

超声联合微泡开放血脑屏障的研究进展

钟林宏 祝兴宇 张 渝 杨远梅 陈东鸿 王玉琦 云旦次仁 李 攀

摘 要 超声联合载药微泡靶向运输技术开放血脑屏障可提高颅内特定区域的药物浓度,从而发挥药物治疗作用。超声作用下的微泡会产生空化效应,打开内皮细胞间的紧密连接,随着血脑屏障的开放,载药微泡可靶向传递至颅内特定部位。但以微泡为载体的超声靶向微泡运输技术会因超声强度、辐射时间、微泡材料及剂量大小等因素影响血脑屏障开放的程度及安全性,合理运用超声技术开放血脑屏障并减少其对脑组织的损伤,有助于提高脑部疾病的微泡靶向治疗效果。本文就超声联合微泡开放血脑屏障的方法、安全性评估及防控对策进行综述。

关键词 超声;微泡;血脑屏障;安全性

[中图法分类号]R445.1

[文献标识码]A

Research progress of ultrasound combined with microbubbles to open the blood-brain barrier

ZHONG Linhong, ZHU Xingyu, ZHANG Yu, YANG Yuanmei, CHEN Donghong, WANG Yuqi, YUNDAN Ciren, LI Pan
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

ABSTRACT Opening the blood-brain barrier by ultrasound combined with drug-loaded microbubble targeted transport technology can increase the local drug concentration in the brain, so as to better play its pharmacodynamic effect and have a better therapeutic effect on brain diseases. Microbubbles under the action of ultrasound will produce a cavitation effect. With the opening of the blood-brain barrier, the tight junctions between endothelial cells are opened, and drug-loaded microbubbles formed by drugs and microbubbles can be delivered to specific parts of the brain. However, the ultrasound-targeted microbubble transport technology using microbubbles as a carrier is not completely non-invasive. Parameters such as ultrasound intensity, radiation time, microbubble material and dose will affect the opening degree and safety of blood-brain barrier, so it is reasonable to open blood-brain barrier and reducing technical damage are very important for the effect and prognosis of microbubble targeted therapy for brain diseases. This paper reviews the method, safety evaluation, prevention and control measurement of opening blood-brain barrier by ultrasound combined with microbubbles.

KEY WORDS Ultrasound; Microbubble; Blood-brain barrier; Safety

血脑屏障是保持中枢神经系统稳定的特殊解剖学结构,其确保了脑正常生理功能,对脑组织有较好的保护作用,但也会阻碍药物进入颅内,不能在脑组织中达到有效浓度,从而对脑部疾病的治疗效果^[1]。开放血脑屏障并增强其对药物的通透性能较好地解决上述问题。常见血脑屏障开放方法包括:①开颅进行脑室穿刺,但手术感染风险大且危险性高;②对药物进行脂溶性化学修饰,但会减少药物的利用度,难以达到药物有效浓度且副作用大^[2]。因此,如何安全、高效地开放血脑屏障,使药物能在颅内局部达到有效浓度,是目前研究的重点。超声是一种可控的实现血脑屏障开放的有效方法,在微泡定位

下具有提高颅内局部药物浓度的潜在能力。超声靶向微泡破坏(UTMD)技术可暂时增加超声聚焦区域的血管通透性,介导药物高效靶向运输至脑部病灶区域,增加脑部特定区域的药物浓度^[3]。该方法可以实现相对有效的局部治疗,不会引起严重的神经元损伤,在脑部疾病治疗领域具有广阔的研究前景。但超声强度、辐射时间、微泡材料及剂量大小等均会影响血脑屏障开放的程度及安全性^[4]。本文就超声联合微泡开放血脑屏障的方法、安全性评估及防控对策进行综述。

一、超声联合微泡开放血脑屏障的方法

1. 高强度聚焦超声(HIFU)联合微泡开放血脑屏障:HIFU

基金项目:国家自然科学基金项目(81971633);重庆医科大学大学生科学研究与创新实验项目(SRIEP202006)

作者单位:400016 重庆市,重庆医科大学(钟林宏、祝兴宇、张渝、杨远梅、陈东鸿、王玉琦、云旦次仁);重庆医科大学附属第二医院超声科(李攀)

通讯作者:李攀,Email:cqlipan@163.com

的热效应使脑局部组织的温度升高,促进紧密连接复合体蛋白和转运蛋白变性,增加血脑屏障的通透性,以实现血脑屏障的选择性开放。在脑肿瘤的治疗方面,HIFU联合微泡传递化疗药物能使脑肿瘤内的药物浓度上升,抑制肿瘤生长,从而延长实验动物的生存期^[5]。在阿尔兹海默症的转基因小鼠模型中,HIFU联合微泡可减少 β -淀粉样斑块负荷,延缓tau蛋白的磷酸化趋势,有效改善小鼠的行为学表现^[6],表明HIFU联合微泡对神经疾病具有一定的治疗效果。动物研究和临床试验^[7]证实,HIFU联合微泡开放血脑屏障可以有效治疗脑部疾病,能广泛应用于运动障碍病、精神病、脑肿瘤和阿尔兹海默症的治疗,以及减轻神经病理性疼痛。

2. 诊断超声联合微泡开放血脑屏障:刘平等^[8]使用诊断超声(频率1.7 MHz,机械指数1.3)经大鼠尾静脉注入不同剂量的自制脂质体超声造影剂,经颅超声辐照10 min,随着超声造影剂剂量增加,反映血脑屏障渗透性大小的伊文思蓝染液在脑组织的渗出量也不断增多,其分布与辐照方向一致,渗出区域也局限于超声辐照部位,表明在诊断超声作用下微泡造影剂能够增加血脑屏障的通透性。Xie等^[9]使用经颅多普勒(频率1 MHz)联合微泡使猪血脑屏障的通透性增高,效果与单独通过静脉注入微泡的作用相同,经超声辐照120 min后血脑屏障恢复其原有功能,说明血脑屏障在诊断超声联合微泡或单独使用微泡作用下保持开放2 h后关闭。而Mesiwala等^[10]研究显示,HIFU开放的血脑屏障在超声处理后72 h内关闭,且在血脑屏障开口区域会出现小范围的脑组织损伤。因此,在保持较低峰值负压的条件下,诊断超声联合微泡较HIFU联合微泡能更安全地实现血脑屏障的可逆性开放,提高血脑屏障对药物的转运作用。

3. 低频超声联合微泡开放血脑屏障:相较于HIFU与高压超声对周围正常脑组织的损害风险,低频超声的吸收系数小,组织损伤小,热效应和脑局部组织的温度升高程度可忽略不计。因此,低频超声结合微泡能更安全、快速地诱使血脑屏障的开放,促进生物大分子的吸收。此外,低频超声与微泡介导的靶向基因治疗相结合,不仅可以增强裸质粒DNA在癌细胞中的转染和表达,还可以提高基因治疗的靶向性,减少全身性副作用。程远等^[11]经大鼠尾静脉注射微泡(0.5 ml/kg),同时使用43 kHz的低频超声持续辐照大鼠头顶部区域,10 min后光镜观察到超声辐照区域出现轻微的脑组织水肿,24 h内基本恢复,无明显的脑实质损害;电镜扫描法发现辐照区镧离子通过内皮细胞、基底膜及神经胶质细胞,说明在低频超声联合微泡作用下超声辐照部位的血脑屏障通透性增加,处于开放状态,而轻微的脑水肿形成可能为超声作用下微泡的空化效应使内皮细胞间的紧密连接先撑宽后恢复,表明血脑屏障先开放后关闭;透射电镜可观察到血管结构完整,紧密连接加宽,吞饮小泡增多,可见内皮细胞间的微孔,但并未出现脑组织损伤,说明在低频超声的作用下,微泡发生空化效应撑开紧密连接,能无损伤、可逆性地开放血脑屏障。

二、超声联合微泡开放血脑屏障的安全性评估

1. MRI:可作超声联合微泡处理后评估颅内特定区域损伤程度的检测手段,T2加权(T2WI)成像可以提供细微的解剖结构信息,T2WI成像上的低强度信号可提示含铁血黄素或红细

胞外渗,以此反映超声联合微泡作用对脉管系统造成的损伤,高强度信号可提示脑水肿的形成^[12];而T1加权(T1WI)成像则可以显示超声联合微泡处理后血脑屏障通透性的改变,目标区域信号强度的增加表示血脑屏障通透性增强^[13],同时T1WI成像可用于研究超声处理后血脑屏障开放的持续时间,也可以通过T2WI或磁敏感加权MRI序列检测脑微出血的情况,但这些序列对检测分散或不连续的红细胞外渗能力有一定局限^[14]。

2. 组织学检查:组织学检查较MRI具有更高的敏感性,可以通过HE染色观察红细胞外渗区来反映超声联合微泡作用对脉管系统造成的损伤,坏死细胞、凋亡细胞和空泡的存在也可以通过HE染色或其他标记物进行评估^[15]。TUNEL染色可以观察到凋亡小体的存在,而普鲁士蓝染色能够反映含铁血黄素的沉积。此外,伊文思蓝和台盼蓝两种染液因其在生理状态下均无法正常通过血脑屏障,常被用于测定血脑屏障的通透性变化,以及超声联合微泡开放血脑屏障的实验研究。伊文思蓝染液渗出量随血脑屏障通透性的增加而增加,通过分光光度计检测脑组织中的染液含量,能够作为判断血脑屏障开放程度的一种定量指标^[16]。

三、超声联合微泡开放血脑屏障的安全性防控

1. 超声强度和换能器频率:换能器频率、超声强度和峰值负压均会影响血脑屏障破坏的程度及其安全性。一项对大鼠神经肿瘤模型的实验^[17]发现,在1.0 MHz的换能器频率作用下,0.3~0.5 MPa的超声强度会引起超声辐照区域的分散或不连续的红细胞外渗,超过1.5 MPa则会引起辐照区域的红细胞连续外渗或微出血;而在1.5 MHz的频率作用下,2.4 MPa的超声强度会对辐照区域造成坏死性损伤或大出血伴细胞凋亡。有研究^[18]发现,高强度峰值负压超声处理会对脉管系统和脑实质造成一定程度的损害,超声波峰值负压为0.6 MPa,驱动频率为0.69 MHz的HIFU联合微泡处理4 h后,可见少量红细胞外渗,而在0.8 MPa的峰值负压作用下红细胞外渗的数量和大小均显著增加。此外,有研究^[19]发现空化效应与超声频率成反比,相对空化值的增加取决于超声频率的减小,在低频超声作用下微泡造影剂更容易发生空化效应。研究^[18]也表明超声联合微泡开放血脑屏障后导致的微出血不仅可以避免,还能够在较低的超声功率下实现血脑屏障的开放,而且血脑屏障在较低压力和较低换能器频率下更容易被破坏。随着超声频率的增加,脑组织的衰减程度也在不断上升,可能导致颅骨热量增加而加重组织的热损伤,促使超声焦点的扭曲变形。

2. 辐照时间和炎症反应:随着超声辐照时间的改变,HIFU联合微泡介导的血脑屏障开放会对脑组织造成不同程度的炎症反应。通过星形胶质细胞和小胶质细胞的标志物胶质原纤维酸性蛋白(Gfap)及离子化钙结合适配器分子1(Iba1)表达水平的变化可以反映超声干预后脑局部炎症的发展过程。一项对野生型小鼠的实验^[19]发现,相对于非超声处理的对侧皮层,经超声处理4 h和4 d后脑皮层中Iba1的表达水平发生了上调,差异有统计学意义($P<0.05$),但15 d后两侧比较差异无统计学意义;而Gfap的表达水平在HIFU联合微泡处理4 d后发生了上调,差异有统计学意义($P<0.05$),但4 h及15 d后比较差异均无统计学意义。表明HIFU联合微泡介导的血脑屏障开放可以在

一定程度上促进神经胶质细胞的短暂活化,且根据辐照时间的不同,胶质细胞的激活时间也会发生改变,但大多在 2 周内恢复正常。分离 HIFU 处理后的脑微血管可以发现,超声辐照 6 h 后 Ccl2、Ccl3、Ccl7、C3、Il1b、Il6、Sele 等与急性炎症发生有关的基因表达均上调,在一定程度上反映了 Mcp1、Icam1、Tnfa 和 Mmp9 等炎症反应蛋白水平的升高,一直持续到辐照后 24 h 上述基因的表达才恢复到正常基线水平^[20]。另外,与急性炎症发生有关的 Tnf、Icam1、Ccl5、Il1b 基因表达水平均与血脑屏障通透性的变化程度有关^[21]。

3. 微泡材料和剂量:研究^[22]发现,空化阈值随微泡剂量的减少而增加,较大的微泡剂量更容易引起空化效应,从而加速诱导血脑屏障的开放。而在固定剂量下,较大尺寸的微泡具有更长的循环时间,但在相同的超声参数下,更大尺寸微泡和更长的有效循环时间意味着更高的出血风险^[23]。目前,大多数新型微泡造影剂的直径为 2~8 μm ,与红细胞相似^[24],经外周静脉快速注射微泡造影剂后,可以通过肺循环顺利进入体循环。随着分子成像技术的飞速发展,近年出现了纳米级超声造影剂,与微米级微泡相比,其在靶向治疗领域上有更好的应用潜能。如纳米脂质体造影剂和纳米碳氟乳剂,不仅具有更好的回声特性,还可以输送更多的活性分子穿过血脑屏障,降低药物的分子毒性并提高治疗效果^[25]。

四、总结与展望

总之,超声联合微泡治疗能可逆性地开放血脑屏障,使药物能够靶向递送至脑组织的特定区域,提高药物在颅内的局部浓度。今后应针对优化超声参数、增强微泡的靶向性、延长微泡在目标区域的停留时间及有效控制释放时间进行研究,探讨不同超声参数下超声联合微泡在不同脑部疾病中的应用价值。

参考文献

- [1] Lee CS, Leong KW. Advances in microphysiological blood-brain barrier(BBB) models towards drug delivery[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, 66(1):78-87.
- [2] Veys K, Fan Z, Ghobrial M, et al. Role of the GLUT1 glucose transporter in postnatal CNS angiogenesis and blood-brain barrier integrity[J]. *Circ Res*, 2020, 127(4):466-482.
- [3] Makkouk A, Weiner GJ. Cancer immunotherapy and breaking immune tolerance: new approaches to an old challenge [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(1):5-10.
- [4] Banks WA. The blood-brain barrier interface in diabetes mellitus: dysfunctions, mechanisms and approaches to treatment [J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(13):1438-1447.
- [5] Shi G, Zhong M, Ye F, et al. Low-frequency HIFU induced cancer immunotherapy: tempting challenges and potential opportunities [J]. *Cancer Biol Med*, 2019, 16(4):714-728.
- [6] Burgess A, Dubey S, Yeung S, et al. Alzheimer disease in a mouse model: MR imaging-guided focused ultrasound targeted to the hippocampus opens the blood-brain barrier and improves pathologic abnormalities and behavior [J]. *Radiology*, 2014, 273(3):736-745.
- [7] Park YS, Jung NY, Na YC, et al. Four-year follow-up results of magnetic resonance-guided focused ultrasound thalamotomy for essential tremor [J]. *Mov Disord*, 2019, 34(5):727-734.
- [8] 刘平,谭开彬,马丽慧,等.经颅超声造影对血脑屏障通透性影响机制初探[J]. *中华超声影像学杂志*, 2009, 18(2):159-162.
- [9] Xie F, Boska MD, Lof J, et al. Effects of transcranial ultrasound and intravenous microbubbles on blood brain barrier permeability in a large animal model [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2008, 34(12):2028-2034.
- [10] Mesiwala AH, Farrell L, Wenzel HJ, et al. High-intensity focused ultrasound selectively disrupts the blood-brain barrier in vivo [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2002, 28(3):389-400.
- [11] 程远,于锐,宋彧,等.低频超声联合微泡经颅开放血脑屏障初步研究[J]. *中国医学影像技术*, 2006, 22(1):42-44.
- [12] Best JG, Ambler G, Wilson D, et al. Development of imaging-based risk scores for prediction of intracranial haemorrhage and ischaemic stroke in patients taking antithrombotic therapy after ischaemic stroke or transient ischaemic attack: a pooled analysis of individual patient data from cohort studies [J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(4):294-303.
- [13] Yang Y, Pacia CP, Ye D, et al. Static magnetic fields dampen focused ultrasound-mediated blood-brain barrier opening [J]. *Radiology*, 2021, 300(3):681-689.
- [14] Haller S, Montandon ML, Lazeyras F, et al. Radiologic-histopathologic correlation of cerebral microbleeds using pre-mortem and post-mortem MRI [J]. *PLoS One*, 2016, 11(12):e0167743.
- [15] O' Reilly MA, Hough O, Hynynen K. Blood-brain barrier closure time after controlled ultrasound-induced opening is independent of opening volume [J]. *J Ultrasound Med*, 2017, 36(3):475-483.
- [16] Garbuzova-Davis S, Haller E, Tajiri N, et al. Blood-spinal cord barrier alterations in subacute and chronic stages of a rat model of focal cerebral ischemia [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2016, 75(7):673-688.
- [17] Kamimura HA, Flament J, Valette J, et al. Feedback control of microbubble cavitation for ultrasound-mediated blood-brain barrier disruption in non-human primates under magnetic resonance guidance [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2019, 39(7):1191-1203.
- [18] McDannold N, Vykhodtseva N, Hynynen K. Use of ultrasound pulses combined with definity for targeted blood-brain barrier disruption: a feasibility study [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2007, 33(4):584-590.
- [19] Jordão JF, Thévenot E, Markham-Coultes K, et al. Amyloid- β plaque reduction, endogenous antibody delivery and glial activation by brain-targeted, transcranial focused ultrasound [J]. *Exp Neurol*, 2013, 248(1):16-29.
- [20] Kovacs ZI, Kim S, Jikaria N, et al. Disrupting the blood-brain barrier by focused ultrasound induces sterile inflammation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(1):75-84.
- [21] McMahan D, Hynynen K. Acute inflammatory response following increased blood-brain barrier permeability induced by focused ultrasound is dependent on microbubble dose [J]. *Theranostics*, 2017, 7(16):3989-4000.
- [22] Mehra S, Buch A, Truong CN, et al. Post-traumatic internal mammary artery pseudoaneurysm: a rare complication of pericardiocentesis [J]. *Radiol Case Rep*, 2015, 9(1):e00031.
- [23] Wu SK, Chu PC, Chai WY, et al. Characterization of different microbubbles in assisting focused ultrasound-induced blood-brain

barrier opening[J].Sci Rep,2017,20(4):46689.

[24] Li H, Yang Y, Zhang M, et al. Acoustic characterization and enhanced ultrasound imaging of long-circulating lipid-coated microbubbles[J].J Ultrasound Med,2018,37(5):1243-1256.

[25] Upadhyay A, Dalvi SV. Microbubble formulations: synthesis, stability, modeling and biomedical applications [J].Ultrasound Med Biol,2019,45(2):301-343.

(收稿日期:2020-08-30)

· 病例报道 ·

Ultrasonic manifestations of seminal vesicle paraganglioma: a case report

精囊腺副神经节瘤超声表现 1 例

杨文敏 叶冯颖 李尚青 吕国荣

[中图法分类号]R445.1

[文献标识码]B

患者男,64岁,因“左肾上腺占位1周”入院。既往有高血压病史,以及排尿后胸闷、心悸症状。经直肠超声检查:前列腺大小约4.1 cm×4.5 cm×2.8 cm,实质回声均匀,内外腺分界清,于前列腺左后上方探及一大约7.1 cm×5.4 cm混合性回声,以实性为主,实性部分回声欠均匀,形态欠规则,与直肠及前列腺分界尚清,膀胱受压变形,与膀胱壁分界欠清晰,右侧精囊腺受压移位,未探及左侧精囊腺腺体回声;CDFI于肿物内可探及丰富血流信号(图1),血流频谱示峰值流速19.7 cm/s,舒张末期血流速度7.6 cm/s,阻力指数0.62。超声提示:左侧精囊腺占位。CT检查:前列腺增大,密度不均匀,边缘不光整,见结节状隆起,增强扫描见结节状强化,双侧精囊角变钝(图2);CT提示:前列腺恶性占位。MRI检查:前列腺上缘见一分叶状团块灶,T1WI等信号,T2WI高信号,DWI较高信号,明显强化,内可见低强化区,膀胱明显受压凹陷(图3)。MRI提示:精囊腺占位。遂后患者于腹腔镜下行经膀胱盆腔占位切除术,术中沿肿瘤表面将其剥离时血压明显升高,术后大体标本:肿物切面呈灰黄灰褐色,质中,局灶质稍软。镜下见上皮样细胞呈小巢状、片状排列;免疫组化检查:CgA(+++),CD56(+++),Syn(+++),S100(+++),Ki67(约2%),Melan-A(-),Inhibin-α(-),CKpan(-)。病理结果:副神经节瘤,侵犯膀胱壁固有肌层。

讨论:副神经节瘤是来源于肾上腺髓质以外副神经节系统的肿瘤,可具有内分泌功能,又称为异位嗜铬细胞瘤。由于其可释放大量儿茶酚胺,因此可引起高血压、发热、搏动性头痛、心悸、出汗等临床表现^[1]。副神经节瘤的影像学表现缺乏特异性,超声表现多为圆形或椭圆形低回声,包膜完整,边界清晰,内部回声不均匀,可探及较丰富的血流信号^[2]。发生于精囊的副神经节瘤十分罕见,本病例超声表现为前列腺左后上方见形态欠规则的混合性回声,膀胱受压变形,结合患者临床症状考虑为副神经节瘤。经直肠超声有助于肿物的定位,从而与膀胱副神经节瘤、前列腺癌相鉴别,本病例肿物与直肠及前列腺分界尚清,右侧精囊腺受压移位,未探及左侧精囊腺腺体回声,故考虑病变来源于左侧精囊腺。部分副神经节瘤具有侵袭性,而本病例肿物与膀胱壁分界欠清晰,故考虑侵犯膀胱的可能。经直肠超声能清晰显示肿物血流分布情况及与周围脏器的关系,可为临床诊断提供参考信息。

参考文献

- [1] 陈杰,步宏.临床病理学[M].北京:人民卫生出版社,2015:288-290.
[2] 郑雪松,于艳丽.左精囊肾外副神经节瘤超声表现1例[J].中华超声影像学杂志,2016,25(5):427.

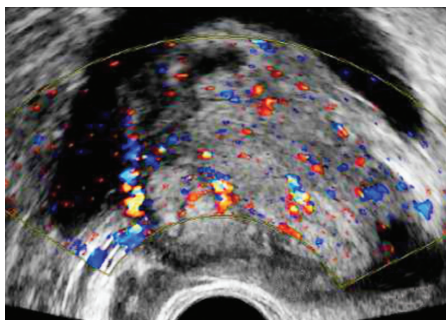


图1 精囊腺副神经节瘤超声 CDFI 图



图2 精囊腺副神经节瘤 CT 图

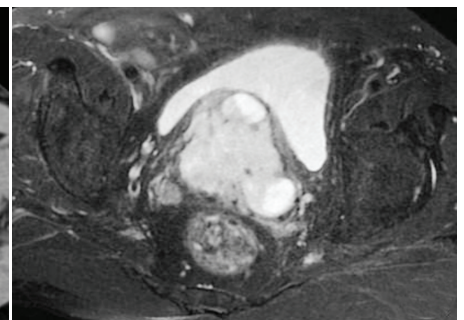


图3 精囊腺副神经节瘤 MRI 图

(收稿日期:2020-10-28)