

超声微泡技术开放脑胶质瘤血-脑脊液屏障的研究进展

唐莉莉 朱正权 杨群英 夏海成

摘要 血-脑脊液屏障是脑胶质瘤综合治疗药物入脑最重要的屏障结构,超声微泡技术能够有效开放血-脑脊液屏障,具有无创、可逆等独特优势。笔者通过对国内外超声微泡技术增强血-脑脊液屏障通透性实现药物进入脑组织的相关文献进行研读,阐述了超声微泡技术开放血-脑脊液屏障的安全性及其在脑胶质瘤中的研究进展。

关键词 脑胶质瘤 超声 微泡 血-脑脊液屏障

中图分类号 R739.4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.08.004

脑胶质瘤是最常见的原发颅内恶性肿瘤,根据中国国家癌症中心发表的数据显示,脑胶质瘤在我国年发生率为(5~8)/10万,年病死人数高达3万,5年病死率在全身肿瘤中仅次于胰腺癌和肺癌,并且呈逐年上升的趋势。目前脑胶质瘤的标准治疗是以最大范围安全切除肿瘤为主,结合放疗、化疗等综合治疗,但其中恶性程度最高的胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)采用标准治疗的5年生存率仅9.8%。影响脑胶质瘤综合治疗效果的一个最重要因素就在于血-脑脊液屏障(blood-brain barrier, BBB),BBB对抗肿瘤药物进入脑肿瘤组织的限制,使得脑胶质瘤的综合治疗效果难以突破。

超声微泡技术是一种无创、靶向、暂时的增强超声聚焦区域BBB对药物渗透性的技术,可以快速提高脑实质中的血药浓度。微泡是一种超声造影剂,常用于临床提高超声图像分辨力。在超声波的作用下微泡可发生空化效应,增加BBB的通透性,增强药物递送效率。同时,微泡 also 具有良好的搭载能力,大量研究显示,利用超声微泡技术开放BBB之后,载药微泡可以在特定位置释放化学药物、基因片段、抗体,甚至可以向脑内递送干细胞^[1~3]。

一、BBB与血-肿瘤屏障

BBB主要由内皮细胞、紧密连接、基膜、周细胞、

星形胶质细胞足突构成,是位于中枢神经系统与循环系统之间的生理屏障。正常情况下,BBB仅允许相对分子质量小于(400~500)kDa、高脂溶性、无毒性、带正电的部分小分子物质通过,BBB的存在对维持中枢神经系统内环境的稳态和防止血液循环中有毒有害物质的侵入发挥着重要的作用。在脑胶质瘤中,BBB被肿瘤细胞破坏,其中侵入的胶质瘤细胞代替脑毛细血管内皮细胞发挥着类似的屏障功能,产生的新脉管系统被称之为血-肿瘤屏障(blood-tumor barrier, BTB)。脑胶质瘤的BTB与正常的BBB存在许多不同之处。BTB由高度增殖、形态异常的肿瘤毛细血管形成,这些肿瘤血管可能具有跨细胞蛋白的异常表达。此外,血管周围成分如肿瘤血管上的星形胶质细胞足突发生改变,这些异常改变为选择性开放肿瘤中的BTB而不影响正常BBB提供了靶点^[4]。

在GBM中,大多数血管周细胞是由胶质瘤干细胞(glioma stem cells, GSCs)分化而来,这些GSCs衍生的周细胞具有肿瘤特异性基因改变,可将其与正常周细胞区分开来^[5]。在原位GBM模型中,利用伊布替尼靶向干预GSCs来源的周细胞,可有效破坏BTB的紧密连接,增加血管通透性,并且伊布替尼与BTB通透性差的药物协同作用,可以提高GBM患者的化疗效果^[6]。

虽然BTB的渗透性高于BBB,但脑胶质瘤BTB的异质性和外排转运蛋白仍然可以限制药物向脑组织渗透^[7]。如何开放BBB,提高脑胶质瘤肿瘤组织中的血药浓度成为当今的研究热点。目前已有多种增强BBB渗透性的方法,例如:高渗溶液、缓激肽受体、药物脂化修饰、经细胞膜被动扩散途径、胞吞转

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(面上项目)(2020D01C202)

作者单位:830011 乌鲁木齐,新疆医科大学研究生院(唐莉莉);830000 乌鲁木齐,新疆医科大学第三附属医院(朱正权、杨群英、夏海成)

通信作者:夏海成,主任医师,硕士生导师,电子信箱:xiahaicheng@qq.com

运、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 结合盒外排转运蛋白转运、对流增强递送、直接向颅腔内注射或鼻腔给药、新型纳米颗粒辅助转运等,但这些方法均有其使用的局限性并没有在临床上广泛应用^[8]。与开放 BBB 的方法比较,超声微泡技术开放 BBB 具有靶向、暂时、可逆、无创等优势,在增加脑胶质瘤 BBB 渗透性方面具有良好的应用前景。

二、超声微泡技术开放 BBB 的机制

近年来,超声微泡技术对 BBB 通透性影响的机制研究显示,空化效应和机械效应是所有类型超声增强 BBB 通透性的基础机制。微泡的存在可降低超声开放 BBB 所需的能量,缩短超声辐照时间,降低超声引起组织损伤的风险。现将众多文献阐述的机制总结如下。

1. 空化效应:当一定声压的超声波作用于液体时,液体中微泡空化核发生振荡、膨胀、收缩和塌陷,在毛细血管壁上产生机械应力导致 BBB 紧密连接变宽,实现 BBB 的开放,此时血管的通透性明显增加,允许高达 2000kDa 的物质进入大脑微环境内^[9,10]。空化效应包括稳定空化和惯性空化。在 $0.3 \sim 3.0 \text{ W} \cdot \text{cm}^2$ 的低强度超声作用下,微泡进行稳定的振荡,称之为稳定空化,这是目前被大多数研究者认为开放 BBB 的主要机制之一;在 $>3.0 \text{ W} \cdot \text{cm}^2$ 强度的超声作用下,微泡剧烈膨胀、崩塌、破裂,称为惯性空化^[11]。惯性空化的微泡突然破裂,在周围液体中产生强烈的微流和微射流,可导致脑组织出血,神经元损伤,甚至坏死^[12]。在使用超声微泡技术开放 BBB 时,应选择低强度聚焦超声 (focused ultrasound, FUS),避免惯性空化的发生。

2. 机械效应:在微泡活化产生的机械效应作用下, BBB 的内皮细胞上的机械敏感性离子通道活化,生物学信号转导通路激活,周围细胞发生一系列变化,包括形态改变、通透性暂时增加和溶解等,这些效应可进一步增强药物转运和吸收,但同时也可引起细胞膜穿孔及红细胞外渗等^[13]。

3. 促进内吞:内皮细胞小窝 (caveolae) 是细胞质膜表面的囊状结构,主要介导物质跨膜的内吞转运和信号转导,维持 BBB 的通透性。小窝蛋白 (caveolin - 1) 是 BBB 血管内皮细胞上 caveolae 的主要标志蛋白。邓金木等^[14]研究发现, FUS 微泡技术可通过显著上调小鼠 caveolin - 1 的表达水平和 caveolae 的数量,来增强 caveolae 介导的内吞转运。Pandit 等^[15]研究也得出了类似的结论,并发现 FUS 联合微泡作用

后,野生小鼠组 500kDa 的葡聚糖渗漏量较 caveolin - 1 敲除小鼠组增加了 3.5 倍,但两组均未观察到 2000kDa 葡聚糖的渗漏,说明 FUS 联合微泡可促进 caveolae 对大分子物质的内吞转运,但转运物质的分子量是有限制的。这种 caveolae 介导的内吞转运途径可能与其他转运途径协同诱导 BBB 的开放。

4. 抑制外排、减少耐药作用:P - 糖蛋白 (permeability - glycoprotein, P - gp), 是 ATP 结合盒超家族编码的一类跨膜蛋白,是 BBB 上的最重要的外排转运蛋白之一,可主动将大部分药物转运出脑组织,减少神经毒性物质的蓄积,也是 BBB 上的主要耐药蛋白之一^[16]。该蛋白在 BTB 和肿瘤细胞的质膜上过度表达,和其他外排转运蛋白联合作用可导致肿瘤对多种治疗药物产生交叉耐药性。FUS 微泡技术通过激活 c - Jun 氨基末端蛋白激酶信号通路选择性抑制 P - gp 转录和翻译调节,并确定 0.5MPa 是抑制 P - gp 表达且无组织和血管损伤的最佳 FUS 参数^[17]。

5. 影响细胞旁途径:细胞旁途径指开放相邻血管内皮细胞之间的紧密连接。紧密连接蛋白 - 5 (claudin - 5)、闭锁小带蛋白 - 1 (zonula occluden 1, ZO1) 是紧密连接的关键性蛋白,在脑血管内皮细胞上高表达。在 FUS 微泡技术作用 BBB 后, claudin - 5、ZO1 的表达显著下降,同时已表达的 claudin - 5 不再沿内皮细胞膜聚集,但是 24h 后观察到这些蛋白表达和移位恢复正常,说明超声微泡技术开放细胞旁途径是可逆的^[14]。

三、超声联合微泡技术开放 BBB 的安全性评估

2001 年, Hynynen 等^[18]在动物实验中发现,静脉造影剂联合频率为 1.63MHz 的 FUS 可无创、靶向开放 BBB,在 6.3MPa 的超声压力下兔脑组织可出现血管壁损伤、组织坏死、缺血和细胞凋亡。通过多次实验发现降低声压可显著降低上述不良反应。该项研究成果为后续研究者进行大量 FUS 联合微泡开放 BBB 输送药物入脑的研究奠定了坚实的基础。根据超声强度高低, FUS 分为高强度 FUS 和低强度 FUS。高强度 FUS 可开放 BBB,但其明显的热效应可致组织凝固性坏死^[19]。低强度 FUS 的吸收系数小,组织损伤轻,热效应不明显。因此,低强度 FUS 联合微泡技术能更安全、有效地开放 BBB。大量的动物实验研究表明,低强度 FUS 联合微泡技术开放 BBB 具有良好的安全性和可逆性,但从理论上推测,不排除 BBB 过度开放导致并发症的可能,如出血、血管源性脑水肿、占位效应、神经功能缺损、甘露醇等脱水剂外渗导

致脱水治疗的反跳现象等。

2016年, Carpentier等^[20]给予GBM患者运用植入型脉冲超声系统(SonoCloud[®])联合微泡技术将卡铂递送入脑肿瘤组织,当声压为1.1MPa时,未发现不良反应,在人体试验中证实了植入型超声联合微泡开放BBB具有良好安全性和耐受性。2019年, Mehta等^[21]采用磁共振引导聚焦超声(MR-guided focused ultrasound, MRgFUS)联合微泡技术治疗阿尔茨海默病患者的Ⅱ期临床试验(NCT03671889)中,入组的3例患者成功完成了FUS诱导海马和内嗅皮层BBB开放,颅脑磁共振(contrast-enhanced magnetic resonance imaging, MRI)上即见周围静脉区域强化,24h后该强化区域逐渐消退,期间未观察到颅内出血和其他不良反应。这些研究表明,超声微泡技术开放BBB虽然存在红细胞外渗、组织损伤的不良反应,但通过控制超声和微泡参数在一定范围内,这些不良反应可以显著降低甚至规避。通过多次复查MRI证明,这些不良反应只存在于BBB开放的早期以及靶向区域。同时,在人体研究并没有发现神经功能缺失,证明超声微泡技术开放BBB是安全的。为了安全起见,在将FUS确定为常规临床程序之前,应通过MRI对其使用过程进行监测。

四、超声微泡技术开放BBB在脑胶质瘤中应用

1. 超声联合微泡在脑胶质瘤的综合治疗中的研究:临床前研究的结果显示,通过超声微泡技术开放脑胶质瘤的BBB产生了良好的药物递送效果。Dréan等^[22]将这项技术应用于静脉输送卡铂进入GBM荷瘤小鼠模型,发现卡铂联合FUS微泡技术可增加颅内卡铂渗透性4.2倍,无明显神经或全身毒性,提高了小鼠的生存期并显著延缓肿瘤生长速度。Wei等^[23]利用FUS联合微泡静脉输送依托泊苷使脑肿瘤组织中依托泊苷浓度增加了8倍,肿瘤体积增长降低了约45%,中位生存率增加了约30%。Zhang等^[24]在胶质瘤模型中研究利用低强度脉冲超声联合微泡静脉递送两种不同剂型的紫杉醇,结果发现两种制剂的紫杉醇在脑组织中的血药浓度分别提高了3倍、5倍。Ye等^[25]将FUS微泡技术应用于GL261的胶质瘤模型,通过鼻内给药的方式,成功将抗程序性细胞死亡配体1抗体(anti-programmed cell death-ligand 1 antibody, aPD-L1)输送入小鼠脑组织内,并且发现与单独鼻内给药比较,aPD-L1蓄积量增加3.74倍。

临床研究也证明超声微泡技术开放BBB后能够

提高脑胶质瘤患者脑实质血药浓度,增强化疗疗效,延长生存时间,且具有良好的安全性。2019年, Id-baih等^[26]发表的一项颅内低强度脉冲超声装置(sonocloud-1)联合静脉微泡和卡铂治疗复发GBM患者的单中心试验结果表明,MRI显示BBB无破坏或破坏不良($n=8$)患者的中位无进展生存期(progression-free survival, PFS)为2.73个月,中位总生存期(overall survival, OS)为8.64个月。BBB明显开放患者($n=11$)的PFS中位数为4.11个月,OS中位数为12.94个月,生存期比较差异有统计学意义,且未观察到卡铂相关神经毒性表现。超声微泡技术在中枢神经系统的研究已经从开放BBB到现在输送各种药物入脑组织,相对分子质量也从低分子药物发展到高分子药物(如紫杉醇的相对分子质量为853kDa)甚至抗体。

2. 超声联合微泡在脑胶质瘤荧光引导手术中的研究:脑胶质瘤呈浸润性生长,与周围正常脑组织分界不清,手术切除范围难以确定。应用荧光素钠(Sodium fluorescein, SF)在高级别脑胶质瘤中显影可以帮助确定肿瘤边界,在最大范围保全神经功能的前提下,最大范围切除肿瘤。但在弥漫性星形胶质瘤中SF无法显影,手术中难以确认肿瘤边界,容易造成肿瘤切除不足、残留过多或扩大切除后影响神经功能。

肿瘤切除程度与患者预后有着密切关系,早期、广泛切除可延缓弥漫性星形胶质瘤的肿瘤进展和恶变的时间。因此,亟需寻找一种能够安全、有效增加弥漫性星形胶质瘤BBB通透性的方法,让荧光显影剂能够进入其肿瘤组织中,帮助确定肿瘤边界。Anastasiadis等^[27]给予4例弥漫性胶质瘤患者应用FUS微泡技术治疗后,在MRI上观察到在手术计划切除的区域内出现新的信号增强区域,注射SF后,可以清楚地看到与新的信号增强区域一致的黄色荧光信号,与未经处理的非增强肿瘤组织比较,FUS微泡技术处理区域SF积累量增加了2.2倍($P<0.01$),说明SF可以在FUS微泡技术的作用下辅助弥漫性胶质瘤术中显影,但该研究并未证明新出现的对比增强区域开放的是BBB还是BTB。诊断超声在微泡的作用下也可增加BBB的通透性,促进BBB对药物的转运^[28]。

在一项回顾性研究中,利用SF联合超声造影进行手术的7例低级别胶质瘤患者中,有2例术中显影为黄色,5例为粉色,该研究中超声造影所需的造影剂即为微泡,说明在诊断超声和微泡的作用下,荧光

素钠可进入低级别胶质瘤组织并有助于手术边界显影。由于该研究未提及对诊断超声和微泡参数进行调节,可能将微泡爆破时对脑组织产生损伤,而且该研究的低级别胶质瘤样本数量少,未能证明诊断超声联合微泡增强通透性的是 BBB 还是 BTB,但给今后该技术用于开放低级别弥漫性胶质瘤的 BBB 或 BTB 的研究提供了参考。今后仍需开展大规模的临床试验来证明该技术的有效性和安全性。

综上所述,超声微泡技术能够无创、靶向、重复开放 BBB,能够将药物靶向递送至脑组织,在脑胶质瘤的综合治疗方面具有广泛运用前景。由于目前超声微泡技术的数据多来源于动物实验,人类颅骨对超声波的衰减作用,以及动物模型与人类的生理结构的不同,目前超声微泡技术应用于脑胶质瘤的临床治疗最佳参数尚不明确,还需进行更多的大规模临床试验予以进一步证实。此外,是否可以通过调节超声和微泡参数靶向开放 BTB,从而增强 SF 在弥漫性低级别胶质瘤的术中肿瘤边界显影效果或者增强术后化疗时脑组织中的血药浓度,还有待于深入研究。

参考文献

- 1 Stavarache MA, Petersen N, Jurgens EM, *et al.* Safe and stable non-invasive focal gene delivery to the mammalian brain following focused ultrasound[J]. *J Neurosurg*, 2019, 130(3): 989–998
- 2 Janowicz PW, Leinenga G, Götz J, *et al.* Ultrasound – mediated blood – brain barrier opening enhances delivery of therapeutically relevant formats of a tau – specific antibody[J]. *Sci Rep – UK*, 2019, 9(1): 1–9
- 3 Cui H, Zhu Q, Xie Q, *et al.* Low intensity ultrasound targeted micro-bubble destruction assists MSCs delivery and improves neural function in brain ischaemic rats[J]. *J Drug Target*, 2020, 28(3): 320–329
- 4 Watkins S, Robel S, Kimbrough I F, *et al.* Disruption of astrocyte – vascular coupling and the blood – brain barrier by invading glioma cells[J]. *Nat Commun*, 2014, 5(1): 1–15
- 5 Cheng L, Huang Z, Zhou W, *et al.* Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth[J]. *Cell*, 2013, 153(1): 139–152
- 6 Zhou W, Chen C, Shi Y, *et al.* Targeting glioma stem cell – derived pericytes disrupts the blood – tumor barrier and improves chemotherapeutic efficacy[J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(5): 591–603, e4
- 7 Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwińska K, *et al.* Physiology and pharmacological role of the blood – brain barrier[J]. *Pharmacological Reports*, 2008, 5: 24
- 8 朱明微, 刘鹏飞, 陈耀东, 等. 通过开放血脑肿瘤屏障治疗胶质母细胞瘤[J]. *实用肿瘤杂志*, 2020, 35(4): 371–377
- 9 Wang L, Zheng S. Advances in low – frequency ultrasound combined with microbubbles in targeted tumor therapy[J]. *J Zhejiang Univ – sc B*, 2019, 20(4): 291–299
- 10 Vince O, Peeters S, Johanssen VA, *et al.* Microbubbles containing lysolipid enhance ultrasound – mediated blood – brain barrier breakdown in vivo[J]. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10(3): 2001343
- 11 李倩, 杜丽娜. 聚焦超声联合微泡开放血脑屏障增强脑靶向递送

- 研究进展[J]. *药学报*, 2021, 56(3): 761–770
- 12 覃君芳, 李世勇, 任叶青. 超声联合微泡技术在开放血脑屏障中的研究进展[J]. *医学综述*, 2016, 22(12): 2371–2374
- 13 Husseini GA, Diaz de la Rosa MA, Richardson ES, *et al.* The role of cavitation in acoustically activated drug delivery[J]. *J Control Release*, 2005, 107(2): 253–261
- 14 邓金木. 聚焦超声联合微泡开放血脑屏障的机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2013
- 15 Pandit R. Role for caveolin – mediated transecytosis in facilitating transport of large cargoes into the brain via ultrasound[J]. *J Control Release*, 2020, 327(10): 667–675
- 16 徐艳艳, 梅紫薇, 任雅君, 等. 超声技术应用于脑疾病治疗的研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2020, 47(1): 16–21
- 17 Choi H, Lee EH, Han M, *et al.* Diminished expression of p – glycoprotein using focused ultrasound is associated with JNK – dependent signaling pathway in cerebral blood vessels[J]. *Front Neurosci – switz*, 2019, 13: 1350
- 18 Hynynen K, McDannold N, Vykhodtseva N, *et al.* Noninvasive MR imaging – guided focal opening of the blood – brain barrier in rabbits[J]. *Radiology*, 2001, 220(3): 640–646
- 19 傅晓凤, 司星, 朱江. 高强度聚焦超声技术临床应用研究进展[J]. *中国临床新医学*, 2021, 14(10): 1044–1048
- 20 Carpentier A, Canney M, Vignot A, *et al.* Clinical trial of blood – brain barrier disruption by pulsed ultrasound[J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(343): 343re2
- 21 Mehta RI, Carpenter JS, Mehta RI, *et al.* Blood – brain barrier opening with MRI – guided focused ultrasound elicits meningeal venous permeability in humans with early alzheimer disease[J]. *Radiology*, 2021, 298(3): 654–662
- 22 Dréan A, Lemaire N, Bouchoux G, *et al.* Temporary blood – brain barrier disruption by low intensity pulsed ultrasound increases carboplatin delivery and efficacy in preclinical models of glioblastoma[J]. *J Neuro – oncol*, 2019, 144(1): 33–41
- 23 Wei HJ, Upadhyayula PS, Pouliopoulos AN, *et al.* Focused ultrasound – mediated blood – brain barrier opening increases delivery and efficacy of etoposide for glioblastoma treatment[J]. *Int J Radiat Oncol*, 2021, 110(2): 539–550
- 24 Zhang DY, Dmello C, Chen L, *et al.* Ultrasound – mediated delivery of paclitaxel for glioma: a comparative study of distribution, toxicity, and efficacy of albumin – bound versus cremophor formulations[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(2): 477–486
- 25 Ye D, Yuan J, Yue Y, *et al.* Focused ultrasound – enhanced delivery of intranasally administered anti – programmed cell death – ligand 1 antibody to an intracranial murine glioma model[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(2): 190
- 26 Idhah A, Canney M, Belin L, *et al.* Safety and feasibility of repeated and transient blood – brain barrier disruption by pulsed ultrasound in patients with recurrent glioblastoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(13): 3793–3801
- 27 Anastasiadis P, Gandhi D, Guo Y, *et al.* Localized blood – brain barrier opening in infiltrating gliomas with MRI – guided acoustic emissions – controlled focused ultrasound[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(37): e2103280118
- 28 钟林宏, 祝兴宇, 张渝, 等. 超声联合微泡开放血脑屏障的研究进展[J]. *临床超声医学杂志*, 2021, 12(23): 934–937

(收稿日期: 2022–08–08)

(修回日期: 2022–09–10)