

超声靶向微泡破坏在肿瘤基因治疗中的应用现状及研究进展

张波 王琳萍

〔作者简介〕 张波,中日友好医院主任医师,教授,博士生导师。现任中国医师协会浅表超声专业委员会副主任委员、北京抗癌协会甲状腺专业委员会副主任委员。擅长小器官及浅表超声,主要从事甲状腺疾病超声临床及基础研究。主持完成课题15项,其中国家自然科学基金资助项目2项(面上项目1项、学部主任基金资助项目1项)、北京市自然科学基金资助项目(面上项目)、北京协和医学院学科建设(专项建设)项目1项、处在研究阶段7项;作为第二负责人完成国家自然科学基金资助项目(面上项目)、中华人民共和国教育部博士点基金等课题5项,其中2项目目前处在研究阶段。培养硕士生5名。主编、参编书籍12部。以第一作者及通讯作者身份发表科研学术论文40余篇。

摘要 实体肿瘤是致死的最主要原因之一。随着基因编辑工具和生物信息学的快速发展,基因疗法在肿瘤治疗中发挥着重要作用,然而缺乏安全有效的基因传递技术成为了基因治疗最大的瓶颈。超声靶向微泡破坏技术(ultrasound-targeted microbubble destruction, UTMD)增强基因传递效率且侵袭性低、特异性强,是一种很有前景的基因递送策略。本文对 UTMD 在肿瘤基因治疗的应用现状及研究进展进行综述并提出展望。

关键词 超声靶向微泡破坏技术 基因治疗 肿瘤

中图分类号 R4 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.04.001

2000年人类基因组测序完成标志着分子医学的新时期,新时期的医学发展趋势主要为基因检测和分子治疗。基因治疗领域的科学家在改善基因导入协同和载体方面付诸了大量的努力,新思路、新技术和新方法层出不穷。目前,关于基因导入载体有两大主流:一是非病毒载体系统,劣势为安全性差;二是病毒载体系统,劣势为转染低效性。纳米医学技术的产生和发展为提高非病毒性载体的转染率带来了曙光。非病毒载体和人工载体的深入研究将成为基因治疗的重要策略。

一、基因治疗及超声靶向微泡破坏技术概述

1. 基因治疗:基因治疗是将外源性基因导入病变组织,从功能上取代有缺陷的基因或产生相应的生物学效应。目前已成功应用于多种遗传病以及获得性疾病的临床前研究试验,包括肿瘤、神经退行性疾病和心血管疾病^[1]。

2. 纳米级超声造影剂:随着对细胞和组织特异性分子标记理解的进步,功能化微泡也得到了发展,目

前用于靶向分子成像的研究。当微泡暴露在超声波下时,它们会发生体积振荡,并再次辐射出二次声响应,其振幅明显高于同等大小的刚性球体产生的散射。因此,它们比红细胞产生更强的回声,使它们能够作为血池(blood pool)试剂使用。此外,即使在中等超声压力下,微泡振荡也可能是高度非线性的,由此产生的辐射信号中的谐波含量可用于实现更高的组织对比度^[2]。

超声造影剂已由游离微泡(用于右心系统显像)、包裹空气的微泡、包裹氟碳类气体的微泡发展到了包裹惰性气体的靶向性超声造影剂(targeted ultrasound contrast agents, tUCAs), tUCAs 可分为微米级 tUCAs 和纳米级 tUCAs(一般为 450 ~ 700nm),通常认为直径 < 700nm 的超声造影剂可以通过肿瘤组织的高通透性及滞留效应(即 EPR 效应)实现血管外成像。

目前,纳米级超声造影剂根据成膜材料主要分为以下3类:(1)高分子聚合物类:以多于4个碳原子为全氟烷液体形式作为内核,且以聚合物和天然大分子为主,包括聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)、聚L-乳酸(PLLA)、聚己内酯(PCL)等,其优点是易于制备、粒径均一、穿透力和稳定力强,适用于延迟成像

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7192152)

作者单位:100029 中日友好医院(张波);100730 中国医学科学院/北京协和医学院(王琳萍)

通讯作者:张波,电子信箱:zora19702006@163.com

和聚集显像,通过修饰和改性可实现药物缓释,是目前报道最多的一种纳米级超声造影剂。但需要较强的超声能量才能使其发生有效的振动,这可能引发细胞溶解、毛细血管破裂等不良生物反应。(2)脂质类:纳米脂泡造影剂为内含惰性气体成分(包括氟碳气体或者氟硫气体),外为脂质成分构成的声学造影剂,在超声激励下增强效率较低,但气体包裹率高,多用于携带靶向药物治疗和基因转染;纳米级脂质造影剂是在制备脂质体的基础上进行改造,使其内部含有许多小的气体囊泡,常用的包括饱和与不饱和的磷脂酸、磷脂酰胆碱、乙醇胺和胆固醇等,以及包括一些化学成分(如生物素、荧光和聚乙二醇等)修饰后的对应物质。超声显像效果介于上述两种纳米级超声造影剂之间,适用于递送药物和多模态显像,安全无毒,可用于临床。(3)无机纳米材料类:二氧化硅及纳米金等,具有良好的组织相容性、生物稳定性及较高的反应活性,可用于多模态成像,实现对肿瘤的诊疗一体化。

3. 超声靶向微泡破坏技术:超声与微泡不仅能够进行声学成像,还可以实现基因与药物的靶向递送。在活体内,将靶向微泡偶联或包载基因/药物,在特定部位发射不同声强的超声波,达到基因/药物的定点释放,当超声强度足够大时血液中的微泡发生破裂,通过产生微射流、冲击波使周围的血管壁或细胞膜表面出现可逆的或不可逆的穿孔,使血管内皮屏障损伤,进而增加血管通透性,增加外源性物质到达特定部位的剂量,从而发挥相应的生物学效应。UTMD的可能机制包括空化效应及其二级效应、内吞作用与声辐射力及活性氧促 Ca^{2+} 内流等方面^[3]。UTMD所产生的空化效应和致死性声孔效应可直接导致肿瘤细胞发生裂解死亡,这为UTMD直接治疗肿瘤提供了理论依据。

4. 基因传递系统:基因转染技术系统包括病毒传递系统和非病毒传递系统。以病毒为载体时基因转染率虽高但安全性差,且易引起机体产生免疫反应。Carlo等^[4]开发了一种基因转移方法,该方法结合了脂质包裹的全氟化碳微泡和超声波来保护人类腺病毒并将其传递至目标组织。以质粒、脂质体等非病毒为载体的基因转染,虽具有生物安全性和成本效率优势,但转染率低、靶向性差,存在适用范围受限和有创等缺点。Zhang等^[5]开发了一种新型壳聚糖结合的脂质微泡,它具有良好的生物相容性和较高的基因负载能力,结合UTMD可促进安全高效的基因体外转

染和体内靶向基因传递的潜力。

二、UTMD 在肿瘤基因治疗中的应用

靶向微泡作为载体与UTMD联合,不仅保留了UTMD非侵入性、可重复性、时空靶点特异性、低免疫原性和毒性的优点,还可进一步增强传递的靶向性并改善UTMD难以控释的不足。1998年,Price等首次报道了UTMD与纳米粒在活体动物模型上的联合应用。2008年,Lentacker等首次报道UTMD成功介导载基因纳米粒的转染,该研究表明聚乙二醇化纳米粒可保护核酸免受核酸酶的影响,从而实现超声靶向基因或siRNA的递送。

从本质上来讲,肿瘤是一种基因病,其发生、发展与复发均与基因的变异、缺失、畸形相关。随着人类基因组计划的顺利实施和完成,以及新的人类疾病基因的发现和克隆,肿瘤的基因治疗已成为备受瞩目的研究领域并初步取得令人振奋的成果,针对肿瘤的特异性分子靶点设计肿瘤治疗方案,是肿瘤靶向治疗中最有前景的方案。

UTMD在肿瘤组织中的应用较为成熟,在导致人类死亡的重要疾病实体肿瘤中,新生成的肿瘤微血管的内皮细胞之间存在间隙,管壁的最大孔径为380~780nm,因此,部分粒径较小的纳米超声造影剂穿透肿瘤血管壁,实现肿瘤细胞的靶向显像和治疗。在微泡表面装配上对肿瘤新生血管内皮具有特异识别能力的分子探针,构建成肿瘤的特异性载基因/药超声靶向微泡,可高效地靶向结合于肿瘤血管内皮,对肿瘤进行早期诊断,结合UTMD技术可提高肿瘤治疗的特异性和靶向性。

微泡作为超声造影剂的发展为超声在临床中的应用开辟了新道路,同时也提供了众多探索新兴领域的研究机会。一些实验开发的应用已经应用于临床实践,欧洲联盟已经发布了关于它们的使用指南,特别是在肝脏中。近年来,UTMD联合载基因纳米粒已在多种肿瘤的细胞与动物实验中获得了良好的治疗效果,包括肝癌、胰腺癌、结肠癌、肾细胞癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、胶质瘤、鳞状细胞癌等(表1)。UTMD联合纳米粒在心血管疾病、视网膜疾病、中枢神经系统疾病的治疗领域也展现出了一定的潜力^[6-10]。

三、展 望

超声靶向微泡破坏技术在肿瘤治疗中已成为一种新型的基因/药物传递方法,且取得了许多积极的治疗效果。然而目前研究多停留于细胞和动物实

表 1 UTMD 在肿瘤基因治疗中的应用

疾病	递送基因	治疗	目标对象	结果及生物学意义
肝癌	HIF-1 α shRNA ^[11]	UTMD + TAE	Wistar 大鼠	明显沉默 HIF-1 α 和 VEGF 表达,抑制肿瘤生长
	NET-1 siRNA ^[12]	UTMD	BALB/c 雌性裸鼠	UTMD 递送方法改善了 NET-1 siRNA 的抗肿瘤作用
	siRNA ^[13]	UTMD + siCCAT2	小鼠	CCAT2-FOXM1 可能成为治疗肝癌的新靶点
	shRNA ^[14]	UTMD + 脂质体	HepG2 细胞	提高脂质体转染效率,抑制生存素表达,诱导 HepG2 细胞凋亡
	DNA ^[15]	UTMD + 肝素化	小鼠	基因转移的肝肿瘤选择性提高 4000 倍
胰腺癌	miR-21 ^[16]	Gem-Au DENPs/ miR-21i	SW1990 细胞	促进协同递送
结肠癌	miR-122 ^[17]	UTMD	裸鼠	可作为在体内导入肿瘤的有效工具
前列腺癌	人腺病毒 DNA ^[4]	UTMD	小鼠	微泡介导的人腺病毒传递不会引起先天和适应性免疫应答
	miR-205 ^[18]	UTMD + 顺铂	PC-3 细胞	增强顺铂对前列腺癌细胞的毒性
	ABCG2-Ad.tCCN1- CTV-m7 ^[19]	UTMD + BI-97D6	裸鼠、Hi-Myc 小鼠	诱导细胞凋亡和肿瘤生长抑制
	siRNA ^[20]	UTMD + Cav1.3	肿瘤移植小鼠	E ₂ 上调了 Ca ²⁺ 内流中 Cav1.3 的表达,促进了 p-ERK1/2 的表达,促进了细胞增殖
乳腺癌	miR-133a ^[21]	UTMD	MCF-7、MDA-MB-231 细胞	使肿瘤体积减小,生存率增加
	siEFGR ^[22]	UTMD + CPP	TNBC 细胞	实现高效的 TNBC 治疗
	ABCG2-siRNA ^[23]	UTMD + PEAL	MCF-7/ADR 细胞	增强递送,在体外细胞中介导 siRNA 转染
卵巢癌	shRNA ^[24]	UTMD	A2780/DDP	介导转染,抑制生存素基因表达,诱导卵巢癌细胞凋亡
胶质瘤	siRNA ^[25]	UTMD	裸鼠	可能是 siRNA 现胶质瘤微创治疗的理想载体
鳞状细胞癌	STAT3 诱骗物 ^[26]	UTMD	SCC 小鼠	增加传递,诱骗物可以抑制 STAT3 信号转导和肿瘤生长

验阶段,缺乏应用于大型动物模型的相关报道,在向临床转化的道路上尚有许多问题有待解决,如肿瘤的发生、发展过程、UTMD 介导物质传递、超声对纳米粒的作用以及纳米粒如何解离的机制尚未明确;优化参数的过程较为复杂;超声微泡的应用存在安全问题,除微泡在血液循环中可能引起微栓塞和毒性外,空化效应的潜在危险性也不容忽视,以上问题均限制了临床前实验的推广性,故当前的研究主要关注提高基因转染效率及改善靶向性、生物相容性、提升负载量、多模态成像等方面。有研究者制备了经 PEI-600 修饰并涂有 iRGD 肽和抗 CCR-2 抗体的双靶向阳离子微泡 (MBiRGD/CCR-2),该微泡具有良好的稳定性、包载率及靶向性,具有促进基因转染的潜在价值。近年来出现了大量关于磁性微泡发展的研究,Chertok 等^[27]将肝素化的磁性纳米颗粒偶联到蛋白功能化的微泡表面,制备了具有强磁性和声学活性的循环稳定磁性微泡 (MagMB),MagMB 在循环系统中可以避开肺的截留,并且磁靶向可使其积聚在肿瘤血管内,通过超声监测并在需要时通过超声进行破坏。在此基础上,通过对磁声信号的实时监测,可以调整磁声靶向药物以增强其靶向性。Li 等^[28]构建了 MBs@CS/PB/DNA 的多功能基因传递体系,通过光热疗法与

UTMD 协同增效基因转染。结果表明,MBs@CS/PB/DNA 在体内外均能显著增强超声成像效果,表现出优异的生物相容性,使其有望进一步探索成为超声成像、光热治疗、药物递送、基因治疗的联合平台。Liu 等^[29]成功制造了多功能叶酸靶向和载氧/吲哚菁脂质纳米颗粒 (FA-OINPs),用于卵巢癌细胞和皮下异种移植模型的双模式成像引导治疗,FA-OINPs 被证明是极具潜力的超声和光声 (US/PA) 成像造影剂,可增强 US/PA 的体内外成像能力。结果提示在 US/PA 双模成像的指导下,光动力/光热介导的 FA-OINPs 为卵巢癌的协同治疗提供了一种有前途的策略。

综上所述,高效表达载体和适用于临床的基因转移方法是决定基因治疗成功的基础。优势互补的多模态成像与诊疗一体化在综合评价肿瘤诊疗方面能够发挥巨大作用,是超声靶向微泡破坏技术运用于肿瘤基因诊疗中的必然发展趋势。随着超声靶向微泡破坏技术和基因治疗技术的深入研究,相关作用机制将会逐渐明确,可以预期 UTMD 联合基因治疗肿瘤技术最后的成功,将使其更好地服务于临床,对医学界产生深远的影响。

参考文献

1 Jun W, Li RK. Ultrasound-targeted microbubble destruction in gene

- therapy: a new tool to cure human diseases[J]. *Genes Dis*, 2017, 4(2):64-74
- 2 Lajoinie G, Cock ID, Coussios CC, *et al*. In vitro methods to study bubble-cell interactions: fundamentals and therapeutic applications [J]. *Biomicrofluidics*, 2016, 10(1):011501
 - 3 邹朋林, 陈惠莉, 郑林丰, 等. 超声靶向微泡破坏与载药/载基因纳米粒联合应用的生物物理学机制及应用研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(4):789-793
 - 4 Carlo FD, Thomas L, Brooke B, *et al*. Microbubble-mediated delivery of human adenoviruses does not elicit innate and adaptive immunity response in an immunocompetent mouse model of prostate cancer [J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1):19-33
 - 5 Zhang H, Tu JW, Liao YY, *et al*. Chitosan-conjugated lipid microbubble combined with ultrasound for efficient gene transfection [J]. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2018, 32(4):982-987
 - 6 Qian L, Thapa B, Hong J, *et al*. The present and future role of ultrasound targeted microbubble destruction in preclinical studies of cardiac gene therapy[J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(2):1099-1111
 - 7 Jin H, Li DY, Chernogubova E, *et al*. Local delivery of miR-21 stabilizes fibrous caps in vulnerable atherosclerotic lesions[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(4):1040-1055
 - 8 Du J, Sun Y, Li FH, *et al*. Enhanced delivery of biodegradable mPEG-PLGA-PLL nanoparticles loading Cy3-labelled PDGF-BB siRNA by UTMD to rat retina[J]. *J Biosci*, 2017, 42(2):299-309
 - 9 Jones RM, Deng L, Leung K, *et al*. Three-dimensional transcranial microbubble imaging for guiding volumetric ultrasound-mediated blood-brain barrier opening [J]. *Theranostics*, 2018, 8(11):2909-2926
 - 10 Lipsman N, Meng Y, Bethune AJ, *et al*. Blood-brain barrier opening in Alzheimer's disease using MR-guided focused ultrasound[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):2336-2344
 - 11 Liao Y, Luo H, He Z, *et al*. A combination of UTMD-Mediated HIF-1 α shRNA transfection and TAE in the treatment of hepatic cancer[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 16:1-8
 - 12 Liang X, Wu B, Shang H, *et al*. VTIQ evaluates antitumor effects of NET-1 siRNA by UTMD in HCC xenograft models[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3):2893-2902
 - 13 Chen F, Bai G, Li YH, *et al*. A positive feedback loop of long non-coding RNA CCAT2 and FOXM1 promotes hepatocellular carcinoma growth[J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(7):1423-1434
 - 14 He Y, Rong YN, Wang G, *et al*. Ultrasound-targeted microbubble destruction promotes lipofectamine-mediated shRNA-survivin transfection efficiency thereby inhibiting survivin expression and inducing apoptosis of HepG2 cells[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2017, 10(11):15140-15150
 - 15 Chertok B, Langer R, Anderson DG. Spatial control of gene expression by nanocarriers using heparin masking and ultrasound-targeted microbubble destruction[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(8):7267-7278
 - 16 Lin L, Fan Y, Gao F, *et al*. UTMD-promoted co-delivery of gemcitabine and miR-21 inhibitor by dendrimer-entrapped gold nanoparticles for pancreatic cancer therapy[J]. *Theranostics*, 2018, 8(7):1923-1939
 - 17 Wang TY, Choe JW, Pu K, *et al*. Ultrasound-guided delivery of microRNA loaded nanoparticles into cancer [J]. *J Control Release*, 2015, 203(2015):99-108
 - 18 Qin D, Li H, Xie H. Ultrasound targeted microbubble destruction mediated miR205 enhances cisplatin cytotoxicity in prostate cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(3):3242-3250
 - 19 BAQ SS, Shen XN, Das RD, *et al*. Therapy of prostate cancer using a novel cancer terminator virus and a small molecule BH-3 mimetic [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(13):10712-10723
 - 20 Ji Y, Han Z, Shao L, *et al*. Ultrasound-targeted microbubble destruction of calcium channel subunit α 1D siRNA inhibits breast cancer via G protein-coupled receptor 30[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(4):1886-1892
 - 21 Ji Y, Han Z, Shao L, *et al*. Evaluation of in vivo antitumor effects of low-frequency ultrasound-mediated miRNA-133a microbubble delivery in breast cancer[J]. *Cancer Med*, 2016, 5(9):2534-2543
 - 22 Jing H, Cheng W, Li S, *et al*. Novel cell-penetrating peptide-loaded nanobubbles synergized with ultrasound irradiation enhance EGFR siRNA delivery for triple negative breast cancer therapy[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 146(6):387-395
 - 23 Teng Y, Bai M, Sun Y, *et al*. Enhanced delivery of PEAL nanoparticles with ultrasound targeted microbubble destruction mediated siRNA transfection in human MCF-7/S and MCF-7/ADR cells in vitro [J]. *Int J Nanomed*, 2015, 10(2015):5447-5457
 - 24 Zhang Y, Chang S, Sun J, *et al*. Targeted microbubbles for ultrasound mediated short hairpin RNA plasmid transfection to inhibit survivin gene expression and induce apoptosis of ovarian cancer A2780/DDP cells[J]. *Mol Pharm*, 2015, 12(9):3137-3145
 - 25 Cai W, Lv W, Feng Y, *et al*. The therapeutic effect in gliomas of nanobubbles carrying siRNA combined with ultrasound-targeted destruction[J]. *Int J Nanomed*, 2018, 13(8):6791-6807
 - 26 Kopeček 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
 - 27 Chertok B, Langer R. Circulating magnetic microbubbles for localized real-time control of drug delivery by ultrasonography-guided magnetic targeting and ultrasound[J]. *Theranostics*, 2018, 8(2):341-357
 - 28 Li XD, Yue XL, Wang JR, *et al*. Prussian blue nanoparticle-loaded microbubbles for photothermally enhanced gene delivery through ultrasound-targeted microbubble destruction [J]. *Sci Bull*, 2016, 61(2):148-156
 - 29 Liu YJ, Chen SN, Sun JC, *et al*. Folate-targeted and oxygen/indocyanine green-loaded lipid nanoparticles for dual-mode imaging and photo-sonodynamic/photothermal therapy of ovarian cancer in vitro and in vivo [J]. *Mol Pharmaceut*, 2019, 16(10):4104-4120

(收稿日期:2019-12-03)

(修回日期:2019-12-16)