

# 基于超声靶向微泡破坏技术的纳米给药系统的研究进展

周厚妊 张 月 辛 莹 李诗慧 刘小奇 刘治军

**摘 要** 纳米给药系统是治疗多种疾病,尤其是肿瘤的一种极具应用潜力的方法。然而,目前其药物输送效率仍难以满足靶向治疗的需要。超声靶向微泡破坏(UTMD)技术作为一种安全的物理靶向方法,可以增强组织渗透性和细胞膜通透性,进而提高纳米给药系统的药物递送效率。本文就UTMD介导的纳米给药系统的研究进行综述。

**关键词** 超声靶向微泡破坏技术;靶向性;纳米给药系统;肿瘤

[中图法分类号]R445.1

[文献标识码]A

## Research progress of nano drug delivery system based on ultrasound-targeted microbubble destruction technology

ZHOU Houren, ZHANG Yue, XIN Ying, LI Shihui, LIU Xiaoqi, LIU Zhijun

Department of Ultrasound, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China

**ABSTRACT** Nano-drug delivery system is a potential method to treat many diseases, especially tumors. However, drug delivery efficiency does not meet the needs of targeted therapy. Ultrasonic-targeted microbubble destruction (UTMD), as a safe physical targeting method, can enhance tissue and cell membrane permeability, improving the drug delivery efficiency of nano-drug delivery system. This article reviews the research of UTMD-mediated nano drug delivery systems.

**KEY WORDS** Ultrasound-targeted microbubble destruction technology; Targeted; Nano-drug delivery system; Tumor

纳米给药系统是指药用材料与药物制备的粒径为1~1000 nm的纳米级药物输送体系,具有靶向、控释、易被细胞摄取及能提高药物稳定性等特点,在疾病的治疗,尤其是在肿瘤的治疗方面具有较好的应用前景。然而,目前其药物输送效率仍有待于提高。超声靶向微泡破坏(ultrasound-targeted microbubble destruction, UTMD)技术是一种安全的物理靶向方法,其产生的微流和辐射力可使血脑屏障、致密结缔组织及细胞膜等坚固屏障破裂,使更多的靶向药物进入细胞和组织,从而显著提高纳米给药系统效率。本文就UTMD技术及其提高纳米给药系统效率的可能机制、基于UTMD技术的新型纳米给药系统的分类、影响纳米给药系统靶向性的因素、纳米给药系统与靶向配体耦联的策略,以及UTMD介导纳米给药系统在肿瘤、糖尿病心肌病、糖尿病肾病、视网膜疾病等多种疾病诊治中的应用等研究进展进行综述。

### 一、UTMD技术及其相关机制

UTMD技术是指经超声图像确定载基因或药物的微泡到

达靶组织或器官后,给予不同强度的超声辐照,致使微泡发生收缩、振荡、膨胀及破裂,其产生的空化与声孔效应使细胞膜形成小孔,进而促进外源性基因或药物的靶向运输。UTMD介导纳米给药系统相较于其他基因或药物递送方式具有如下优势:①具有低毒和低免疫原性;②纳米给药系统通过血管注射入体内,具有非侵入性及高度可重复性;③实现了靶组织及细胞水平的诊疗一体化;④与其他成像方式比较,具有较高的经济实用性;⑤通过UTMD技术可增强靶向性,提高转染率,药物或基因可被选择性地递送到指定的感兴趣区域,从而降低系统给药的毒性,减少全身性反应<sup>[1]</sup>。

UTMD提高纳米给药系统效率的可能机制:①空化效应,包括稳态空化及瞬态空化,稳态空化可产生较小的辐射压和微射流,瞬态空化可产生高能冲击波及巨大切应力。空化效应可使血管内皮细胞间隙增大,细胞膜通透性增加,促进纳米给药系统向血管外靶向位置的渗透;②声孔效应,在瞬态空化的作用下,细胞膜表面形成可持续数秒的短暂开口,纳米给药系统

基金项目:国家自然科学基金项目(81801712)

作者单位:110004 沈阳市,中国医科大学附属盛京医院超声科

通讯作者:刘治军, Email: liuzj1@sj-hospital.org

进入细胞并递送基因及药物;③超声波作用下细胞内氧自由基的产生大大增加,提高细胞膜通透性,同时超声波可使细胞膜温度升高,改变膜磷脂流动性,大幅度地提高了细胞膜的渗透性,进而促进细胞对纳米给药系统的摄取<sup>[2]</sup>;④超声波可刺激细胞内吞功能<sup>[3]</sup>并通过产生过氧化氢促进钙离子内流,钙离子依赖的钾离子通道开放,激活细胞膜转运,从而增加纳米给药系统的摄取。

## 二、基于UTMD技术的新型纳米给药系统的分类

1. 载药超声纳泡。载药超声纳泡是由脂质或多聚物包裹惰性气体(多选用氟碳气体)及药物或基因构成。有学者<sup>[4]</sup>制备了含有全氟丙烷的载基因脂质超声纳泡,并将其注入小鼠体内,结果显示基因摄取仅限于暴露于超声下的区域,表明超声破坏载基因脂质超声纳泡可用于增加DNA转导。近年来,载药超声纳泡的制备和初步应用取得了很好的效果,与微气泡比较,纳米气泡的稳定性和负载量均有了较大提高,并实现了系统的外渗。

2. 载药氟碳纳米乳剂。载药氟碳纳米乳剂的外壳多为磷脂分子材料,其可生物降解且可变性,利于特异性配体耦联。内核选用液态全氟化碳,目前使用较多的内核为全氟己烷或过氟辛基溴。Vlaisavljevich等<sup>[5]</sup>利用超声(短的高压脉冲)激发载药相变氟碳纳米乳剂转化为微泡,从而通过乳滴声学气化来增强回声。文献<sup>[6]</sup>报道当外渗的纳米乳在生理温度下转化为微泡时,肿瘤的超声对比度显著增加。UTMD技术介导载药氟碳纳米乳剂,使药物向所需区域输送,且由于其稳定性佳,使治疗剂的延迟释放成为可能,从而潜在地减少了药物的相关副作用。

3. 微泡-载药纳米粒复合给药系统。该纳米给药系统是将微泡与载药纳米粒相结合的复合体系。张霞等<sup>[3]</sup>以肝素为原料制备生物素化包裹紫杉醇的肝素纳米粒,采用机械震荡法制备生物素化脂质微泡,并借助桥联亲和素-生物素将两者耦联,制备了一种新型复合纳米给药系统。超声破坏普通载药微泡可增加靶组织药物浓度,但普通载药微泡药物负载率低,体内稳定性差,半衰期短;以肝素为载体的纳米粒药物负载率高,但因粒径小,其易与靶组织以外的组织聚积,降低靶组织浓度的同时增大全身不良反应。微泡-载药纳米粒的复合纳米给药体系,成功地结合了微泡与纳米药物递送两种系统的优势,并避开了各自的不足。

## 三、影响纳米给药系统靶向性的因素

1. 纳米给药系统表面电荷。人体的体内环境为负电性的,纳米给药系统表面的负电荷限制了它们与靶组织和细胞,特别是与肿瘤细胞的结合<sup>[7]</sup>。

2. 免疫系统监测。进入人体的纳米给药系统可以被肝脏和脾脏网状内皮系统的单核吞噬细胞当作异物清除,从而影响纳米给药系统向靶组织或器官的聚积<sup>[8]</sup>。

3. 纳米给药系统的大小。不同大小的纳米给药系统对不同肿瘤组织具有选择性。直径20~30 nm的纳米给药系统通常在进入靶组织前被肾脏清除;30~150 nm的纳米给药系统易在心脏、肾脏和骨髓中积累;150~300 nm的纳米给药系统易在肝、脾中积累。

4. 肿瘤细胞表面特异性抗原或受体的高表达。这些于肿瘤细胞表面高表达的抗原或抗体,在正常细胞为中表达甚至不表达的,从而使连接特定靶头的纳米给药系统能更好地靶向至肿瘤组织<sup>[9]</sup>。纳米给药系统与靶向配体耦联的策略有两种形式。①被动靶向:肿瘤新生血管内皮细胞间隙增大(通常为380~780 nm),使纳米级给药系统外渗;淋巴引流不良及静脉回流缓慢进一步增加纳米给药系统在血管外间隙的滞留及积聚。这种高渗透滞留效应的积累称为被动靶向,通常发生于10~200 nm的纳米系统中<sup>[10]</sup>。但此方式靶向性略显不足,要达到满意疗效必须增加给药剂量,势必导致成本及毒副作用的增加。②主动靶向:能克服基因治疗靶向性低的缺点,增加疗效并减少对其他器官或组织的毒副作用。壳膜表面连接的配体通常是多肽类、聚合物或抗体等,连接方式中生物素(非共价)或通过羧基、巯基或马来酰亚胺的共价耦联是最常见的<sup>[11]</sup>。共价耦联不需要外源蛋白,产生免疫反应的几率较低。共价靶向方法取决于暴露在纳米给药系统表面的官能团类型。碳二亚胺可以激活靶向纳米给药系统壳上的羧基,形成活性酯,与蛋白质氨基发生反应,形成酰胺键。但其导致耦合率相对较低<sup>[12]</sup>。另外,壳上的马来酰亚胺与配体上的巯基也可实现耦联(反之亦然),形成硫醚键<sup>[13]</sup>。马来酰亚胺-硫醇耦联的优点是定向耦联,显著提高了耦合率。非共价靶向方法的基础是将蛋白质、脂质等靶向配体掺入到纳米给药系统的壳中。常用的非共价靶向方法之一是将磷脂酰丝氨酸结合到磷脂微泡的壳中,从而赋予微泡对活化白细胞的靶向性。另一常见方法即利用聚乙二醇间隔臂将亲和素结合到微泡表面,然后利用桥联亲和素-生物素连接病理特异性配体<sup>[14]</sup>。该方法非常灵活,有利于临床前检测,但由于亲和素的免疫原性,尚不能应用于临床。

## 四、UTMD介导纳米给药系统在疾病诊治中的应用进展

1. 肿瘤。恶性肿瘤是目前患病死亡的主要原因之一,全身化疗是治疗肿瘤的主要方法。加强肿瘤组织的局部药物递送,同时最大限度减少全身副作用是化疗成功的关键。UTMD介导的纳米给药系统,是一种新的肿瘤靶向药物递送策略,通过增加肿瘤血管及细胞膜通透性,提高病灶区域的药物释放浓度,达到靶向治疗并减小副作用的目的。王翔<sup>[15]</sup>制备的微泡-载甲氨蝶呤纳米粒给药系统结合UTMD技术,微泡在超声波的作用下产生空化作用,引起血脑屏障紧密连接开放,明显增加了甲氨蝶呤跨大鼠血脑屏障转运,进而有效抑制颅内肿瘤细胞的增殖。Teng等<sup>[16]</sup>制备负载乳腺癌耐药蛋白siRNA的超声纳泡,其基因包封率高于98%,结合UTMD技术,大大地提高了siRNA转染率,相应的蛋白表达相对于裸siRNA显著下调。Gao等<sup>[17]</sup>制备的载酸解阿霉素前药的氟碳纳米乳剂超声触发纳米给药系统,通过UTMD的超声空化作用,可达到高成像对比度,并大大增强肿瘤细胞对药物的摄取,从而获得更好的抗肿瘤治疗效果。Chumakova等<sup>[18]</sup>报道,由UTMD触发的聚乳酸-羟基乙酸共聚物和聚乙烯亚胺包载DNA的超声纳泡在体内成功递送到肿瘤细胞,且其基因转染效率至少提高了8倍。UTMD介导纳米递送系统仍处于细胞和动物实验阶段,但极具前景,未来将大大改善肿瘤患者的预后和生活质量。

2. 其他。UTMD 介导纳米给药系统在肿瘤治疗中的应用前景推动了其在其他疾病治疗中的实验研究。越来越多的临床研究证明了 UTMD 介导纳米给药系统在多种疾病中的治疗作用。张明等<sup>[19]</sup>制备微泡-包载碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)纳米粒的复合纳米给药系统,结合 UTMD 技术,实现了高效 bFGF 心脏靶向转运,其减少全身给药副作用的同时,可有效促进血管内皮细胞分裂增殖,诱导血管新生,增加心脏灌注,改善心肌功能,有望成为治疗糖尿病心肌病的一种新方法。DU 等<sup>[20]</sup>报道,UTMD 介导的载 siRNA 超声纳泡可更有效下调 mRNA 及血小板源性生长因子的蛋白表达,且组织学检查未见明显的组织损伤,证明 UTMD 可安全地促进载 siRNA 的单甲氧基聚(乙二醇)-聚(乳酸-乙醇酸)-聚-L-赖氨酸(mPEG-PLGA-PLL)超声纳泡在大鼠视网膜的转染率。Sheng 等<sup>[21]</sup>研究发现,糖尿病肾病大鼠经包载 bFGF 的纳米给药系统结合 UTMD 治疗后,肾脏中 bFGF 浓度明显高于单纯 bFGF 的纳米给药系统治疗(均  $P < 0.05$ );且经 B 超检查及组织学分析显示,前者大鼠肾脏形态和功能均明显恢复。总之,UTMD 介导纳米给药系统可促进基因或药物的靶点释放,降低系统给药毒性,减少全身反应并增强基因转染,为很多疾病提供了新的相对安全有效的递送方式。

### 五、小结与展望

总之,UTMD 结合纳米给药系统通过延长药物在体内的循环时间,增加了药物在靶组织的聚积浓度,从而大大提高了药物的递送效率,是目前最具潜力的靶向治疗方法,有望广泛地应用于人类各种疾病。但此项技术尚处于研究阶段,仍存在不足:①靶向纳米给药系统的制备技术尚需完善;②UTMD 的空化效应在发挥作用的同时也会产生一些负面生物学效应,因而需要确定适宜的微泡剂量和超声参数,使其最大化发挥正面效能的同时尽可能地降低对细胞的损伤;③UTMD 介导纳米给药系统仅停留在细胞和动物实验阶段,尚未进行临床研究,仍不能确切说明该给药系统的功能特性。尽管当前的 UTMD 介导的纳米给药系统研究存在诸多问题,但随着国内外专家不断地深入探索,UTMD 介导的纳米给药系统必将拥有更广阔的应用前景。

### 参考文献

- [1] Laing ST, Mcpherson DD. Cardiovascular therapeutic uses of targeted ultrasound contrast agents[J]. Cardiovasc Res, 2009, 83(4): 626-635.
- [2] Meijering BDM, Juffermans LJM, Van Wamel A, et al. Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation[J]. Circ Res, 2009, 104(5): 679-687.
- [3] 张霞, 王莺, 杨莉, 等. 脂质微泡-载紫杉醇纳米粒包裹紫杉醇的肝素纳米粒与脂质微泡复合物的制备[J]. 中国超声医学杂志, 2014, 30(11): 1030-1033.
- [4] 刘晓玲. 自制脂质纳米泡用于体内外超声造影显像及介导细胞基因转染的实验研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [5] Vlasisavljevich E, Durmaz YY, Maxwell A, et al. Nanodroplet-mediated histotripsy for image-guided targeted ultrasound cell ablation[J]. Theranostics, 2013, 3(11): 851-864.
- [6] Yi-Ju H, Chih-Kuang Y. Theranostic performance of acoustic nanodroplet vaporization-generated bubbles in tumor intertissue[J]. Theranostics, 2017, 7(6): 1477-1488.
- [7] Nafee N, Taetz S, Schneider M, et al. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides[J]. Nanomedicine, 2007, 3(3): 173-183.
- [8] Binhua L, Huageng L, Shengwei Z, et al. Novel lactoferrin-conjugated amphiphilic poly(amino-ethyl ethylene phosphate)/poly(L-lactide) copolymer nanobubbles for tumor-targeting ultrasonic imaging[J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10(1): 5805-5817.
- [9] Chen Y, Wu JJ, Huang L. Nanoparticles targeted with NGR motif deliver c-myc siRNA and doxorubicin for anticancer therapy[J]. Mol Ther, 2010, 18(4): 828-834.
- [10] Rui L, Chuan H, Yuanyuan Y, et al. Theranostic nanoparticles with tumor-specific enzyme-triggered size reduction and drug release to perform photothermal therapy for breast cancer treatment[J]. Acta Pharm Sin B, 2019, 9(2): 410-420.
- [11] Sun CY, Zhang BB, Zhou JY. Light-activated drug release from a hyaluronic acid targeted nanoconjugate for cancer therapy[J]. J Mater Chem B, 2019, 7(31): 4843-4853.
- [12] Güvener N, Appold L, de Lorenzi F, et al. Recent advances in ultrasound-based diagnosis and therapy with micro- and nanometer-sized formulations[J]. Methods, 2017, 130(1): 4-13.
- [13] Zhang K, Chen H, Guo X, et al. Double-scattering/reflection in a single nanoparticle for intensified ultrasound imaging[J]. Sci Rep, 2015, 5(1): 8766.
- [14] 程伟, 赵大威, 田猛, 等. 载脑源性神经营养因子脂质体纳米微粒脂膜微泡超声造影剂的制备与初步评价[J]. 临床超声医学杂志, 2018, 20(4): 217-220.
- [15] 王翔. 治疗超声联合耦连载 MTX 纳米粒微泡促药物跨血脑屏障转运的实验研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2013.
- [16] Teng Y, Bai M, Sun Y, et al. Enhanced delivery of PEAL nanoparticles with ultrasound targeted microbubble destruction mediated siRNA transfection in human MCF-7/S and MCF-7/ADR cells in vitro[J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10(1): 5447-5457.
- [17] Gao J, Yu B, Li C, et al. Ultrasound triggered phase-change nanodroplets for doxorubicin prodrug delivery and ultrasound diagnosis: an in vitro study[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2019, 174(1): 416-425.
- [18] Chumakova OV, Liopo AV, Andreev VG, et al. Composition of PLGA and PEI/DNA nanoparticles improves ultrasound-mediated gene delivery in solid tumors in vivo[J]. Cancer Letters, 2008, 261(2): 215-225.
- [19] 张明, 马卫成, 徐锦龙, 等. 包载碱性成纤维细胞生长因子纳米粒结合超声微泡爆破技术预防糖尿病心肌病[J]. 中华糖尿病杂志, 2016, 8(3): 142-146.
- [20] DU J, Sun Y, Li FH, et al. Enhanced delivery of biodegradable mPEG-PLGA-PLL nanoparticles loading Cy3-labelled PDGF-BB siRNA by UTMD to rat retina[J]. J Biosci, 2017, 42(2): 299-309.

[21] Sheng WS, Xu HL, Zheng L, et al. Intrarenal delivery of bFGF-loaded liposome under guiding of ultrasound-targeted microbubble destruction prevent diabetic nephropathy through inhibition of

inflammation[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(sup2): 373-385.

(收稿日期:2019-07-21)

## · 病例报道 ·

# Ultrasonic diagnosis of Madelung syndrome: a case report 超声诊断马德龙综合征 1 例

曹文悦 张航 刁宗平 张赛

[中图分类号]R445.1;R730.262

[文献标识码]B

患者男,44岁,因“颈部肿大伴双侧耳前包块半年”就诊。半年前自觉颈部逐渐肿大伴耳前出现包块,无疼痛、吞咽困难、呼吸困难等不适。既往高血压病史10年,饮酒史20年,100~200 ml/d,无吸烟史,否认糖尿病、病毒性肝炎、特殊药物服用史及类似疾病家族史。体格检查:血压159/85 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa),颈前后、颈下、颌下、腮腺区弥漫性对称性肿大,边界不清,质软,无压痛感;全身浅表淋巴结未触及肿大;心、肺、腹未见明显异常。肝功能实验室检查:白蛋白39.9 g/L,球蛋白30.8 g/L,谷草转氨酶89 U/L,谷氨酰转肽酶129 U/L,谷丙转氨酶、乳酸脱氢酶正常。血常规、甲状腺功能正常。超声检查:甲状腺大小、形态正常,实质回声均匀,未见明显占位(图1A);颈部皮下脂肪组织对称性、弥漫性增厚,未见明显包膜,其内可见线状或网状的纤维间隔,边界不清,向颈后肌间隙广泛浸润(图1B);超声弹性成像提示增厚的脂肪组织质地较软(图1C);颈部大血管未见受压;颈动脉血流流速、阻力均正常(图1D);腹部皮下脂肪组织未见弥漫性增厚。综合患者病史、体格检查、实验室检查及超声检查诊断为马德龙综合征。患者拒绝手术治疗,采取戒酒、保肝等保守治疗。3个月后电话随访脂肪堆积无明显进行性增多,无吞咽困难、呼吸困难等表现,病情尚稳定。

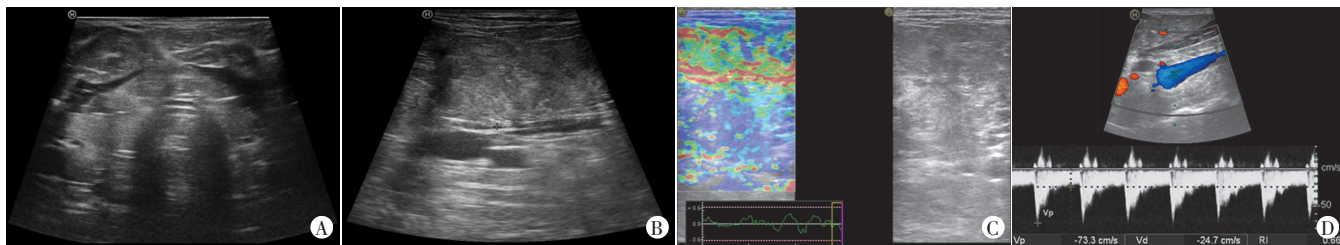
讨论:马德龙综合征又称为良性对称性脂肪瘤病,好发于地中海和东欧地区的中年白种人,男性发病率显著高于女性<sup>[1]</sup>。其特征主要为面部、颈部等部位出现多个对称的脂肪团块。多数患者有大量饮酒史,部分患者伴有肝功能异常、高血压、胰岛素抵抗等,极少部分患者可伴有进行性双侧乳腺肿大<sup>[2]</sup>。目前该病的发病机制尚不清楚,可能与酒精导致的 $\beta$ 肾上腺素受体数量减少或活性下降,脂肪组织合成增加有关;亦

可能与酒精导致线粒体DNA基因突变/氧化障碍,导致脂肪组织堆积有关<sup>[2]</sup>。根据脂肪组织分布可分为:I型,脂肪组织主要沉积在颈、项部、上躯干、臂和肩部,似“马颈”;II型,脂肪组织主要沉积在上背部、三角肌区、臀部和大腿区。本例为I型。该病诊断主要根据病史、体格检查、影像学及病理学检查,病理学检查是其诊断的金标准。根据本例患者病史、实验室检查、超声检查结果,以及无“水牛背”、向心性肥胖,皮肤无紫纹等症状,暂排除Cushing综合征;考虑发病位置,且无对称性分布的特点,暂排除脂肪肉瘤,综合考虑诊断为马德龙综合征。本例超声主要表现为颈部、背部等部位脂肪组织对称性、弥漫性增厚,无明显包膜,与周围组织分界不清,其内可见纤维分隔,并可向周围广泛浸润;超声弹性成像提示脂肪组织质地较软。CT与MRI更能清楚显示脂肪组织的范围及浸润程度,但该患者由于经济原因,拒绝上述两种检查。

目前该病暂无疗效确切的治疗手段。常规治疗方式包括戒酒、减重、药物、手术治疗。考虑术后容易复发,该患者采取保守治疗。3个月后电话随访患者表示病情尚稳定。该病较为罕见、原因不明,可能被其他疾病掩盖,故超声检查中需注意鉴别诊断。

## 参考文献

- [1] Mevio E, Sbrocca M, Mullace M, et al. Multiple symmetric lipomatosis: a review of 3 cases[J]. *Case Rep Otolaryngol*, 2012, 2012(1):910526.
- [2] Gao H, Xin ZY, Yin X, et al. Madelung disease: a case report[J]. *Medicine*, 2019, 98(3):e141116.



A: 甲状腺大小、形态正常,实质回声均匀;B: 颈部皮下脂肪组织对称性、弥漫性增厚;C: 超声弹性成像提示增厚的脂肪组织质地较软;D: 颈部大血管未见受压,颈动脉血流流速、阻力均正常

图1 马德龙综合征声像图

(收稿日期:2019-04-11)