

超声靶向破坏微泡介导基因或药物 抗血管再狭窄的研究进展

金琳¹ 综述, 杜联芳² 审校

(1. 上海市嘉定区中心医院超声科, 上海市 201800; 2. 上海交通大学附属第一人民医院超声科, 上海市 200080)

[关键词] 超声造影剂; 微泡; 血管再狭窄; 基因治疗; 药物治疗

[摘要] 血管成形术是治疗狭窄或闭塞性血管疾病的主要方法之一, 而术后的再狭窄影响其远期疗效, 预防再狭窄一直是心血管疾病的重要课题。超声靶向破坏微泡技术使携带的基因或药物在靶组织定向释放, 使局部浓度大大增高, 从而达到靶向治疗目的, 为抗再狭窄提供了新的方法。现对超声靶向破坏微泡介导基因或药物治疗的原理及在抗血管再狭窄中的研究现状及应用前景作一综述。

[中图分类号] R540.4

[文献标识码] A

Ultrasound-targeted Microbubble Destruction Mediate Gene or Drug Therapy for Vascular Restenosis

JIN Lin¹, and DU Lian-Fang²

(1. Department of Ultrasound, Jiading Center Hospital, Shanghai 201800, China; 2. Department of Ultrasound, Shanghai First People's Hospital, Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

[KEY WORDS] Ultrasound Contrast Agent; Microbubble; Vascular Restenosis; Gene Therapy; Drug Therapy

[ABSTRACT] Angioplasty treatment is one of the main methods for narrow or occlusive vascular disease, but restenosis affects the long-term effect. Prevent vascular restenosis has been an important subject in cardiovascular diseases. Ultrasound-targeted microbubble destruction can deliver gene or drug to the points of interest in the body, which can enhance the concentration of the gene or drug, enhance efficacy cure effects, and provide a new method for restenosis. In this review, we will introduce the theory of gene or drug therapy mediated by ultrasound-targeted microbubble destruction, and its prospects in vascular restenosis.

经皮冠状动脉腔内血管成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 是治疗冠状动脉粥样硬化的重要方法之一, 已在全世界范围内得到了广泛的应用。但 PTCA 术后再狭窄率仍可达 20% ~ 40%^[1], 血管成形术后的血管再狭窄 (restenosis, RS) 一直是心血管领域的一大难题。超声靶向破坏微泡 (ultrasound-targeted microbubble destruction, UTMD) 是一种新型、安全、无创的非病毒类的载体转移技术。随着新型基因或药物的不断出现, UTMD 技术介导的基因或药物治疗为临床抗血管再狭窄提供了一种新的途径。本文主要对 UTMD 技术在抗血管再狭窄中的研究进展进行综述。

1 血管成形术后再狭窄的主要机制

血管再狭窄是一种多因素多种机制共同参与的过程, 目前一致认为 PTCA 使血管壁受损, 局部血管壁损伤后出现修复反应, 经历血管的弹性回缩、平滑肌细胞增殖迁移以及血管重塑阶段, 最终形成再狭窄^[2]。血管内皮损伤是 RS 的始动因子, 而其中最重要的过程是血管平滑肌增殖和迁移^[3], 阻断这一病理过程, 无疑是防止再狭窄的关键。针对 RS 发生的不同机制, 人们采用了很多有效的治疗措施^[4,5], 包括药物治疗、普通支架、药物涂层支架等, 在一定程度上减少了 RS 的发生, 但均不能完全解决新生内膜增生的问题。随着超声在治疗领域的探

[收稿日期] 2011-12-20

[作者简介] 金琳, 学士, 住院医师, 研究方向为超声诊断, E-mail 为 jinlin205@163.com。通讯作者杜联芳, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为超声诊断, E-mail 为 du_lf@163.com。

索应用,UTMD 技术介导的基因或药物治疗提供了新的方法并引起了国内外学者的广泛关注。

2 UTMD 技术概述

1968 年 Gramiak 和 Shah^[6]首次报道了注射超声造影剂后 M 型超声心动图检查的图像明显增强,此后超声造影剂开始被人们关注并应用于临床。超声造影剂发展至今共经历了 3 个阶段^[7]:第 1 代,主要为二氧化碳或氧气等简单的气泡,无壳膜游离的微气泡。第 2 代,主要为空气或惰性气体,有壳膜,稳定性相对较好,代表类型有 Albunex、SonoVue、全氟显等。第 3 代,利用可生物降解多聚体材料为外壳制备的新型造影剂。UTMD 技术是超声微泡造影剂在治疗领域的探索,UTMD 技术介导基因或药物治疗的研究也日益广泛。

随着对 UTMD 研究的不断深入和拓展,目前 UTMD 介导基因或药物治疗的研究领域已经涉及到了心脏、血管、骨骼肌、肾脏、肝脏、胰腺、肿瘤、神经组织、角膜、椎间盘等,并且 UTMD 技术在心肌缺血^[8]、糖尿病^[9]、关节炎^[10]等动物疾病模型治疗中也取得了一定的疗效。但是由于微泡造影剂最早应用于心血管疾病的诊断,因此超声靶向破坏微泡技术在血管系统疾病的治疗研究是最早的,也是相对最成熟的。

3 UTMD 技术介导基因或药物治疗的主要机制

UTMD 技术介导基因转染或药物治疗是一个多因素综合影响的过程。目前认为最主要包括两种机制:空化效应和声孔效应。空化效应指存在于液体中的微小气泡(又称“空化核”)在超声场的作用下不断振动、压缩和膨胀的过程。空化效应包括稳定空化和惯性空化^[11,12],一般认为,其生物学效应主要是惯性空化所致^[13,14]。稳态空化是在低强度的超压下,空化泡产生对称性的压缩和膨胀,气泡的直径保持相对恒定而不破裂。当能量达到一定阈值,空化泡压缩膨胀不均衡以致发生破裂(即惯性空化),此时释放出巨大的能量,该能量可使周围细胞的细胞膜通透性增加,在细胞膜上形成多个瞬时开放的小孔(即声孔效应)。当微泡表面携带药物或基因时,该能量可促使基因或药物进入靶细胞,瞬时开放的声孔是增强外源性的基因或药物进

入的直接原因。在不同的超声频率和超声强度条件下,声孔的开放时间在毫秒至秒之间,声孔形成的大小程度也不同,直径在 30 ~ 100 nm 之间,声孔开放时间和大小与空化效应程度呈正相关。

微泡造影剂主要由两部分组成,其内含的气体 and 微泡的外壳。随着微泡造影剂的快速发展,目前第 2 代、第 3 代超声微泡造影剂主要采用惰性气体如全氟化碳和六氟化硫,其外壳主要成分为蛋白质、脂质类、表面活性剂或者是高分子聚合物。微泡造影剂的外壳决定了微泡的稳定性以及微泡在超声场中振动和抵抗破裂的能力^[15]。

超声微泡携带基因或药物的方法主要有 4 种:将基因或药物直接黏附在微泡表面,镶嵌在微泡壁内外层之间,包裹在微泡内部及与微泡外壳形成非共价结合方式^[16]。

4 UTMD 技术在抗血管再狭窄中的应用

4.1 体外研究

Taniyama 等^[17]对人主动脉内皮细胞和平滑肌细胞使用 Optison 微泡介导荧光素酶质粒进行转染,结果显示,微泡联合超声组的荧光素酶活性相比单用质粒分别增加了 8 000 倍和 7 000 倍。同时在大鼠颈动脉血管中,微泡联合超声组的荧光素酶转染率较对照组增加 1 000 倍。Lawrie 等^[18]用荧光素酶裸 DNA 质粒对猪平滑肌细胞和内皮细胞进行转染,使用 1 MHz、0.4 W/cm² 的超声分别照射 60 s 和 30 min,2 天后平滑肌细胞和内皮细胞内的荧光素酶活性较无超声照射组分别增加 7.5 倍和 2.4 倍,并且对两种细胞的活性无影响。汪迎晖等^[19]应用 SonoVue 微泡联合 1.0 W/cm² 超声辐照 30 s 将血管生成素 1 (angiopoietin-1, Ang-1) 基因转染入血管内皮细胞,发挥了促血管生成的作用。

雷帕霉素作为一种免疫抑制剂目前广泛应用于心血管领域,可抑制平滑肌细胞的增殖及新生内膜的增生^[20]。Phillips 等^[21]使用超声联合微泡介导雷帕霉素转染血管平滑肌细胞。在使用不同参数的超声辐照后,得出在最优化的超声参数条件下(1 MHz、400 kPa)辐照 6 min,相比单纯使用雷帕霉素和微泡的对照组明显降低了平滑肌细胞的增殖。以上抗再狭窄的体外实验中取得的结果令人鼓舞,也为超声微泡介导基因或药物体内实验奠定了基础。

4.2 体内研究

在细胞增殖的过程中,有一系列的细胞周期调

节基因被激活,从而参与细胞增殖。诱饵寡核苷酸可作为诱饵与特定的转录因子结合,从而阻止特定的基因激活。Inagaki^[22]对 C57BL/6 鼠建立了股动脉损伤模型,使用 Optison 微泡介导诱骗核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 转染损伤股动脉,使用 1 MHz、1.0 W/cm² 的超声辐照,14 天之后,相比对照组增强了转染,抑制了新生内膜的增殖。Hashiya 等^[23]在 SD 大鼠颈动脉球囊损伤模型中,将 Optison 微泡和 E2F decoy 混合后,注入颈动脉球囊损伤大鼠体内,使用 1 MHz、2.5 W/cm² 的超声辐照 2 min,2 周后,治疗组的新生内膜明显受抑制。

随着新型抗再狭窄基因的研制,针对不同的再狭窄机制,UTMD 技术携带不同的治疗基因而被广泛研究。组织因子 (tissue factor, TF) 是外源凝血的启动因子,也是平滑肌细胞迁移和增生的主要启动因子之一,组织因子途径抑制剂 (tissue factor pathway inhibitor, TFPI) 蛋白作为 TF 唯一的天然抑制物,可有效抑制 TF 活性。Zhou 等^[24]使用 SonoVue 微泡作为基因载体,介导 TFPI-2 抑制因子注入兔子颈动脉球囊损伤模型体内。使用 1.5 MHz、1.0 W/cm² 超声辐照 3 min,4 周后,结果显示,相比对照组,内膜/中膜比值降低了 41%,并且降低了增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的表达。

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 基因是目前在心血管治疗领域研究最多的基因,能高效特异的作用于血管内皮细胞,促进受损的血管内皮迅速修复。马小五等^[25]建立了兔髂外动脉球囊损伤模型,超声造影剂 SonoVue 携带 VEGF 基因靶向转染损伤血管,2 周后,实验组的髂外动脉血管内皮依赖性舒张功能明显改善,血管壁平滑肌细胞 PCNA 表达明显减低,并且实验组 VEGF 的表达量明显高于对照组,实现了 VEGF 基因的有效转染,为抗血管再狭窄提供了新的方法。

Phillips 等^[26]在体外使用 UTMD 技术介导雷帕霉素成功抑制平滑肌细胞增殖之后,建立了大鼠颈动脉球囊损伤模型,分别使用 1×10^8 及 1×10^9 个不同数量的雷帕霉素微泡注入静脉内,并在损伤颈动脉处使用 5 MHz、1.5 MPa 超声辐照 8 min,结果显示分别使内膜增生减少了 35.9%、34.9%,证实了使用超声辐照后,可使 1×10^8 个雷帕霉素微泡达到相同的抑制内膜增生的效果,减少治疗药物的总剂量。

以上实验证实了 UTMD 技术介导基因或药物治疗的可行性,并且展现出如下的优势:①低毒性,

降低全身给药的总药物剂量;②相比病毒基因载体为低免疫原性;③无创性,可重复应用;④靶组织的特异性;⑤相对廉价;⑥无辐射。因此,UTMD 技术为血管成形术后抗血管再狭窄提供了一种更加安全高效的途径。

5 展 望

UTMD 技术是一种新型的介导基因或药物治疗的技术,拓展了超声影像的领域,增强了治疗的靶向性、无创性、安全性,并已在大量实验中得到了充分的肯定。和其他新技术一样,UTMD 技术在临床应用之前,对周围组织或器官还有一些生物学的效应需要考虑^[27,28],如毛细血管破裂、局部红细胞渗出等;另有报道指出,高能量超声条件下可引起室性早搏^[29]。这些生物学作用被认为与空化效应相关,其主要与超声微泡及超声能量呈总剂量依赖性,因此根据不同的设备、不同的微泡、不同的靶组织,优化出最佳参数才能更好的应用于临床。此外,进一步提高微泡造影剂和基因或药物的结合效率,并增加其与靶组织的靶向结合能力,才能提高基因或药物的靶向传递效率。

综上所述,随着超声技术的发展,UTMD 技术介导基因或药物在抗血管再狭窄的治疗方面必将具有更广阔、更安全的临床应用前景。

[参考文献]

- [1] Unger EC, Porter T, Culp W, et al. Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56(9): 1 291-314.
- [2] Kang SJ, Mintz GS, Park DW, et al. Mechanisms of in-stent restenosis after drug-eluting stent implantation: intravascular ultrasound analysis [J]. Circ Cardiovasc Interv, 2011, 4(1): 9-14.
- [3] Guildford AL, Stewart HJ, Morris C, et al. Substrate-induced phenotypic switches of human smooth muscle cells: an in vitro study of in-stent restenosis activation pathways [J]. J R Soc Interface, 2011, 8(58): 641-649.
- [4] 王丽岳,李俊,王珣,等.血小板源生长因子诱导核受体 Nur77 调节血管平滑肌细胞增殖[J].中国动脉硬化杂志,2011,19(6): 483-488.
- [5] 纪征,邸亚丽,张琦.国产雷帕霉素洗脱支架应用于冠状动脉分叉病变的效果评价[J].中国动脉硬化杂志,2011,19(4): 343-346.
- [6] Gramiak R, Shah PM. Echocardiography of the aortic root [J]. Invest Radiol, 1968, 3(5): 356-366.

- [7] 杜联芳. 超声造影新技术的临床实践[M]. 上海: 上海科技教育出版社, 2008; 1-5.
- [8] Korpanty G, Chen S, Shohet RV, et al. Targeting of VEGF-mediated angiogenesis to rat myocardium using ultrasonic destruction of microbubbles[J]. *Gene Ther*, 2005, 12(17): 1 305-312.
- [9] Chen S, Ding J, Yu C, et al. Reversal of streptozotocin-induced diabetes in rats by gene therapy with betacellulin and pancreatic duodenal homeobox-1 [J]. *Gene Ther*, 2007, 14(14): 1 102-110.
- [10] Nakaya H, Shimizu T, Isobe K, et al. Microbubble-enhanced ultrasound exposure promotes uptake of methotrexate into synovial cells and enhanced antiinflammatory effects in the knees of rabbits with antigen-induced arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(8): 2 559-566.
- [11] 李玲, 王志刚. 超声微泡造影剂携带基因治疗与超声空化效应[J]. *临床超声医学杂志*, 2005, 7(3): 195-197.
- [12] Miller DL. Overview of experimental studies of biological effects of medical ultrasound caused by gas body activation and inertial cavitation[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2007, 93(1-3): 314-330.
- [13] Hallow DM, Mahajan AD, McCutchen TE, et al. Measurement and correlation of acoustic caitation with cellular bioeffects[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2006, 32(7): 1 111-122.
- [14] Liang HD, Tang J, Halliwell M. Sonoporation, drug delivery, and gene therapy [J]. *Proc Inst Mech Eng H*, 2010, 224(2): 343-361.
- [15] Hernot S, Klivanov AL. Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(10): 1 153-166.
- [16] 逯敏飞, 程永清, 李丽君, 等. 微泡超声造影剂: 一种新型的药物靶向载体[J]. *中国医学影像技术*, 2005, 21(4): 513-515.
- [17] Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, et al. Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound[J]. *Circulation*, 2002, 105(10): 1 233-239.
- [18] Lawrie A, Briskin AF, Francis SE, et al. Ultrasound enhances reporter gene expression after transfection of vascular cells in vitro[J]. *Circulation*, 1999, 99(20): 2 617-620.
- [19] 汪迎晖, 郭瑞强, 周青, 等. 超声辐射与微泡瞬时转染血管内皮细胞及其促血管生成的研究[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2010, 32(8): 570-573.
- [20] 胡名松, 胡建国, 郑宝石. 雷帕霉素对大鼠移植心脏血管平滑肌细胞表型及内膜增生的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(4): 279-282.
- [21] Phillips LC, Klivanov AL, Wamhoff BR, et al. Localized ultrasound enhances delivery of rapamycin from microbubbles to prevent smooth muscle proliferation[J]. *J Control Release*, 2011, 154(1): 42-49.
- [22] Inaqaki H, Suzuki J, Oqawa M, et al. Ultrasound-microbubble-mediated NF-kappa B decoy transfection attenuates neointimal formation after arterial injury in mice [J]. *J Vasc Res*, 2006, 43(1): 12-18.
- [23] Hashiya N, Aoki M, Tachibana K, et al. Local delivery of E2F decoy oligodeoxynucleotides using ultrasound with microbubble agent (Optison) inhibits intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 317(2): 508-514.
- [24] Zhou J, Wang Y, Xiong Y, et al. Delivery of TFPI-2 using ultrasound with a microbubble agent (SonoVue) inhibits intimal hyperplasia after balloon injury in a rabbit carotid artery model[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2010, 36(11): 1 876-883.
- [25] 马小五, 张平洋, 王沛. 靶向超声介导血管内皮生长因子基因转染对兔损伤动脉血管内皮功能的影响[J]. *临床超声医学杂志*, 2011, 13(9): 577-580.
- [26] Phillips LC, Dhanaliwala AH, Klivanov AL, et al. Focused ultrasound-mediated drug delivery from microbubbles reduces drug dose necessary for therapeutic effect on neointima formation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(12): 2 853-855.
- [27] Miller DL, Averkiou MA, Brayman AA, et al. Bioeffects considerations for diagnostic ultrasound contrast agents [J]. *J Ultrasound Med*, 2008, 27(4): 611-632.
- [28] ter Haar GR. Ultrasonic contrast agents: safety considerations reviewed [J]. *Eur J Radiol*, 2002, 41(3): 217-221.
- [29] Chapman S, Windle J, Xie F, et al. Incidence of cardiac arrhythmias with therapeutic versus diagnostic ultrasound and intravenous microbubbles [J]. *J Ultrasound Med*, 2005, 24(8): 1 099-107.

(此文编辑 曾学清)