

超声靶向微泡破坏技术及其在乳腺癌治疗方面的应用

郑文艺, 吴裕明, 郝轶*

(南方医科大学深圳医院超声医学科, 广东深圳518000)

摘要: 超声靶向微泡破坏(UTMD)技术利用超声造影剂微泡(UCAs)作为载体,联合基因或药物治疗多种疾病,目前已表现出强大潜力。在乳腺癌治疗方面,低频超声辐照下微泡破裂产生的声孔效应及空化效应有效增加靶细胞内基因或药物浓度,增强对癌细胞杀伤力,具多重优点。但是,UTMD技术在实际应用中仍然面临许多问题。

关键词: 超声靶向微泡破坏技术;乳腺癌;治疗

中图分类号:R737.9 文献标志码:A

Ultrasound targeted microbubble destruction technology and its application in the treatment of breast cancer

ZHENG Wen-yi, WU Yu-ming, HAO Yi*

(Department of Medical Ultrasonic, Shenzhen Hospital, Southern Medical University, Shenzhen 518000, China)

Abstract: UTMD which uses UCAs as carriers and combines genes or drugs to treat a variety of diseases has shown great potential. The UCAs under the low-frequency ultrasound irradiation produce sound hole and cavitation effect, which effectively increases the concentration of genes or drugs in the targeting cells that enhance the lethargy to breast cancer cells. Although UTMD technology has been proved to support clinical performance, it still faces some challenges in terms of the practical application.

Key words: ultrasound targeted microbubble destruction technology; breast cancer; treatment

乳腺癌(breast cancer)是全球女性发病率最高的恶性肿瘤^[1],目前多采用联合治疗,但预后却不尽人意,部分患者最终死于肿瘤局部复发或远处转移。基因治疗利用载体将外源性基因转入靶细胞,调节或操纵目的基因表达过程^[2],通过纠正目的基因异常表达治疗疾病。常用方法包括癌基因治疗、抑癌基因治疗、双自杀基因治疗、微小RNA治疗(microRNA)等。目前基因治疗尚缺乏安全的载体

系统,传统病毒载体与非病毒载体具低特异性、高免疫原性和激活癌基因潜能等劣势,而超声靶向微泡破坏(ultrasound targeted microbubble destruction, UTMD)技术的出现有望解决该难题,为基因治疗提供可靠载体,也为药物治疗提供新给药途径。因此,探索UTMD技术在疾病治疗中机制、疗效和前景对乳腺癌治疗具有重大意义。本文就UTMD技术及其在乳腺癌治疗方面的应用简要综述。

收稿日期:2019-08-26 修回日期:2019-12-04

基金项目:深圳市科创委自由探索项目(JCYJ20170307144246792);南方医科大学临床研究启动计划项目(LC2016YM018)

*通信作者(corresponding author): haoyi0320sz@163.com

1 UTMD 技术

1.1 UTMD 技术原理

UTMD 是协助药物或基因穿过血管壁及细胞膜的新技术。注射入体内的微泡 (ultrasound contrast agents, UCAs) 在低频超声刺激下产生稳定空化作用 (微泡在声场的负压相中膨胀, 随即在声场的正压相中收缩, 在这种稳定变化下产生微流及剪切力) 及惯性空化作用 (超声频率、强度增加到一定程度时微泡急剧压缩破裂, 产生射流、冲击波以及高温、高压等物理条件), 上述空化作用产生的机械、化学效应及热效应造成细胞膜和血管壁内皮细胞损伤, 于细胞膜上形成可逆性小孔 (声孔)、内吞小泡, 使血管内皮细胞间隙增宽, 通透性增加, 此作用过程称为声孔效应^[3-4]。微泡所载物质 (基因、药物等) 借助通道穿过细胞膜进入细胞质或穿过血管壁到达靶区, 基因顺利表达后干扰肿瘤细胞基因表达, 阻碍病态细胞增殖、分化等进程; 细胞内局部药物浓度增高, 对肿瘤细胞杀伤作用显著增强^[5]。同时, 组织损伤启动体内炎性反应机制, 使体内巨噬细胞、T 淋巴细胞等局部聚集, 对病态组织进一步清除。低频超声的应用提高了该技术靶向性, 能较大程度避免正常组织误伤, 但邻近肿瘤的组织仍不可避免受到影响, 其程度可能与声学参数存在相关性。

1.2 微泡 (UCAs) 分类及物理性能

传统微泡 (microbubble, MB), 如商业微泡 Definity 等为球形小分子物质, 直径 $< 8 \mu\text{m}$, 中央由惰性气体 (如 NO、全氟化碳气体) 充填, 表面由白蛋白、脂类聚合物或磷脂双分子层包被。微泡内气体与体内组织声阻抗特性相差极大, 且超声脉冲下产生强烈回波, 因而可在血管内检测到高回声的微泡, 故常规用作超声造影剂, 在超声心动图显像领域应用广泛。理想微泡应具备: 1) 良好选择性、靶向性和稳定性; 2) 半衰期长; 3) 易于制备和保存; 4) 最低毒性、最低免疫原性; 5) 花费低等特点。由于常规微泡作为载体缺乏特异性且体积偏大, 近年来不仅研制出纳米级微泡, 还研制出性能更佳微泡, 例如: 1) 阳离子微泡 (cationic MB)。其与负电荷细胞膜中和后加速微泡进入细胞, 提高靶区肿瘤细胞内基因或者药物浓度^[6]; 2) 配体型微泡 (antibody-conjugated MB)。表面载某种配体, 可与肿瘤或血管内

皮细胞表面特异性抗原、生物素等结合, 显著增加微泡与靶细胞亲和力、黏附力^[7], 靶向性明显提高; 3) 细胞穿膜肽微泡 (cell-penetrating peptide-loaded MB, CPP MB)。由少于 30 个氨基酸构成, 能与负电荷细胞膜反应, 且 CPP 可不依赖受体自由穿过细胞膜, 转运蛋白质、低聚核苷酸等物质^[8], 有利于提高转染效率。微泡的精准定位与聚焦超声靶向控释构成具有特异性的基因转染系统。然而, 现有微泡尚不能完全满足目前需求, 微泡作为一种外来移植物, 虽然目前没有研究报道, 但多次、长时间使用 UTMD 技术是否对免疫系统造成损害不得而知。此外, 其潜在威胁也不可忽视, 除了开发物理性能更佳的微泡外, 如何将微泡“内源化”也尚待研究。

2 UTMD 技术在乳腺癌治疗方面的应用

超声微泡携基因或者药物靶向治疗乳腺癌是近年超声分子影像学研究的热点。

2.1 UTMD 技术在乳腺癌基因治疗方面的应用

2.1.1 小干扰 RNA (small interfering, siRNA): siRNA 是一类长约 21 个核苷酸的双链 RNA, 通过 UTMD 技术导入细胞内, 降解同源 mRNA, 减弱甚至敲除特定基因表达。用此方法将 siRNA 转入细胞进行实验, siRNA 封装率更高 ($> 85\%$)、体内释放率更高 ($> 90\%$)、目的基因表达率更低, 抗肿瘤效应更明显, 小鼠存活率更高^[8-9]。近年来, UTMD 技术被发现可用于基因治疗与光动力治疗联合疗法^[10-11], 使二者抗肿瘤效应最大化。光动力治疗利用特定波长激光束激发光敏剂, 使其在肿瘤细胞内产生单氧发挥杀伤效应。低氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor 1α , HIF- 1α) 和叉头框蛋白 A1 (forkhead-box A1, FOX-A1) 是存在于多数乳腺癌细胞中的转录因子, HIF- 1α 辅助肿瘤细胞耐受低氧, FOX-A1 在超过 50% 乳腺癌细胞中过表达, 二者在乳腺癌细胞增殖、转移方面均发挥作用。阳离子卟啉微泡中卟啉成分可作光敏剂, 其氨基端可通过静电吸附 siRNA, UTMD 技术使光敏剂与 HIF- 1α -siRNA 均在靶区高浓度聚集, 乳腺癌细胞 HIF- 1α 基因表达率下调 80%, 且证实细胞内单氧存在, 抑制 HIF- 1α 表达后光动力治疗效果更佳^[10]。利用 FOX-A1-siRNA 进行实验得到类似实验结果, 且发现肿瘤细胞周期发生停滞^[11]。以微泡为纽带, 将光敏剂与治疗基因结

合,可对光敏剂实时监控,对光动力治疗参数调节也有一定指导意义。虽然光动力治疗目前存在光敏剂不稳定、难修饰等问题,但筛选微泡性能、改善微泡内光敏剂包裹方式、化学修饰光敏剂与治疗基因也许是有有效解决方案。

2.1.2 微小 RNA (microRNA, miRNA): miRNA 为一类拥有约 22 个核苷酸的非编码单链 RNA,在 mRNA 转录后水平直接互补贴附于 3'-非翻译区,导致基因表达翻译过程及时终止, mRNA 降解,若该过程无法及时中止,即细胞癌变。治疗前乳腺癌患者体内 Let-7 表达量明显低于正常人群,手术、化疗和放疗后出现增加现象,而 miR-21、miR-155、miR10b 则呈现完全相反变化^[12]。证实 miRNA 是一种有希望诊断和预测乳腺癌预后的标志物,也为基于 miRNA 的基因治疗提供可靠理论基础。miR-133a 在乳腺癌组织中低表达,载体微泡有效延长外源性 miR-133a 体内循环时间,通过阻碍表皮生长因子受体(EGFR)生成和蛋白激酶磷酸化过程抑制癌细胞增殖,肿瘤体积明显减小,小鼠生存率也明显提高^[13]。除微泡以外,miRNA 还有金石墨烯纳米复合物^[14]及壳聚糖载体^[15](表 1)。

金石墨烯纳米复合物载 miRNA 转染率最高可达 96%^[14],但其制备过程复杂、成本高而应用受限;壳聚糖转染率最高可达 100%^[15],但颗粒大小及表面电荷易受 N/P 值影响,miRNA 剂量难以精确控制,治疗过程无法实时监控,载体缺乏靶向性。微泡就制备成本、物理性能、转染效率和治疗效果等方面综合优势明显。用于乳腺癌诊断、预测、疗效评估的 miRNA 种类繁多^[16],但能有效治疗乳腺癌的 miRNA 种类有限。因此,寻找更具特异性、敏感性的 miRNA 对于该疾病治疗意义重大。

2.1.3 双自杀基因(double suicide gene):双自杀基

因疗法是将某些病毒或细菌的基因导入肿瘤细胞,其编码特异性酶类将无毒前体药物转化为有毒药物,利用直接杀伤和旁观效应损伤肿瘤及周边细胞。乳腺癌细胞内导入重组质粒 pEGFR-KDRp-CD/TK 微泡后,其对 5-氟胞嘧啶(5-FC)、更昔洛韦(GCV)敏感性增加,此外,旁观者效应更显著^[17]。本团队研究发现双自杀基因慢病毒载体微泡对宫颈癌细胞具有显著杀伤效应,联合超声辐照其作用明显增强^[18]。证明低频超声辐照增强肿瘤治疗效果的可行性。出现上述结果不仅因为基因传导效率的增加,还源于超声及微泡增强化疗药物毒性,与双自杀基因发挥协同抗肿瘤效应。载双自杀融合基因微泡将治疗性基因与诊断超声微泡结合,包裹具有良好热吸收性能的纳米金棒,通过超声和近红外激光双重辐照,对癌细胞及其移植瘤成功进行了超声辐照/光热/基因三联靶向治疗,这已经在肝癌细胞中被证实^[19]。因此,UTMD 技术在双自杀基因的载体方面同样具有优势,不仅可以加强抗肿瘤效应,还可以实现多模态抗肿瘤体系的建立,为乳腺癌双自杀基因治疗提供了新的研究思路。

2.2 UTMD 技术在乳腺癌药物治疗中的应用

微泡还能用作化疗药物(紫杉醇等)载体^[20],传统静脉给药方式具有肿瘤靶区浓度低、药物循环时间短等不足,且肾毒性、骨髓抑制等不良反应明显。UTMD 技术能靶向控释药物,具药物释放率高、分布均匀、循环时间长、不良反应小、抗肿瘤效应明显等优点。临床上已有首例 UTMD 技术辅助晚期恶性肿瘤化疗的研究,晚期胰腺癌患者静脉注射吉西他滨后,采用低频超声(1.9 MHz、0.25 W/cm²)辐照上腹部 31.5 min,辐照同时间隔注射微泡(5×10⁻⁴ L SonoVue)与 0.9%氯化钠溶液(5×10⁻³ L)混合液。12 疗程后肿瘤体积明显缩小,为患者赢得手术治疗

表 1 miRNA 载体比较

Table 1 Comparison of carriers of miRNA

载体类型	成分	形态	直径(mm)	稳定性	辅助技术
金石墨烯纳米复合物	Au、纳米颗粒、石墨烯氧化物、稳定剂	棒状/多形态	棒状:纵径 6.5×10 ⁻⁵ ~9.3×10 ⁻⁵ 、横径 1.4×10 ⁻⁵ ~3.6×10 ⁻⁵ ; 球形:3.7×10 ⁻⁵ ~7.2×10 ⁻⁵	不良	近红外光谱技术
壳聚糖	壳聚糖	球形	2.9×10 ⁻⁴ ~3.8×10 ⁻⁴	良好	无
微泡	磷脂/脂质壳、惰性气体	球形	<8×10 ⁻³	良好	低频超声

的机会,延长生存时间,且相对于单纯化疗组无额外不良反应^[21]。虽该研究未直接使用微泡作为化疗药物载体,但仍有力证明 UTMD 技术增强药物疗效临床推广的可行性。因此,该技术辅助乳腺癌治疗并取得显著化疗效果亟待证实。此外,还应思考如下问题:基于乳腺癌常采用药物联合化疗,微泡有能力在多载药体系中表现出独特优势,体系内不同溶解度理论参数药物之间的连接机制及相互作用仍需进一步探究。UTMD 技术的探究不应仅局限于微泡本身,更应视药物及微泡体系为整体,探究其在治疗过程中发生的分子生物学效应及其机制,进而可以根据肿瘤细胞类型筛选微泡及药物。就目前形势,UTMD 技术介导下的化疗最具可行性,不久将实现基础医学到临床医学的转化。

3 展望与不足

目前 UTMD 技术用于治疗乳腺的研究尚处于细胞及小型动物实验阶段,其临床应用尚存在以下两方面难题:

3.1 UTMD 技术的安全性

虽然部分研究证实 UTMD 技术的安全性:10 例胰腺癌患者生命体征、心电图、临床常用血清学指标相对于对照组未出现差异^[21];大鼠肝脏细胞于实验后 0.5 h 出现肿胀,体内 AST、ALT 也出现升高,于 1 周后恢复正常^[22]。但其介导下治疗心肌梗死时出

现过暂时心脏功能异常^[23];上述高安全性能研究涉及样本有限,所监测指标也具有局限性,是否存在目前无法监测的危害尚不得而知;且重复多次使用该技术是否对血管壁、细胞膜、心功能具有累计损伤效应,最终造成不可逆损害仍未知,损害程度与微泡浓度、大小及超声声学参数的相关性都需要进一步研究。该技术安全性为目前临床应用首要难题。

3.2 探索 UTMD 技术的最佳参数条件

包括最佳微泡浓度、微泡大小、低频超声声学参数等。声学参数(频率、声强、辐照时间、占空比)是转染效率和治疗效果的主要影响因素,故声学参数优化至关重要。过低声学参数使转染效率低下、治疗效果不佳;过高声学参数引发毛细血管损伤、血栓形成、辐照烫伤、周围组织误伤等不良反应,目前多采用的参数为频率 1~1.5 MHz、声强 1~2 W/cm²、辐照时间 1~2 min、占空比 50%^[21, 24]。4 种常见乳腺癌细胞最佳超声频率、声强、辐照时间参数存在差异^[25],提示探索其他类型乳腺癌细胞最佳声学参数,特别是多重耐药细胞株。声学参数的设置不仅取决于肿瘤细胞学类型,还与微泡(类型、浓度)、基因/药物特性(理化性质、剂量)、载体连接方式、肿瘤(大小、部位、深度)、疾病的进展情况(浸润或局限)等相关,优化声学参数的探索任重道远。如果上述问题得到妥善解决,UTMD 技术用于乳腺癌治疗具有广阔前景。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68: 394-424.
- [2] High KA, Roncarolo MG. Gene therapy[J]. *N Engl J Med*, 2019, 381: 455-464.
- [3] Lentacker I, De Cock I, Deckers R, *et al.* Understanding ultrasound induced sonoporation: definitions and underlying mechanisms[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 72: 49-64.
- [4] Helfield B. A review of phospholipid encapsulated ultrasound contrast agent microbubble physics[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2019, 45: 282-300.
- [5] Yang J, Zhang XJ, Cai HJ, *et al.* Ultrasound-targeted microbubble destruction improved the antiangiogenic effect of Endostar in triple-negative breast carcinoma xenografts[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145:1191-1200.
- [6] 张东旻, 杨雷, 田海, 等. 阳离子微泡提高超声波靶向击碎微泡技术体内基因靶向转染效率及治疗效果的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2018, 32: 228-236.
- [7] Anderson CR, Hu X, Zhang H, *et al.* Ultrasound molecular imaging of tumor angiogenesis with an integrin targeted microbubble contrast agent[J]. *Invest Radiol*, 2011, 46: 215-224.
- [8] Jing H, Cheng W, Li S, *et al.* Novel cell-penetrating

- peptide-loaded nanobubbles synergized with ultrasound irradiation enhance EGFR siRNA delivery for triple negative Breast cancer therapy [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 146: 387-395.
- [9] Wan Y, Dai W, Nevagi RJ, *et al.* Multifunctional peptide-lipid nanocomplexes for efficient targeted delivery of DNA and siRNA into breast cancer cells [J]. *Acta Biomater*, 2017, 59: 257-268.
- [10] Sun S, Xu Y, Fu P, *et al.* Ultrasound-targeted photodynamic and gene dual therapy for effectively inhibiting triple negative breast cancer by cationic porphyrin lipid microbubbles loaded with HIF1 α -siRNA [J]. *Nanoscale*, 2018, 10: 19945-19956.
- [11] Zhao R, Liang X, Zhao B, *et al.* Ultrasound assisted gene and photodynamic synergistic therapy with multifunctional FOXA1-siRNA loaded porphyrin microbubbles for enhancing therapeutic efficacy for breast cancer [J]. *Biomaterials*, 2018, 173: 58-70.
- [12] Khalighfard S, Alizadeh AM, Irani S, *et al.* Plasma miR-21, miR-155, miR-10b, and Let-7a as the potential biomarkers for the monitoring of breast cancer patients [J]. *Sci Rep*, 2018, 8. doi:10.1038/s41598-018-36321-3.
- [13] Ji Y, Han Z, Shao L, *et al.* Evaluation of *in vivo* antitumor effects of low-frequency ultrasound-mediated miRNA-133a microbubble delivery in breast cancer [J]. *Cancer Med*, 2016, 5: 2534-2543.
- [14] Assali A, Akhavan O, Adeli M, *et al.* Multifunctional core-shell nanoplateforms (gold@ graphene oxide) with mediated NIR thermal therapy to promote miRNA delivery [J]. *Nanomedicine*, 2018, 14: 1891-1903.
- [15] Kaban K, Salva E, Akbuga J. The effects of chitosan/miR-200c nanoplexes on different stages of cancers in breast cancer cell lines [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2016, 95: 103-110.
- [16] Loh HY, Norman BP, Lai KS, *et al.* The regulatory role of microRNAs in breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20. doi:10.3390/ijms20194940.
- [17] Li XH, Zhou P, Wang LH, *et al.* The targeted gene (KDRP-CD/TK) therapy of breast cancer mediated by SonoVue and ultrasound irradiation *in vitro* [J]. *Ultrasonics*, 2012, 52: 186-191.
- [18] Hao Y, Guo L, Abudula A, *et al.* Proliferation inhibition and apoptosis enhancement of human cervical cancer cells by ultrasound-targeted microbubble destruction delivered double suicide genes [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7: 5330-5335.
- [19] Wang L, Lu H, Gao Q, *et al.* A multifunctional theranostic contrast agent for ultrasound/near infrared fluorescence imaging-based tumor diagnosis and ultrasound-triggered combined photothermal and gene therapy [J]. *Acta Biomater*, 2019, 99: 373-386.
- [20] Zhang J, Wang S, Deng Z, *et al.* Ultrasound-triggered drug delivery for breast tumor therapy through iRGD-targeted paclitaxel-loaded liposome-microbubble complexes [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14: 1384-1395.
- [21] Dimcevski G, Kotopoulos S, Bjanec T, *et al.* A human clinical trial using ultrasound and microbubbles to enhance gemcitabine treatment of inoperable pancreatic cancer [J]. *J Control Release*, 2016, 243: 172-181.
- [22] Yang D, Tan KB, Gao YH, *et al.* Effects of diagnostic ultrasound-targeted microbubble destruction on permeability of normal liver in rats [J]. *Ultrasonics*, 2012, 52: 1065-1071.
- [23] Vancraeynest D, Havaux X, Pouleur AC, *et al.* Myocardial delivery of colloid nanoparticles using ultrasound-targeted microbubble destruction [J]. *Eur Heart J*, 2006, 27: 237-245.
- [24] Yoon YI, Yoon TJ, Lee HJ. Optimization of ultrasound parameters for microbubble-nanoliposome complex-mediated delivery [J]. *Ultrasonography*, 2015, 34: 297-303.
- [25] Qu N, Shi D, Shang M, *et al.* Breast cancer cell line phenotype affects sonoporation efficiency under optimal ultrasound microbubble conditions [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 9054-9062.