[6–8]。蛋白质在不升高血糖水平的同时可增加胰岛素应答。因此膳食和加餐中增加蛋白质摄入并不能预防或治疗低血糖。脂肪摄入方面,富含单不饱和脂肪酸的地中海式饮食结构可能对血糖控制和心血管危险因素有益,所以应推荐为低脂高碳水化合物饮食结构的一个有效替代。由于心血管系统的远期获益,推荐富含长链 ω–3 脂肪酸,如富含脂肪的鱼类(EPA 和 DHA)及坚果和种子(ALA)的食物。

作者单位:100730 北京,中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院营养科

通讯作者:肖新华,电子信箱:xiaoxh2014@vip.163.com