

· 综述 ·

Treatment of ultrasound contrast agents for gene or drug delivery

WANG Zhao-xia*, WANG Zhi-gang

(Institute of Ultrasonic Imaging, Department of Ultrasonography, the Second Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

ABSTRACT The ultrasound microbubble agents cavitate after intravenous injection by ultrasound energy. The genes or drugs incorporated in the microbubbles can pass across the endothelial cell barrier effectively, which reach the sufficient local concentrations at the specific tissue area and achieve target treatment effect. Microbubble may be a vector for target treatment. Therefore, ultrasound contrast agent as an new and non-invasive vector for treatment holds considerable promises.

KEY WORDS Ultrasonography; Microbubble; Gene or drug delivery

超声微泡造影剂携基因或药物治疗研究

汪朝霞* 综述, 王志刚 审校

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

[摘要] 超声微泡造影剂经静脉注射到靶组织后, 在超声能量作用下, 因“空化效应”, 能有效穿透血管内皮屏障, 定向释放内部包裹的基因或药物, 使局部浓度大大增高, 达到靶向治疗目的。微泡可能成为靶向治疗的载体, 超声造影剂作为一种新型、无创的运载系统具有广阔的应用前景。

[关键词] 超声检查; 微泡; 携基因和药物

[中图分类号] R814.43; R815 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-8475(2006)04-0306-03

0 引言

自 1968 年 Gramiak 首次报道了超声造影剂的应用以来, 其声学特性不断地为人们所认识并应用于实践。人们在利用微泡增强超声显像的同时, 还发现微泡具有靶向运载作用, 利用微泡在超声介导下的空化效应, 可以靶向传输基因或药物, 达到治疗疾病的目的。这无疑极大地拓展了超声造影剂的应用领域, 并可能建立一种安全、有效、无创的超声介导靶向传输系统。

研究表明, 超声波可致细胞膜的通透性增高, 加入微泡造影剂后此效应更为明显。在超声场中微泡受声波辐射、破坏, 其“空化效应”可致局部微循环细胞连接及靶细胞膜轻度可逆性损害, 膜通透性增高, 从而使

细胞对基因或药物的摄入增强。当微泡到达特定组织时, 超声波破坏携带基因或药物的微泡, 可达到在靶器官定向治疗的目的, 并且由于微泡在血循环中的稳定性较好, 可减少基因或药物到达靶器官前在体内的破坏。目前, 超声微泡造影剂携基因或药物的治疗研究主要有以下几个方面。

1 心脏

随着人类基因产品的诞生和分子生物学的发展, 许多治疗性基因已被发现。而安全有效的基因运送载体是临床基因治疗成功的保证。目前发展的运送载体, 如脂质体和病毒等均因存在较大的局限性而影响其在体内作用的发挥。近来有关超声造影剂的一系列研究显示, 它可作为运送基因物质安全、有效的载体。周忠江等^[1]构建真核表达质粒 pcDNA3.1+/VEGFcDNA165 之后, 将其包载于脂质微泡中, 超声辐射下向心肌传输, 发现实验组基因表达及血管密度高于空白对照组。王志刚等^[2]将血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 黏附于微泡造影剂外

[作者简介] 汪朝霞(1980 -), 女, 重庆人, 在读硕士。研究方向: 影像医学与核医学。

[通讯作者] 汪朝霞, 重庆医科大学附属第二医院超声科, 重庆医科大学超声影像学研究所, 400010。E-mail: zhaoxia_wang103@163.com

[收稿日期] 2005-10-11 **[修回日期]** 2006-04-12

壳,经心肌梗塞模型的 Wister 大鼠尾静脉输入,用一定能量的超声破坏含靶基因的微泡造影剂。结果显示,超声微泡携 VEGF 基因转染大鼠心肌组织中可见大量新生血管。此外,Averkiou 等^[3]进行的靶向超声微泡携带药物、基因治疗心脏疾病的研究,并取得进展。

2 肿瘤

随着超声微泡技术的不断发展和可携带药物、基因超声微泡造影剂的研制,超声微泡在肿瘤的诊断与治疗方面取得了进展。Unger 等^[4]载裸鼠的种植人类黑色素瘤,对这些肿瘤注射能够产生白介素-2 的基因,用脂类做载体,72 h 后处死动物,切除肿瘤,在肿瘤中获取细胞并培养,发现超声能增加肿瘤细胞内基因表达,用细胞培养模型分析超声照射下细胞基因的表达,发现超声上调了一定数量的修复基因的表达。Reynolds 等^[5]的一项研究表明,整合素 $\alpha\gamma\beta 3$ 靶向的纳米粒子基因载体能选择性作用于小鼠肿瘤血管内皮细胞,而致肿瘤消退。

利用脂质体携带抗肿瘤药物进行治疗研究已有 20 多年历史。由于脂质体是维持肿瘤血管内皮完整性的成分之一,故直径在 30 ~ 120 nm 的脂质体首先在肿瘤部位聚集。在脂质体表面结合抗肿瘤相关抗原的单克隆抗体,及携带细胞毒性的因子后,便可形成对肿瘤组织有特异性的免疫脂质体^[6]。在这一技术的启发下,提出了用声学造影剂作为抗肿瘤化疗药物载体的设想。

3 血管和血栓

血栓形成过程中,血管内膜受损,内膜下胶原暴露,可以激活血小板和凝血系统,促进止血,并可表达某些活性因子。在微泡表面连接特异性针对这些活性因子的配体,研制可靶向结合于血凝块的微泡,可提高血栓显像。若将靶向造影剂与溶栓药物相结合,则可大大提高其溶栓作用。张群霞等^[7]将大白兔左股动脉结扎后,局部注入 VEGF 质粒与超声微泡造影剂的混合物,DSA 可见侧支循环的建立。金玉等^[8]在体外试验中将尿激酶结合在 MRX-408 微泡的外壳上,当微泡与血栓结合后,用超声波照射引起微泡破裂,释放出药物,从而使血栓软化、溶解。Taniyama 等^[9]应用超声/微泡转导 p53 质粒 DNA 来抑制颈动脉内膜增生,观察其对颈动脉球囊扩张后再狭窄的预防作用,体内和体外试验均呈现了良好的效应,而且对血管没有增加损伤。

4 肌肉

Taniyama 等^[10]观察到在 Optison 与超声同时存在

下,大鼠骨骼肌质粒荧光素酶转染率高于对照组 10 倍。他们同时研究在兔后肢缺血模型中,超声与 Optison 介导肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 质粒促进新生血管形成的治疗作用的可行性。转染 10 周后,超声 + Optison 组显著提高了转染率,血管造影评分与毛细血管密度显著提高,同时伴有血流速度与血压的明显提高。Danialou 等^[11]将 Definity 与表达 Lac Z 蛋白的质粒共同注入肌营养不良小鼠的肌肉中,并用 1 MHz 超声作用后,发现转染肌纤维数目提高了 3 倍,Lac Z 蛋白表达总量提高 22 倍,同时没有发现相应的肌肉破坏,由此可见,超声与微泡介导基因治疗肌营养不良,显示出诱人的临床应用价值。

5 肾脏

在器官移植的急性排斥反应中,核因子 KB (nuclear factor kappa B, NFkappaB) 发挥了很大的作用,它可以调节细胞因子和黏附分子一系列基因的表达。而 NFkappaB 的顺式分子——寡脱氧核糖核苷酸 (NfkappaB-decoy) 可以在体外和体内有效地抑制主要的炎症介质产生。Azuma 等^[12]用超声造影剂 Optison 作为 NfkappaB-decoy 的载体。超声处理后成功地转染了 Wistar 大鼠同种异体移植,肾模型的肾组织中,对照组的肾组织明显破坏,并有大量炎症介质产生,9 天后所有动物死亡。实验组移植肾的功能和组织结构保持的很好,并且由 NFkappaB 介导的细胞因子和黏附分子 (包括 IL-1, iNOS, MCP-1, TNF- α , ICAM-1) 均呈低表达状态,动物的存活期比对照组明显延长。实验证实,这种方法介导的 NFkappaB-decoy 的转染,可以明显提高移植肾的存活期。Lan 等^[13]通过强力霉素控制 Smad7 基因的表达,治疗鼠肾纤维化模型获得成功,治疗组鼠的 Smad7 上升 5 倍,Smad2 和 Smad3 下降 6 倍,肾间质肌成纤维细胞减少 85%,肾内 I、III 型胶原 mRNA 及蛋白质减少 60% ~ 70%。它不但具有靶向性基因转导的特点,而且能够达到定量调控基因表达的目的,在临床基因治疗上有很大的实用性。

6 子宫

Endoh 等^[14]将宫内注射微泡携带目的基因并联合超声辐照的技术称为“鸟枪法” (shotgun method, SGM),发现通过 SGM 可使小鼠胚胎组织中各种标记基因,如荧光素酶、GFP 和 β -Gal 等高水平表达,比单独注射裸 DNA 增高 10 倍,因此认为 SGM 可能为开展宫内基因治疗提供一个新途径。

以超声破坏微泡介导的基因和药物治疗增强了基因的转染和表达,提高了治疗的靶向性,降低了药物的

不良反应。但仍然存在许多尚未解决的问题:①构建安全、有效、有组织特异性和靶向性的载体;②将微泡与基因或药物高浓度地结合起来;③解决好超声波使用剂量与微泡浓度及组织损伤的关系;④目的基因在体内实现高效、稳定、可调控的表达。

尽管目前超声微泡携基因或药物治疗还存在许多难题,但取得的研究进展已显示出诱人的前景^[15]。随着分子生物学和超声医学的发展,将为人类疾病提供一种新的治疗途径。

[参考文献]

- [1] Zhou ZJ, Ye HY, Zhang XY, et al. Proangiogenesis of infarcted myocardium induced by human vascular endothelial growth factor (VEGF165) directed by the targeted delivery system of ultrasound mediated bearing-gene microbubbles' cavitation. *Chin J Cardiol (Chinese)*, 2004, 32(5): 438-441.
- [2] Wang ZG, Ling ZY, Ran HT, et al. Ultrasound-mediated microbubble destruction enhances VEGF gene delivery to the infarcted myocardium in rats. *Clin Imaging*, 2004, 28(6): 395-398.
- [3] Averkiou M, Powers J, Skyba D, et al. Ultrasound contrast imaging research. *Ultrasound Q*, 2003, 19(1): 27-37.
- [4] Unger EC, McCreery TP, Sweitzer R. Ultrasound enhances gene expression of liposomal transfection. *Invest Radiol*, 1997, 32(12): 723-727.
- [5] Reynolds AR, Moein Moghimi S, Hovalala-Dilke K. Nanoparticle-mediated gene delivery to tumor neovasculature. *Trends Mol Med*, 2003, 9(1): 2-4.
- [6] Sugano M, Egilmez NK, Yokota SJ, et al. Antibody targeting of doxorubicin-loaded liposomes suppresses the growth and metastatic spread of established human lung tumor xenografts in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res*, 2000, 60(24): 6942-6949.
- [7] Zhang QX, Wang ZG, Ran HT, et al. Microbubble-mediated VEGF gene therapy for lower limb vascular occlusion. *Chin J Imaging Technol (Chinese)*, 2005, 21(4): 507-509.
- [8] Jin Y. Therapeutic applications of the microbubbles. *Foreign Medical Sciences Cardiovascular Disease*, 2003, 30(4): 231-233.
- [9] Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, et al. Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation*, 2002, 105(10): 1233-1239.
- [10] Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, et al. Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther*, 2002, 9(6): 372-380.
- [11] Danialou G, Comtois AS, Dudley RW, et al. Ultrasound increases plasmid-mediated gene transfer to dystrophic muscles without collateral damage. *Mol Ther*, 2002, 6(5): 687-693.
- [12] Azuma H, Tomita N, Kaneda Y, et al. Transfection of NFkappaB-decoy oligodeoxynucleotides using efficient ultrasound-mediated gene transfer into donor kidneys prolonged survival of rat renal allografts. *Gene Ther*, 2003, 10(5): 415-425.
- [13] Lan HY, Mu W, Tomita N, et al. Inhibition of renal fibrosis by gene transfer of inducible Smad7 using ultrasound-microbubble system in UUO model. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(6): 1535-1548.
- [14] Endoh M, Koilbuchi N, Sato M, et al. Fetal gene transfer by intrauterine injection with microbubble-enhanced ultrasound. *Mol Ther*, 2002, 5(5): 501-508.
- [15] Zhang QX, Wang ZG, Ran HT, et al. Enhanced gene transfection in tumor cells by ultrasound and microbubbles. *J Ultrasound in Clin Med (Chinese)*, 2005, 7(2): 78-80.