

# 超声靶向微泡破坏技术介导基因转染的研究进展

张 月 周厚妊 辛 莹 李诗慧 刘小奇 刘治军

**摘 要** 基因转染技术的高速发展不仅革新了生物学和医学许多基本问题的研究,也推动了诊断和治疗的进步。基因作为核酸类生物活性大分子,极易在体内降解,因此传递基因的载体尤为重要。超声靶向微泡破坏(UTMD)技术利用超声波和微泡之间的相互作用,以及其产生的生物学效应,使微泡携基因进行转染,并与多种载体联合应用,为疾病的治疗提供了有效手段。本文就UTMD技术介导基因转染的研究进展进行综述。

**关键词** 超声靶向微泡破坏技术;基因转染;微泡;载体

[中图分类号]R445.1

[文献标识码]A

## Research progress in gene transfection mediated by ultrasound-targeted microbubble destruction technology

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

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

**ABSTRACT** The rapid development of gene transfection technology has not only revolutionized the research of many basic problems in biology and medicine, but also promoted the progress of diagnosis and treatment. As a biologically active macromolecule of nucleic acids, the gene is easily degraded in the body, so the carrier for gene delivery is particularly important. Ultrasound-targeted microbubble destruction technology (UTMD) utilizes the interaction between ultrasound and microbubbles and the biological effects it produces to enable microbubbles to carry genes for gene transfection and can be used in combination with a variety of vectors. The treatment of a variety of diseases provides an effective means. This article reviews the recent advances in gene transfection by ultrasound-targeted microbubble destruction.

**KEY WORDS** Ultrasound-targeted microbubble destruction; Gene transfection; Microbubble; Carrier

近年来,随着分子生物学技术和现代医学影像学的快速发展,其结合产物——分子影像学逐渐成为研究热点。超声分子影像学作为一重要组成部分,具有特异性高、敏感性强、安全、无创、方便等优点,亦成为当前分子影像学领域的研究热点。超声靶向微泡破坏(ultrasound-targeted microbubble destruction, UTMD)技术随着时代的发展而出现,为疾病的治疗增加了更多选择。本文就UTMD技术介导基因转染的研究进展进行综述。

### 一、UTMD的主要作用机制

UTMD是将生物活性物质或治疗基因注入或掺入微泡中并输送至血液循环,最终在超声的作用下破坏微泡并将其释放到靶组织或靶器官的技术<sup>[1]</sup>。该技术可向特定部位发射不同强度的超声波,当超声强度足够大时血液中的微泡便会发生破裂,破裂后的微泡产生微射流和冲击波,促使周围的血管壁

或细胞膜表面出现可逆或不可逆的小孔,增加了血管或细胞膜的通透性,也增加了外源性物质到达特定部位的剂量,从而发挥其特有的生物学效应<sup>[2]</sup>。其中,最主要的是空化效应,也是UTMD发挥作用的主要机制<sup>[3]</sup>,UTMD诱导的空化效应又分为稳定空化和惯性空化,两种空化方式对细胞有不同的生物学改变。在稳定空化条件下,微泡的机械振动和体积变化不仅可以通过离子浓度改变细胞膜电位,还可以对细胞膜产生剪切力,刺激细胞内吞,从而促进跨细胞膜基因的转运;惯性空化也会引起细胞膜电位的变化,不仅可产生瞬时剪切力,还能对细胞产生强烈的冲击和热效应,破坏细胞膜的完整性。与稳定空化相比,惯性空化诱导了更大尺寸的膜孔形成,实现了大分子物质的转运。

### 二、UTMD与其他载体联合使用介导基因转染

#### 1. UTMD与脂质体联用:脂质体是人工合成的双层磷脂囊

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

泡,因其具有类细胞膜结构、高生物相容性、低免疫原性、能保护药物或活性基团、延长药物半衰期及增效减毒等优势,已成为有效传递活性生物化合物的一种有前途的载体。虽其具有转染效率低、表达时间短等缺点,但上述不足均可联合 UTMD 应用得到解决。外源性质粒 DNA 要进入细胞核,就必须与包涵体解离,而脂质体介导的基因转染最重要的限速步骤正是如此。研究<sup>[4]</sup>表明,UTMD 产生的空化效应是 UTMD 联合脂质体介导基因转染的主要机制,也是其提高脂质体转染效率的主要原因。Xu 等<sup>[5]</sup>分析 UTMD 联合脂质体提高效率的原因:①脂质体虽对质粒 DNA 有良好的包封率,但部分仍可能在脂质体外;②转染后仅小部分 DNA 可从包涵体中释放,而空化作用可促进其释放;③细胞有清除外源性物质的能力,部分 DNA 可被细胞通过胞吐作用排出,空化作用产生的冲击波和微射流可在一定程度上抑制细胞的胞吐作用,提高脂质体的转染效率。Chen 等<sup>[6]</sup>发现辅酶 Q10-脂质体联合 UTMD 显著增强了辅酶 Q10 在肾脏中的特异性分布,可能是预防糖尿病肾病发生的潜在策略。

2. UTMD 与外泌体联用:外泌体是由细胞分泌的纳米级磷脂双层囊泡,可以通过携带多种生物大分子如 RNA、DNA、蛋白质等在细胞间传递信息,介导多种生理和病理功能,亦被视为是一种非常有前途的药物载体。然而,心脏、脂肪组织及骨骼肌对外泌体具有耐药性,在治疗上提高这些组织或器官的药物传递效率,可能扩大外泌体的潜在应用范围。Sun 等<sup>[7]</sup>研究表明,UTMD 诱导产生的空化效应可以瞬间破坏微血管系统,增加了外泌体在心脏、脂肪组织等耐药器官中的浸润,UTMD 作为一种新的组织特异性基因传递手段,可使外泌体进入心脏、脂肪和肌肉组织,为这些器官或组织的基因治疗带来了希望。

3. UTMD 与聚合物胶束联用:聚合物胶束是通过嵌段共聚物的自组装而形成的核壳型纳米粒子,由于其尺寸、稳定性、药物掺入效率及释放速率等关键特性均可以通过设计嵌段共聚物来调节,因此是最具前途的纳米载体之一<sup>[8]</sup>。UTMD 与聚合物胶束的结合会带来一种全新的疾病检测模式,研究<sup>[9]</sup>报道根据超声与聚合物胶束相互作用机制的不同,可将超声介导的聚合物胶束药物递送分为两种:一种是基于超声波对胶束的物理破坏和有效载荷的可逆释放,另一种是基于胶束超声机械化学破坏和载荷的不可逆释放。Wu 等<sup>[10]</sup>成功研制出具有超声反应特性的新型载姜黄素的聚合物胶束,并发现其能显著抑制肿瘤生长。

4. UTMD 与病毒载体联用:转染效率高、表达持续的病毒载体是将治疗基因输入靶细胞的最常用工具。但病毒载体自身存在毒性且缺乏特异性,常会引起免疫副反应<sup>[11]</sup>。UTMD 与病毒载体结合具有协同作用,可以改善病毒载体的不足。微泡通过超声辐射提高了特定部位释放的强度,进而提高了病毒载体的特异性;UTMD 通过空化作用产生的微射流可以增强细胞膜和毛细血管的穿透性,克服内皮屏障;此外,微泡可以对病毒引起的免疫应答施加限制,允许静脉注射作为传递方式,因此掺入微泡中的病毒载体可允许血管内给药和重复注射<sup>[12]</sup>。UTMD 不仅提高了病毒载体的效率,还避免了病毒载体的免疫原性,使病毒载体能更好地应用于临床。Li 等<sup>[13]</sup>发现单独应用重组腺相关病毒血清 2 型转染到人肾细胞癌的效率很低,但联

合 UTMD 可将病毒转移效率提高 2~3 倍,病毒基因组 DNA 提高 9 倍以上,且不会降低细胞活力,表明 UTMD 可与重组腺相关病毒血清 2 型联合用于癌症的基因治疗。

### 三、UTMD 在疾病治疗中的应用

1. 肿瘤:UTMD 作为一种新兴的基因传递方式,其介导自杀基因的转染亦是一种极具前景的肿瘤治疗技术<sup>[14]</sup>。单纯疱疹病毒胸苷激酶/更昔洛韦(HSV-TK/GCV)系统是目前最成熟有效的自杀基因疗法,TK 基因是药敏基因,肿瘤细胞转染该基因后,对前体药物丙氧鸟苷或无环鸟苷变得敏感,故能被杀死<sup>[15]</sup>。Zhou 等<sup>[16]</sup>研究结果表明 UTMD 技术介导 HSV-TK 基因的转染能有效抑制小鼠卵巢癌。王玲等<sup>[17]</sup>制备了载 HSV-TK 基因脂质纳米微泡,表明载 HSV-TK 基因的纳米微泡联合 UTMD 对甲胎蛋白阳性的肝癌细胞有明显抑制作用。

2. 心血管疾病:Shentu 等<sup>[18]</sup>研究表明,利用 UTMD 可成功转染血管内皮生长因子基因至心脏,并以 P-选择素为靶向部分提高了转染效率,血管内皮生长因子的成功表达增加了心肌血管密度,改善了缺血心肌功能。Cui 等<sup>[19]</sup>研究表明 UTMD 与核定位信号联合构建的亲核传递系统促进了治疗基因在犬心肌梗死模型中的表达,有效地增加了血管生成,提高了转染效率。Huang 等<sup>[20]</sup>发现通过 UTMD 下调肾脏 G 蛋白偶联受体 4 型表达可以降低自发性高血压大鼠的血压。

3. 关节炎:Wang 等<sup>[21]</sup>建立了胶原诱导的关节炎大鼠模型,发现 UTMD 能显著提高肿瘤坏死因子受体基因转染大鼠肌肉和滑膜炎症的效率,改善关节炎症状,降低滑膜组织和外周血炎症因子水平。Xiang 等<sup>[22]</sup>也发现 UTMD 可提高增强型绿色荧光蛋白基因在抗原诱导关节炎兔模型体内的转染效率,有望成为一种安全有效的非病毒基因转染治疗关节炎的方法。

4. 其他:Wan 等<sup>[23]</sup>研究证明 UTMD 与聚乙烯亚胺联合应用能提高人视网膜色素上皮细胞和 SD 大鼠视网膜内质粒 DNA 的基因表达,且无明显的组织损伤。Xiang 等<sup>[24]</sup>研究证实 UTMD 可以同时将胰岛素样生长因子-1cDNA 和转化生长因子- $\beta$ shRNA 转染至损伤大鼠的跟腱,提高基因转染效率,且联合转染可以改善肌腱的生物力学性能,为肌腱损伤的基因治疗提供了依据。

### 四、小结与展望

UTMD 作为基因治疗中一种全新的工具,具有毒性小、非免疫原性强、操作简便等优点,是一种发展前景极佳的治疗技术。但目前 UTMD 的临床应用仍存在挑战,如何最大限度地提高基因转染效率的同时又使其对组织损伤的程度达到最小,如何更好地提高微泡的包载能力、优化超声参数和超声频率依然是亟需解决的问题。随着科技的进一步发展和超声微泡性能的改善,相信今后 UTMD 可以在人类疾病的诊疗中发挥重要作用。

### 参考文献

- [1] Liao YY, Chen ZY, Wang YX, et al. New progress in angiogenesis therapy of cardiovascular disease by ultrasound targeted microbubble destruction[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014(1): 872984.
- [2] 王龚, 卓忠雄. 超声靶向破坏微泡技术在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 中国医学影像学杂志, 2013, 21(11): 866-868.

- [3] Chen ZY, Yang F, Lin Y, et al. New development and application of ultrasound targeted microbubble destruction in gene therapy and drug delivery[J]. *Curr Gene Ther*, 2013, 13(4):250-274.
- [4] Xie A, Belcik T, Qi Y, et al. Ultrasound-mediated vascular gene transfection by cavitation of endothelial-targeted cationic microbubbles[J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2012, 5(12):1253-1262.
- [5] Xu J, Wang Y, Li Z, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction (UTMD) combined with liposome increases the effectiveness of suppressing proliferation, migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) via targeting metastadherin (MTDH) by ShRNA[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25(4):2640-2648.
- [6] Chen PP, Xu HL, Yue T, et al. CoQ10-loaded liposomes combined with UTMD prevented early nephropathy of diabetic rats [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(14):11767-11782.
- [7] Sun W, Li Z, Zhou X, et al. Efficient exosome delivery in refractory tissues assisted by ultrasound-targeted microbubble destruction [J]. *Drug Deliv*, 2019, 26(1):45-50.
- [8] Nishiyama N, Matsumura Y, Kataoka K. Development of polymeric micelles for targeting intractable cancers[J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(7):867-874.
- [9] Xia H, Zhao Y, Tong R. Ultrasound-mediated polymeric micelle drug delivery[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 880(4):365-384.
- [10] Wu P, Jia Y, Qu F, et al. Ultrasound-responsive polymeric micelles for sonoporation-assisted site-specific therapeutic action [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(31):25706-25716.
- [11] 张传领, 周德敏. 基因治疗用病毒载体的化学修饰策略[J]. *中国科学(化学)*, 2018, 48(11):1365-1375.
- [12] Chen ZY, Lin Y, Yang F, et al. Gene therapy for cardiovascular disease mediated by ultrasound and microbubbles [J]. *Cardiovasc Ultrasound*, 2013, 11(1):11.
- [13] Li F, Jin L, Wang H, et al. The dual effect of ultrasound-targeted microbubble destruction in mediating recombinant adeno-associated virus delivery in renal cell carcinoma: transfection enhancement and tumor inhibition [J]. *J Gene Med*, 2014, 16(1-2):28-39.
- [14] 刘怡萱, 边珍, 马红梅. 癌症基因治疗技术进展与展望[J]. *中国生物工程杂志*, 2016, 36(5):106-111.
- [15] 许坚吉, 王爽, 寇卜心, 等. 肿瘤基因治疗的研究进展[J]. *中华全科医学*, 2017, 15(4):655-658.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Shentu WH, Yan CX, Liu CM, et al. Use of cationic microbubbles targeted to P-selectin to improve ultrasound-mediated gene transfection of hVEGF165 to the ischemic myocardium [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2018, 19(9):699-707.
- [19] Cui J, Deng Q, Zhou Q, et al. Enhancement of angiogenesis by ultrasound-targeted microbubble destruction combined with nuclear localization signaling peptides in canine myocardial infarction [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017(1):9390565.
- [20] Huang H, Li X, Zheng S, et al. Downregulation of renal g protein-coupled receptor kinase type 4 expression via ultrasound-targeted microbubble destruction lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(10):e004028.
- [21] Wang L, Tang X, Xiang X, et al. Experimental study of TNF- $\alpha$  receptor gene transfection by ultrasound-targeted microbubble destruction to treat collagen-induced arthritis in rats in vivo [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(3):1601-1610.
- [22] Xiang X, Tang Y, Leng Q, et al. Targeted gene delivery to the synovial pannus in antigen-induced arthritis by ultrasound-targeted microbubble destruction in vivo [J]. *Ultrasonics*, 2016, 65(2):304-314.
- [23] Wan C, Qian J, Li F, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction enhances polyethylenimine-mediated gene transfection in vitro in human retinal pigment epithelial cells and in vivo in rat retina [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2):2835-2841.
- [24] Xiang X, Leng Q, Tang Y, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction delivery of insulin-like growth factor 1 cDNA and transforming growth factor beta short hairpin RNA enhances tendon regeneration and inhibits scar formation in vivo [J]. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2018, 29(4):198-213.

(收稿日期:2019-09-27)

## 《临床超声医学杂志》征订启事

《临床超声医学杂志》是经国家科委批准,集超声影像诊断、治疗、工程及基础研究为一体的科技刊物。国内外公开发行,月刊。为“中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊”、“中国科技论文统计源期刊”、“中国科技核心期刊”。设有临床研究、实验研究、综述、经验交流、临床报道、病例报道、述评、专家讲座、工程技术及译文等栏目,以各级超声医学工作者、相关临床专业医师及医学院校师生为主要读者对象。

本刊刊号:ISSN 1008-6978;CN 50-1116/R;邮发代号 78-116。

每期定价:19元,全年228元(含邮寄费)。请到全国各地邮局订阅,也可直接向本刊编辑部订阅。

地址:重庆市渝中区临江路74号,重庆医科大学附属第二医院内,临床超声医学杂志编辑部。邮编:400010

电话:023-63811304 023-63693117 Email:lcscq@vip.163.com