

基于生物合成气囊的影像造影剂的研究进展

黄 驰 张 月 辛 莹 刘治军

摘 要 气囊是一种遗传编码的、自然稳定的纳米结构,可以自由渗透周围介质中的气体,使其具有独特的声学、磁化率、光学特性,可作为多种成像方式的造影剂。通过对气囊基因的修饰,可制备出用于肿瘤诊断和治疗的复合材料,将气囊开发为声学报告基因具有巨大潜力。本文就基于气囊的影像造影剂的研究进展进行综述。

关键词 气囊;造影剂;影像;声学报告基因

[中图法分类号]R445.1

[文献标识码]A

Research progress of image contrast agent based on gas vesicles

HUANG Chi, ZHANG Yue, XIN Ying, LIU Zhijun

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

ABSTRACT Gas vesicles (GVs) are genetically encoded and naturally stable nanostructures that can freely permeate to gases in the surrounding media, giving them unique acoustic, magnetic susceptibility and optical properties. GV's also can be used as contrast agents for a variety of imaging methods. By modifying GV's gene, the composite materials can be prepared for tumor diagnosis and treatment. In addition, it has great potential to develop GV's gene as acoustic reporter gene. This paper reviews the research progress of image contrast agent based on gas vesicles.

KEY WORDS Gas vesicles; Contrast agent; Imaging; Acoustic reporter gene

具有多种影像学对比显影能力的多模态影像造影剂已成为当前影像学领域的研究热点之一。多模态影像造影剂多是在其组成成分中加入声响应、磁性或光敏物质等以实现多模态响应,结构复杂,制备相对繁琐。气囊是一类在浮游生物或古菌体内由基因编码合成的中空双锥形、刚性、多孔蛋白质纳米结构,长约 100~600 nm,宽约 45~250 nm,囊壁厚约 2 nm,其对水不通透,但允许气体自由通过,因此气囊内外几乎无气压差,可在纳米级尺寸保持稳定的物理状态^[1]。气囊的这一特殊性质,使其具有同时作为超声、MRI、光学相干断层扫描(OCT)等多种模式造影剂的潜力。气囊主要由 8~14 个不同的基因编码,包括 2 个主要结构蛋白即气囊蛋白 A(GvpA)和气囊蛋白 C(GvpC),以及几个次要蛋白和调节蛋白组成。GvpA 是气囊蛋白质外壳的主体,GvpC 附着在 GvpA 外层,影响气囊整体的完整性和结构强度。不同物种来源的气囊由于其蛋白组成不同,还具有不同的压力敏感性,在达到某一特定临界压力时会破裂,因此可以利用其这一特征进行气囊破裂前后的图像减影,获得来自某一种气囊的特异性信号^[1-2]。此外还可以通过基因

编辑等方式对气囊的组成蛋白进行修饰和改性,从而获得具有不同抗压性、靶向性等特性的气囊^[3-4]。研制基于气囊的多功能造影剂及声学报告基因是当前研究的热点。本文就基于气囊的影像造影剂的研究进展进行综述。

一、基于气囊的超声造影剂

超声造影剂通过改变局部组织的声学特性,如背向散射系数、衰减系数、非线性效应等,从而提高超声成像的分辨力、对比度和准确性。Shapiro 等^[2]首次报道从水华鱼腥藻(Ana)和嗜盐古菌(Halo)分离提纯的气囊在超声辐照下能产生稳定、强烈的背向散射信号,可用于超声造影;且 Halo 气囊能产生强烈的二次谐波和三次谐波信号。二次谐波信号是由造影剂微泡在声场中的非线性运动产生的,其峰值频率是基波的 2 倍。通过宽频超声探头接收发射频率的 2 倍频率实现由二次谐波组成的影像,而组织解剖结构的基波信号基本不被接收,从而凸显来自微泡造影剂的信号,获得显著的造影效果。Yang 等^[5]研究也证明,气囊具有足够的回声特性,且回声强度与气囊浓度呈正相关,可作为超声造影剂的理想材料;并且 Ana 气囊在声场

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

中也能产生显著的二次谐波,降低组织背景信号和改善图像质量;而Shapiro等^[2]未检测到Ana气囊的谐波信号是因为Ana气囊需在更高频率的声场中才能产生二次谐波信号,而这一频率超过了该实验中所用的频率及探头的接收频率。Cherin等^[6]通过有限元模拟及体外实验证实,气囊在静水中的临界破坏压力低于在超声脉冲中的临界破坏压力,当气囊处于两个临界压力之间的超声脉冲时,能产生稳定、强烈的二次谐波信号。气囊产生谐波信号的能力与表面的GvpC含量密切相关,GvpC含量高的气囊刚性更强,更难产生二次谐波信号。2017年Maresca等^[7]采用气囊进行体外、体内造影发现,临床常用于超声微泡的非线性对比模式——反转脉冲和振幅调制可以实现对气囊产生的谐波信号进行高效地选择性成像,避免组织背景的散射信号带来干扰,提高了气囊的对比度特异性。2020年Maresca等^[8]对小鼠进行经颅神经活动的血流动态超声成像发现,与目前常用的超声造影微泡声诺维(SonoVue)相比,气囊具有更好的成像稳定性,可以检测到更大范围和更低血流速度的信号。王宇等^[9]利用骨髓间充质干细胞的内吞特性和气囊的声学响应性,构建了具有超声显影能力的骨髓间充质干细胞,可在移植治疗后利用超声成像长时间追踪其在小鼠肌肉组织中的分布情况。Le Floc'h等^[10]将^{99m}Tc与气囊表面的氨基相互结合,用以观察气囊在小鼠体内的分布情况,发现在注射20 min后,84%的气囊被肝脏代谢,要实现体内长时间造影显像,则需要对气囊进行一定的修饰,以避免被网状内皮系统(RES)迅速吞噬、清除。Ling等^[11]研究发现,气囊在肝组织中被巨噬细胞摄取并经溶酶体降解后,回声信号消失,因此通过检测注射气囊后血液循环和肝脏中超声强度的动态变化可定量评估小鼠肝脏中巨噬细胞的吞噬和溶酶体降解功能,并在小鼠体内验证了该技术对巨噬细胞缺乏症和非酒精性脂肪肝病的诊断价值。Yan等^[12]采用脂肪乳或钆剂GdCl₃抑制RES后,延长了气囊在血液循环中存在的时间;采用聚乙二醇(PEG)对气囊修饰后,避免了其被RES吞噬、清除,显著延长了气囊的造影时间。Wang等^[13]采用PEG和透明质酸对气囊进行表面修饰,成功制备出了能避免被RES吞噬,且对CD44阳性的SCC7人鳞状细胞癌细胞系具有靶向性的气囊,在肿瘤部位实现了长达48 h的持续增强造影。

二、基于气囊的MRI造影剂

MRI具有较高的组织空间分辨率、多参数成像等优点,是目前临床常用的影像检查方法之一。MRI造影剂通过改变局部组织的磁化率,改变其纵向弛豫时间(T_1)和/或横向弛豫时间(T_2)增强组织对比度,从而提高MRI的诊断敏感性和特异性。Lu等^[14]发现,由于气囊中的空气与周围环境中的水具有不同的磁化率,气囊的存在使得其周围液体环境中的微磁场发生改变,导致其周围水中的氢原子共振频率发生改变,可产生类似于超顺磁性氧化铁的效果,在MRI检查中能够明显缩短 T_2 ,显著降低 T_2 加权MRI信号,产生负性增强显影效果;联合超声脉冲破坏气囊,通过气囊被破坏前后的MRI减影图像可以获得来源于气囊的特异性信号,避免传统 T_2 增强造影时原本呈低信号的组织结构(如血管、组织界面等)对病灶信号的干扰。经气囊

在小鼠大脑纹状体的MRI造影显示,联合超声脉冲的MRI显著增强了气囊的对比度特异性。化学交换饱和转移(CEST)-MRI是新兴的基于饱和质子和周围介质中质子交换的体内分子成像技术,结合分子成像和高质量解剖成像,在多种代谢物成像方面具有独特优势^[15]。利用气囊的气体自由渗透特性,气囊能够与氙气进行化学交换饱和转移作用,当应用预载超极化氙气的气囊作造影剂时,其敏感性大大高于基于氢原子的CEST-MRI,可在皮摩尔浓度产生明显的CEST对比度,而基于氢原子的CEST-MRI需在微摩尔浓度时才能达到类似的CEST对比度^[16]。Kunth等^[17]发现,气囊装载的超极化氙气在体内分布遵循理想气体定律,因而基于超极化氙气的CEST-MRI成像的信号强度与环境中的总氙气的量呈线性关系,这一特性可以产生基于氙气浓度的定量CEST-MRI成像的信号。

三、基于气囊的OCT造影剂

OCT是利用细胞或组织对光的折射率不同产生不同的光学信号来进行成像的一种新型成像方式,具有较高的时空分辨率,可以直观地显示生物组织的结构特征化学成分等优点。Lu等^[18]发现气囊特殊的内部中空结构使其具有与周围组织不同的光折射率,导致气囊对入射光产生强烈的散射,从而产生可用于OCT成像的光学信号。通过体外造影实验和对小鼠玻璃体及视网膜下腔的体内造影实验证实,利用超声脉冲破坏气囊后的减影图像减少了来自内源性背景散射的干扰,提高了OCT的对比度特异性。

四、基于气囊的声学报告基因的研究

报告基因的产物是一类可用特定成像方式检测信号的蛋白质,其信号强度与表达量呈正相关,将报告基因与目的基因融合或在其同源启动子下实现共表达,可以实现检测目的基因的表达水平、研究动态分子信、对细胞进行跟踪监测等目的^[19]。Bourdeau等^[20]将Ana的GvpA基因和GvpC基因与巨大芽孢杆菌的GvpR-GvpU基因重组,合成了一种新的声学报告基因(ARG1),在大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌中转导ARG1后,成功表达出可用于超声显影的气囊。将ARG1导入用于治疗肠道疾病的益生菌中后,成功用超声成像监测到其在小鼠肠道内的分布情况。相对于传统的荧光报告基因的光学成像,超声成像能提供更高的空间分辨率,且具有更好的穿透性,可探测到深部组织的信号^[21]。Farhadi等^[22]利用巨大芽孢杆菌的气囊基因簇,构建了一组哺乳动物声学报告基因,转染到人胚胎肾脏细胞293T中后,成功表达出可被超声检测的气囊,并验证了其在活体内利用超声成像相关细胞分布和生物学行为的能力。Lakshmanan等^[23]构建了包含不同酶作用位点的GvpC,利用酶切后气囊产生非线性信号的能力不同,对酶活性进行可视化评估,并成功在体外、益生菌内和小鼠胃肠道内进行成像,显示出良好的酶活性检测能力和成像能力。

五、基于气囊的超声造影剂在肿瘤治疗中的应用

超声靶向微泡破坏技术是指在超声实时监测下,在特定部位利用微泡在不同强度的超声辐照下产生的空化与声孔效应对细胞膜的一系列影响,达到促进药物或基因靶向运输或治疗的效果。Szablowski等^[24]发现,气囊在低频超声辐照下可以产

生空化效应,联合低频超声辐照和对高表达 $\alpha V\beta_3$ 整合素受体的人胶质母细胞瘤细胞系 U87 靶向的 RGD-气囊,其产生的空化效应可对肿瘤细胞造成杀伤作用。另外可将编码气囊的基因插入表达治疗性药物的细菌中实现共表达,在实时超声监测下于特定靶器官中利用气囊在超声辐照下产生的空化效应将细菌裂解,在靶器官中释放出荷载的共表达药物,从而实现靶向给药。Tayier 等^[25]采用聚乙烯亚胺对气囊进行表面修饰,构建了表面带正电荷的气囊,将其作为基因载体。借助气囊纳米级尺寸的优势,可通过血管内皮间隙,直接进入靶组织细胞外液与靶细胞直接接触,在超声显像的实时监测下联合低功率聚焦超声产生的空化效应,可以提高靶组织的转染效率,为基因治疗提供了一个良好的载体。

六、小结与展望

总之,气囊作为一种新型的造影剂载体,具有其独特的结构与性质,且易于修饰,是制备具有超声、MRI、OCT、荧光等成像能力的多模态造影剂的理想材料,但现阶段想要投入临床应用仍面临许多挑战:目前基于气囊的影像造影剂尚处于实验阶段,研究模型大多为细胞和动物模型,其在人体应用的安全性尚有待验证;另外,如何从基因水平对气囊进行优化,制备出针对各种成像方式具有最佳性能的气囊尚有待研究。气囊作为造影剂及治疗载体具有很大应用潜力,随着研究的深入,其在疾病诊疗、分子生物研究中将发挥广泛的作用。

参考文献

- [1] Pfeifer F. Distribution, formation and regulation of gas vesicles [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10(10): 705-715.
- [2] Shapiro MG, Goodwill PW, Neogy A, et al. Biogenic gas nanostructures as ultrasonic molecular reporters [J]. *Nat Nanotechnol*, 2014, 9(4): 311-316.
- [3] Lakshmanan A, Farhadi A, Nety SP, et al. Molecular engineering of acoustic protein nanostructures [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(8): 7314-7322.
- [4] Lakshmanan A, Lu GJ, Farhadi A, et al. Preparation of biogenic gas vesicle nanostructures for use as contrast agents for ultrasound and MRI [J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(10): 2050-2080.
- [5] Yang Y, Qiu Z, Hou X, et al. Ultrasonic characteristics and cellular properties of anabaena gas vesicles [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2017, 43(12): 2862-2870.
- [6] Cherin E, Melis JM, Bourdeau RW, et al. Acoustic behavior of halobacterium salinarum gas vesicles in the high-frequency range: experiments and modeling [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2017, 43(5): 1016-1030.
- [7] Maresca D, Lakshmanan A, Lee-Gosselin A, et al. Nonlinear ultrasound imaging of nanoscale acoustic biomolecules [J]. *Appl Phys Lett*, 2017, 110(7): 073704.
- [8] Maresca D, Payen T, Lee-Gosselin A, et al. Acoustic biomolecules enhance hemodynamic functional ultrasound imaging of neural activity [J]. *Neuroimage*, 2020, 209(1): 116467.
- [9] 王宇, 严飞, 周美君, 等. 生物合成纳泡-干细胞体系的制备及超声成像示踪 [J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2020, 40(6): 362-367.
- [10] Le Floc'h J, Zlitni A, Bilton HA, et al. In vivo biodistribution of radiolabeled acoustic protein nanostructures [J]. *Mol Imaging Biol*, 2018, 20(2): 230-239.
- [11] Ling B, Lee J, Maresca D, et al. Biomolecular ultrasound imaging of phagolysosomal function [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(9): 12210-12221.
- [12] Yan J, Yin M, Foster FS, et al. Tumor contrast imaging with gas vesicles by circumventing the reticuloendothelial system [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2020, 46(2): 359-368.
- [13] Wang G, Song L, Hou X, et al. Surface-modified GVs as nanosized contrast agents for molecular ultrasound imaging of tumor [J]. *Biomaterials*, 2020, 236(1): 119803.
- [14] Lu GJ, Farhadi A, Szablowski JO, et al. Acoustically modulated magnetic resonance imaging of gas-filled protein nanostructures [J]. *Nat Mater*, 2018, 17(5): 456-463.
- [15] 徐晶, 赵世华, 陆敏杰. 化学交换饱和和转移在心脏 MRI 中的研究进展 [J]. *中国医学影像技术*, 2020, 36(2): 291-294.
- [16] Shapiro MG, Ramirez RM, Sperling LJ, et al. Genetically encoded reporters for hyperpolarized xenon magnetic resonance imaging [J]. *Nat Chem*, 2014, 6(7): 629-634.
- [17] Kunth M, Lu GJ, Witte C, et al. Protein nanostructures produce self-adjusting hyperpolarized magnetic resonance imaging contrast through physical gas partitioning [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(11): 10939-10948.
- [18] Lu GJ, Chou L, Malounda D, et al. Genetically encodable contrast agents for optical coherence tomography [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(7): 7823-7831.
- [19] Gilad AA, Shapiro MG. Molecular imaging in synthetic biology, and synthetic biology in molecular imaging [J]. *Mol Imaging Biol*, 2017, 19(3): 373-378.
- [20] Bourdeau RW, Lee-Gosselin A, Lakshmanan A, et al. Acoustic reporter genes for noninvasive imaging of microorganisms in mammalian hosts [J]. *Nature*, 2018, 553(7686): 86-90.
- [21] Piraner DI, Farhadi A, Davis HC, et al. Going deeper: biomolecular tools for acoustic and magnetic imaging and control of cellular function [J]. *Biochemistry*, 2017, 56(39): 5202-5209.
- [22] Farhadi A, Ho GH, Sawyer DP, et al. Ultrasound imaging of gene expression in mammalian cells [J]. *Science*, 2019, 365(6460): 1469-1475.
- [23] Lakshmanan A, Jin Z, Nety SP, et al. Acoustic biosensors for ultrasound imaging of enzyme activity [J]. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(9): 988-996.
- [24] Szablowski JO, Bar-Zion A, Shapiro MG. Achieving spatial and molecular specificity with ultrasound-targeted biomolecular nanotherapeutics [J]. *Acc Chem Res*, 2019, 52(9): 2427-2434.
- [25] Tayier B, Deng Z, Wang Y, et al. Biosynthetic nanobubbles for targeted gene delivery by focused ultrasound [J]. *Nanoscale*, 2019, 11(31): 14757-14768.

(收稿日期: 2020-10-09)