

Application of ultrasound contrast agent in diagnosis and treatment of diseases

WANG Zhi-gang *

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

[Abstract] The effects of ultrasound contrast agent in diagnosis and treatment of diseases have made gradual improvement. Ultrasound contrast agent may be used in myocardium contrast echocardiography (MCE) and diagnosis of other diseases, and the targeted ultrasound contrast agent to tissue, thrombus and tumor has been widely used in diagnosis of these diseases. Present study shows that ultrasound contrast agent which may be effective carrier of drug and gene have great potential in treatment. The treatment of tumor with microbubble destruction by low-power ultrasound can make great breakthrough.

[Key words] Ultrasound contrast agents, microbubbles; Ultrasonography; Treatment

超声微泡造影剂在疾病诊断与治疗中的研究进展

王志刚 *

(重庆医科大学超声影像学研究所,重庆 400010)

[摘要] 超声微泡造影剂在疾病诊断与治疗中的作用日渐明显。超声微泡造影剂可用于对心脏、肝脏、肿瘤等的声学造影诊断,具有靶向性的超声微泡造影剂对组织、血栓及肿瘤的靶向显影应用前景广阔。目前的研究表明,超声微泡造影剂在治疗中也显示出巨大潜力,可作为一种有效的基因或药物运载工具。而低功率超声辐射微泡治疗肿瘤研究亦有望取得突破性进展。

[关键词] 超声造影剂,微泡; 超声检查; 治疗

[中图分类号] R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2005)08-1148-03

随着超声影像新技术的不断发展和超声造影剂制备技术的不断改进,超声造影剂在疾病诊断和治疗中的作用日趋重要。本文就这一领域的研究进展做一述评。

1 超声微泡造影剂研究进展

近几年,超声造影剂的研制取得很大进展,主要表现在超声微泡造影剂的直径减小($<8\mu\text{m}$),使其能经外周静脉注射后通过肺循环最终到达靶器官或靶组织,实现组织回声增强;超声微泡造影剂的稳定性不断提高,可观察到造影剂在感兴趣区组织中的显影情况。各种类型的超声微泡造影剂相继出现,如白蛋白、脂质、表面活性剂类^[1-3]及具有广阔前景的高分子材料类造影剂(羟基乙酸超声微泡造影剂)^[4]。

新近,又研究出靶向液态氟碳造影剂。此造影剂不同于具有先天性反射和背向散射特征的超声微泡造影剂,只有聚

集在组织细胞表面时才具有较强的反射和背向散射性能,可明显增强其对比信号。此微泡直径可小于 100 nm,可以穿过血管内皮细胞间隙,在体内的循环半衰期长,其聚集时半衰期可延长至数天。可用作超声、CT、MRI 造影剂,连接放射性物质还可作为核医学造影剂。

2 超声微泡造影剂在诊断中的研究与应用

超声微泡造影剂已广泛用于心肌声学造影、急性局灶性炎症、血栓、肿瘤的诊断及部分良、恶性肿瘤的鉴别诊断。靶向超声微泡造影剂近来发展迅速,将特异性配体连接到微泡造影剂表面,通过血液循环使之到达感兴趣的组织或器官,选择性地与相应受体结合,从而达到特异性增强靶区超声信号的目的。目前对靶向超声造影剂的显像研究主要集中于以下几方面。

2.1 炎症显像 Lindner 等^[5]体外和体内实验研究发现,微泡与激活的中性粒细胞和单核细胞黏附后,被吞噬入细胞内,且保持其声学特性不变。因此,当血液循环中的自由微泡被清除后,细胞内的微泡同样可被超声探及,可以用来发现炎症发生的部位。此后,他们又将磷脂酰丝氨酸结合于脂质微泡壳上,发现可以增强补体的活化,提高了微泡与激活的白细胞的结合程度。

[基金项目] 本课题受国家自然科学基金重点(30430230)、面上(30370402)及重庆市重点科技攻关(渝科发[2002]28号)项目资助。

[作者简介] 王志刚(1945—),男,重庆市人,教授,博士生导师。

[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] 2005-07-06 **[修回日期]** 2005-07-25

2.2 血栓显像 Unger 等^[6]报道 MRX 408 脂质微泡可结合特异性寡肽,与活化血小板的 GP II b/III a 受体具有强的亲和力。显微镜下观察发现,实验微泡可特异性地结合到血凝块上,并且这些微泡不仅被血栓周边或表面摄取,而且吸收到血栓块的深部。该研究者认为,相对于陈旧性血栓,新鲜血栓有更多的表达 GP II b/III a 受体的血小板,可黏附更多的微泡,因此,MRX 408 可有助于新鲜与陈旧性血栓的鉴别。

2.3 肿瘤显像 Lindner 等^[7]研究发现,靶向超声微泡造影剂能够用于对肿瘤新生血管的评估。他们通过静脉注入表面偶联单克隆抗体或 echistatin 分子(一种可与表达在新生血管内皮细胞特定分子结合的解离素)的脂质体超声微泡,然后通过活体显微镜发现,echistatin 和单抗包被的脂质体微泡紧密黏附在微血管内皮上。在此基础上,他们通过给大鼠皮下注射由肿瘤分泌物的胶状物质(implanting matrigel),造模 10 天后,注入靶向超声微泡造影剂,发现微泡量与新生血管数密切相关。认为,靶向超声微泡造影剂可用于肿瘤血管和组织的显影。

3 超声微泡造影剂在疾病治疗中的研究

3.1 携带基因治疗 随着人类基因组计划的完成,许多疾病都与基因异常有关,许多难治性疾病也期望通过基因治疗而得到根本解决。但目前基因治疗还存在一些问题,如缺乏安全、有效、有组织特异性和靶向性的基因转载系统,缺乏稳定的表达和转录后的宿主反应等。目前基因导入的方式多为将目的基因直接注射于靶组织,在某些疾病,如心血管疾病多采用心肌内直接注射或心导管注入质粒 DNA 或腺病毒载体,但其有创性和转染效率低等局限制了其临床应用。

新近研究发现,超声微泡造影剂为基因治疗提供了一种安全、高效的新型载体。其基本原理为:声场内的超声波破坏微泡造影剂后,其产生的空化和机械效应可使细胞膜通透性增加,致直径 $\leq 7 \mu\text{m}$ 的微血管破裂、内皮细胞间隙增宽。靶基因可通过破裂的微血管和内皮细胞间隙到达组织细胞内。同时,利用超声波在特定时间和空间内击碎靶组织内微泡,可提高治疗的靶向性。国外的研究表明:超声波破坏微泡可使基因的转染率和表达明显提高,有报道,可使裸露 DNA 的转染率提高 3000 倍^[8]。目前,对超声微泡介导的基因转染涉及心脏、血管、肝脏、肾脏、神经系统等众多领域^[9-11],特别是在心血管疾病的基因治疗中。针对基因治疗中常用心肌直接注射法的有创性和现有载体的局限性,采用超声破坏微泡方法介导基因转染心肌组织,实现了心肌中血管生长因子基因的高效表达,促进了缺血心肌血管的新生^[12]。用此基因转移技术同样实现了在体外对肿瘤细胞的基因转染,可为肿瘤的基因治疗提供一种新方法。同样,采用超声破坏微泡的方法也实现了质粒载体和腺病毒载体在肝脏的高效表达^[13]。

影响超声微泡造影剂介导基因转染率的因素较多,除不同组织和基因种类的影响外,超声能量、辐照时间、基因与微泡比例等众多因素均对转染效率可产生影响。其中,超声能量是较重要的因素。研究发现,在体外采用一定能量的超声破坏微泡后,对微泡所携带的质粒结构无明显损伤,而当改变超声强度后,对局部组织的作用随强度增加而逐渐明显。强

度过大,对组织可产生损伤。且研究发现,基因转染效率与超声波的频率大小成反比,频率越低,转染效率越高。因此有必要对基因转染的超声辐照条件进行优化。

3.2 携带药物治疗 研究显示,超声破坏微泡可实现蛋白在心脏的定向转移^[14]。我们采用在体内能生物降解的新型人工合成高分子聚合物乳酸/羟基乙酸共聚物(PLGA)作为成膜材料,采用双乳化法(乳化溶剂蒸发法)和冷冻干燥技术,成功制备了包裹常用抗肿瘤药物阿霉素和氟碳气体的高分子聚合物微泡声学造影剂,结合超声破坏微泡技术,证实能在体外定向释放。具有免疫靶向的微泡造影剂携带药物在感兴趣区释放,可望取得更好的治疗效果。

3.3 溶栓治疗 血栓形成和栓塞是许多临床紧急事件,如急性心肌梗死、中风和肺动脉栓塞的关键因素。及时、恰当地溶栓治疗常常能挽救患者生命。但由于大剂量纤溶剂会引起出血等并发症,静脉溶栓治疗的应用存在局限性。自 1976 年 Trubestein 首次使用血管内高频超声溶解血栓获得成功,利用超声进行溶栓治疗受到广泛关注。随着超声微泡造影剂的发展,在血栓显影中显示出巨大优势。20 世纪 80 年代有人提出可以使用微泡与超声联合溶栓,但直到 1995 年 Porter 才进行了真正有实际意义的微泡联合超声助溶的实验。此后,不少研究证实,在理想的条件下,微泡与超声合用可以完美地溶解血栓,并且不会引起出血等并发症。目前,对血栓靶向超声造影剂的研究取得进展,有助于提高溶栓效果。不仅可利用超声联合微泡造影剂进行溶栓治疗,而且研究发现,超声微泡造影剂可提高溶栓药物的作用。将溶栓药物与微泡结合将有助于局部溶栓效果,降低并发症。研究还发现,低频超声联合白蛋白微泡可促进尿激酶溶解体外血栓。因此,溶栓治疗已成为超声微泡携药物治疗的一个有前景的研究及应用课题。

3.4 抗肿瘤治疗 对恶性肿瘤的治疗一直是研究的重点和难点。利用超声微泡造影剂运送化疗药物治疗肿瘤的设想,来源于 20 年前开始的有关脂质体运送抗肿瘤药物的研究。然而,尽管采取了各种方法,由于过度的肝脏摄取,免疫脂质体在活体动物中的应用一直十分局限。而采用微泡运送细胞毒药物,并在超声介导下破坏微泡,以在局部释放药物,可在提高局部药物浓度,降低药物对全身的毒副作用。

肿瘤滋养血管在恶性肿瘤的生长和转移中起着重要的作用,而用低功率超声破坏微泡可引起肿瘤血管栓塞,体外实验发现,超声破坏微泡可使肿瘤细胞发生溶解和凋亡^[15]。这有可能为恶性肿瘤治疗提供一种无需加入基因或药物,只用超声破坏微泡的简便、无创、有效的方法。用超声破坏微泡可使肿瘤新生血管发生明显的超微结构改变,引起内皮细胞线粒体肿胀、髓样变、细胞质空化等,为超声微泡造影剂直接治疗肿瘤提供了理论依据。

4 超声微泡造影剂用于疾病治疗的声像图和超声组织定征监控

超声作为一种无创检诊技术,可用于各种疾病的诊断,而微泡造影剂则可提高超声对疾病的诊断率,声像图可以引导、监控微泡到达靶器官,用一定能量超声波击碎微泡后,可在靶

组织进行基因转染或药物释放,将会出现组织特性改变,可用市售超声诊断仪、国产“DFY 型超声图像定量分析诊断仪”和超声背向散射积分技术等进行引导、监控,观察其声像图回声强度变化,对治疗效果做出评价。此方法无创、简便、可反复使用。

5 有关仪器研究

近几年,在超声破坏微泡所用仪器的应用方面取得了进展,我所自行研制的“超声微泡造影剂带基因或药物治疗系统”及“低功率超声辐照微泡肿瘤治疗系统”(已获国家发明专利受理),可集监控及定向破坏微泡于一体,并对超声辐照时间、能量可控,有利于超声破坏微泡实现基因和药物定向转移研究、应用的深入开展。

6 目前存在的问题

利用超声破坏微泡实现基因和药物的定向转移这一技术同样也会对机体产生一定的有害的生物学效应。超声破坏微泡有引起组织出血、血管内溶血,体外培养细胞和含气组织及器官(如肺和肠)损伤的报道^[16],亦有资料证实可引起心室收缩功能可逆、短暂性的降低、冠状动脉灌注压的增高和心肌组织内乳酸盐的过量沉积。此外,光学显微镜检测显示,靶组织内毛细血管的破裂,红细胞的外渗和内皮细胞的破坏。一系列的副作用可能直接归因于超声破坏微泡所引起的机械作用,虽然高能量超声辐照可增加内皮细胞间隙和细胞膜的通透性,但同时也可能引起一定的组织损伤,因此,有必要对超声破坏微泡各种相关的超声参数进行更深入的优化,同时改进超声微泡的制作工艺及微泡与基因或药物结合的方式亦显得十分重要。

超声微泡造影剂具有广阔的发展前景。随着将分子生物学、物理、化学及材料学(包括纳米技术)等与超声相结合的“超声分子影像学”的诞生和不断发展,超声造影剂将在疾病的诊断和治疗中发挥更大的作用。

[参考文献]

[1] Bian AN, Gao YH, Tan KB, et al. Preparation and targeting study in vitro of immunoliposome contrast agent[J]. Chin J Med Imaging Technol, 2004, 20(3):356-358.
卞爱娜,高云华,谭开彬,等.免疫脂质体微泡造影剂的制备及体外靶向研究[J].中国医学影像技术,2004,20(3):356-358.

[2] Luo L, Li LJ, Cheng YQ, et al. Ability of ultrasound contrast agent microbubbles to carry DNA[J]. Chin J Med Imaging Technol, 2005, 21(4):498-500.
罗亮,李丽君,程永清,等.多聚体超声造影剂微泡携带 DNA 能力研究[J].中国医学影像技术,2005,21(4):498-500.

[3] Yue DC, Xu HX, Lv MD, et al. HepG2 membrane permeability effected by SonoVue enhanced ultrasound exposure[J]. Chin J Med Imaging Technol, 2005, 21(4):510-512.
岳殿超,徐辉雄,吕明德,等.声诺维(SonoVue)增强超声辐照对 HepG2 细胞膜通透性的影响[J].中国医学影像技术,2005,21(4):510-512.

[4] Zheng YY, Wang ZG, Ran HT, et al. Preliminary experimental study of a new self-made high molecular ultrasound contrast agent [J]. Chinese J Ultrasound Med, 2004, 20(12):888-890.
郑元义,王志刚,冉海涛,等.自制高分子材料超声造影剂及初步实验研究[J].中国超声医学杂志,2004,20(12):888-890.

[5] Lindner JR, Dayton PA, Coggins MP, et al. Non-invasive imaging of inflammation by ultrasound detection of phagocytosed microbubbles[J]. Circulation, 2000, 102(5):531-538.

[6] Unger E, Metzger P 3rd, Krupinski E, et al. The use of a thrombus-specific ultrasound contrast agent to detect thrombus in arteriovenous fistulae[J]. Invest Radiol, 2000, 35(1):86-89.

[7] Lindner JR, Song J, Christiansen J, et al. Ultrasound assessment of inflammation and renal tissue injury with microbubbles targeted to P-selectin [J]. Circulation, 2001, 104(17):2107-2112.

[8] Lawrie A, Briskin AF, Francis SE, et al. Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery[J]. Gene Ther, 2000, 7(23):2023-2027.

[9] Wang ZG, Ling ZY, Ran HT, et al. Experimental study on ultrasound mediated microbubble destruction deliver VEGF gene to myocardium of rats and its biological effects[J]. Chin J Med Imaging Technol, 2003, 19(6):656-658.
王志刚,凌智瑜,冉海涛,等.超声微泡造影剂对心肌组织的生物学效应及介导 VEGF 基因转染大鼠心肌的实验研究[J].中国医学影像技术,2003,19(6):656-658.

[10] Jiang YX. The basic study and clinical applications of ultrasound contrast imaging[J]. Chin J Med Imaging Technol, 2004, 20(3):325.
姜玉新.超声造影的基础研究与临床应用(述评)[J].中国医学影像技术,2004,20(3):325.

[11] Zhang QX, Wang ZG, Ran HT, et al. Microbubble-mediated VEGF gene therapy for lower limb vascular occlusion[J]. Chin J Med Imaging Technol, 2005, 21(4):507-509.
张群霞,王志刚,冉海涛,等.超声微泡介导 VEGF 基因治疗下肢血管闭塞[J].中国医学影像技术,2005,21(4):507-509.

[12] Wang ZG, Ling ZY, Ran HT, et al. Ultrasound-mediated microbubble destruction enhances VEGF gene delivery to the infarcted myocardium in rats[J]. Clin Imaging, 2004, 28(6):395-398.

[13] Zhang DZ, Ren H, Wang ZG, et al. Ultrasound enhancing the infection efficiency of adenoviral vector into the intact hepaocyte [J]. J Ultrasound Clin Med, 2002, 4(6):321-323.
张大志,任红,王志刚,等.超声微泡造影剂促进腺病毒载体感染肝细胞的实验研究[J].临床超声医学杂志,2002,4(6):321-323.

[14] Bekeredian R, Chen S, Grayburn PA, et al. Augmentation of cardiac protein delivery using ultrasound targeted microbubble destruction[J]. Ultrasound Med Biol, 2005, 31(5):687-691.

[15] Zheng YY, Wang ZG, Ran HT, et al. Diagnostic ultrasound and contrast microbubbles on new capillaries[J]. Chin J Med Imaging Technol, 2004, 20(3):349-351.
郑元义,王志刚,冉海涛,等.诊断超声加微泡造影剂对新生血管的作用[J].中国医学影像技术,2004,20(3):349-351.

[16] ter Haar GR. Ultrasonic contrast agents: safety considerations reviewed[J]. Eur J Radiol, 2002, 41(3):217-221.