

Application of ultrasound targeted microbubble destruction in gene therapy of diabetes mellitus

ZHENG Zhiwei, ZHAO Yun, LIU Zhaoqi*

(Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

[Abstract] Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by hyperglycemia, resulting in chronic damage and dysfunction of many organs, such as the eyes, kidneys, heart, blood vessels, nerves, etc., which increase the difficulty of treatment for diabetes. In recent years, gene therapy for diabetes mellitus has become a hot topic. Ultrasound targeted microbubble destruction (UTMD) has the advantage of safety, good repeatability and tissue targeting, and has become a potential strategy for gene delivery. The related study progresses of UTMD in gene therapy of diabetes mellitus were reviewed in this article.

[Key words] Diabetes mellitus; Microbubbles; Gene therapy

DOI:10.13929/j.1672-8475.201712036

超声靶向破坏微泡在糖尿病基因治疗中的应用

郑智唯, 赵云, 刘朝奇*

(三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002)

[摘要] 糖尿病是以高血糖为特征的代谢性疾病,常伴有各种组织,特别是眼、肾、心脏、血管、神经慢性损害和功能障碍,为治疗带来困难。近年来,糖尿病的基因治疗成为热点。超声靶向破坏微泡(UTMD)安全性高、重复性好,组织靶向高,已经成为基因潜在传递方法。本文就 UTMD 技术及其在糖尿病基因治疗中的研究进展进行综述。

[关键词] 糖尿病;微泡;基因疗法

[中图分类号] R587.1; R454.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-8475(2018)06-0383-04

近年,超声靶向破坏微泡(ultrasound targeted microbubble destruction, UTMD)介导的基因递送具有安全性高、重复性好和组织靶向高的优点,在糖尿病治疗中已经取得很大进步,并有望用于临床。本文就 UTMD 技术及其在糖尿病基因治疗中的研究进展进行综述。

1 糖尿病的基因治疗

糖尿病是因胰岛素分泌缺陷、生物作用受损,或二者协同引起,并以高血糖为特征的代谢性疾病,现已经

成为继心脑血管疾病、癌症后威胁人类生命的第三大非传染性疾病。国际糖尿病联盟(International Diabetes Federation, IDF)2011 年调查结果显示,全世界糖尿病患者已达 3.66 亿,预计 2030 年将上升至 5.52 亿^[1]。现阶段对糖尿病的研究已取得了一系列进展。目前认为注射胰岛素是治疗糖尿病的有效方法^[2]。然而,注射外源性胰岛素及其类似物存在需多次注射、胰岛素无法自身按生理需求分泌及需密切监控等问题,故基因治疗受到逐渐关注。

针对因胰岛素缺乏导致的 1 型糖尿病的主要基因治疗策略如下:①直接导入胰岛素的替代基因,其首要原则是利用胰岛素原的 cDNA 替代缺乏的胰岛 β 细胞;由于以腺病毒为载体,其免疫原性缩短了基因的表达时间^[3],故其临床应用有限。②刺激 β 细胞再生。移植胰岛是治疗 1 型糖尿病的有效方法,但胰岛源稀

[基金项目] 国家自然科学基金(81473461)。

[第一作者] 郑智唯(1993—),男,安徽巢湖人,在读硕士。研究方向:超声介导靶向基因微泡对疾病的治疗。E-mail: 1548408533@qq.com

[通信作者] 刘朝奇,三峡大学医学院,443002。

E-mail: ctgulc@163.com

[收稿日期] 2017-12-19 **[修回日期]** 2018-03-21

缺及人体对异体器官的免疫排斥反应一直是器官移植的难题。研究^[4]发现,胰十二指肠同源异型盒基因 1 (PDX-1)蛋白是胰岛素基因转录的重要调节因子,在 β 细胞特异性启动子的控制下,PDX-1 过度表达有助于刺激胰岛细胞增殖。Xu 等^[5]发现补充 L-精氨酸可以通过激活蛋白激酶 B(AKT)和 PDX-1 来改善糖尿病大鼠后代的胰岛素敏感性和 β 细胞功能。Samson 等^[6]利用 PDX-1 促使内分泌细胞转变为胰岛细胞的能力来取代胰岛移植治疗 1 型糖尿病。③改善胰岛 β 细胞免疫应答,可治疗因免疫耐受缺失引起的胰岛 β 细胞受损导致的 1 型糖尿病。理论上基因疫苗可从根源上预防糖尿病的发生、发展,但其所引起的免疫应答在某些情况下可致病,即可能发生严重过敏反应^[7]。④提高胰岛 β 细胞对血糖浓度的敏感性,可治疗胰岛素抵抗导致的 2 型糖尿病。胰高血糖素样肽 1(GLP-1)是胰高血糖素原基因翻译后加工修饰的 L 细胞分泌的一种肠降血糖素,能诱导胰岛 β 细胞增殖和分化,促进葡萄糖依赖的胰岛素分泌,抑制胰高血糖素分泌,降低血糖水平^[8]。研究^[9]发现,胰腺 α 细胞衍生的胰高血糖素相关肽为 β 细胞适应和葡萄糖稳态所必需。现阶段 GLP-1 基因治疗主要是以腺病毒为载体的基因递送及电穿孔法,受限于其免疫原性和有创性及短半衰期,用于临床治疗依然存在困难。

糖尿病导致的一系列并发症,如糖尿病性视网膜病变^[10]、糖尿病心脏病、糖尿病肾病等的基因治疗也受到广泛关注。研究^[11]显示,通过局部维持肾素、血管紧张素系统之间的平衡,可以预防和逆转糖尿病性视网膜病变和其他糖尿病性微血管并发症,为治疗和预防糖尿病提供了新的思路。寻找特异的作用靶点,有效的治疗基因,合理的投递系统是目前基因治疗面临的首要任务。

2 UTMD 技术的应用研究

超声微泡造影剂的出现与发展开辟了超声无创诊断和治疗的新领域。超声微泡是一种生物可降解外壳包裹不同气体形成的球状物质,根据外壳材料的不同和包裹气体的差异,前后经历了 4 代的更新和发展,其稳定性不断增加,粒径不断降低,生物相容性越来越好。随着研究的深入,超声微泡造影剂不仅是一种超声显像对比剂运用于临床诊断,而且可作为药物、基因的载体用于疾病治疗。

近年来,靶向超声微泡以其精确的靶向性、高效的治疗作用、良好的临床应用前景^[12]而成为现阶段研究的热门。UTMD 是指携带药物或基因的超声微泡造

影剂到达特定组织时,利用低频率和高机械指数的间歇性超声击破微泡,将微泡携带的药物或目的基因释放出来,达到对病变部位进行靶向治疗的目的^[13-14]。研究^[15]表明,UTMD 介导基因传输主要与其产生的空化效应有关。微泡在超声波作用下产生振动,使细胞膜通透性增加,甚至产生可逆性小孔,促进细胞对基因或其他大分子物质的摄取,为靶向基因治疗提供了基础。与病毒载体相比,超声微泡具备的低免疫原性、可重复性和靶向性的特点,且 UTMD 可保护基因片段不被核酸酶降解和网状内皮系统清除,能在增加药物、基因传输,提高局部摄取的同时降低机体摄入总量,减轻全身毒副作用。

UTMD 介导的基因治疗是超声医学发展最快的领域之一,在心血管、肿瘤等研究领域已经取得一些成果。Zhang 等^[16]利用 UTMD 联合阳离子脂质(CMBs)微泡将 shPHD2 基因转染大鼠心肌细胞(H9C2)和缺血性心肌组织,发现 UTMD 联合 CMBs 可提高质粒 DNA 转染效率,通过 UTMD 转染 shPHD2 可有效下调 PHD2 基因,激活参与低氧反应途径的下游血管生成基因的表达,增强新血管生成,减少心肌细胞凋亡,从而改善大鼠心肌梗死模型的心室功能。UTMD 介导的基因治疗在宫颈癌、肝癌、前列腺癌等治疗方面均获显著效果;联合聚焦超声,通过开放血脑屏障,在治疗脑肿瘤方面也取得了显著成果^[17]。UTMD 可通过诱导血管内皮细胞凋亡增加肿瘤对放射线的敏感度,从而增强放射治疗的疗效,是肝细胞癌放疗的有效辅助手段^[18]。关于超声辐照最佳条件的研究也取得了一些成果。Ling 等^[19]研究显示,与 0.5 W/cm²或对照组相比,1.5 W/cm²和 1 W/cm²组的基质细胞衍生因子 1 和血管内皮生长因子表达显著升高($P < 0.01$);与 1.0 W/cm²组相比,1.5 W/cm²组的白细胞介素 1 β 表达增加了 2 倍,而 0.5 W/cm²组则无明显变化。Li 等^[20]认为在目的基因达到最高表达的同时,须注意超声强度对机体有无影响,以便确定最佳条件超声辐照条件,使 UTMD 真正成为一种高效安全的基因治疗手段。

3 UTMD 在糖尿病基因治疗中的应用

Xing 等^[21]通过 UTMD 治疗胰腺肿瘤,即将载有目的基因的超声微泡造影剂通过血液循环到达胰腺组织,在一定强度超声照射下破裂,将基因定向递送到靶组织。Chen 等^[22]利用 UTMD 将 RIP-人胰岛素和 RIP-己糖激酶 I 质粒递送至成年大鼠的胰岛,前者使人 C 肽明显增加、血糖水平降低,后者使胰岛己糖激

酶 I 蛋白表达明显增加、血液中胰岛素含量增加、葡萄糖水平降低,提示 UTMD 可无创地将基因递送至胰岛,调节 β 细胞功能。Chen 等^[23]对链脲霉素诱导的糖尿病模型狒狒进行研究,运用超声靶向微泡破坏技术递送 cyclinD2、CDK4 和 GLP-1 基因的复合物,成功诱导了胰岛再生和 β 细胞质量的恢复。人血管素样蛋白 8(ANGPTL8)可促进胰腺 β 增殖并干扰小鼠三酰甘油代谢,但其引起的严重高甘油三酯血症限制了其临床应用。近年研究^[24]表明,UTMD 介导的 ANGPTL8 基因递送可促进成年和老龄 β 细胞增殖,扩大 β 细胞团,改善葡萄糖耐量。UTMD 治疗后空腹血胰岛素水平升高,但未引起严重的高甘油三酯血症,提示故 UTMD 可优化现有治疗方法,具有临床治疗意义。

田新桥等^[25]通过对大鼠腹腔注射 1% 链脲佐菌素溶液,成功构建了糖尿病心肌病大鼠模型,并运用超声破坏经尾静脉注射的携 aFGF 微泡造影剂进行干预治疗,结果显示超声微泡靶向递送 aFGF 可以增加心肌微血管数量,降低心肌胶原含量,具有抗心肌细胞凋亡作用,有效改善大鼠左心室舒缩功能。Wu 等^[26]实验证实 UTMD 可提高肾组织通透性,并且具有可恢复性。超声破坏载 SDF-1 微泡靶向释放 SDF-1 可以提高肾脏 SDF-1 浓度水平,促进移植的外源性间充质干细胞肾向归巢能力,有效延缓糖尿病肾病的进展。虽然 UTMD 介导的基因表达为一过性,但基因表达结束所产生的生物学效应却持久存在,为基因治疗人类糖尿病奠定了基础。

4 问题与展望

超声微泡介导的基因递送在糖尿病的基因治疗中展现出了巨大潜力,较病毒载体安全、高效,在动物实验中取得了一系列研究成果,但在用于临床治疗之前,还存在一系列难题亟待解决:①寻找新的有效治疗基因,不仅要研究单个靶基因,且要根据糖尿病形成调控基因异常表达的相关信号通路,发现更多有效的基因。②寻找保证超声微泡载体质量和提高转染效率策略。UTMD 介导的以超声微泡为载体的基因转染效率仅 40% 左右,故优化超声微泡造影剂制备工艺,在降低粒径的同时提高稳定性,制备出高质量的超声微泡以及探索合适的超声辐照条件,对于提高转染效率具有重要意义。③UTMD 介导的基因治疗安全性和伦理性仍有待观察。为降低微泡造影剂和基因用量,减少不良反应,避免资源浪费,应进一步深入研究结合特异性配体的靶向超声微泡造影剂。

总之,基因治疗为治疗糖尿病及其并发症提供了新的思路,UTMD 又为基因治疗提供了有效的方法,相信 UTMD 介导的糖尿病基因治疗将会成为有效的临床方法。

[参考文献]

- [1] Alam U, Asghar O, Azmi S, et al. General aspects of diabetes mellitus. *Handb Clin Neurol*, 2014,126:211-222.
- [2] Lind M, Polonsky W, Hirsch IB, et al. Continuous glucose monitoring vs conventional therapy for glycemic control in adults with type 1 diabetes treated with multiple daily insulin injections the Gold randomized clinical trial. *JAMA*, 2017, 317 (4): 379-387.
- [3] Hsu PY, Kotin RM, Yang YW. Glucose- and metabolically regulated hepatic insulin gene therapy for diabetes. *Pharm Res*, 2008,25(6):1460-1468.
- [4] Hayes HL, Zhang L, Becker TC, et al. A Pdx-1-regulated soluble factor activates rat and human islet cell proliferation. *Mol Cell Biol*, 2016,36(23):2918-2930.
- [5] Xu F, Liang FX, Chen R, et al. Electroacupuncture improves insulin sensitivity in high-fat-diet-induced insulin resistance rats via activation of sirt1 and glut4 in quadriceps femoris. *J Integr Med*, 2014,791(3):231-232.
- [6] Samson SL, Chan L. Gene therapy for diabetes: Reinventing the islet. *Trends Endocrinol Metab*, 2006,17(3):92-100.
- [7] Prudhomme GJ, Draghia-Akli R, Wang Q. Plasmid-based gene therapy of diabetes mellitus. *Gene Ther*, 2007,14(7):553-564.
- [8] Yanai H, Moriyama S. Elevated pancreatic enzymes, IgM, soluble interleukin-2 receptor in anti-GADab(+) type 1 diabetes. *World J Diabetes*, 2011,2(5):75-76.
- [9] Traub S, Meier DT, Schulze F, et al. Pancreatic β -cell-derived cathelicidin regulates diabetes. *Cell Rep*, 2016,18(1):34.
- [10] Agarwal A, Ingham SA, Harkins KA, et al. The role of pharmacogenetics and advances in gene therapy in the treatment of diabetic retinopathy. *Pharmacogenomics*, 2016, 17 (3): 309-320.
- [11] Aggarwal N, Kare PK, Varshney P, et al. Role of angiotensin converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms in angiotensin converting enzyme inhibitor-mediated antiproteinuric action in type 2 diabetic nephropathy patients. *World J Diabetes*, 2017,8(3):112-119.
- [12] 刘莹莹,徐金锋,严飞,等. Integrin $\alpha_v\beta_3$ 靶向超声微泡的制备及体外寻靶实验. *中国医学影像技术*, 2016,32(2):175-178.
- [13] Zhou L, Luo WL. Vascular endothelial growth factor-targeted paclitaxel-loaded liposome microbubbles and inhibition of human epidermoid-2 cell proliferation. *Head Neck*, 2017, 39 (4): 656-661.
- [14] 肖洋,冉海涛,夏琼,等. 靶向 VEGFR2 光声/超声双模态造影剂的制备及体外寻靶实验研究. *中国介入影像与治疗学*, 2015,12

- (9):554-558.
- [15] Suzuki R, Oda Y, Utoguchi N, et al. Progress in the development of ultrasound-mediated gene delivery systems utilizing nano- and microbubbles. *J Control Release*, 2011, 149(1):36-41.
- [16] Zhang L, Sun ZX, Ren PP, et al. Localized delivery of shRNA against PHD2 protects the heart from acute myocardial infarction through ultrasound-targeted cationic microbubble destruction. *Theranostics*, 2017, 7(1):51-66.
- [17] Qin J, Wang TY, Willmann JK. Urine diagnosis for cancer. *Bulletin of the Chinese Academy of Sciences*, 2002, 880(3):136-137.
- [18] Daecher A, Stanczak M, Liu JB, et al. Localized microbubble cavitation-based antivascular therapy for improving HCC treatment response to radiotherapy. *Cancer Lett*, 2017, 411:100-105.
- [19] Ling ZY, Shu SY, Zhong SG, et al. Overexpression of the neuroglobin gene delivered by ultrasound-targeted microbubble destruction protects SH-SY5Y cells against Cobalt chloride induced hypoxia. *Neural Regeneration Research*, 2011, 39(25):1947-1953.
- [20] Li XD, Yue XL, Wang JR, et al. Prussian blue nanoparticle-loaded microbubbles for photothermally enhanced gene delivery through ultrasound-targeted microbubble destruction. *Ko Hsueh Tung Pao*, 2016, 36(2):148-156.
- [21] Xing LX, Shi QS, Zheng KL, et al. Ultrasound-Mediated microbubble destruction (UMMD) facilitates the delivery of CA19-9 targeted and paclitaxel loaded mPEG-PLGA-PLL nanoparticles in pancreatic cancer. *Theranostics*, 2016, 6(10):1573-1587.
- [22] Chen SY, Ding JH, Bekerredjian R, et al. Efficient gene delivery to pancreatic islets with ultrasonic microbubble destruction technology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(22):8469-8474.
- [23] Chen SY, Bastarrachea RA, Roberts BJ, et al. Successful β cells islet regeneration in streptozotocin-induced diabetic baboons using ultrasound-targeted microbubble gene therapy with cyclinD2/CDK4/GLP1. *Cell Cycle*, 2014, 13(7):1145-1151.
- [24] Chen JX, Chen SY, Huang PT, et al. In vivo targeted delivery of ANGPTL8 gene for beta cell regeneration in rats. *Diabetologia*, 2015, 58(5):1036-1044.
- [25] 田新桥, 茹翱, 赵应征, 等. 超声微泡靶向递送 aFGF 对糖尿病心肌病的治疗作用及其机制研究. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(8):1387-1392.
- [26] Wu SZ, Li L, Wang G, et al. Ultrasound-targeted stromal cell-derived factor-1-loaded microbubble destruction promotes mesenchymal stem cell homing to kidneys in diabetic nephropathy rats. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9(1):5639-5651.

2017 版中国科技期刊引证报告相关数据 ——《中国介入影像与治疗学》

由中国科学技术信息研究所主持的“2016 中国科技论文统计结果发布会”于 2017 年 10 月 31 日在北京国际会议中心举行。《中国介入影像与治疗学》杂志在《2017 版中国科技期刊引证报告》(核心版)的相关数据为:

- 1 文献来源量:175 篇;
- 2 基金论文比:0.40;
- 3 总被引频次:675;
- 4 影响因子:0.505;
- 5 学科扩散指标:10.14;
- 6 学科影响指标:0.76;
- 7 综合评价总分:39.30。