

文章编号 1006-8147(2018)02-0177-03

综述

## 超声微泡造影在前列腺癌诊治中的研究进展

高宏伟 综述,刘春雨,牛远杰 审校

(天津医科大学第二医院尿石症治疗中心,天津市泌尿外科研究所,天津 300211)

**摘要** 前列腺癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一,随着人们生活方式的改变、人口老龄化加剧、自然环境改变等影响,近期我国前列腺癌发病率不断攀升,所以,有关这种病的前期诊疗越来越受到人们的重视,且对于前列腺癌的预后有着更为重要的意义。超声造影技术的出现,不仅可以提高肿瘤组织在超声显影的清晰度,提高了超声诊断的精准度,随着这项技术的研究与发展,超声造影技术在疾病的治疗中的作用也受到人们的重视。靶向微泡及超声微泡破坏技术的出现,对提高基因的转染效率和化疗药物的载递都起到了重要作用,为肿瘤的治疗提供了一个新手段。

**关键词** 前列腺癌;超声;微泡;诊断;治疗

**中图分类号** R737.25

**文献标志码** A

作为目前对老年男性公民造成巨大伤害的常见病症,前列腺癌已经被人们所认知,它在欧美国家中高发,但近几年,前列腺癌在我国的发病率每年都在不断攀升。目前,关于前列腺癌的影像诊断有超声诊断、CT、核磁共振(MRI)等技术手段。超声造影的出现带来了超声医学的第三次革命,它是利用与人体组织回声明显不同的特点,将声阻抗差异显著的物质注入血管内,增强对组织脏器或病变部位的显示以及血流灌注信息。超声造影技术使超声的无创性观察活体组织器官的微循环灌注成为可能,使超声进入到从形态学成像过渡到功能性成像的发展阶段<sup>[1]</sup>。用微泡对比造影剂能够显示出前列腺内相关的微血管影,利用侦测前列腺癌内部微血管密度升高的变化,进行前列腺癌的诊断<sup>[2]</sup>。超声微泡是一种微小的球形气泡(一般为微米级),其构成的核心部分为不同种类的气体,其外壳由白蛋白、脂类、表面活性剂或可生物降解的高分子材料等不同成分构成。超声微泡造影剂的发展主要经历了3个阶段:第1阶段的微泡造影剂用在心脏分流中的诊断,但是其体积较大不能顺利通过毛细血管且稳定性较差;第2阶段的微泡在造影剂第一阶段的基础上缩小了体积、改善了微泡的稳定性,但仍然沿用着不稳定的气体作为核心成分;第3个阶段有了比较大的变化,它采用惰性气体制备微泡,使其稳定性有了进一步提高,在血液中的半衰期得到了进一步延长<sup>[3]</sup>。

### 1 超声微泡分类

1.1 依照微泡核心部位包裹气体类别的不同,超声微泡造影剂可以简单分成两代。

1.1.1 第一代内部核心包裹的是最为普通的空气,而包膜材料则通常由白蛋白或半乳糖等组成。但包膜的弹性比较差,稳定性不高,在血液中能够维持的时间并不长,而且非常容易裂开,所以在临床应用方面,需要更精准的观测,以便达到最佳效果。其中,最具代表性的第一代造影剂有 Albunex、Echo-vist(SHU-454)和 Levovist(SHU-508A)。

1.1.2 第二代超声微泡造影剂包裹包含了高分子量气体,比

如:六氟化硫、全氟丙烷等,微泡的直径一般在 2~5  $\mu\text{m}$  范围,而且包膜的材料变成了脂质体。这一代的微泡造影剂具有稳定时间长,振动及回波特性好,显像稳定及清晰的特点。具有代表性的品种有 Aerosomes (DMP-115)、EchoGen、Sonovist (SHU-563A)等。

1.2 根据包裹核心气体的外部材料不同又可以将微泡超声造影剂分为4类。

1.2.1 白蛋白类 这种造影剂的包膜由蛋白质构成,是由 Feinstein 等<sup>[4]</sup>采用超声声振的方法制得。其中人血清白蛋白在超声造影剂的应用和研究最为常见。蛋白类物质在超声辐照的作用下,可以形成具有一定机械强度的薄膜。主要原因是蛋白质分子里两类化学基团(羧基与氨基)合成了氢键,这大大加强了分子之间相互的作用力。所以,气泡包膜的强度通常比较高,而且,在制作白蛋白微泡造影剂时加入一些蔗糖能够有效提升它的平稳性。杜永峰等<sup>[5]</sup>在蛋白质内加入不同浓度的蔗糖,采用超声空化方法制备白蛋白超声造影剂,研究表明在一定范围内蔗糖浓度的增加会提高微泡的稳定性和耐热性,并且不影响微泡的粒径分布。这类微泡造影剂代表有 Albunex 和 Optison,如果把它们当作微泡薄膜制成材料,具备着无害、容易制作等若干优势,然而,其缺陷有:不太稳定、性价比不高、在某些人体中很容易诱发免疫反应。

1.2.2 表面活性剂类 表面活性剂类微泡造影剂有非离子型表面活性剂和离子型表面活性剂,我们一般使用的是前者,这是因为表层活性剂类物质会减少溶液表层张力,很容易制造出微泡,会减少制备造影剂难度。气泡形成过程中,表面活性剂的疏水端和亲水端将分别面对气体与液体。还有,其膜层通常拥有受创后自愈能力。当前被普遍运用到超声造影剂成膜材料的表面活性剂,其属于非离子表面活性剂,我们平时最为常见的是 Tween 与 Span 系列,例如把它们当作原料制作出来的 ST44 与 ST68 系列微泡超声造影剂。

1.2.3 脂类大分子 脂质是常用的包覆材料,因为脂质可以分散在微泡的表面,形成一层致密的外壳,能够有效阻止微泡内部气体逸出,同时它具有乳化剂的特点,能够依附在微泡表面可形成界面膜,降低其表面张力。一般它具备以下形式<sup>[6]</sup>:其一是由脂质分子形成的单分子包膜气泡;其二是具有

**基金项目** 天津市自然科学基金重点项目基金资助(15JCZDJC35400)

**作者简介** 高宏伟(1980-),男,主治医师,硕士,研究方向:泌尿系超声、超声造影,泌尿系结石的治疗;通信作者:牛远杰,E-mail:371030940@qq.com。

双亲性的脂质体形成的双分子层构造包膜气泡。脂类包膜造影剂通常较为稳定,其粒径通常很小,在若干微米左右,它本身能够存留的时间比较长。此外它还具备主动靶向的特点,能够聚焦于特定部位,做到靶向超声诊疗。不过它也有个别缺陷,比如加强显影时间不长、成本费用不低等等。

1.2.4 可生物降解的高分子材料 常见有乳酸羟基乙酸共聚物(PLGA)、多聚糖、聚乙二醇(PEG)、海藻酸盐等。这种材料制得的多聚体微泡超声造影剂大小分布均一性好,体外储存时间较长。外壳较白蛋白、表面活性剂和脂类硬,因此其抗压性和体内稳定性都有显著提高。Basude<sup>[7]</sup>利用对聚合原料类别与条件作出改变,能够获得声学性能可控的微泡,这也是最近国内外关于微泡超声造影剂的研究重点,其代表产品有 BP127 和 AI-700。

## 2 超声微泡在肿瘤治疗中的机制

在较高的声压条件下,通常声压大于 0.6 MPa,伴有微泡瞬间剧烈的爆破,产生瞬态空化,瞬间产生剧烈的能量,伴随着瞬间的高温高压,从而导致周围血管内皮的损伤,进而在小血管中诱导血栓形成,阻断肿瘤组织的血供<sup>[8]</sup>,超声辐照治疗后,可以明显上调与肿瘤细胞增殖、凋亡相关的基因表达,从而促进肿瘤细胞的凋亡<sup>[9]</sup>。这是超声微泡造影对肿瘤的直接作用。

超声临床医学一直研究探索的热点问题就是利用微泡超声空化作用提升基因转染效率和靶向药物释放<sup>[10-11]</sup>,进而达到控制、削弱肿瘤组织生长,甚至达到将其消灭的目的。肿瘤组织里存在着许多表达的血管内皮生长因子以及血管内皮细胞酪氨酸激酶受体,这些不单单是化疗药物与肿瘤滋养血管栓塞治疗的靶向位点,还能够被当作靶向微泡的作用位点。经过对靶向微泡造影剂携带转染基因或化疗药物作出特殊的设计,可将其径直作用于肿瘤组织,从而实现肿瘤治愈的目的。而超声微泡造影剂本身就是一类较好的基因载体,与一般病毒载体比较,其具有较大的体积,能够携带寡反义核苷酸、DNA 片段、甚至整个染色体<sup>[12]</sup>。所以,在微泡上面连接附有肿瘤特异性靶向配体或者是以抗体构造超声靶向微泡,让微泡能够和靶组织或器官之间有着更为密切的结合,就能够再次提升基因转染效率<sup>[13]</sup>。Shapiro 等<sup>[14]</sup>用 1.4 MHz、200 kPa、100 周期脉冲长度和 540 Hz 脉冲频率处理注射过 50  $\mu$ g 荧光素酶质粒 DNA 的小鼠,治疗后 4 d,与单独注射 DNA 组和 DNA 联合微泡注射组相比,小鼠的生物发光信号能高出 100 倍,且没有组织损伤或脱靶递送的现象。分析超声微泡有助于促进基因转染,主要存在两种机制:首先,诱导胞吞作用引起的细胞膜偏转,第二,微泡喷射诱导细胞膜中的孔的形成。目前有很多研究证明,采取对超声照射和微泡进行联合利用的方式,能够让基因转染率得到显著提升,并有可能为进一步临床治疗提供一种新的更加有效的方法<sup>[15-17]</sup>。

## 3 超声微泡造影在前列腺癌诊断中的作用

前列腺癌主要发生于前列腺组织的外周带,早期前列腺癌病灶小且多发、分布散,极少看到大量坏死和出血,用直肠超声检查图像及 Doppler 检查,其具体特征是前列腺外腺中不规则低回声区,不容易跟增生结节区别,而且前列腺腺体内血管非常细小,微血管直径仅有 11~51  $\mu$ m,经直肠前列腺超声检查作为早期筛选的手段之一,虽然比经腹超声检查具有更高的分辨率,但是由于早期肿瘤病灶不明显、内外腺回声

本身具有差异和部分前列腺癌回声表现为等回声等特点,在灵敏度和特异性方面,对早期前列腺癌的诊断还是欠缺的。

利用超声微泡造影技术使得超声的无创性观察活体组织器官微循环灌注成为可能,也使得超声从形态学成像过渡到功能性成像的阶段。超声造影可以显著提高前列腺血管成像的分辨率。前列腺靶向穿刺活检不仅有利于 PSA 升高的病人前列腺癌的检出,而且还可以提高对那些常规穿刺活检阴性结果中 PSA 持续升高的病人前列腺癌的检出率。Uemura 等<sup>[18]</sup>通过对 71 例接受前列腺活检的患者静脉注射全氟丁烷微泡造影剂,对得到的造影图像进行评估和分析,得出结论,经直肠超声造影靶向前列腺穿刺活检可以提高前列腺癌的检出率,能够进行更少数量的活组织检查和更准确的前列腺癌的诊断。超声微泡造影在前列腺癌的检测和调高前列腺穿刺活检准确度方面起到重要作用。

然而,靶向超声造影剂的应用使前列腺癌的超声显像得到进一步的准确与清晰。靶向超声微泡借助微泡表层特有的生物学特征,或者经过对微泡表面作出特别加工构造而成。通过静脉注射可以让这些微泡靶向性汇集在一起,然后长时间停留在靶组织或靶器官里面。特异性靶向超声微泡表层携带能够辨识靶分子水平的分子探针,它可以跟组织器官上的靶分子特异结合,进一步让器官在超声影像里面,其特异性能够加强,或是起到部分靶向治疗功效<sup>[19]</sup>。

前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 位于前列腺细胞膜上,是一种 II 型跨膜糖蛋白,在前列腺癌细胞膜上高表达,PSMA 在前列腺癌细胞膜上特异性表达,是前列腺癌尤其是转移性癌及激素难治性前列腺癌高度相关的生物学标志和诊治靶点。PSMA 包括 750 个氨基酸序列,具有较大的胞外区(44~750 氨基酸),能提供多个与其他物质结合的位点。当前已针对 PSMA 制备了多种能够与 PSMA 相结合的物质,包括肽段、小分子化合物及适体等。研究表明,以 PSMA 抗体为靶向的纳米超声微泡,能穿过肿瘤血管进入组织间隙、与前列腺癌细胞特异性靶向互相结合,能够做到前列腺癌组织特异性显像,从而给前列腺癌前期诊疗与靶向治疗打好根基<sup>[20]</sup>。Fan<sup>[21-22]</sup>通过生物素-链霉亲和素系统构建的携带抗 PSMA“靶向”纳米微泡,对 3 种细胞(LNCaP, C4-2 和 MKN45)构建的肿瘤模型进行超声成像检查,对比指标的评估,结果显示,靶向纳米气泡显示与空白纳米气泡相比,具有显著差异。他们并制备了携带抗 PSMA A10-3.2 适体的靶向纳米微泡,通过实验证实了在前列腺癌超声检查中,就有靶向成像的作用。

## 4 超声微泡造影在前列腺癌治疗中的研究

近年来,医学界对于超声微泡造影的研究继续加深,很多人认为超声微泡造影剂不单单是一类性能优越的超声显像对比剂,它还是一类关键的药物运输载体<sup>[23]</sup>。目前研究的超声微泡造影剂直径为 1~8  $\mu$ m,它能在血管腔中保持相对稳定并可顺利通过肺循环<sup>[24]</sup>,实现全身器官组织、尤其是血管较丰富的组织区域,如心脏、富血管的肿瘤等组织的显像,并提高显影的清晰度<sup>[25]</sup>,但若作为一种药物递送载体,这种造影剂缺乏特异性,且与病变的组织不能特异性结合。但是,靶向超声造影剂能够做到把特异性抗体或配体接连至微泡造影剂表面,并依托抗原-抗体或配体-受体之间的特异性结合,经由血液循环累积到特异的靶器官或靶组织,最终让器



官或组织在超声显影中其特性能得到强化。微泡携带药物或基因的方式也有多种:(1)将药物或基因直接粘附于壳膜表面;(2)将药物或基因以非共价形式结合到壳膜表面;(3)将药物或基因插入壳膜中;(4)将药物或基因包裹在脂质双分子层的内外层之间;(5)将药物或基因包裹入微泡内部<sup>[20]</sup>。

目前,对超声微泡造影在前列腺癌治疗中的作用的研究尚处于试验阶段。Eggen 等<sup>[27]</sup>对超声微泡造影技术研究表明在前列腺转移癌中的药物的传递、释放和微观分布都有明显的增强。Fan 等<sup>[28]</sup>将带有前列腺癌的小鼠分成 DOX 组、DOX + NB 组、DOX + US 组、DOX + NB + US 组,结果显示,与其他组相比,DOX + NB + US 组中可以看见更多的通过超声靶向微泡破坏,可以明显增强前列腺癌小鼠中硝酸镧颗粒进入实质细胞。证实了超声靶向微泡破坏技术是促进药物在超声辐射部位发挥作用的有效办法,分析其潜在的机制可能与空化效应有关。Wang 等<sup>[29]</sup>研究表明,通过低频低能超声照射携带米托蒽醌(MIT)的微泡,增加了肿瘤细胞尤其是药物抵抗细胞对化疗药的摄取,从而提高 MIT 对前列腺癌 DU145 细胞疗效,并能够减少 MIT 的副作用。Wei 等<sup>[30]</sup>研究发现,超声微泡参与了细胞外基质的降解,抑制了 MMP-2 和 MMP9 的活力,这对癌细胞的侵袭和迁移起着重要的作用。可能与超声微泡通过下调 PC3 中的 MMP2, MMP9 表达有关,从而起到抑制癌细胞的侵袭和转移。通过超声微泡造影技术,纳米微泡携带的药物或特异性抗体能够靶向进入前列腺癌组织中,从而发挥更有效的抗肿瘤作用,同时,减少了药物全身毒性作用,是一种很有发展前景的技术手段。

#### 参考文献:

- [1] Wilson S R, Burns P N. Microbubble-enhanced US in body imaging: what role[J]. *Radiology*, 2010,257(1):24
- [2] Smeenge M, Mischl M, Laguna P, et al. Novel contrast-enhanced ultrasound imaging in prostate cancer[J]. *World J Urol*, 2011,29(5):581
- [3] Pitt W G, Hussein G A, Staples B J. Ultrasonic drug delivery—a general review[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2004,1(1):37
- [4] Feinstein S B, Ten C, Zwehl W, et al. Two-dimensional contrast echocardiography in vitro development and quantitative analysis of echo contrast agents[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1984,3(1):14
- [5] 杜永峰,万明习,赵文明. 含蔗糖白蛋白包膜微泡超声造影剂制备研究[J]. *药学报*, 2001,36(11):859
- [6] Bauer A, Solbiati L, Weissman N. Ultrasound imaging with SonoVue: low mechanical index real-time imaging[J]. *Acad Radiol*, 2002,9 (Suppl 2):S282
- [7] Basude R, Duckworth J W, Wheatley M A. Influence of environmental conditions on a new surfactant-based contrast agent: ST68[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2000,26(4):621
- [8] Shi W T, Forsberg F, Vaidyanathan P, et al. The influence of acoustic transmit parameters on the destruction of contrast microbubbles in vitro[J]. *Phys Med Biol*, 2006,51(16):4031
- [9] Tabuchi Y, Takasaki I, Zhao Q L, et al. Genetic networks responsive to low-intensity pulsed ultrasound in human lymphoma U937 cells[J]. *Cancer Lett*, 2008,270(2):286
- [10] Cochran M C, Eisenbrey J, Ouma R O, et al. Doxorubicin and paclitaxel loaded microbubbles for ultrasound triggered drug delivery[J]. *Int J Pharm*, 2011,414(1/2): 161
- [11] Stride E P, Coussios C C. Cavitation and contrast: the use of bubbles in ultrasound imaging and therapy[J]. *Proc Inst Mech Eng H*, 2010, 224(2): 171
- [12] Li X H, Zhou P, Wang L H, et al. The targeted gene (KDRP-CD/TK) therapy of breast cancer mediated by SonoVue and ultrasound irradiation in vitro[J]. *Ultrasonics*, 2012,52(1):186
- [13] Phillips L C, Klibanov A L, Wamhoff B R, et al. Targeted gene transfection from microbubbles into vascular smooth muscle cells using focused, ultrasound-mediated delivery[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2010, 36(9):1470
- [14] Shapiro G, Wong A W, Bez M, et al. Multiparameter evaluation of in vivo gene delivery using ultrasound-guided, microbubble-enhanced sonoporation[J]. *J Control Release*, 2016,223(223):157
- [15] 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(65):304
- [16] Jing H, Cheng W, Li S, et al. Novel cell-penetrating peptide-loaded nanobubbles synergized with ultrasound irradiation enhance EGFR siRNA delivery for triple negative breast cancer therapy[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016,146(146):387
- [17] Schlegel P, Huditz R, Meinhardt E, et al. Locally targeted cardiac gene delivery by AAV microbubble destruction in a large animal model[J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2016,27(2):71
- [18] Uemura H, Sano F, Nomiya A, et al. Usefulness of perflubutane microbubble-enhanced ultrasound in imaging and detection of prostate cancer: phase II multicenter clinical trial[J]. *World J Urol*, 2013, 31(5):1123
- [19] Klibanov A L. Microbubble contrast agents: targeted ultrasound imaging and ultrasound-assisted drug-delivery applications [J]. *Invest Radiol*, 2006,41(3):354
- [20] Wang L, Li L, Guo Y, et al. Construction and in vitro/in vivo targeting of PSMA-targeted nanoscale microbubbles in prostate cancer[J]. *Prostate*, 2013,73(11):1147
- [21] Fan X, Wang L, Guo Y, et al. Ultrasonic nanobubbles carrying Anti-PSMA nanobody: construction and application in prostate cancer—Targeted imaging[J]. *PLoS One*, 2015,10(6):e0127419
- [22] Fan X, Guo Y, Wang L, et al. Diagnosis of prostate cancer using anti-PSMA aptamer A10-3.2-oriented lipid nanobubbles[J]. *Int J Nanomedicine*, 2016,11:3939
- [23] Tinkov S, Bekeredjian R, Winter G, et al. Microbubbles as ultrasound triggered drug carriers[J]. *J Pharm Sci*, 2009,98(6):1935
- [24] Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, et al. Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound[J]. *Circulation*, 2002,105(10):1233
- [25] Ter Haar G R. Ultrasonic contrast agents: safety considerations reviewed[J]. *Eur J Radiol*, 2002,41(3):217
- [26] Kang S T, Yeh C K. Ultrasonic microbubble contrast agents for diagnostic and therapeutic applications: current status and future design[J]. *Chang Gung Med J*, 2012,35(2):125
- [27] Eggen S, Fagerland S M, Mørch Y, et al. Ultrasound-enhanced drug delivery in prostate cancer xenografts by nanoparticles stabilizing microbubbles[J]. *J Control Release*, 2014,187:39
- [28] Fan X, Wang L, Guo Y, et al. Inhibition of prostate cancer growth using doxorubicin assisted by ultrasound-targeted nanobubble destruction[J]. *Int J Nanomedicine*, 2016,11:3585
- [29] Wang Y, Bai W K, Shen E, et al. Sonoporation by low-frequency and low-power ultrasound enhances chemotherapeutic efficacy in prostate cancer cells in vitro[J]. *Oncol Lett*, 2013,6(2):495
- [30] Wei C, Bai W K, Wang Y, et al. Combined treatment of PC-3 cells with ultrasound and microbubbles suppresses invasion and migration[J]. *Oncol Lett*, 2014,8(3):1372