

超声靶向微泡破坏技术介导自杀基因在恶性肿瘤中的研究进展

吴桐 黄驰 杜兆林 姚懿染 刘治军

摘要 恶性肿瘤在全球的发病率和死亡率逐年上升,严重威胁人类的健康。自杀基因疗法为各种类型的恶性肿瘤提供了一种极具前景的治疗手段。超声靶向微泡破坏(UTMD)技术为自杀基因的传递赋予了新的方式。本文就UTMD技术介导的自杀基因转染在恶性肿瘤治疗中的研究进展进行综述。

关键词 超声靶向微泡破坏技术;微泡载体;自杀基因;恶性肿瘤

[中图法分类号]R445.1;R73

[文献标识码]A

Research progress of ultrasound-targeted microbubble destruction technology mediated suicide genes in malignant tumors

WU Tong, HUANG Chi, DU Zhaolin, YAO Yiran, LIU Zhijun

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

ABSTRACT Malignant tumor is an important cause of morbidity and mortality worldwide, which poses a serious threat to human health. Suicide gene therapy offers a highly promising treatment for various forms of malignancy. Ultrasound-targeted microbubble destruction (UTMD) technology provides a new way for suicide genes delivery. This article reviews the research progress of UTMD-mediated suicide genes transfection in the treatment of malignant tumors.

KEY WORDS Ultrasound targeted microbubble destruction technology; Microbubble carrier; Suicide genes; Malignant tumor

恶性肿瘤在全球的发病率和死亡率逐年上升,其治疗被认为是临床和科研问题中最关键和最重要的课题之一。尽管医学在化学治疗、放射治疗和外科手术方面进步斐然,但肿瘤的治疗效果并未达到同等程度的预期。基因疗法日渐成为一种全新的肿瘤治疗模式,包括免疫基因治疗、反义基因治疗、溶瘤病毒治疗和自杀基因治疗在内的多种基因治疗方法已经取得了重大进展。其中自杀基因疗法因其独特的作用机制而备受关注,其利用基因工程技术将前药转换酶基因(自杀基因)转入肿瘤细胞进行表达,编码产生的酶类将无毒或低毒的前药转化成毒性产物,随后通过凋亡或非凋亡机制导致细胞死亡^[1]。自杀基因系统主要包括单纯疱疹病毒胸苷激酶基因/丙氧鸟苷(HSV-TK/GCV)系统、大肠杆菌胸腺嘧啶脱氨酶基因/5-氟胞嘧啶(CD/5-FC)系统,以及大肠杆菌尿嘧啶磷酸核糖转移酶(UPRT)和硝基还原酶(NTR)等。达到特定的目的需要封装自杀基因的载体,并将其传递给指定的肿瘤细胞或肿瘤局部环境。超声

靶向微泡破坏(ultrasound-targeted microbubble destruction, UTMD)技术将超声与各种功能性微泡载体相结合,可增强靶基因的转染和表达,已成为一种极具前景的无创定位基因转移方法,广泛应用于癌症的基因治疗。本文就UTMD技术介导下自杀基因的转染在恶性肿瘤治疗中的研究进展综述如下。

一、微泡载体系统及UTMD技术概述

1. 微泡载体系统:作为非病毒表达载体,微泡具备安全性高、制备成本低、易于快速代谢、可主动靶向肿瘤受体等优势,成为恶性肿瘤治疗方法中更为安全有效的替代方案。微泡在发展过程中经历了丰富多样的存在形式,从微气泡、相变液滴、固体空化核到回声脂质体、纳米微粒及从细菌中提取的蛋白质包被的气体囊泡^[2],不仅性能得到了优化,而且粒径实现了从微米级到纳米级的飞跃。与微米级造影剂相比,纳米级造影剂具有更好的生物相容性、稳定性及易修饰性,可以提供优越的循环时间和组织渗透,以独特的优势成为新型的基因

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: liuzjl@sj-hospital.org

载体^[3]。在微泡外壳加以特异性的配体修饰,形成能够与肿瘤中的过表达受体特异性结合的靶向超声造影剂,从而限制治疗基因负载载体局部传递到肿瘤,提高疗效,避免脱靶副作用。Johansen等^[4]合成了一种以受体蛋白酪氨酸磷酸酶mu(PTPmu)衍生的癌症生物标记物为作用位点的靶向纳泡,并与非靶向纳泡进行了对比评估。结果表明,与非靶向对照纳泡相比,PTPmu靶向纳泡利用超声分子成像识别肿瘤效果更强、更快,且在体内均表现出良好的稳定性。Wu等^[5]制备了均匀的阳离子纳泡,实验表明其在超声下显示明显的对比度增强,尤其对低频超声非常敏感;且带有特异性配体的纳泡对裸鼠前列腺特异性膜抗原阳性细胞和异种移植肿瘤较阴性对照组具有较高的亲和力,说明靶向微泡可使基因实现更有效的转染。

2.UTMD技术:将超声波与各种功能性微泡载体相结合形成了UTMD技术,这是一种新的非病毒基因运输方式。一方面,携带基因的超声微泡本身可作为良好的显像对比剂实现在肿瘤部位成像;另一方面,在不同强度超声波辐照下,微泡被逐一击破,从而释放基因到肿瘤部位。此外,在UTMD作用过程中产生的声孔效应及空化效应使得膜屏障作用减弱^[6],进而增加了治疗基因向胞内运输,使得治疗效果大幅提升。UTMD技术克服了病毒载体相关的免疫原性,并具有高时空分辨率的特点,能够实时地监测和捕获基因,在恶性肿瘤的治疗中发挥了优势。Li等^[7]在一项研究下调miR-767抑制非小细胞肺癌的实验中,应用UTMD转染miR-767抑制剂的细胞与单独转染miR-767抑制剂的细胞相比,其增殖、侵袭和迁移能力被进一步抑制,说明肿瘤的进展受UTMD介导的影响。

二、UTMD技术介导自杀基因在恶性肿瘤中的研究进展

UTMD技术介导自杀基因形成了一种更有针对性、更为安全有效的自杀基因传递系统,以肿瘤特异性受体或组织特异性启动子为作用位点,可在一定程度上避免由于缺乏肿瘤特异性而导致的治疗失败,实现更精准的基因治疗。

1.UTMD技术介导HSV-TK/GCV系统:目前在实验模型中应用的各种自杀基因,以HSV-TK/GCV系统研究最为透彻。HSV-TK可催化无毒性抗病毒药物更昔洛韦(GCV)磷酸化反应,通过阻止DNA合成而发挥对肿瘤细胞的毒性杀伤作用。此外,旁观者效应将GCV转导到邻近细胞,从而引起周围未转染细胞的死亡。UTMD技术介导HSV-TK/GCV系统进行的实验研究领域包括肝癌^[8-11]、胃癌^[12-13]、卵巢癌^[14]、脑胶质瘤^[15-16]、视网膜母细胞瘤^[17]等;证明UTMD技术不仅能够提高TK基因的转染效率,同时肿瘤细胞和异种移植物的杀伤效果也进一步增强,为未来的临床研究奠定了基础。Wu等^[8]研究表明,UTMD技术介导HSV-TK自杀基因系统不仅提高了基因靶向性,而且增强了基因转染效率,在体内和体外均表现出显著的抗癌活性。修阳等^[18]研究表明,UTMD技术介导HSV-TK/GCV系统还可作为高强度聚焦超声(HIFU)治疗后的一种新的辅助疗法。HIFU依据超声波能够穿透软组织的原理,将高能量超声聚焦于病变组织,凭借产生的瞬时机械效应和热效应杀灭肿瘤细胞,但在肝癌治疗中存在因消融不完全而导致癌组织残留等问题。谢辉等^[19]通过建立异种移植肝癌裸鼠模型,结果表明载

HSV-TK的液态氟碳纳米粒联合UTMD技术可降低HIFU治疗后残留组织中的血管内皮生长因子、缺氧诱导因子-1 α 及微血管密度水平,破坏肿瘤生长的血供条件,进而抑制肿瘤生长,提高HIFU的治疗效果。因此,UTMD技术介导HSV-TK/GCV系统联合HIFU对癌症的治疗有协同作用。

2.UTMD技术介导CD/5-FC系统:CD基因可将无毒的前药5-FC转化为有毒的代谢物5-氟尿嘧啶(5-FU)。由于体积小和中性电荷,5-FU可以很容易地扩散到细胞中^[20]。因此,与HSV-TK/GCV系统相比,CD/5-FC系统具有远程旁观者效应的独特优势,从而达到更大范围的杀伤效果。研究^[21]表明,在UTMD技术作用下,携带CD基因的阳离子纳泡能够将自杀基因成功转染并有效表达,提高杀灭膀胱癌T-24细胞的效率,且恢复缝隙连接蛋白Cx26表达,可改善细胞缝隙连接通讯并加强CD/5-FC的旁观者效应,在增强杀伤效应的同时又能够预防和降低复发可能。

3.UTMD技术介导双自杀基因系统:随着研究的不断深入,发现当2个自杀基因联合后,各自不同的作用机制可以互相补充,进而大大提高肿瘤的杀伤效率^[22]。由于载体转染容量的限制,目前大多数为双自杀基因系统,其中以CD/TK双自杀基因系统最为常用。UTMD介导CD/TK双自杀基因系统在恶性肿瘤中的研究包括肝癌^[22-23]、膀胱癌^[24-26]、肺癌^[27]、宫颈癌^[28]等。Hu等^[26]发现,CD/TK双自杀基因负载纳泡结合UTMD能够抑制体外膀胱肿瘤细胞和裸鼠体内膀胱癌的增殖,而双前药较单前药具有更显著的作用。同时这项研究在肺癌模型中也得到了相同的结论^[27]。除了上述的双自杀基因,有学者对UTMD技术介导CD/UPRT和TK/NTR双自杀基因对乳腺癌的治疗也进行了相应的研究。Paris等^[29]开发了一种新型的介孔二氧化硅纳米粒用于制备超声纳泡,进而负载CD/UPRT融合自杀基因,联合UTMD技术转染骨髓间充质干细胞(DMSCs)。实验结果表明转染了自杀基因的DMSCs,当暴露于无毒的前药物5-FC时,会产生一种有毒药物,这种有毒物质从DMSCs源扩散,到达周围的癌细胞,从而能够诱导共培养的大鼠乳腺癌细胞死亡。Devulapally等^[30]合成了聚乙二醇(PEG)酰化聚乳酸-乙醇酸/聚乙烯亚胺纳米粒(PLGA/PEI NP),并与TK/NTR融合基因结合。结果表明,UTMD技术介导TK-NTR-DNA-NP复合物转染后,在体外三阴性乳腺癌细胞中用GCV/CB1954前药处理显示出有效的细胞杀伤作用;体内实验结果表明,UTMD技术可以成功地将TK/NTR基因转移到小鼠肿瘤中,并显示出TK/NTR蛋白的高表达水平,且其肿瘤体积显著减小($P<0.05$)。表明UTMD技术介导TK/NTR基因可作为三阴性乳腺癌患者的潜在临床治疗选择。除了自杀基因之间的相互联合,自杀基因还可与其他介导肿瘤凋亡的基因形成融合基因,在UTMD技术作用下,对肿瘤的抑制起到协同作用。Kumar等^[31]合成了一种三重治疗基因TK-p53-NTR,结果表明TK、NTR自杀基因与P53抑癌基因对三阴性乳腺癌、肝癌细胞及裸鼠模型均有协同抗癌效果,且联合miRNAs使得前药GCV和CB1954对肿瘤细胞有效致敏,增强细胞凋亡。此外,UTMD技术显著增加了体内负载miRNAs和TK-p53-NTR纳泡的肿瘤内传递,从而增加了治疗

效果,可以实现较传统治疗方法更有效的抗癌治疗。

4. 多模态成像介导的自杀基因治疗:目前的诊断成像方法,如超声成像、光声成像、荧光成像,都有其自身的局限性。随着多功能造影剂的快速发展,超声成像与其他成像方法相结合可以实现多模态成像。因而UTMD技术与其他先进的治疗技术相结合,使得自杀基因以更为完善的方式发挥疗效。Wang等^[32]设计了一种双模态的超声/近红外荧光(NIRF)造影剂,并将其应用从图像对比度增强扩展到超声定向和部位特异性靶向的联合诊断和治疗。通过体外和体内实验评估聚乙烯亚胺和DNA复合物偶联的近红外荧光金纳泡(PEI-DNA/NIR797/AuMBs)作为双模态造影剂的潜力,结果表明所开发的治疗性AuMB复合物不仅可以提供良好的超声和NIRF成像以检测肿瘤,而且可以作为一种有效的超声触发载体,用于异种移植裸鼠肿瘤的基因传递和光热消融。与单基因治疗或单次暴露组(超声或NIRF)比较,超声+NIRF暴露组细胞抑制率、细胞凋亡和坏死率,以及Bel-7402异种移植抑制率均较高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。表明超声联合近红外荧光成像介导的双融合自杀基因对于提供更全面的诊断信息,以及指导更准确、有效的协同癌症治疗具有重要价值。

三、总结与展望

总之,UTMD技术介导自杀基因转染是一种极具临床应用潜力的无创靶向基因转移方法,大量的临床前研究不仅证明了基因传递的可行性,而且还有可量化的治疗效果。然而,这项技术研究多停留在细胞、动物实验阶段,在向临床转化的道路上仍存在挑战。酶和前药的开发、转染效率的优化、微泡造影剂的安全性及靶向性等问题仍需进一步探索。优势互补的多模态成像是UTMD技术应用于肿瘤治疗的发展趋势,有望实现恶性肿瘤的诊疗一体化。相信在国内外学者的共同努力下,UTMD技术介导自杀基因治疗恶性肿瘤终将从实验研究过渡到临床应用,以更全面、更实际的方式服务于人类健康。

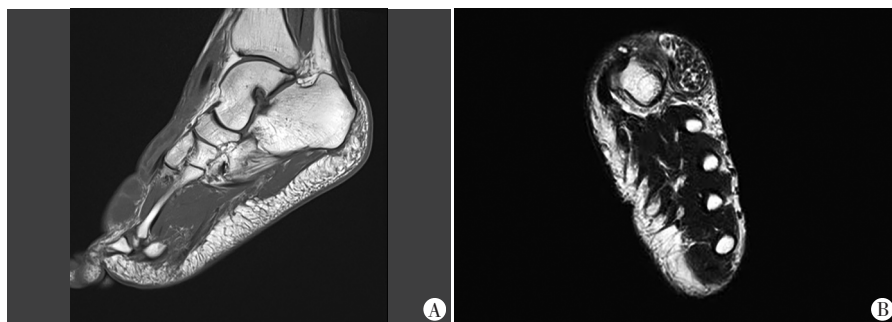
参考文献

- [1] Navarro SA, Carrillo E, Griñón-Lisón C, et al. Cancer suicide gene therapy: a patent review [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2016, 26(9): 1095-1104.
- [2] Zu H, Gao D. Non-viral vectors in gene therapy: recent development, challenges, and prospects [J]. *AAPS J*, 2021, 23(4): 78.
- [3] Duan L, Yang L, Jin J, et al. Micro/nano-bubble-assisted ultrasound to enhance the EPR effect and potential theranostic applications [J]. *Theranostics*, 2020, 10(2): 462-483.
- [4] Johansen ML, Perera R, Abenojar E, et al. Ultrasound-based molecular imaging of tumors with PTPmu biomarker-targeted nanobubble contrast agents [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1983.
- [5] Wu M, Zhao H, Guo L, et al. Ultrasound-mediated nanobubble destruction (UMND) facilitates the delivery of A10-3.2 aptamer targeted and siRNA-loaded cationic nanobubbles for therapy of prostate cancer [J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1): 226-240.
- [6] Chowdhury SM, Abou-Elkacem L, Lee T, et al. Ultrasound and microbubble mediated therapeutic delivery: underlying mechanisms and future outlook [J]. *J Control Release*, 2020, 326(1): 75-90.
- [7] Li X, Xu M, Lv W, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction-mediated miR-767 inhibition suppresses tumor progression of non-small cell lung cancer [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(5): 3391-3397.
- [8] Wu L, Zhou W, Shen F, et al. Connexin32-mediated antitumor effects of suicide gene therapy against hepatocellular carcinoma: in vitro and in vivo anticancer activity [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(4): 3213-3219.
- [9] 李炯, 顾海涛, 孙勇. 携目的基因的靶向超声微泡对肝癌 HepG2 细胞增殖活性的影响 [J]. *重庆医学*, 2017, 46(5): 600-603.
- [10] 王玲, 李嘉, 卢航青, 等. 正电荷基因纳米微泡的超声成像及靶向杀伤肝癌细胞的研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(12): 1667-1673.
- [11] 鲁敏, 曾燕, 郝兰, 等. 载自杀基因的叶酸靶向肝癌相变纳米粒的制备及鉴定 [J]. *肿瘤*, 2020, 40(1): 1-8.
- [12] 张月, 周厚妊, 罗语岑, 等. HER2 靶向载 HSV-TK 基因并具有核定位效应的纳米超声造影剂制备 [J]. *山东医药*, 2021, 61(16): 20-23.
- [13] 辛莹, 周厚妊, 张月, 等. HER2 靶向载 HSV-TK 基因纳米泡诱导胃癌细胞凋亡的体外研究 [J]. *中国医学影像学杂志*, 2021, 29(2): 106-110.
- [14] Zhou XL, Shi YL, Li X. Inhibitory effects of the ultrasound-targeted microbubble destruction-mediated herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir system on ovarian cancer in mice [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(4): 1159-1163.
- [15] Chang E, Ting C, Hsu P, et al. Angiogenesis-targeting microbubbles combined with ultrasound-mediated gene therapy in brain tumors [J]. *J Control Release*, 2017, 255(1): 164-175.
- [16] 张怡, 潘敏, 邓志婷, 等. 聚焦超声介导阳离子脂质体携带 HSV-TK 增强基因转染及联合更昔洛韦对大鼠胶质瘤 C6 细胞的影响 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2018, 32(5): 417-421.
- [17] 伍瑛, 陈永东, 李凡, 等. 载自杀基因的靶向微泡联合超声辐照抑制视网膜母细胞瘤的实验研究 [J]. *临床超声医学杂志*, 2017, 19(11): 725-728.
- [18] 修阳阳, 曾燕, 赵建农, 等. 低强度超声联合载 HSV1-TK/GCV 自杀基因阳离子微泡对高强度聚焦超声不完全消融后残余肝癌细胞的抑制作用 [J]. *中国介入影像与治疗学*, 2017, 14(1): 45-49.
- [19] 谢辉, 刘山, 曾辉, 等. HIFU 联合载 HSV-TK 基因的纳米级超声分子探针治疗对裸鼠肝移植瘤血管生成的影响 [J]. *重庆医学*, 2017, 46(6): 725-728.
- [20] Karjoo Z, Chen X, Hafezi A. Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 99(Pt A): 113-128.
- [21] 陈思乡, 姜庆, 张俊勇. 恢复 connexin26 表达联合载酵母菌胞嘧啶脱氨酶自杀基因纳泡杀灭膀胱癌细胞 [J]. *第三军医大学学报*, 2018, 40(4): 322-327.
- [22] Li J, Zhou P, Li L, et al. Effects of cationic microbubble carrying CD/TK double suicide gene and $\alpha V\beta 3$ integrin antibody in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e158592.

- [23] 何炼图, 汤庆, 何小洪, 等. 微泡造影剂超声辐照介导自杀基因系统治疗肝癌实验研究[J]. 广东医学, 2017, 38(21): 3235-3238.
- [24] Fu YR, Luo Y, Xie X, et al. Nanoscale bubble delivered YCD-TK/Cx26 gene therapeutic system suppresses tumor growth by inducing necrosis of tumor tissues in mouse Xenograft bladder cancer models [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(1): 7338-7349.
- [25] Fu YR, Chen F, Luo Y, et al. Nanoscale bubble ultrasound contrast agents-mediated suicide gene therapy system, nanoscale bubble-LV5-YCD-TK/GCV/5-FC, effectively inhibits bladder cancer cell growth [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(1): 75-86.
- [26] Hu C, Jiang D, Wu M, et al. Ultrasound-mediated nanobubble destruction (UMND) facilitates the delivery of VEGFR2-targeted CD-TK-loaded cationic nanobubbles in the treatment of bladder cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2020, 146(6): 1415-1426.
- [27] 胡聪, 杜晓焱, 江德鹏, 等. 超声靶向介导载CD-TK双自杀基因的微泡对肺癌的治疗作用[J]. 重庆医科大学学报, 2019, 44(2): 157-162.
- [28] Hao Y, Guo L, Abudula A, et al. Proliferation inhibition and apoptosis enhancement of human cervical cancer cells by ultrasound-targeted microbubble destruction delivered double suicide genes [J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(12): 5330-5335.
- [29] Paris JL, de la Torre P, Cabañas MV, et al. Suicide-gene transfection of tumor-tropic placental stem cells employing ultrasound-responsive nanoparticles [J]. Acta Biomater, 2019, 83(1): 372-378.
- [30] Devulapally R, Lee T, Barghava-Shah A, et al. Ultrasound-guided delivery of thymidine kinase-nitroreductase dual therapeutic genes by PEGylated-PLGA/PIE nanoparticles for enhanced triple negative breast cancer therapy [J]. Nanomedicine (Lond), 2018, 13(9): 1051-1066.
- [31] Kumar SU, Wang H, Telichko AV, et al. Ultrasound triggered co-delivery of therapeutic micrornas and a triple suicide gene therapy vector by using biocompatible polymer nanoparticles for improved cancer therapy in mouse models [J]. Adv Ther, 2021, 4(5): 2000197.
- [32] Wang L, Lu H, Gao Q, et al. A multifunctional theranostic contrast agent for ultrasound/near infrared fluorescence imaging-based tumor diagnosis and ultrasound-triggered combined photothermal and gene therapy [J]. Acta Biomater, 2019, 99(1): 373-386.

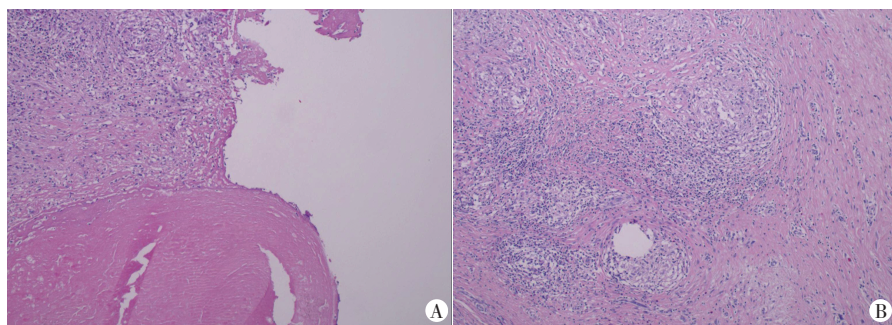
(收稿日期: 2021-11-25)

(上接第373页)



A: T1WI矢状位左足踝长伸肌腱滑囊内弥漫分布颗粒状T1信号影; B: T2WI轴位左足踝长伸肌腱滑囊内弥漫分布“黑芝麻”样等低信号影

图2 踝关节米粒体滑膜炎MRI图



A: 片状凝固性坏死及纤维蛋白样物; B: 肉芽肿性结节形成

图3 踝关节米粒体滑膜炎病理图(HE染色, ×200)

性、非特异性炎症, 无肉芽肿的形成。本病例镜下可见纤维组织增生, 部分区域血管增生, 伴大量肉芽肿性结节形成, 与以往文献^[2]报道不同, 可能与其形成病因有关。米粒体滑膜炎的影

像学诊断主要依赖于MRI, 其MRI表现为颗粒状T1WI信号, 短T2WI信号, 在高信号积液背景下呈典型的“米粒样”改变, 增强后无强化^[2]。米粒体滑膜炎具有其独特的超声表现, 在关节积液中可见多发的纺锤形中低回声结节, 大小多为0.2~0.7 cm, 结节周边回声较高, 内部回声较低, 其内无明显血流信号。本病例超声表现典型, 但因对本病认识不足, 超声未给予明确提示。超声医师应提高对本病的认识。最终确诊仍需依赖病理诊断。

参考文献

- [1] Sugano I, Nagao T, Tajima Y, et al. Variation among giant rice bodies: report of four cases and their clinicopathological features [J]. Skeletal Radiol, 2000, 29(9): 525-529.
- [2] 吴梦楠, 王若凝, 黄志明, 等. 关节米粒体滑膜炎MRI影像征象分析[J]. 南昌大学学报(医学版), 2020, 60(3): 78-80, 84.
- [3] Lee EY, Rubin DA, Brown DM. Recurrent Mycobacterium marinum tenosynovitis of the wrist mimicking extraarticular synovial chondromatosis on MR images [J]. Skeletal Radiol, 2004, 33(7): 405-408.

(收稿日期: 2021-11-02)