

超声微泡造影剂的发展及最新临床应用研究

赵金花, 惠春, 陈亚珠 (上海交通大学 生物医学仪器研究所, 上海 200030)

摘要:目的: 超声微泡造影剂经历了不同的技术发展阶段, 目前靶向微泡造影剂的应用是一个重要的研究领域。方法: 超声微泡造影剂可分为普通型和特殊型两类。普通超声造影剂经历了三个发展阶段, 第一代内含空气的气泡, 无包膜且尺寸大; 第二代内含空气, 有膜包被, 尺寸小; 第三代内含氟碳类气体, 有稳定的膜壳。靶向微泡造影剂是一类特殊造影剂, 最新研究用于超声-微泡介导的靶向分子成像, 如血栓、炎症显影, 还可用于溶栓治疗, 靶向药物或基因治疗等方面。结果: 超声造影剂的稳定性不断提高, 靶向微泡造影剂经静脉注射可到达特定靶区, 低能超声作用下可提高局部组织显影的分辨率。携带治疗药物或基因的靶向微泡造影剂在低频(1 MHz)超声作用下产生瞬态空化效应, 细胞膜的通透性增加, 因而有效提高了药物或基因的转染率。结论: 超声联合靶向微泡技术在临床诊断和治疗中显示出了较大的优势, 但其确切的生物学机制还未清楚, 超声治疗参数需进一步优化。

关键词: 超声造影剂; 微泡; 靶向; 分子成像; 治疗

中图分类号: R318; R445.1; R814.43

文献标识码: A

文章编号: 1005-202X(2010)02-1802-04

Development and New Clinical Applications of Ultrasound Microbubble Contrast Agents

ZHAO Jin-hua, HUI Chun, CHEN Ya-zhu

(Biomedical Instrument Institute of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

Abstract: Objective: Several generations of ultrasound contrast agents have been developed. Now the application of targeted microbubble is an important research field. **Methods:** Ultrasound microbubble contrast agents can be divided into two types: ordinary and special ones. First generation microbubble products are air bubbles. They lack a stabilizing shell and have large size. The second ones are stabilized by a shell and have a smaller size, instable gas cores consisting of air. The third ones have a stable shell and gas cores with perfluorocarbons. Researches on new applications of targeted microbubble involve the targeted molecular imaging such as thrombus and inflammation imaging, thrombolytic therapy, drug/gene therapy and so on. **Results:** The stability of microbubble is increased gradually. Microbubble is injected intravenously and reaches the targeted tissue. At low ultrasound beam power imaging contrast can be improved. Low frequency ultrasound (1 MHz) can cause transient perforation of cell membrane by cavitation effects and thereby improve drug/gene delivery efficiency. **Conclusions:** Ultrasound-targeted microbubble has shown its advantages over other methods in the clinical diagnosis and treatment. While the bio-effects are not fully understood. And physical parameters affecting drug or gene delivery efficiency should be optimized.

Key words: ultrasound contrast agents; microbubble; targeted; molecular imaging; therapy

前言

近年来,随着超声技术的不断发展,作为一种无创、价优的诊断模式,超声影像诊断技术在临床上得

到了广泛的应用,如肝脏、脾脏、胆囊、胎儿异位等疾病的诊断。另外,超声治疗技术也开始逐渐被应用于临床,如高强度聚焦超声(HIFU)利用声束聚焦产生瞬间高温的性质,使聚焦靶区的肿瘤细胞产生不可逆的坏死,从而达到消融肿瘤的效果,目前HIFU已被研究用于前列腺癌、乳腺癌、胰腺癌、子宫纤维瘤等疾病的治疗中^[1,2]。

同时,超声诊断和治疗技术也存在一些问题,如超声图像的对比度相对于CT、MRI较差,有时局部组织无法较好的显影;治疗超声消融肿瘤的靶向性需提

收稿日期: 2009-12-02

基金项目: 上海市科委项目(No. 0752nm027)

作者简介: 赵金花(1986-),女,上海崇明人,硕士研究生,主要从事医疗器械的应用研究。E-mail: jinhua018@hotmail.com。

高等, 超声微泡造影剂的出现一定程度上有效解决了这些问题。超声微泡造影剂是一种内含气体、外部包有一层膜的微气泡, 直径为 $1\ \mu\text{m}\sim 8\ \mu\text{m}$, 它能实现组织的回声增强从而提高组织显影的清晰度, 另外它可作为一种靶向药物或基因治疗的载体, 减小周围正常组织的损伤, 增强肿瘤的治疗效果。

1 超声微泡造影剂的技术研究进展

1968年, Gramiak、Shah 报道了注射造影剂的盐水溶液后能增强人体心室动脉的超声回波信号, 首先将超声造影剂应用于临床^[3], 之后超声造影剂的发展经历了不同的阶段。

1.1 普通超声造影剂的三个发展阶段

第一代超声造影剂为自由气体(空气或氧气), 无膜包被, 不稳定, 尺寸大, 不能经外周静脉注射, 而是通过心导管插入主动脉或心腔内, 属有创性治疗。由于造影剂在血液中持续时间短、不能通过肺循环, 导致左心不能显影, 只能右心显影, 因此其使用受到一定的限制。第一代造影剂代表类型为 Echovist^[4]。第二代造影剂在空气气泡外围包裹一层白蛋白、脂类、聚合物或表面活性剂作为膜壳, 稳定性好, 尺寸小($<8\ \mu\text{m}$), 因此微泡经静脉注射后, 通过肺循环到达左心室及外周血管, 从而使其显影, 信噪比明显增大, 这实现了超声造影剂尺寸向微泡级、应用向无创性的过渡发展。第二代造影剂代表类型为 Albunex, Levovist。由于内含气体为空气, 使得微泡在血液中的持续时间在 5 min 内^[5], 所以研制持续时间更长的微泡造影剂成了一种必然要求。第三代造影剂内含氟碳类气体, 外有膜包裹, 使其在血液中的持续时间延长到了 15 min 以上, 稳定性进一步提高。第三代造影剂代表类型为 Optison, SonoVue^[4,5]。目前, 国外批准上市的超声微泡造影剂有: Albunex、SonoVue、Optison 等^[6], 其中 Sonazoid 和 Optison 是 GE 的产品。国内超声造影剂的生产还没进入产业化, 有待进一步研究。

1.2 特殊用超声造影剂

一些具有特殊理化性质的微泡造影剂的研究使其发展进入到一个更新的阶段, 如靶向微泡、携带治疗药物或基因的微泡是近几年研究的重要方向。

1.2.1 靶向微泡

靶向微泡造影剂也是内含气体, 具有稳定性外壳包被的微气泡, 与普通微泡不同的是, 在其表面连接有针对特定组织特异性受体的配体或是针对特异性抗原的抗体, 这使得微泡经静脉注射后通过肺循环达到感兴趣的组织或器官, 选择性的与相应的受体结合, 增强靶区的超声回波信号, 有利于局部组织疾病的诊断^[7]。靶向配体(大多为蛋白质分子)可直接连接到微泡膜壳上, 如配体通过共价键直接连接到微泡白蛋白膜上, 此法取决于微泡表面的成分和配体的性

质。另外还可以通过生物素—抗生物素蛋白连接桥将靶向配体连接到微泡表面上^[8]。

1.2.2 携带治疗药物或基因的靶向微泡

一些治疗性的化学药物或基因可通过多种方式被微泡携带, 如直接黏附在微泡表面, 包裹入微泡内, 通过非共价键连接到微泡表面等, 其中直接将药物或治疗基因包裹入微泡内是一种比较稳定的结合方法。经静脉注射携药或基因的靶向微泡后, 用低频超声(约 1 MHz)照射特定的组织, 微泡产生非线性的剧烈振动, 超声的瞬态空化效应致使微泡破裂, 治疗药物或基因由此被释放到靶区, 最终达到靶向治疗的作用^[9]。因此作为一种新型的药物或基因的载体, 靶向微泡造影剂越来越受到研究者的关注, 超声联合微泡如今已成为一种靶向治疗的新模式。

2 超声微泡造影剂在影像诊断中的应用研究

超声微泡造影剂现已广泛应用于心脏、肝脏、胰腺、肾脏等器官的超声影像诊断中, 靶向微泡造影剂的出现使局部组织的显影增强, 提高了特异性靶区的诊断效果。

2.1 超声联合超声微泡造影剂的显像机制

在一定频率的超声作用下, 微泡受压膨胀收缩, 增强了背向散射信号, 使组织的对比度加强。一般的, 在低声压下, 微泡产生对称性的压缩和膨胀, 其直径保持恒定且不破裂。声压较高, 机械指数 MI 较低, 频率为 1 MHz~20 MHz 时, 微泡产生非线性的振动但未破裂, 出现高次谐波信号。谐波成像技术如脉冲相位倒置成像是处理非线性信号的一种有效的手段^[10]。

2.2 超声微泡造影剂的诊断应用研究

微泡造影剂最早被用于心脏动脉的显影, 后来被较多的用于肝脏、胃肠等器官的显影^[11]。近年来靶向超声微泡造影剂的诊断应用研究主要包括血栓、炎症或动脉粥样硬化等病症的靶向分子成像^[11,12]。

对于血栓的显影, 早前 Unger 等^[13]用 MRX408 脂质微泡做了血栓成像的实验, 发现微泡与活化血小板的 GPIIb/IIIa 受体具有强的亲和力, 且新鲜血栓有更多的表达 GPIIb/IIIa 受体的血小板, 这可用来区别新旧血栓。近几年, 有学者开始研究利用靶向超声微泡造影剂进行血栓的靶向显影。Martina 等^[14]体外细胞实验发现, 在 MI=0.7 的超声作用下, 绑定阿昔单抗的微泡可特异性的结合到血凝块上, 由此可增强血栓的显影, 从而提高中风等疾病的诊断效果。高云华等^[15]利用自制的造影剂和新鲜的人体血块在模拟的人体系统中进行体外的血栓显影实验, 结果发现靶向造影剂组比非靶向造影剂组更能增加血栓的超声显像。

对于炎症超声显影的研究, Lindner 等^[16]将白细胞靶向的微泡静脉注射入患有心肌缺血炎症的狗体内, 用 MI=0.9 的超声探测得到血流灌注的超声图像, 与

炎症的核医学图像做对比之后发现,靶像微泡造影图像能准确、清晰地显示炎症区域。

3 超声微泡造影剂在疾病治疗中的应用研究

3.1 超声联合超声微泡造影剂的治疗机制

微泡在低频的超声作用下发生不对称的压缩和膨胀直至破裂,即瞬态空化效应,这种效应使得细胞膜上产生一过性的空隙,膜的通透性增加,膜外的分子就可以渗透到膜内,这种现象称为声孔效应^[17]。膜外分子还可以通过吞噬细胞的内吞作用进入到膜内^[18]。另外有学者认为超声作用微泡还能提高血管壁的通透性^[6],过高的超声能量还会引起热效应,致使靶区肿瘤细胞产生不可逆的凝固性坏死,超声作用参数控制不好也会引起周围正常组织细胞的死亡^[17],因此超声作用微泡时,要对超声作用频率、声压、声强、作用时间等进行最优化选择以免引起热损伤。目前,空化效应被认为是超声作用微泡的主要机制,确切的机制有待进一步研究证明。

3.2 超声微泡造影剂的治疗应用研究

3.2.1 溶栓治疗

由于大剂量纤溶剂的使用,静脉溶栓治疗会引起出血等并发症,导致其应用存在较大的局限性。早前有学者已证明血管内高频超声能溶解血栓,后来用超声联合药物治疗血栓也取得较好的效果,近几年研究证明携带溶栓药物的微泡在高能低频超声作用下产生的瞬时空化效应有助于血栓溶解,它使溶栓剂(尿激酶 UK 等)易于向血栓内渗透,靶向携药微泡联合超声作用能靶向释放药物,进一步提高了溶栓的效果^[7]。Alonso, Martina 等^[19]动物实验表明,相对于无超声作用或无微泡造影剂的对照组,用 2 MHz 超声联合微泡作用于事先注入凝血块的老鼠,溶栓的效果更加明显。Feng Xie 等^[20]采用血小板靶向微泡联合 MI=1.9 的诊断超声,在患有心肌梗死的猪身上进行溶栓疏通血管的实验,发现作用后微血管的循环能有效快速的恢复,溶栓效率高。

3.2.2 携药物或基因治疗

超声微泡造影剂作为一种新型的药物或基因靶向载体,低频超声作用使其破裂,在特定组织释放药物或治疗基因,这样可以有效增加靶区组织的药物浓度或基因表达量,降低药物对全身的毒副作用^[21]。

目前靶向微泡携抗肿瘤药物联合超声作用正成为靶向治疗肿瘤的一种新模式,是近期医学研究的一个热点,如熊正爱等^[22]将载紫杉醇的微泡加入到体外培养的宫颈癌细胞中,用低频超声(约 1 MHz)破坏微泡,电镜下观察到宫颈癌 HeLa 细胞株增殖明显被抑制,且癌细胞发生凋亡。

另外,国外的许多研究表明,超声作用微泡有效增强了基因的转染率,提高了基因治疗的靶向性^[21]。

近来 Juffermans 等^[23]作了同样的研究,他们将标记荧光物质的微泡混合入心肌细胞溶液,1 MHz 的超声作用后,在荧光显微镜中观察到细胞的荧光转染率比无超声作用时明显增高。

同时不同的超声作用参数对基因转染的效率会产生不同的影响,国内外的许多学者对此做了相应的实验研究,如王志刚等^[24]动物实验表明,在频率 1 MHz,声强 0.5 W/cm²,作用时间为 1 s 的超声参数下,基因转染率较高;Rahim 等^[25]体外细胞实验表明,在频率 1 MHz,声压 0.5 MPa,声强 0.8 W/cm²~1.5 W/cm²,作用时间为 10 s 的超声参数下,基因转染率较高。

近年来,妇科疾病的基因治疗已受到国内外学者的关注和认可,如宫颈癌的基因治疗主要是针对首要病因 HPV 病毒的,治疗这种 DNA 病毒的感染主要有抑癌基因治疗、癌基因治疗、免疫基治疗等^[26]。超声微泡造影剂联合超声作用能促进基因的转染率,应用在妇科疾病的基因治疗中,将会明显增加疗效。早在 2002 年,Endoh 等就在胎鼠宫内注射携标记基因绿色荧光蛋白 GFP 的微泡,联合超声作用后观察到组织细胞内的 GFP 表达明显增加;王斌等实验验证了超声微泡造影剂促进 GFP 质粒转染卵巢癌细胞,同时探讨了超声参数的影响^[27]。因此,不同于常用的病毒载体,超声微泡造影剂介导的靶向基因治疗将会成为一种更加安全有效的基因治疗手段。

4 问题与展望

经过多年的研究,超声微泡造影剂在其制备技术、诊断和治疗应用等方面都取得了一定的成果。同时,这一技术的发展还不够成熟,有些问题亟待改进或解决,如:(1)靶向微泡的膜壳材料的稳定性(2)超声作用微泡的确切机制(3)超声联合微泡应用到临床上的安全性和高效性还需进一步的研究证明(4)超声治疗参数(如频率、声压、声强、作用时间)、微泡种类、微泡浓度的优化选择。随着分子细胞生物学和医学超声的发展,这些问题会逐步解决,相信超声微泡造影剂在重大疾病的治疗方面将会有美好的应用前景。

参考文献:

- [1] Gail ter Haar. Therapeutic applications of ultrasound [J]. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2007,93:111-129.
- [2] Kevin D. Evans, Brandon Weiss, Michael Knopp. High-Intensity Focused Ultrasound (HIFU) for Specific Therapeutic Treatments: A Literature Review [J]. Journal of Diagnostic Medical Sonography, 2007,23:319-327.
- [3] Gramiak R, Shah PM. Echocardiography of the aortic root [J]. Investigative Radiology, 1968,3(5):356-366.
- [4] 赵应征,张彦,梅兴国. 微泡超声造影剂的研究进展[J]. 国外医学药学分册, 2003,30(5):299-302.
- [5] Steliyan Tinkov, Raffi Bekeredjian, et al. Microbubbles as ultrasound triggered drug carriers[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009,98(6):1935-1961.

- [6] 夏国园, 吕国兴. 超声微泡造影剂应用研究进展 [J]. 实用放射学杂志, 2007,23(2):262-265.
- [7] 王志刚. 超声微泡造影剂在疾病诊断与治疗中的研究进展[J]. 中国医学影像技术, 2005,21(8):1148-1150.
- [8] Katherine Ferrara, Rachel Pollard, et al. Ultrasound microbubble contrast agents: fundamentals and application to gene and drug delivery [J]. Annu.Rev. Biomed. Eng, 2007, 9:415-447.
- [9] 逯敏飞,程永清,李丽君,等. 微泡超声造影剂:一种新型的靶向载体[J]. 中国医学影像技术, 2005,21(4):513-515.
- [10] V R Stewart, P S Sidhu, et al. New directions in ultrasound: microbubble contrast [J].The British Journal of Radiology, 2006, 79: 188-194.
- [11] Bryant Furlow. Contrast-enhanced Ultrasound [J]. Radiologic Technology,2009, 80(6):547-561.
- [12] Jens-Uwe Voigt. Ultrasound molecular imaging[J]. Methods ,2009,48: 92-97.
- [13] Unger E, Metzger P 3rd, et al. The use of a thrombus-specific ultrasound contrast agent to detect thrombus in arteriovenous fistulae[J]. Invest Radiol,2000,102(5):531-538.
- [14] A. Della Martina, E. Alle'mann, et al. Grafting of abciximab to a microbubble-based ultrasound contrast agent for targeting to platelets expressing GP IIb/IIIa - Characterization and in vitro testing[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008,68: 555-564.
- [15] 杨钰楠,高云华,夏红梅,等.携RGDS的脂膜氟烷超声造影剂增强血栓显影的实验研究[J].临床超声医学杂志,2007,9(7):388-390.
- [16] J.P. Christiansen, J.R Lindner, et al. Noninvasive Imaging of Myocardial Reperfusion Injury Using Leukocyte-Targeted Contrast Echocardiography[J]. Circulation ,2002,105 (15) :1764-1767.
- [17] Victor Frenkel. Ultrasound mediated delivery of drugs and genes to solid tumors[J]. Adv Drug Deliv Rev. 2008 ,60(10): 1193-1208.
- [18] Yiyao Liu , Hirokazu Miyoshi, et al .Encapsulated ultrasound microbubbles: Therapeutic application in drug/gene delivery[J]. Journal of Controlled Release ,2006,114:89-99.
- [19] Angelika Alonso, Carl-Erik Dempfle, Alberto Della Martina, et al. In vivo clot lysis of human thrombus with intravenous abciximab immunobubbles and Ultrasound [J]. Thrombosis Research ,2009,124: 70-74.
- [20] Feng Xie, John Lof, et al. Diagnostic Ultrasound Combined With Glycoprotein IIb/IIIa -Targeted Microbubbles Improves Microvascular Recovery After Acute Coronary Thrombotic Occlusions[J].Circulation, 2009,119:1378-1385.
- [21] 张萍,高云华. 超声微泡造影剂在基因转移中的应用[J]. 中国医学影像技术, 2004,20(3):362-364.
- [22] 王娜,熊正爱,王志刚,等. 超声破坏载紫杉醇微泡对宫颈癌细胞株 HeLa 的抑制增殖及诱导凋亡作用[J]. 中国超声医学杂志, 2008,24 (8):692-695.
- [23] L.J.M. Juffermans, B.D.M. Meijering, et al. Ultrasound and Microbubble-targeted delivery of therapeutic compounds[J].Netherlands Heart Journal, 2009,17(2):82-86.
- [24] 冉海涛,任红,王志刚,等. 超声波与微泡声学造影剂增强基因定位转染动物实验研究[J]. 中国医学影像技术, 2005,21(8):1158-1160.
- [25] Ahad Rahim, Sarah L. Taylor,et al. Physical Parameters Affecting Ultrasound/Microbubblemediated Gene Delivery Efficiency In Vitro [J]. Ultrasound In Med. & Biol., 2006,32(8):1269-1279.
- [26] 陈琰,向阳. 宫颈癌的基因治疗[J]. 癌症进展杂志, 2008,9,6(5):463-467.
- [27] 唐艳,熊正爱. 超声微泡造影剂与妇科基因治疗[J]. 中华现代妇产科学杂志, 2009 6(2):100-103.

(上接第 1801 页)

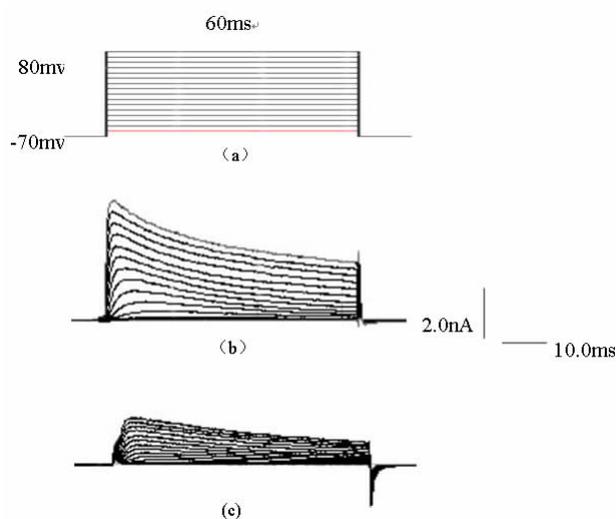


图7 磁场作用前后的电流 I_A (a)刺激脉冲;(b)记录到的 I_A 电流;(c) 磁场照射后的 I_A 电流

Fig.7 Effect of magnetic field on I_A (a) Stimulation pulses; (b)Current traces of I_A ;(c)Recorded current curves of I_A under the magnetic field radiation

步阶段,磁场强度的改变和正弦波频率的改变将会对细胞形态及细胞膜上离子通道电流造成什么影响,都将是今后要研究的内容。

参考文献:

- [1] 黄卡玛,李颖. 弱电磁场与生命系统相互作用的动力学基础——生物代谢动态过程中的电磁干扰[J].中国医学物理,1997,14(4):205-207.
- [2] Maria A S, Trevor W D. Interaction of low-frequency electric and magnetic fields with the human body [J].Proceedings of the IEEE, 2000,88(5):643-664.
- [3] Blackman F. Influence of electromagnetic fields on the efflux of calcium ions from brain tissue in vitro: A three-model analysis consistent with the frequency response up to 510 Hz [J]. Bioelectromagnetics, 1988,9:315-327.
- [4] 丁早兰,等. 50Hz 正弦交变磁场对 K562 细胞生长的影响 [J]. 中国医学物理学杂志, 1996(4):223-225.
- [5] 张毅刚,彭喜元. 单片机原理及接口技术[M]. 北京: 人民邮电出版社, 2008,33-45.
- [6] 李东生,张勇,等. Protel 99Se 电路设计技术入门与应用[M]. 北京: 电子工业出版社, 2002,47-175.
- [7] 陆果. 基础物理学教程上卷[M]. 北京: 高等教育出版社. 2002,267-280.