

超声微泡造影剂:基因和药物传递的原理与应用

周文英^{1,2}, 杜丽娜¹, 金义光^{1,2}

(1. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850; 2. 河南大学药学院, 河南 开封 475004)

摘要: 文章分析了目前医用微泡的工艺水平及其在治疗用传递和检测中的应用。由于聚焦超声束能破坏传递载体和血管壁, 所以能局部传递药物或基因。传递载体的临床应用需克服目前存在的困难, 包括体内清除迅速及载药量低等。

关键词: 控释; 空化作用; 超声作用

中图分类号: R944 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-0440(2008)04-0305-04

1 前言

1968 年首次报道了可增强超声显影的小气泡。不具有稳定壳的空气泡的寿命很短, 因此需开发能稳定气-液界面的方法。目前稳定化的气泡已用于增强心脏病学和放射学中灌注组织的反射。尽管临床上尚未应用分子靶向试剂, 但成功的临床前研究已证明了其在血管生成和血管炎症中的应用。如果微泡超声造影剂在超声作用下能膨胀、移动或成碎片, 需考虑其在超声作用下的安全性。由于许多参数未知(如可能的成壳材料、靶向配体、装载分子和超声参数等), 因此以临床优化微泡为基础的药物或基因传递载体的开发很具挑战性。

2 微泡物理化学

2.1 微泡稳定性

由于气-液界面表面张力的作用, 未经包裹的微泡几乎在刚形成的同时自发溶解。如欲使微泡具有适宜的半衰期(几天到几个月不等), 则微泡壳必须足够坚固以消除表面张力并传递显著的渗透阻力, 而高分子气体可增强壳渗透阻力。经脂质包衣、充填全氟碳气体的微泡溶解度较低、溶解动力学较慢, 经高度稀释后可被修饰用于靶向和药物传递。

2.2 脂质壳的性质

脂质是一大类由一种或几种碳氢化合物或氟碳链与亲水性头基经丙三醇共价连接而成的化合物, 脂质壳没有其他类型(如聚合物)的壳稳定, 但较易形成更易产生回波微泡。

脂质从可溶性聚集物(即胶束和囊泡)自发吸附到气-液界面并自组装成单层包衣。在纳米范围内, 脂质分子被定向为疏水尾朝向气相, 通过增加或减少链长可调节疏水力和色散力介导的相互作用。增加链长能减小表面张力和增加表面粘度、气体渗透阻力及壳皱曲的稳定性, 产生更牢固的微泡。

脂质能屏蔽刷层(brush layer)、表达配体并与药物、基因及其他复合物结合。此外, 在超声诱导的振荡中, 脂质壳对剧烈的面积膨胀和压缩高度适应。脂质壳易于伸展、破裂、再密封、压缩、弯曲及随每次声学循环再伸展。

2.3 其他成壳材料

在 20 世纪 80 年代, 超声造影剂用糖类或蛋白质包衣。白蛋白包衣的微泡 Albutex[®] 和 Optison[™] (GE Healthcare) 是第一代商业化的经 FDA 批准的造影剂。最近, 以蛋白质为壳的微泡已功能化以携带靶向配体和负载基因。已有几种方法将气体包裹入聚合物壳中。利用分散和离子凝胶化已制得以海藻酸盐为壳的微泡。少数研究者已使用有机溶剂溶解和分散聚合物, 然后再分散冻干样品以形成空心的聚合物囊。而聚合物壳固有的链缠结和共价键缓冲了气核振荡直至壳膨胀被破坏。

2.4 靶向作用

物理化学的相互作用可增加靶向的特异性, 利用表面电荷即是一个简单例子。但由于生物环境的复杂性, 一般静电相互作用特异性不够强。而配体-受体相互作用能在生物介质中产生高度特异性。这种情况下微泡表面可用能特异性结合到血管腔细胞株受体的配体来修饰。

聚合物刷(polymer brush)的存在使配体与单层壳之间需要间隔物, 以便配体能在平行表面寻找受

收稿日期: 2007-11-14

作者简介: 周文英, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 药物新剂型与新技术, Tel: 010-66931220, E-mail: zwy1126@sina.com

体。最典型的是配体与在长度上等于周围刷链长或比周围刷链长的间隔物相连接,使配体最大程度地暴露于生物环境。使配体最大限度暴露于靶组织表面结构的设计也有以下风险,即引起能导致早期粒子清除的免疫原性化合物增加,甚至过敏反应。

将配体连接到微泡表面有两种基本方法:通过直接的共价键或通过生物素-亲和素连接。生物素-亲和素连接是一种简单技术,它是将生物素化的配体经亲和素桥连接到生物素化的微泡上,但免疫原性阻碍了其应用于人体。共价连接是更理想的方法,能在微泡壳形成前或形成后完成。与微泡结合的策略包括通过碳二酰亚胺、*N*-羟基琥珀酰亚胺将配体的氨基与微泡壳上的羧基结合,或将配体的巯基与微泡壳上的马来酰亚胺结合。对脂质包衣造影剂而言,采用配体化脂质聚合物的优点是将微泡应用于患者时,给药更方便。

适宜的连接方法和修饰顺序的选择取决于配体类型。需重点考虑配体大小及其对生物利用度的影响。亲水性小分子如代谢产物和多肽,能直接与聚合物间隔物结合而不会显著影响聚合物动力学。相反,大型蛋白质配体如抗体,由于受与微泡分散有关的剪切力和有机溶剂的影响而易于变性。因此抗体(约 120 ku)需通过生物素-亲和素连接而结合到已形成的微泡表面。所形成的复合物更类似于硬质支架而不是游离聚合物链。

2.5 配体的类型

几类配体(如抗体、多肽和维生素)已被结合到微泡表面。单克隆抗体,尤其是免疫球蛋白- γ (IgG)家族已被广泛地用于靶向细胞表面受体。多用途的单克隆抗体在纳摩尔到皮摩尔范围内均有亲和力。用于靶向成像和药物传递的抗体生产价格昂贵且费时,批与批之间结合活性也不同。抗体作为靶向剂的局限性是贮存期有限且对温度敏感。

多肽是一类化学性质稳定且免疫原性较低的小分子。一类尚未用于微泡靶向的配体是适配子(aptamer),它是基于 RNA 或 DNA 的配体,与靶点结合的亲和力和特异性很好。由于适配子是经化学合成的,所以避免了抗体的一些限制。

2.6 载药量

除用于靶向成像外,超声微泡能用于传递治疗药物。用于介入治疗的微泡处方组成的一个关键是壳中负载治疗药物。气核实质上是一个不能隔离有机化合物的空腔,而脂质壳太薄(约 3 nm)不能容纳

足够的负载分子。提高载药量的一个方法是将能溶解亲水性或亲脂性药物的油引入到脂质壳中。

当阳离子脂质或变性蛋白存在时,荷电治疗药物(如 DNA 或 RNA)能通过静电作用与壳结合,此技术已广泛用于基因转染实验。在实验中观察到的脂质包衣微泡的负载能力是 $0.01 \text{ pg} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ 。目前正尝试一种提高负载能力的方法,通过多层增加静电结合的总表面积,初期数据表明 10 层 DNA 的负载能力增加了 10 倍多。

微泡表面负载药物也可利用配体-受体相互作用完成。如 Lum 等最近报道了一项研究,将纳米粒通过生物素-亲和素连接而结合到壳上。这些结果为负载药物提供了一个标准模式,首先治疗药物被装载到纳米粒室中,然后被装入微泡载体中。此方法提供了一个能根据特定治疗药物的疏水性、大小和释放要求而调整的多功能平台。

3 声振时微泡物理过程

3.1 微泡振荡

在声脉冲过程中,高度可压缩的微泡随所用压力的减小和增大而膨胀和收缩。由于依赖于微泡尺寸的共振行为,直径几微米的微泡在对兆赫级超声频率的响应上有极大不同。在直径约 $10 \mu\text{m}$ 的血管中,微泡振动幅度下降,没有观察到单一超声脉冲引起的破碎。在超声刺激的过程中观察到微泡造影剂的破坏,破坏机制包括微泡断裂成更小的泡及(或)被包埋气体溶出。

3.2 辐射力

1906 年首次报道了辐射力效应,当时观察到声场中气泡间的吸引和排斥。最新研究表明,微米级超声造影剂通过临床超声仪器可产生强辐射力效应。尽管高压脉冲的传递将增加辐射力产生的偏离,但微泡在数十万帕斯卡压力下可成碎片。因此常使用低压和频率接近微泡共振频率的长脉冲。

4 微泡特异性成像技术

随着微泡造影剂的使用,超声对毛细血管和极低流速变得敏感。由于微泡可高度压缩并引起超声强散射,所以微泡在超声成像时很明亮。当声振时,微泡的膨胀和压缩可导致非线性信号的产生。

已有许多其他方法可加强非线性造影剂的回波并抑制从周围组织产生的回波。谐波成像是可在一定频率发射入射波并在入射波的谐波处(整数

倍)听取回波的一大类技术。但其使用也有限制,例如在影像对比度和空间分辨率之间必须折衷。另外,组织也能产生非线性回波,从而降低了对比分辨率。

为克服这些局限,发展了相反转成像技术(phase inversion imaging)。相反转成像是将多重超声脉冲顺序发射,与首次脉冲相比,二次脉冲被倒转。线性反射体所发射的脉冲原样返回,因此成对波总和被抵消而不产生信号。而非线性脉冲的成对响应将引起回波改变,当回波加和时不被抵消。已引进了其他多脉冲成像技术,如成像特异性序列(如Siemens的CPS[®]),利用脉冲相和振幅改变相结合而选择性地使组织回波最小化并增强超声造影剂的回波。随着各接受回波的选择性定位及所有回波的加合,舍弃了组织信号而保留了非线性微泡回波。

如上所述,超声造影剂受到合适频率和足够压力的超声振荡时能被破坏。具破坏性脉冲的超声可在成像区破碎造影剂。低压、高频、非破坏性脉冲能使血管内造影剂进入成像区再填充后显像。

5 对治疗的响应成像

将靶向显像模式与损伤定向治疗相结合能测定与阳性治疗响应相关的生物学现象。一种超声显影增强技术是将破坏-再填充超声与次谐波相反转成像结合以增强空间分辨率,并区分从组织回波中产生的成像回波。在非破坏性成像脉冲中,声波从探头以特定频率发射,而接受功能用于检测初始频率的次谐波频率。次谐波振荡由超声造影剂而不是周围组织产生,从而使大量次谐波回波来自于血管内的造影剂,极少或没有信号来自于周围组织。

6 细胞膜及血管通透性的改变

电镜已表明细胞膜内小孔的产生与微泡破碎和气流产生有关。细胞膜内孔的产生依赖于超声参数,寿命较短,能引起细胞死亡或将外源性物质成功引入到细胞质内。除改变细胞膜通透性外,将超声应用到含微泡的小血管能改变血管壁的通透性,使粒子外渗到细胞间隙。毛细血管通透性的改变依赖于泡大小、壳组成及毛细管直径与泡直径的比例。改变超声参数(如声压和脉冲间隔)及物理参数(如注射部位和微血管压力)能使微泡局部药物传递效率最大化。研究还表明随着毛细血管压力升高,微泡转运通过毛细血管壁的能力增强。

7 应用:成像潜力和治疗靶点

由于超声造影剂能被迫在小至数百微米、大至几厘米的瞬时范围内振荡,所以适于局部药物传递。一种策略是将药物与超声造影剂同时全身注射,然后在靶部位应用超声。在较小血管内,微泡振荡将改变血管壁引起药物外渗。药物也可能被包裹到微泡内,通过在供给损伤部位的血管处选择性地破碎微泡而增加局部药物传递。已报道微泡可引起新生内膜生成减少、内皮转染及血栓溶解。尽管到目前为止微泡有效负载所传递药物的容量较小,但以微泡为基础将药物或基因传递跨越血脑屏障极具应用前景。辐射力已被用于在微泡破坏之前将其导向血管壁。与单独使用超声相比,这种方法可使荧光标记的油在体外细胞上的沉积量增加10倍。

更具特异性的药物传递是将配体作为特定的表面标记物连接到载药微泡外表面。例如内皮表面标记物作为血管生成区过度表达的特定标记物,是极具吸引力的靶点,靶向微泡可黏附于这些标记物上。

7.1 血栓溶解治疗

在20世纪90年代后期利用亲和素-生物素吸附成功研制了第一个靶向超声造影剂。首先,注入能与血栓内纤维蛋白结合的生物素化单克隆抗体,然后再注入能与单克隆抗体上生物素结合的亲和素。最后,加入生物素化的靶向超声造影剂,它能与亲和素分子的暴露末端结合。这种超声造影剂靶向的方法能使血栓回声信号增强4倍。

最近Unger等研制了一种靶向于活化血小板的超声造影剂MRX408。这种造影剂采用了另一种连接方式,是将精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)分子直接与造影剂表面相连。RGD能与活化血小板上存在的糖蛋白II B/III A受体结合。

无论微泡是否存在,已证明超声可增强溶栓效应,若与静脉注射血栓溶解剂相结合则效果更显著。当在低频高功率声振时,随着造影剂膨胀和收缩,有可能使血栓破碎。另外,血栓溶解剂如t-PA能被包入到微泡内,当微泡破裂时沉积到血栓内。已证明空化作用与传递血栓溶解剂相结合用于溶解血栓比单用超声和造影剂更成功。

7.2 抗癌治疗

多年来将脂溶性抗癌药包裹到传递载体内以避免全身毒性。现在也有可能将疏水性药物包入成微泡的脂质外层或将亲水分子吸附到微泡壳上。另外也有可能将疏水性药物包入声学活性脂质体

(AAL)的油层。毒理研究表明,当小鼠全身注射载紫杉醇的 AAL 时,与未包裹的紫杉醇相比毒性减少了 90%。

血管内物质如超声造影剂易于接近与血管生成有关的内皮细胞和受体。已证明超声造影剂表面连接配体可成功地用于成像。整合素(尤其是 $\alpha_v\beta_3$) 在血管生成、细胞黏附、细胞迁移及信号转导中起重要作用。Lindner 研究小组采用亲和素-生物素系统将单克隆抗体与 RGD 多肽结合,而 RGD 多肽对微泡表面的 α_v 整合素亲和力很强。

转化生长因子的受体-endoglin (CD105)是与增生相关的低氧诱导性蛋白质,在血管生成内皮细胞中高表达。用^{99m}Tc-标记的靶向 endoglin 的单克隆抗体的免疫闪烁成像证明其可被肿瘤大量摄取。假如能将多肽和单克隆抗体连接到微泡上,可想像靶向超声造影剂用于血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)及金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPS)的酪氨酸激酶受体成像。

7.3 动脉粥样硬化治疗

动脉粥样硬化的早期标志之一是单核细胞对内皮细胞的活化和黏附,这是由白细胞黏附分子(LAM)如细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的上调介导的。已证明携带靶向 ICAM-1 的单克隆抗体的超声造影剂在体内外结合效率较好。Takalkar 等使用并行板流动室测定携带抗 ICAM-1 的靶向微泡与通过白介素-1 β 人工活化的上皮细胞之间的黏附性。与对照组非靶向微泡相比,靶向微泡的黏附增加了 40 倍。

7.4 基因治疗

靶向超声造影剂的一个潜在治疗应用是传递基因。腺病毒或质粒载体已被包裹到白蛋白超声造影剂中,传递到心肌后使用超声在靶区破坏微泡。携带编码 VEGF 质粒的微泡在超声作用下已用于诱发大鼠心肌的血管生成。而传统微球带负电荷,所以携带负电荷 RNA 或 DNA 分子用于细胞转染的效率较低。Tiukinhoy 等研究了一种用超声波检查可探测到回声的阳离子脂质体。将 DNA 与微泡孵育可将 DNA 融合进微泡壳中从而有利于共注射。经静脉注射和动脉注射含质粒微泡相比,动脉注射的局部组织转染效率要高 200 倍。

治疗剂量药物或基因的传递受限于临床微泡静脉注射的浓度。大鼠心脏基因转染需静脉注射 1 mL 超声造影剂,约含 1×10^9 个微泡。注射 1 mL 壳中含基因的微泡可将治疗基因有效传递至大鼠胰

腺,每毫升含 5×10^9 个微泡。静脉注射少量微泡就能使携基因微泡造影剂成功转染对未来基因翻译的研究很重要。尚不清楚当应用超声时,由于微泡有效负载药物容量较低是否需要高浓度微泡或气泡。质粒 DNA 和微泡共注射进入肾动脉同时结合瞬时血管收缩和超声时,能在肾中产生局部基因表达。Tsunoda 等研究表明,左心室局部注射微泡和质粒 DNA 后与尾静脉注射相比,心脏中报告基因转染效率增加一个数量级。

8 挑战与局限性

靶向成像和药物传递领域面临几个挑战。最重要也是最基础的问题如下:(1)在各个损伤处是否有靶点存在?(2)配体与靶点结合是否为特异性,能与其他靶点结合吗?(3)是否存在足够多的靶点以结合能被检测到的造影剂?(4)所负载药物是局部存在还是进入全身循环中?

超声造影剂作为药物传递载体还存在其他具体问题。首先,与传统制剂相比超声造影剂相对较大,微泡直径多在 1 ~ 10 μm 之间。肿瘤血管易穿透且常具有较大的内皮空隙,但造影剂微泡太大不能逸出血管。Wheatley 等在最近的文献中描述了具有良好声学性质的纳米粒超声造影剂(直径为 450 nm)。这种超声造影剂在实验兔中能使肾成像良好。

尽管在过去几年中超声造影剂的循环时间已延长,但超声药物传递仍需考虑此问题。例如,造影剂 Sonovue 的清除半衰期仅为 6 min。大鼠和猪的肝、肺和脾可摄取 Alburnex,在 3 min 内 70% 从血流中清除。如果造影剂被网状内皮系统从循环中摄取,则循环时间不够长,不足以使大量药物传递至靶区。需要多重循环使足够量造影剂在靶区被破坏以显著增加局部浓度。以聚合物为壳的造影剂可显著延长循环时间。尽管超声微泡相对较大,也需考虑微泡表面所吸附药物的量或包入内部脂质层药物的量。将脂质体或其他微粒加入微泡壳中也能显著增加载体传递效率。

尚未深入了解与超声造影剂有关的生物效应,而此生物效应强烈依赖于造影剂浓度和成像参数。在临床应用中需考虑这些生物效应。

[编译自:Ferrara K, Pollard R, Borden M. Ultrasound microbubble contrast agents: fundamentals and application to gene and drug delivery[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2007, 9: 415-447.]