

## Progress of ultrasound contrast agent mediated gene therapy in ovarian cancer

ZHANG Qing-feng, WANG Zhi-gang\*

(Institute of Ultrasonic Image, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

[Abstract] Gene therapy of ovarian cancer has become a hot spot recently, and the key point is to transfect exogenous gene into cells safely and effectively. As a new gene transfection vector, ultrasonic microbubble contrast agents will break a new way for the gene therapy in ovarian cancer. The research progress of ultrasound contrast agent mediated gene therapy in ovarian cancer were reviewed in this article.

[Key words] Contrast media; Microbubbles; Gene therapy; Ovarian neoplasms

## 超声微泡造影剂介导基因治疗卵巢癌的研究进展

张清凤 综述, 王志刚\* 审校

(重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010)

[摘要] 卵巢癌基因治疗的关键在于如何安全高效地将外源性基因导入细胞。超声微泡造影剂作为新兴的基因转染载体, 有望为卵巢癌基因治疗开辟新的路径。本文就超声微泡造影剂在卵巢癌基因治疗中的研究进展进行综述。

[关键词] 造影剂; 微泡; 基因治疗; 卵巢肿瘤

[中图分类号] R445.1; R737.31; Q782 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2010)12-2389-03

随着分子生物学和基因技术的发展, 基因治疗卵巢癌成为目前生物领域重要的研究课题之一, 如何安全高效地将外源性基因导入靶细胞是基因治疗的关键。传统的病毒载体存在免疫原性和致突变性, 而质粒、脂质体等非病毒载体又存在转染率低和靶向性差等缺陷。近年来, 众多学者采用超声微泡造影剂介导基因治疗<sup>[1]</sup>, 其原理是依靠微泡表面固有的特性或通过对微泡进行特殊修饰, 使其能够靶向性滞留在组织和器官血管内皮细胞, 同时超声照射可增强裸质粒 DNA 在癌细胞内的转染和表达, 提高基因治疗的靶向性, 减少全身不良反应, 是一种新型、安全而高效的基因转染技术。超声靶向破坏微泡技术(ultrasound targeted microbubble destruction, UTMD)为开辟卵巢癌基因治疗新路径奠定了基础。

### 1 超声微泡介导基因治疗的作用机制进展

理想的超声造影剂在循环系统中要足够的安全、稳定, 具有良好的回波信号, 载基因微泡通过超声的触发破坏, 使微泡或微泡破坏后释放的基因能够进入血管壁甚至组织间隙。

#### 1.1 空化效应 超声波通过稳态空化和瞬态空化两种空化

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(30900370)。

[作者简介] 张清凤(1986—), 女, 四川成都人, 在读硕士。研究方向: 超声微泡造影剂的基因治疗。E-mail: qingfengzhang518@126.com

[通讯作者] 王志刚, 重庆医科大学超声影像学研究所, 400010。

E-mail: wzg62942443@163.com

[收稿日期] 2010-07-21 [修回日期] 2010-09-01

效应可以改变细胞的通透性。稳态空化时, 微泡造影剂产生稳定且柔和的振荡, 引发较小微束, 能在气泡表面周围产生流速极高的切变应力, 使细胞膜的脂质双分子层断裂, 形成微孔, 增强外源性基因的摄取、转染与表达。瞬态空化是一种强烈的生物效应, 当达到瞬态空化阈值时, 大量微泡塌陷产生的强大射流将基因或药物注入细胞内, 直接引起肿瘤细胞凋亡、坏死甚至破碎。超声微泡介导的基因转染是一个动力学过程, 有研究<sup>[2-3]</sup>详细探讨了超声微泡在基因传递及显像的应用特点, 认为超声诱导的微泡空化效应是介导无穿透力的生物学分子跨越细胞膜的主要机制, 这种效应与低于瞬时空化阈值压力水平的微泡线性和非线性振荡有关。超声能量的吸收和消散可引起局部、瞬时温度骤升, 影响细胞膜磷脂双层的流动性, 进而影响细胞的通透性; 微泡通过非线性振荡以热能形式将声能驱散。

1.2 声孔效应 微泡在超声波的作用下出现“震荡”或“内爆”活性, 伴随发生的微束, 巨大切应力、冲击波和射流等过程使周围组织细胞壁和质膜被击穿, 产生可逆或不可逆的小孔, 对应产生可修复性声孔效应和致死性声孔效应。Stratmeyer等<sup>[4]</sup>认为在相对较长时间超声辐照后, 超声介导微泡破坏过程中自由基的产生伴随活性氧族生成, 是导致内皮损伤的可能原因, 其动力学特性可以通过超声参数频率、声强、持续时间和机械指数来调控。

1.3 修复动力学机制 类似于膜机械损伤的修复动力学与

小囊泡依赖  $\text{Ca}^{2+}$  的胞吐作用,浆膜损伤后的重新密封为基因摄取的途径,使之成为基因跨越浆膜的可能机制,作用于基因或药物传递,使不良反应最小化,并可提高转染效率<sup>[5]</sup>。

1.4 内吞作用 内吞作用是超声微泡靶向传递的重要机制之一。超声辐射下微泡破裂可导致过氧化氢生成,其水平升高及邻近细胞膜内流  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  依赖的  $\text{K}^{+}$  通道开放致使局部细胞膜电位超极化,可能与生物大分子物质通过内吞作用和胞饮作用进入细胞内直接相关<sup>[6]</sup>。DNA 一旦进入胞内,通过早期和晚期内含体的分选、再循环,向核膜孔复合体靠近等待转录。

## 2 超声微泡介导基因治疗的靶向性

常用超声微泡造影剂不能溢出血管外,靶向目标只能是血管内皮细胞和血细胞上的黏附分子、受体及标志物等。通过对微泡进行修饰,定位实施超声照射,提高特异结合能力,可实现血管内分子显像和靶向治疗<sup>[7]</sup>。纳米级液态氟碳超声造影剂能够穿越血管进入组织,实现血管外显像,推动了超声分子显像与靶向治疗向血管外领域的拓展<sup>[8-9]</sup>。

将携带目的基因的微泡造影剂经静脉或局部管腔注射后,给予靶组织一定条件的超声照射,可提高局部组织、细胞的基因转染和表达。微泡携带基因的方式分两种:一种是基因通过与带正电荷的阳离子微泡或者脂质体静电吸附在一起,用于增强基因靶向治疗,但在复杂的内环境中,静电吸附的特异性远不如配体-受体系统;另一种是将基因包裹在微泡壁层或者内部,避免血清 DNA 酶降解和肝脏清道夫受体排除,能明显提高基因转染的效率。

如何将特异性好、活性高的配体牢固结合到微泡表面,关键在于微泡的表面修饰。Kim 等<sup>[10]</sup>建议在脂质微泡的单层外壳与配体之间采用多聚物隔离臂,如聚乙二醇(PEG)作为连接子,使配体的游离端活动度明显增大,充分暴露在微泡的表面,提供更多机会与受体结合,提高转染效率,且避免了包埋于微泡膜材料中的配体浪费。为提高在快速血流条件下的定位,克服血流剪切力对靶向作用的影响,微泡表面可制备成含有皱褶和微绒毛的特殊结构<sup>[11]</sup>。杨钰楠等<sup>[12]</sup>采用酰胺键共价结合法将血栓靶向短肽片段精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸(Arg-Gly-Asp-Ser, RGDS, 为血小板膜糖蛋白 GP II b/III a 的特异性配体)连接于脂质微泡表面,成功制备亲血栓靶向超声微泡。Leong-Poi 等<sup>[13]</sup>研究与  $\alpha\text{v}$ -整合素有高度亲和力的单克隆抗体,通过生物素-亲和素系统即非共价连接法连接于微泡,取得了良好效果。

## 3 超声微泡介导基因转染的影响因素

优化超声设备参数(声压强度、频率、持续时间和波长等)和微泡的相关特性参数(大小、气体种类、膜材料、界面张力和转染方式等)是提高基因转染效率和临床应用基因治疗的必要条件。超声设备参数对基因转染效率影响尤为重要,常用的治疗频率介于 1.0~2.0 MHz 之间。固定超声频率后,有效的基因转染依赖于微泡破坏的空化阈,对微泡空化阈值起重要作用。Meijering 等<sup>[14]</sup>发现,超声频率、强度和培养基的类型及更换时间对基因转染效率有很大影响,取最佳条件可使细胞转染数目增加超过 3 倍。陈智毅等<sup>[15]</sup>发现,予以 30  $\mu\text{g}$ /孔质粒浓度、20% DC、超声强度 1.0 W/cm<sup>2</sup>、辐照时间

3 min 时,质粒完整性不受影响,基因转染和细胞活力最优。Rahim 等<sup>[16]</sup>在体外实验中得出超声优化参数为频率 1.0 MHz,声压幅度 0.25 MPa,脉冲重复频率 1 kHz,超声暴露时间为 10 s。近来研究者<sup>[17]</sup>通过对质粒结构的修饰来提高基因转染的效率,提出微型环状 DNA(minicircle DNA, 是一种双链 DNA,包括启动子、目的基因、多腺苷酸信号,但无细菌源性序列)在体内比常规质粒扩散性更好,免疫原性低,超声联合微型环状 DNA 载血管内皮细胞生长因子胞内使转染效率提高 2.5 倍;但价格昂贵和制备技术困难使其规模应用受限。

## 4 携基因靶向微泡在卵巢癌治疗中的研究进展

Bao 等<sup>[18]</sup>首次运用超声微泡介导的基因转染技术,在中国仓鼠卵巢细胞中检测到硫氰酸荧光素葡聚糖的摄取和荧光素酶的表达,超声频率为 2.25 MHz 和 10% 空气白蛋白微泡(albunex),开启了超声微泡用于基因或药物治疗的大门。

4.1 自杀基因疗法具有“旁观者效应”,是晚期卵巢癌较有希望的治疗策略之一。将一些病毒或细菌基因组中的前药转换酶基因导入肿瘤细胞,该基因编码特殊的酶将原本对哺乳动物细胞无毒或低毒的前药在肿瘤细胞中代谢为毒性产物,从而杀死肿瘤细胞。朱元方等<sup>[19]</sup>构建了一个含有人端粒酶逆转录酶(hTERT)启动子和融合型自杀基因 Fcy : : Fur 的重组真核表达质粒 pGL3-hTERT-Fcy : : Fur,以超声微泡作为载体,体外实验证实对卵巢癌细胞株起到特异的靶向杀伤作用。

4.2 早期卵巢癌 p53 基因突变率高达 60%~80%。p53 基因是最重要的抑癌基因之一。对癌前病变的 DNA 损伤,可直接或间接调控其他途径来修复 DNA,防止恶变。作为 p53 载体,腺病毒用于动物卵巢癌基因治疗已经得到广泛认可,目前正向临床应用转换。研究<sup>[20]</sup>发现,将造影剂微泡与野生型 p53 基因混合物注入荷瘤大鼠的卵巢癌瘤体内,并用超声辐照腹部瘤区,p53 转染效率及蛋白表达明显增强。PTEN 是新近发现的一种抑癌基因,通过不同的途径调节细胞的生长、分化、转移及浸润,对妇科肿瘤的早期诊断和基因治疗有重要意义。有报道<sup>[21]</sup>称 PTEN 基因可以通过超声介导造影剂增效基因转染,抑制肿瘤细胞侵袭力,可望成为临床基因治疗的新手段;但也有学者<sup>[22]</sup>认为卵巢上皮性癌中不存在 PTEN 基因的突变或突变比例很低,在卵巢上皮性癌的发生发展中无重要作用。

4.3 RNAi 技术包括两种类型。其一利用同源双链小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)诱导特异性基因表达抑制,主要发生于转录后基因水平,是高效特异的基因抑制技术。Vandenbrouck 等<sup>[23]</sup>发现,装 PEG-siRNA/脂质体微泡在超声辐照作用下基因沉默效应强于游离的 PEG-Plexes。Meijering 等<sup>[24]</sup>比较 siRNA 与质粒 DNA 转染效率,发现运用 siRNA 转染的蛋白表达水平较质粒 DNA 组高,提示超声联合微泡转导 siRNA 将成为更有价值的体内外基因疗法。另一技术为短夹 RNA 质粒(shRNA),表达载体可以用于体内转录,使基因表达减少维持数周或数月,有利于长周期研究,为基因功能分析和抗癌疗法提供便利。Ling 等<sup>[25]</sup>在体外

实验中选用 survivin 为癌基因靶标,以优化的超声靶向微泡破坏技术将 shRNA 导入癌细胞,通过基因沉默抑制 survivin 在细胞中表达,诱导细胞的凋亡。

4.4 通过抗血管新生阻断癌细胞的血供,整合素家族,尤其整合素  $\alpha v\beta 3$  在血管新生过程中的细胞黏附、转移、信号转导中起重要作用。将与整合素有高亲和力的单克隆抗体和 RGD 肽段通过生物素-亲和素系连于微泡表面,经超声辐照和微泡破坏,实现靶向显影效果明显增强<sup>[13]</sup>。Mulgrew 等<sup>[26]</sup>发现,与整合素有较强亲和力的单克隆抗体功能块(如 LM609)到达靶组织后不但能抗血管新生作用,且直接影响肿瘤细胞生长,同时抑制破骨细胞黏附,损伤细胞的再吸收作用,可在一定程度上抑制肿瘤骨转移。联合超声微泡破坏与抗血管技术结合,靶向定位,有望进一步应用于卵巢癌的基因治疗。

## 5 问题与展望

UTMD 技术对基因转染和药物传输应用呈现良好前景,将为卵巢癌的基因治疗带来更新、更有效的方法。目前卵巢癌基因治疗面临的主要挑战是:①安全性:UTMD 尽管转染率不及病毒载体,但安全、无创,且可实现可控性;②靶向性:通过微泡修饰、连接配体、超声局部辐照等,能够实现靶向特异转染,尤其是普通载体不能达到的深部器官基因转染;③有效性:UTMD 转染效率较低,需要进一步解决,新近出现的阳离子脂质体或共聚物能有效络合质粒 DNA,辅以超声辐照和微泡作用时能显著提高基因转染率;而微型环状 DNA 的出现为攻克这一难题带来新希望。筛选并优化卵巢癌目的基因,实现基因在体内高效、稳定、可调控地表达。将卵巢癌的基因治疗更新,更有效的方法。

## [参考文献]

[1] Bekerdejian R, Chen S, Frenkel PA, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart. *Circulation*, 2003, 108(8): 1022-1026.

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

[3] Forbes MM, Steinberg RL, O'Brien WD Jr. Examination of inertial cavitation of Optison in producing sonoporation of chinese hamster ovary cells. *Ultrasound Med Biol*, 2008, 34(12):2009-2018.

[4] Stratmeyer ME, Greenleaf JF, Dalecki D, et al. Fetal ultrasound: mechanical effects. *J Ultrasound Med*, 2008, 27(4):597-605.

[5] Schlicher RK, Radhakrishna H, Tolentino TP, et al. Mechanism of intracellular delivery by acoustic cavitation. *Ultrasound Med Biol*, 2006, 32(6):915-924.

[6] Meijering BD, Juffermans LJ, van Wamel A, et al. Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation. *Circ Res*, 2009, 104(5):679-687.

[7] 景香香, 王志刚. 超声造影剂靶向性作用机制的研究进展. *临床超声医学杂志*, 2003, 5(6):359-360.

[8] 贺娟, 孙江川, 常淑芳, 等. 人卵巢癌靶向超声造影剂的制备及其体

外寻靶能力观察. *中国医学影像技术*, 2009, 25(6):929-932.

[9] 伍星, 王志刚, 李攀, 等. 叶酸靶向超声造影剂的制备及体外寻靶实验研究. *中国超声医学杂志*, 2009, 25(3):217-219.

[10] Kim DH, Klibanov AL, Needham D. The influence of tiered layers of surface grafted poly (ethylene glycol) on receptor-ligand-mediated adhesion between phospholipid monolayer-stabilized microbubbles and coated glass beads. *Langmuir*, 2000, 16(6):2808-2817.

[11] Klibanov AL. Preparation of targeted microbubbles: ultrasound contrast agents for molecular imaging. *Med Biol Eng Comput Technologies*, 2009, 47(8):875-882.

[12] 杨钰楠, 高云华, 谭开彬, 等. 携 RGDS 超声造影剂的制备及鉴定. *中国医学影像技术*, 2005, 21(11):1677-1679.

[13] Leong-Poi H, Christiansen J, Klibanov AL, et al. Noninvasive assessment of angiogenesis by ultrasound and microbubbles targeted to  $\alpha(v)$ -integrins. *Circulation*, 2003, 107:455-460.

[14] Meijering BD, Henning RH, Van Gilst WH, et al. Optimization of ultrasound and microbubbles targeted gene delivery to cultured primary endothelial cells. *J Drug Target*, 2007, 15(10):664-667.

[15] 陈智毅, 谢明星, 王新房, 等. 脂质体微泡对超声介导基因转染的增效作用研究. *中华超声影像学杂志*, 2009, 18(1):62-66.

[16] Rahim AA, Taylor SL, Bush NL, et al. Spatial and acoustic pressure dependence of microbubble mediated gene delivery targeted using focused ultrasound. *J Gene Med*, 2006, 8(11):1347-1357.

[17] Yoon CS, Jung HS, Kwon MJ, et al. Sonoporation of the minicircle-VEGF (165) for wound healing of diabetic mice. *Pharm Res*, 2009, 26(4):794-801.

[18] Bao S, Thrall BD, Miller DL. Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound Med Biol*, 1997, 23(6):953-959.

[19] 朱元方, 李攀, 康楷, 等. 含 hTERT 启动子和 Fcy::Fur 基因重组质粒的构建及其对卵巢癌细胞的体外杀伤作用. *第三军医大学学报*, 2009, 31(4):297-300.

[20] 彭幼玲, 郭爱林, 肖敏, 等. 超声造影剂促进野生型 p53 基因转染抑制大鼠卵巢癌生长的实验研究. *中华超声影像学杂志*, 2006, 15(1):61-64.

[21] 王斌, 傅艺兵, 李晓翠, 等. 超声造影剂介导 PTEN 基因影响卵巢癌侵袭的实验研究. *中华超声影像学杂志*, 2006, 15(1):58-60.

[22] Kurose K, Zhou XP, Araki T, et al. Frequent loss of PTEN expression is linked to elevated phosphorylated Akt levels, but not associated with p27 and cyclin D1 expression, in primary epithelial ovarian carcinoma. *Am J Pathol*, 2001, 158(9):2097-2106.

[23] Vandenbroucke RE, Lentacker I, Demeester J, et al. Ultrasound assisted siRNA delivery using PEG-SIPLEX loaded microbubble. *J Control Release*, 2008, 126(3):265-273.

[24] Meijering BDM, Henning RH, Deelman LE. Ultrasound and microbubble mediated gene therapy: effectiveness of siRNA virus plasmid DNA delivery. Submitted 2008.

[25] Ling X, Li F. Silencing of antiapoptotic survivin gene by multiple approaches of RNA interference technology. *Biotechniques*, 2004, 36(3):450-460.

[26] Mulgrew K, Kinneer K, Yao XT, et al. Direct targeting of  $\alpha v\beta 3$  integrin on tumor cells with a monoclonal antibody, Abegrin. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(12):3122-3129.