

靶向超声微泡在卵巢癌治疗中的研究进展

苏子涵, 赵 云

(三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443000)

【摘要】 近年来,随着对超声生物效应的深入研究,各种兼具诊断治疗双重作用的超声探头及靶向微泡造影剂的研制逐渐成为热点。靶向超声微泡作为一种新的基因或药物有效运载工具,通过携带基因或药物对肿瘤组织靶向释放,介导肿瘤细胞坏死、凋亡以及肿瘤微血管的栓塞和阻断,从而达到靶向治疗的目的。目前,超声微泡介导靶向治疗卵巢癌也展现出了良好的前景,本文就其研究进展进行简要综述。

【关键词】 超声微泡;靶向治疗;卵巢癌

【中图分类号】 R737.31 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2015)09-1331-04

Research progress of targeted ultrasonic microbubble in the treatment of ovarian cancer. SU Zi-han, ZHAO Yun. Department of Ultrasonography, the Second Clinical Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443000, Hubei, CHINA

【Abstract】 In recent years, with the in-depth study of ultrasonic biological effects, development of ultrasonic probe and targeted microbubble contrast agent has gradually become a hot spot. Targeted ultrasound microbubble, as a kind of new gene or effective carrier of drug, achieved its purpose of targeted therapy by carrying genes or drugs for tumor targeting release, and mediating tumor cell necrosis and apoptosis and tumor microvascular thrombosis and blocking. At present, ultrasound microbubble targeting therapy for ovarian cancer has showed good prospects. Therefore, the research progress of ultrasound microbubble targeting therapy for ovarian cancer was reviewed in this article.

【Key words】 Ultrasound microbubble; Targeted therapy; Ovarian cancer

超声靶向微泡造影剂技术在临床应用上具有诊断和治疗双重作用,近年来他们的研制工作成为了该领域的研究热点,热点的背后,是近年来学者们对超声生物效应的不断深入探究。作为一种新兴的药物或基因的有效运载工具,靶向超声微泡通过向肿瘤组织靶向释放其携带的药物或基因,以介导或促使肿瘤细胞的坏死、凋亡及肿瘤微血管的栓塞和阻断,从而达到靶向治疗的目的。卵巢恶性肿瘤是发病率仅排在宫颈癌和子宫体癌之后的第三大女性生殖器官常见恶性肿瘤。由于其起病隐匿,发病早期缺乏典型临床症状,以至于七到八成的患者在就诊时就已属晚期。临床上卵巢癌进行传统手术、化疗和放疗常常难以治愈,并且约六成到八成的患者治疗后最终复发,严重危害女性健康。因此,寻求安全高效的治疗方法成为了国内外学者所共同关注的热点问题之一。近年来,作为一种安全有效的新载体,超声微泡造影剂可以实现在分子水平上对卵巢癌的靶向治疗,并已经开始展现出广泛的应用前景。本文就相关研究进展及现状进行简要综述。

1 靶向超声微泡的构建

普通的超声微泡是一种内含气体,外包壳膜的小球。由于微泡内的气体的声阻抗与微泡外血液的差别甚大,微泡内气体的回波反射性能较强,因此而被认为是一种高效的超声造影材料^[1-2]。超声微泡造影剂的发展过程中,因应用不同的材料制作壳膜而分为了蛋白质类、壳聚糖类、脂质类、可降解高分子类、非离子表面活性剂类等多种超声微泡造影剂^[3-5]。其中,壳膜材料为高分子聚合物的超声微泡造影剂因其具有高效封装、完整释药、保留药物活性、抗压性强等优势而具有广阔前景^[6-11]。

靶向超声微泡是以普通的超声微泡为基础,对造影剂的表面物质材料进行改造,及化学修饰,使靶向物质如抗体、基因等连接在其表面,通过机体的免疫反应或生物反应,实现与不同病变组织及器官血管内皮中的不同特异性抗原分子或受体进行高效且直接地靶向结合,这种方式可使微泡免于吞噬细胞的破坏,因此其具有高水平的特异性和靶向性^[1]。

靶向超声微泡发挥靶向作用的关键在于将配基(单克隆抗体、叶酸、多糖及多肽等)连接到微泡表面。连接的方式包括直接(共价)连接或间接(非共价)连接。在非共价靶向体系中,最有效的生物桥是抗生物素和生物素复合体。有学者研究表明,抗生物素和生物素复合体两者结合位点多,具有高度的亲和力,且因复合体的参与,单核巨噬细胞系统对靶向超声微泡的免疫清除作用也得到大大延缓。因此,抗生物素和生物素复合体成为了目前应用较为广泛的生物桥。在共价连接方式体系中,目前应用最广泛的做法是将某些分子桥插入微泡和配体之间,常用的分子桥为聚乙二醇(PEG)。将聚乙二醇作为分子桥插入于脂质分子层,并与生物素-抗生物素蛋白链霉素-生物素复合体的一端相连接,复合体的另一端结合各类型的配体,从而达到超声微泡靶向到达病灶的目的^[12]。近年来,在卵巢癌的化疗治疗领域中,Liu 等^[13]在载药超声微泡上连接促黄体激素释放激素类似物(LHRHa),通过生物素-亲和素方式与卵巢癌细胞 A2780/DDP 细胞中表达的 LHRH 受体靶向结合,从而达到靶向治疗的目的。

2 在抗肿瘤治疗中,靶向超声微泡的生物作用机制

作为一种靶向治疗载体的超声微泡到达病灶后,超声波与微泡造影剂相互作用并产生一系列生物学效应,这些生物学效应使得基因和药物能够顺利进入血管壁、细胞、甚至组织间隙,进而使药物在局部组织范围内得到高浓度释放,或使其基因转染率增加,从而发挥靶向治疗作用^[14]。对于超声的空化效应而言,微泡造影剂可使超声波的空化阈值降低,而微泡作为空化核的一种,通过超声波的作用,会发生压缩和膨胀,当声能的强度达到一定程度时,微泡就能够被瞬间击碎^[15]。

研究显示,空化效应可通过产生休克波使局部细胞膜通透性得到增加。由于微泡破裂瞬间而产生的切应力会作用在血管内皮细胞膜上,使得生物膜的通透性增加^[16]。这种通透性的增加可能是由于质膜或核膜受到高能冲击波或微射流的冲击,而出现了暂时性的小孔,细胞外大分子和颗粒可以通过细胞膜上的这些暂时非致命声孔进入细胞内,这种超声声孔效应提高了微泡对基因和药物的递送作用^[17]。

3 靶向超声微泡介导治疗卵巢癌相关研究

3.1 载药超声微泡治疗卵巢癌

化学治疗是卵巢癌治疗过程中的主要辅助手段之一,大多数的卵巢癌对化学治疗较为敏感,通过化疗可以延缓患者病情

的进一步发展,而且还有可能使癌灶完全消退消失,从而延长患者的生命。近年来,紫杉醇联合抗癌药物化疗和紫杉醇抗癌药物新剂型的研发等方面均取得了进展,但药物引起的毒副作用:如骨髓抑制、神经毒性、心脏毒性等,使这些药物在临床应用上受到了很大的限制。载药靶向超声微泡的出现,能够有效缓解这一问题。它以低毒、长效缓释的方式进行靶向给药,并有利于靶组织对药物的摄取和吸收,在降低血药浓度的同时实现了靶组织内药物浓度的增加。Unger 等^[18]动物实验表明,通过负荷紫杉醇药物的自制脂质体微泡进行给药,紫杉醇的药效大大增强,且与游离紫杉醇相比,包封的紫杉醇毒性降低了 10 倍。Rapoport 等^[19]用聚合物胶束和十二氟戊烷(Perfluoropentane)制备了携带阿霉素的纳米级超声微泡,通过静脉注射对荷有药物敏感卵巢癌的裸鼠进行治疗,结果表明纳米级微泡通过外渗选择性地进入肿瘤间隙,靶向聚集在肿瘤组织,而几乎不滞留在肝、肾等其他器官,且明显的抑制了肿瘤的生长。近年来,国内学者研究制备的 PLGA-PTX 微球满足了紫杉醇药物释放浓度需要,延长了紫杉醇体内作用时间,减少了毒副作用的发生。其促进 SKOV3 细胞凋亡效果优于紫杉醇注射液,为紫杉醇治疗卵巢癌提供了新的药物剂型和方式方法。研究同时表明 PLGA-PTX 作为一种新型的生物可降解的高分子药物剂型有着较高的包封率与载药率。近年来,随着靶向超声微泡的研究不断进展,Liu 等^[13]利用卵巢癌细胞上的高表达 LHRH(促黄体生成素释放激素)受体这一特性,在 PTX 微球上涂以促黄体激素释放激素类似物(LHRHa)通过生物素链接卵巢癌 A2780/DDP 细胞表达 LHRH 受体,从而达到使药物进入靶向区域的目的。实验结果表明 LHRHa-targeted MBs (TPLMBs) 组对卵巢癌细胞的抑制作用明显高于其他组如 PTX 组和 no-targeted PTX-loaded MBs (NPLMBs) 等组。Pu 等^[20]将携有 LHRH 受体的靶向紫杉醇微泡(TPLMBs)注射于载有 A2780/DDP 卵巢癌细胞的裸鼠模型腹腔中,腹腔注射 TPLMBs 后肿瘤组织的免疫组织化学分析进一步证实了其可以增加肿瘤细胞凋亡和减少血管的生成。

3.2 载基因超声微泡治疗卵巢癌

原癌基因和抑癌基因的双重调控是导致卵巢细胞的发生和发展重要原因,卵巢癌的发生是由于抑癌基因功能减弱后原癌基因被激活。基因治疗卵巢癌已经成为当前热门课题之一,其核心技术是基因的转染与表达。病毒载体是目前常用的基因运载体之一,它作为转基因的

载体有着转染率高的优点,但也存在免疫原性和致突变性的缺点,致使其在临床应用上的安全性较差。非病毒载体虽然较为安全,但由于存在转染率低、靶向性差等缺陷,影响了其在机体内作用的发挥。因此目前基因治疗的关键问题是开发更安全高效、简便实用的基因载体。在超声波的作用下,超声微泡产生谐振效应,所携带基因在微泡破裂后释放,并在能量辐射的作用下进入血管壁甚至组织间隙,进而达到靶向治疗的目的。国内外研究发现,所携带的裸露 DNA 在微泡造影剂和超声的联合使用的情况下,其转染率能够提高 3 000 倍^[21]。超声微泡介导的靶向基因治疗技术既可以提高细胞内裸质粒 DNA 的转染率和表达率,又能增强基因治疗的靶向性,减少全身的不良反应,并且减少机体的免疫反应,而被公认为是安全高效的一项新型基因转染技术。近来,杨艳等^[22]以超声介导微泡转染 pORF-HSV1 TK 质粒至 SKOV3 细胞,结果发现,与其他组相比,运用超声介导微泡组的 HSV1 TK 基因转染率最高,细胞增殖抑制率最高(P 均 <0.05)。该研究表明,超声介导微泡具有诱导 SKOV3 凋亡和抑制 SKOV3 增殖、增强 HSV1 TK/GCV 系统的作用,并且能将 SKOV3 的细胞周期阻断在 G1 期,进而发挥抗癌效应。王斌等^[23]运用超声微泡造影剂介导 PTEN 基因转染 SKOV3 实验的研究表明,向肿瘤细胞中加入 PTEN 基因质粒和微泡造影剂,并经过一定能量的超声照射后,发现其基因转染率得到了明显提高。张勇^[24]利用静电吸附原理和生物素-亲和素桥接法成功制备了 LHRHa 靶向载 Survivin-pshRNA 脂质微泡:该微泡与超声联合介导 Survivin-pshRNA 转染卵巢癌 A2780/DDP 细胞,可抑制 Survivin 基因在卵巢癌细胞中的表达,并可以有效促进卵巢癌细胞的凋亡。Chang 等^[25]制作的 LHRHa 靶向载 pEGFP-N1-野生型 p53 微泡转染 A2780/DDP 细胞,与其他处理组比较,靶向微泡组有更高的转染效率和细胞凋亡率。

3.3 超声能量直接介导肿瘤细胞凋亡 有研究表明,当超声空化效应达到较高的强度时,会导致肿瘤小血管管壁受损,内源或外源性凝血被激活,从而诱发形成血管内血栓,使得肿瘤细胞因为缺少血液供应而引发局部肿瘤细胞坏死。杨宏志等^[26]研究发现卵巢癌细胞的体外生长受到低频超声的显著抑制,并能够在诱导下凋亡。

4 问题与展望

与其他技术手段比较,利用靶向超声微泡携带基因和药物来治疗卵巢癌有着无法比拟的优点,具有广

阔的发展前景。但是,目前运用超声微泡介导靶向治疗卵巢癌仍处于起步阶段,相关研究大多停留在细胞和动物实验阶段,在进入临床应用前,许多实际问题尚有待解决:(1)进行超声辐照微泡治疗时,有部分患者可发生组织出血、血管内溶血和器官损伤等不良临床反应,这表明超声微泡的声学特性尚需进一步明确,并且相关参数仍需进一步优化。(2)超声联合微泡的应用的安全性和高效性还需在临床上进行进一步证明。(3)目前肿瘤发生机制仍不明确,尚需进一步的探究,如何对微泡的浓度、载药量、包封率和超声辐射的各参数进行控制,如何确保基因和药物在靶点稳定、安全、高效的表达和释放等都是目前需要进一步解决的问题。

参考文献

- [1] 黄瑞珠, 宾建平. 靶向超声微泡在肿瘤诊断与治疗领域的研究进展[J]. 肿瘤, 2009, 29(7): 692-695.
- [2] Lindner JR, Kaul S. Delivery of drug with ultrasound [J]. Echocardiography, 2001, 18(4): 329-337.
- [3] 卞爱娜, 高云华, 谭开彬, 等. 免疫脂质体微泡造影剂的制备及体外靶向研究[J]. 中国医学影像技术, 2004, 20(3): 356-358.
- [4] 罗亮, 李丽君, 程永清, 等. 多聚体超声造影剂微泡携带 DNA 能力研究[J]. 中国医学影像技术, 2005, 21(4): 498-500.
- [5] 岳殿超, 徐辉雄, 吕明德, 等. 声诺维(SonoVue)增强超声辐照对 HepG2 细胞膜通透性的影响[J]. 中国医学影像技术, 2005, 21(4): 510-512.
- [6] Rosa GD, Iommelli R, La Rotonda MI, et al. Influence of the co-encapsulation of different non-ionic surfactants on the properties of plgainsulin-loaded microspheres [J]. J Control Release, 2000, 69(2): 283-295.
- [7] Li X, Zhang Y, Yan R, et al. Influence of process parameters on the protein stability encapsulated in poly-dl-lactide-poly (ethylene glycol) microspheres [J]. J Control Release, 2000, 68(1): 41-52.
- [8] Li X, Deng X, Huang Z. *In vitro* protein release and degradation of poly-dl-lactide-poly (ethylene glycol) microspheres with entrapped human serum albumin: quantitative evaluation of the factors involved in protein release phases [J]. Pharm Res, 2001, 18(1): 117-124.
- [9] Pistel KF, Kissel T. Effects of salt addition on the microencapsulation of proteins using w/o/w double emulsion technique [J]. J Microencapsul, 2000, 17(4): 467-483.
- [10] Frauke Pistel K, Breitenbach A, Zange-Volland R, et al. Brush-like branched biodegradable polyesters, part iii. Protein release from microspheres of poly (vinyl alcohol) -graft-poly (d, l-lactic-co-glycolic acid) [J]. J Control Release, 2001, 73(1): 7-20.
- [11] Yang YY, Chia HH, Chung TS. Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of plga microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method [J]. J Control Release, 2000, 69(1): 81-96.

胆管癌危险因素研究进展

陈世成, 符国珍, 周 帅

(海口市人民医院 中南大学湘雅附属海口医院肝胆外科, 海南 海口 570208)

【摘要】 胆管癌(Cholangiocarcinoma)分为肝内胆管癌(ICC)和肝外胆管癌(ECC), ICC 和 ECC 在流行病学、发病机制、临床表现、治疗方法等方面均存在较大差异, 胆管癌是恶性程度较高和预后较为不佳的癌症。目前, 国内胆管细胞癌的发病率和死亡率呈上升趋势, 其原因尚不清楚。现将胆管危险因素做一综述。

【关键词】 胆管癌; 肝内胆管癌; 肝外胆管癌; 危险因素

【中图分类号】 R735.8 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2015)09-1334-05

胆管癌(Cholangiocarcinoma)是一种相对少见的肿瘤, 约占消化道肿瘤的 3%。根据解剖学分类胆管癌分为肝内胆管细胞癌(ICC)和肝外胆管细胞癌(ECC), 肝外胆管癌又可分为肝门部胆管癌(PHC)和远端胆管癌(DCC)。肝内外胆管细胞癌在流行病学、发病机制、临床表现、治疗方法等方面均存在差异。最近有数据表明, 国内外胆管细胞癌的发病率和死亡率呈上升趋势, 这种发生率增加的原因尚不清楚^[1-3]。目前认为胆管癌危险因素有多方面的, 包括原发性硬化

性胆管炎(Primary sclerosing cholangitis, PSC)、肝硬化、病毒性肝炎、肝吸虫病、胆石症、胆管囊肿、炎症性肠病、糖尿病、吸烟、肥胖等。当前, 肝炎病毒是困扰我国人群健康的突出因素之一, 有些学者推测可能是日益流行的慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染导致的。

1 危险因素

1.1 原发性硬化性胆管炎(PSC) 目前, 胆管癌的许多危险因素已经明确, 但仅有很少一部分患者表现出这些明确的危险因素。在西方国家, 患有 PSC 的

通讯作者: 陈世成。E-mail: chenshicheng2011@163.com

[12] Dayton PA, Ferrara KW. Targeted imaging using ultrasound [J]. Magn Reson Imaging, 2002, 16(4): 362-377.

[13] Liu H, Chang S, Sun J, et al. Ultrasound-mediated destruction of LHRHa-targeted and paclitaxel-loaded lipid microbubbles induces proliferation inhibition and apoptosis in ovarian cancer cells [J]. Mol Pharm, 2014, 11(1): 40-48.

[14] Ward AC, Dowthwaite GP, Pitsillides AA. Hyaluronan in joint cavitation [J]. Biochem Soc Trans, 1999, 27(2): 128-135.

[15] Miller MW, Miller DL, Brayman AA, et al. A review of *in vitro* bio effects. Ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective [J]. Ultrasound Med Biol, 1996, 22(9): 1131-1154.

[16] Dijkmans PA, Juffermans LJ, Musters RJ, et al. Microbubbles and ultrasound: from diagnosis to therapy [J]. Eur J Echocardiogr, 2004, 5(4): 245-256.

[17] Frenkel V, Kimmel E, Iger Y. Ultrasound-induced cavitation damage to external epithelia of fish skin [J]. Ultrasound Med Biol, 1999, 25(8): 1295-1303.

[18] Unger EC, McCreery TP, Sweitzer RH, et al. Acoustically active lipospheres containing paclitaxel a new therapeutic ultrasound contrast agent [J]. Invest Radiol, 1998, 33(12): 886-892.

[19] Rapoport N, Gao Z, Kennedy A. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy [J]. J Natl Cancer Inst, 2007, 99(14): 1095-1106.

[20] Pu C, Chang S, Sun J, et al. Ultrasound-mediated destruction of LHRHa-targeted and paclitaxel-loaded lipid microbubbles for the treatment of intraperitoneal ovarian cancer xenografts [J]. Mol Pharmaceutics, 2014, 11(1): 49-58.

[21] Lawrie A, Brisken AF, Francis SE, et al. Microbubble enhanced ultrasound for vascular gene delivery [J]. Gene Therapy, 2000, 7(23): 2023-2027.

[22] 杨 艳, 樊 萍, 杨 竹, 等. 超声微泡介导自杀基因对卵巢癌细胞的抗癌效应[J]. 中国医学影像技术, 2012, 28(6): 1041-1046.

[23] 王 斌, 傅艺兵, 李晓翠, 等. 超声造影剂介导 PTEN 基因影响卵巢癌侵袭的实验研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2006, 15(1): 58-60.

[24] 张 勇. 超声联合 LHRHa 脂质微泡靶向沉默 Survivin 基因对卵巢癌 A2780/DDP 细胞凋亡的影响[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2012.

[25] Chang S, Guo J, Sun J, et al. Targeted microbubbles for ultrasound mediated gene transfection and apoptosis induction in ovarian cancer cells [J]. Ultrason Sonochem, 2013, 20(1): 171-179.

[26] 杨志宏, 王智彪, 于廷和. 低频超声对卵巢癌 COC1 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2004, 31(5): 249-251.

(收稿日期: 2014-10-08)