

· 综述 ·

Research progresses of ultrasound targeted microbubbles destruction in liver diseases

ZHANG Chujun¹, LIU Chaoqi¹, ZHAO Yun^{2*}

(1.College of Basic Medical Science, 2.College of Medicine and Health Science, China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

[Abstract] The incidence of liver diseases remain high, which have long cycle, many adverse reactions and high recurrence risks under the existing treatments, especially chronic liver disease might develop to end-stage cirrhosis or liver cancer. New diagnosis and treatment methods for liver diseases are urgent needed in clinical practice. Ultrasound targeted microbubbles destruction (UTMD) trigger targeted release of drugs and foreign genes in microbubbles using ultrasound irradiation, having broad application prospect for diagnosing and treating liver diseases. The research progresses of UTMD in liver diseases were reviewed in this article.

[Keywords] liver; microbubbles; molecular targeted therapy; ultrasonography

DOI:10.13929/j.issn.1672-8475.2024.11.012

超声靶向微泡破坏用于肝脏疾病研究进展

张楚君¹, 刘朝奇¹, 赵云^{2*}

(1.三峡大学基础医学院, 2.健康医学院, 湖北宜昌 443002)

[摘要] 肝脏疾病发病率高, 现有治疗手段周期长、不良反应多、复发风险高, 尤其慢性肝病可进展为终末期肝硬化或肝癌; 临床亟待开发新型诊疗方法。超声靶向微泡破坏(UTMD)利用超声辐照触发定点释放微泡内药物与外源基因, 用于诊疗肝脏疾病前景广阔。本文就UTMD诊疗肝脏疾病研究进展进行综述。

[关键词] 肝; 微泡; 分子靶向治疗; 超声检查

[中图分类号] R735.7; R445.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-8475(2024)11-0708-04

肝脏疾病发病率高、预后差, 每年造成全球超过200万人死亡, 约占死亡总数的4%, 已成为严峻的公共卫生问题^[1]。我国病毒性肝炎、非酒精性脂肪性肝病及肝硬化患病人数约占全球1/3, 患者罹患肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)风险随之增加^[2]。针对慢性肝病目前尚无特效药物; 而治疗HCC方案主要包括手术切除、消融治疗、放射治疗(放疗)及肝移植, 但存在治疗周期长、费用高、不良反应多及易复发等局限性^[3], 临床亟待确定新的肝脏疾病诊疗策略。

超声靶向微泡破坏(ultrasound targeted microbubbles destruction, UTMD)可对特定部位进行超声辐照, 通过改变生物膜通透性促使微泡(microbubble, MB)携带的药物或基因到达目标组织或器官^[4-5], 为当前诊疗肝脏疾病相关研究焦点之一。本文就UTMD诊疗肝脏疾病研究进展进行综述。

1 UTMD作用机制

MB是由生物相容性材料组成的结构稳定、大小均一、体积微小的气泡, 通过在其表面修饰特异性多

[基金项目] 湖北省自然科学基金计划项目(2023AFB137)。

[第一作者] 张楚君(1992—), 女, 湖北宜昌人, 在读硕士, 主治医师。研究方向: 超声微泡技术及基础医学。E-mail: 453791005@qq.com

[通信作者] 赵云, 三峡大学健康医学院, 443002。E-mail: zhaoyun@ctgu.edu.cn

[收稿日期] 2024-05-14 [修回日期] 2024-06-26

肽、抗体或其他配体可选择性与病变部位高表达的抗原或受体相结合而实现靶向成像^[4]。UTMD主要作用机制包括空化作用、声孔效应和声辐射力^[6]。以超声辐照靶区时,声压达到一定阈值后,微小气泡发生膨胀、破裂,形成稳定空化与惯性空化;前者指MB随声压变化反复膨胀、收缩,产生稳定的剪切力及微射流,后者指大幅度非线性振荡引起MB迅速膨胀、变形直至破裂,产生强激波、内部剪切力及高速微射流等,产生的能量引起细胞膜损伤或微血管破裂,进而在细胞膜表面形成许多暂时可逆的小孔、内吞小泡,扩大毛细血管内皮细胞间隙,增加细胞膜通透性及局部组织血流灌注,促进药物传递、诱导肿瘤细胞死亡。UTMD既能增加靶组织定向摄取MB,促进药物进入血管壁和组织间隙,又可提高靶组织周围局部药物浓度,在疾病诊疗中发挥关键作用。

2 UTMD用于肝脏疾病

2.1 肝纤维化(hepatic fibrosis, HF) HF为常见肝脏疾病,可不同程度影响患者肝功能及生存质量^[7];早期诊断并确定分期十分重要。早期HF仅表现为分子及细胞水平异常,常规超声难以检测^[8]。血管生成与HF密切相关;作为促有丝分裂和促血管生成的经典介质,血管内皮生长因子受体-2(vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2)是评价HF的理想靶点。有学者^[9]以携带VEGFR-2活CD34的脂质MB作为分子探针,利用UTMD检测肝内新生血管,可较为准确地评估HF进程。CD34表达水平与HF呈正相关。BARR^[8]采用UTMD技术联合CD34分子评估大鼠HF病理生理学改变,方法相对简便且不受肝脏炎症状态影响,为早期诊断HF、预测分期提供了新思路。

HF可进展为肝硬化及HCC,最终导致肝衰竭。肝移植为目前公认的最有效的治疗终末期肝脏疾病方法,但存在肝脏供体紧张及移植后并发症等问题^[1-2,10]。干细胞具有再生和修复受损肝细胞的能力,已成为替代肝移植的突破口。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMMSC)是来源于骨髓的干细胞,在治疗慢性肝病及HF相关细胞方面具有巨大应用潜力,但其对肝组织归巢不足为当前面临的重大挑战^[11]。部分研究^[12-13]将UTMD与BMMSC结合,通过超声MB携带肝细胞生长因子并将其释放于受损肝细胞处,发现UTMD有助于促进BMMSC向受损肝脏归巢、改善HF状态。JIN等^[14]报道,UTMD可促进基

因进入肿瘤细胞及多能干细胞、加强BMMSC对急性损伤肝脏的归巢,进而获得更好的治疗效果。联合应用UTMD与多能干细胞有望成为治疗HF的新途径。

2.2 HCC 近年来,肿瘤免疫治疗快速发展,现已成为治疗HCC的重要手段,可通过增强对肿瘤的免疫防御机制刺激机体免疫系统而间接攻击肿瘤细胞、重塑免疫微环境;但目前尚因免疫治疗脱靶毒性、药物渗透积累不足及免疫细胞功能障碍,以及肿瘤微环境缺氧、血管畸形及免疫逃逸等问题致其应用受限。UTMD可通过局部超声辐照触发药物和外源基因靶向释放,促进其向深层组织传递^[15],有助于减少免疫治疗相关不良事件、增强免疫治疗效果、调节肿瘤免疫抑制微环境^[16]。

程序性死亡受体1(programmed death-1, PD-1)和程序性死亡受体配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1)是维持肿瘤免疫微环境的重要因素,可通过抑制免疫细胞活化增殖帮助癌细胞免疫逃逸^[17]。通过抑制PD-1/PD-L1通路的单一疗法已在临床试验中获得成功^[18],但游离PD-L1抑制剂毒性较强、不良反应发生率高。近年来,越来越多证据表明miRNA参与调节机体免疫反应^[19-20]。LIU等^[21]利用小鼠肝癌移植瘤模型评价PD-L1抗体联合miR-424微泡在免疫治疗中的活性,发现负载PD-L1抗体和miR-424基因的靶向MB可在增强肿瘤细胞对药物治疗敏感性的同时激活T细胞、阻断PD-L1免疫检查点,介导肿瘤细胞凋亡、抑制肝癌进展;该团队后续以包载药物的脂质MB及肿瘤特异性单抗治疗HCC,取得满意效果。

UTMD可提高CD8+T细胞及NK细胞浸润率,加强CD8+T细胞活化和杀伤功能,导致血管舒张和肿瘤灌注增强,以改善肿瘤局部缺氧微环境^[21],同时促进树突细胞成熟和巨噬细胞表型转化,减少调节性T细胞和骨髓来源抑制细胞的数目,以促进肿瘤血管正常化、重塑肿瘤免疫微环境^[22]。研究显示^[19]UTMD还可增强阿霉素介导的细胞免疫原性死亡,通过声动力疗法激活声敏剂产生的活性氧,改善肿瘤缺氧微环境,诱导肿瘤细胞凋亡^[19],用于治疗肝脏肿瘤极具潜力。

2.3 急性肝损伤(acute liver injury, ALI) ALI以大量肝细胞损伤及肝功能进行性恶化为主要特征,最终可发展为肝、脑及肾等重要器官衰竭。干细胞可作为肝细胞再生来源而修复受损肝脏,但BMMSC对靶组织的归巢能力严重影响治疗效果^[11]。既往研究^[23]发现,UTMD可促进移植干细胞归巢至缺血心肌。动物

实验^[24]研究结果显示,对ALI大鼠模型行UTMD联合BMMSC治疗(联合组)后,其BMMSC数量显著高于、而肝细胞凋亡率显著低于接受单一BMMSC治疗组及未经治疗组,提示UTMD有助于促进BMMSC肝归巢、修复肝损伤。

3 UTMD联合血管内治疗

现阶段UTMD主要作为辅助手段与现有治疗方式联合应用。超声引导下血管内治疗将局部输送靶向药物与栓塞肿瘤供血动脉相结合,旨在实现输送最大剂量化学治疗(化疗)药物的同时降低全身毒性,但其疗效易受药物对肿瘤传递效果、肿瘤微环境变化及肿瘤复发等因素影响。为有效降低血药浓度、减少药物不良反应,新近研究^[25]以UTMD将人血清白蛋白纳米颗粒输送至兔VX2肝肿瘤以栓塞肿瘤供血动脉,结果显示该方法具有提高载药量、防止药物降解及促进细胞内渗透等优点,提示超声纳米泡可通过促进药物局部持续释放、选择性递送药物及功能性释放靶点而达到更佳抗肿瘤效果^[26],或可用于经动脉治疗HCC。EISENBREY等^[27]分别以TACE(TACE组)及TACE联合UTMD(联合组)治疗HCC,结果显示联合组肿瘤抑制率高于TACE组,而治疗后组间肝功能无明显差异,提示UTMD联合TACE治疗HCC较为安全,可在一定程度上缓解HCC对放疗敏感的问题。此外,UTMD还可实时监测肿瘤血管数目、观察TACE后持续血流成像,有助于预测HCC预后。但目前尚无确切研究证据表明UTMD对肝转移癌有无疗效,有待后续探索^[28-29]。

4 小结与展望

通过分子水平成像早期诊断肝脏疾病并鉴别其病理类型对于指导治疗、改善预后至关重要。近年研究者致力于开发具有特异性标记物的MB载体^[30],UTMD靶向MB可突破血管限制而与血管外组织或肿瘤标志物结合,有利于早期诊断肝脏疾病、进行临床分期、监测疾病进展及指导治疗。相比传统治疗方法,UTMD不损伤心、脾、肾等重要实质器官,不至造成实验动物体质量显著减轻和体细胞活性降低^[22],有助于提高放化疗敏感性。但现有相关研究主要针对动物,而人体内环境更复杂、异质性更高,UTMD临床应用仍面临挑战。另一方面,超声频率、力学指标、占空比、照射时间等超声治疗参数,以及MB剂量、环境温度、空气湿度、组织类型等非超声因素同样影响UTMD疗效,微泡类型和声学参数是治疗方案的关键,亦是未来

研究重点。

部分药物单独作用于人体可导致不良反应或难以维持有效血药浓度,利用UTMD将其附着或包裹于MB表面或内部,经触发在靶组织中局部释放、沉积及激活,可改善药物对组织的渗透,使其通过血脑屏障或其他生物屏障,有助于提高药物治疗指数、降低不良事件发生率。UTMD利用超声触发MB,可通过改变药物的药代动力学安全通过生物屏障结构,促进药物向深层组织传递、辅助实时基因转染,调节药物或分子释放速度而在不干扰全身免疫细胞水平的情况下精确杀死肿瘤区域细胞、缓解化疗引起的免疫缺陷,在优化药物和药物输送系统方面具有巨大潜力,相信未来将在肝脏疾病诊疗中发挥更关键的作用。

利益冲突:全体作者声明无利益冲突。

作者贡献:张楚君查阅文献、撰写文章;刘朝奇修改文章;赵云指导、审阅文章。

[参考文献]

- [1] DEVARBHAVI H, ASRANI S K, ARAB J P, et al. Global burden of liver disease: 2023 update [J]. *J Hepatol*, 2023, 79(2): 516-537.
- [2] XIAO J, WANG F, WONG N K, et al. Global liver disease burdens and research trends: Analysis from a Chinese perspective [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(1): 212-221.
- [3] KHAN S, MAHGOUB S, FALLATAH N, et al. Liver disease and cell therapy: Advances made and remaining challenges [J]. *Stem Cells*, 2023, 41(8): 739-761.
- [4] LIN L, DU Y, HAO J, et al. UTMD inhibits pancreatic cancer growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 160: 114322.
- [5] 邹孝猛,毛盈,张羽,等.超声靶向微泡破坏实现肿瘤递药研究进展[J].*中国医学影像技术*,2022,38(11):1739-1742.
- [6] 罗小琴,赵云,刘朝奇.超声靶向微泡破坏技术在骨骼肌肉疾病治疗中的应用[J].*生命的化学*,2021,41(8):1726-1732.
- [7] PAROLA M, PINZANI M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 37-55.
- [8] BARR R G. US-targeted microbubbles to assess liver fibrosis [J]. *Radiology*, 2022, 304(2): 483-484.
- [9] QIU C, SHA T, YIN T, et al. VEGFR2-targeted ultrasound molecular imaging of angiogenesis to evaluate liver allograft fibrosis [J]. *Biomater Sci*, 2021, 9(17): 5802-5811.
- [10] DURAND F, LEVITSKY J, CAUCHY F, et al. Age and liver transplantation [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(4): 745-758.
- [11] ZHANGDI H, GENG X, LI N, et al. BMSCs alleviate liver

- cirrhosis by regulating Fstl1/Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Heliyon*, 2023,9(11):e21010.
- [12] SUN T, LI H, BAI Y, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction optimized HGF-overexpressing bone marrow stem cells to repair fibrotic liver in rats[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1):145.
- [13] JIANG Z Z, XIA G Y, ZHANG Y, et al. Attenuation of hepatic fibrosis through ultrasound-microbubble-mediated HGF gene transfer in rats[J]. *Clin Imaging*, 2013,37(1):104-110.
- [14] JIN L, LI F, WANG H, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction enhances gene transduction of adeno-associated virus in a less-permissive cell type, NIH/3T3 [J]. *Mol Med Rep*, 2013,8(2):320-326.
- [15] DI IANNI T, BOSE R J C, SUKUMAR U K, et al. Ultrasound/microbubble-mediated targeted delivery of anticancer microRNA-loaded nanoparticles to deep tissues in pigs [J]. *J Control Release*, 2019,309:1-10.
- [16] HAN Y, SUN J, WEI H, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction: Modulation in the tumor microenvironment and application in tumor immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2022,13:937344.
- [17] YI M, ZHENG X, NIU M, et al. Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: Current advances and future directions[J]. *Mol Cancer*, 2022,21(1):28.
- [18] TUMEH P C, HARVIEW C L, YEARLEY J H, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance[J]. *Nature*, 2014,515(7528):568-571.
- [19] CHEN Y, LUO X, LIU Y, et al. Targeted nanobubbles of pd-11 mab combined with doxorubicin as a synergistic tumor repressor in hepatocarcinoma[J]. *Int J Nanomedicine*, 2022,17:3989-4008.
- [20] CHEN L, HEIKKINEN L, WANG C, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools [J]. *Brief Bioinform*, 2019,20(5):1836-1852.
- [21] LIU Y, XIE Q, MA Y, et al. Nanobubbles containing PD-L1 Ab and miR-424 mediated PD-L1 blockade, and its expression inhibition to enable and potentiate hepatocellular carcinoma immunotherapy in mice[J]. *Int J Pharm*, 2022,629:122352.
- [22] LIU S, ZHANG Y, LIU Y, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction remodels tumour microenvironment to improve immunotherapeutic effect [J]. *Br J Cancer*, 2023, 128(5):715-725.
- [23] SUN T, GAO F, LI X, et al. A combination of ultrasound-targeted microbubble destruction with transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells promotes recovery of acute liver injury[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018,9(1):356.
- [24] SUN Z, CAI Y, CHEN Y, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction promotes PDGF-primed bone mesenchymal stem cell transplantation for myocardial protection in acute myocardial infarction in rats [J]. *J Nanobiotechnology*, 2023,21(1):481.
- [25] KIM D, LEE J H, MOON H, et al. Development and evaluation of an ultrasound-triggered microbubble combined transarterial chemoembolization (TACE) formulation on rabbit VX2 liver cancer model[J]. *Theranostics*, 2021,11(1):79-92.
- [26] LEE J H, MOON H, HAN H, et al. Antitumor effects of intra-arterial delivery of albumin-doxorubicin nanoparticle conjugated microbubbles combined with ultrasound-targeted microbubble activation on VX2 rabbit liver tumors [J]. *Cancers (Basel)*, 2019,11(4):581.
- [27] EISENBREY J R, FORSBERG F, WESSNER C E, et al. US-triggered microbubble destruction for augmenting hepatocellular carcinoma response to transarterial radioembolization: A randomized pilot clinical trial [J]. *Radiology*, 2021, 298(2): 450-457.
- [28] SHEN Z, SHAO J, ZHANG J, et al. Ultrasound cavitation enhanced chemotherapy: In vivo research and clinical application[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2020,245(14):1200-1212.
- [29] de MAAR J S, ROUSOU C, van ELBURG B, et al. Ultrasound-mediated drug delivery with a clinical ultrasound system: In vitro evaluation [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 768436.
- [30] KOOIMAN K, VOS H J, VERSLUIS M, et al. Acoustic behavior of microbubbles and implications for drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014,72:28-48.