

Research progresses of ultrasonic microbubble-mediated microRNA in treatment of hepatocellular carcinoma

ZOU Yunlei^{1,2}, LIU Xiaohui¹, ZHAO Yun¹, LIU Zhaoqi¹, LIU Aihua^{1*}

(1. Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, China Three Gorges University, Yichang 443000, China; 2. Department of Ultrasonography, Maternal and Child Health Hospital of Liangping District in Chongqing, Chongqing 405200, China)

[Abstract] Gene therapy has gradually become an important method for treatment of hepatocellular carcinoma (HCC), especially advanced HCC. A sufficient dose of specific microRNA (miRNA) can inhibit the growth of liver cancer cells, and ultrasound microbubble-mediated gene and drug delivery strategy can promote the targeted release of miRNA in tumor area and achieve therapeutic effect. The research progresses of ultrasound microbubble-mediated miRNA in treatment of HCC were reviewed in this article.

[Keywords] carcinoma, hepatocellular; microbubbles; genes, neoplasm; microRNAs; ultrasonography

DOI:10.13929/j.issn.1003-3289.2021.07.028

超声微泡介导微 RNA 治疗肝细胞癌的研究进展

邹云雷^{1,2}, 刘小慧¹, 赵云¹, 刘朝奇¹, 刘爱华^{1*}

(1. 三峡大学肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 湖北宜昌 443000;
2. 重庆市梁平区妇幼保健院超声科, 重庆 405200)

[摘要] 基因治疗正逐渐成为肝细胞癌(HCC)、尤其晚期 HCC 的治疗方案。足够剂量的特定微 RNA(miRNA)可抑制 HCC 细胞生长, 超声微泡介导基因和药物递送治疗策略可促使 miRNA 于肿瘤区域靶向释放, 从而达到治疗效果。本文对超声微泡介导 miRNA 治疗 HCC 研究进展进行综述。

[关键词] 癌, 肝细胞; 微泡; 基因, 肿瘤; 微 RNAs; 超声检查

[中图分类号] R735.7; R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2021)07-1082-04

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是临床常见恶性肿瘤之一^[1]。肝移植和外科手术是治疗早期 HCC 的最佳选择, 但由于移植器官供体缺乏、复发风险高, 且多数 HCC 确诊时已为晚期, 导致仅有小部分患者获益于上述治疗方法。经导管动脉化疗栓塞术为治疗中期 HCC 最常用的方法^[2], 但栓塞所致缺血性损伤及药物非特异性毒性可能进一步损伤肝功能。分子层面的靶向基因疗法正在成为治疗各期 HCC 的新策略, 调控特异性微 RNA(microRNA, miRNA)水

平能控制 HCC 进展^[3], 可于超声引导下将药物或基因传递到靶器官。与传统基因载体相比, 超声微泡用于传递非侵入性基因或药物的安全性、稳定性及转染效率均较高^[4], 已有研究^[5]将超声微泡用于治疗胰腺癌, 并验证了其安全性及有效性。本文对超声微泡介导的 miRNA 治疗 HCC 研究进展进行综述。

1 超声微泡介导 miRNA 转染机制

1.1 超声空化效应 超声和微泡介导的空化通过声穿孔在血管壁上产生短暂或永久性的孔而显著增强

[第一作者] 邹云雷(1987—), 女, 四川广安人, 在读硕士, 主治医师。研究方向: 超声微泡与基因治疗。E-mail: family696680@163.com

[通信作者] 刘爱华, 三峡大学肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 443000。E-mail: zhaoyun@ctgu.edu.cn

[收稿日期] 2020-04-10 **[修回日期]** 2021-04-30

ROI 内药物浓度^[6]。空化效应指微气泡在高、低压超声波交替作用下产生的膨胀和收缩。微气泡在声场中稳定振荡,可见稳定空化现象;微气泡剧烈膨胀或崩塌时,即产生惯性空化现象。稳定空化和惯性空化对邻近组织施加机械力时,惯性空化的微泡溃灭导致额外的撞击效应,如冲击波和液体喷射,进一步增强超声的空化效应^[7]。目前相关研究主要针对孤立环境中的单个微泡动力学,却很少关注体内多个微泡及其与周围环境的相互作用。微泡间的距离或微泡与边界间的距离均可影响空化现象,距离较小时会限制微泡膨胀,从而减轻空化效应。2 个或多个膨胀的微气泡可在高压超声下合并成单个微泡,称为融合微气泡;这种空化会产生更大的机械力并导致更大的孔径,但也可能增加组织损伤范围^[8]。

1.2 肿瘤的高通透性和滞留效应 与正常组织相比,恶性肿瘤血管系统渗透性更强、内皮细胞间隙更宽,淋巴引流不畅且静脉回流缓慢,有助于渗透纳米级物质,增加药物在血管外空间滞留或积聚时间;这种高通透性和滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)介导的累积称为被动靶向,10~200 nm 粒径纳米粒子可通过这种方式积聚于肿瘤部位,超声成像所用纳米级微泡、纳米液滴(nano droplets, ND)的作用原理亦如此^[9]。

2 超声微泡介导 miRNA 转染的递送方式

微泡介导 miRNA 的主要递送方式为微泡与 miRNA 不耦联递送、miRNA 或 miRNA 基因装载于微泡内或微泡壳。微米级微泡仅能到达血管,却无法向周围肿瘤组织渗透,故需采用微泡与 miRNA 不耦联递送方式,另将 miRNA 或编码 miRNA 的基因装载于其他载体。质粒是最常用于构建表达 miRNA 基因的载体之一,但循环过程中载有基因的质粒极不稳定,可被血清中的核酸内切酶分解。聚乳酸-聚乙醇酸纳米粒(poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles, PLGA-NP)通过超声穿孔进入血管外腔室,被肿瘤细胞迅速内吞后,在细胞内缓慢释放 miRNA,可获得持续治疗效果^[10],且具有良好的生物相容性和降解性,是临床所用最有效的聚合物药物递送载体之一^[11]。采用亲水分子如聚乙二醇修饰 PLGA-NP 表面可延长其循环时间。CHOWDHURY 等^[12]发现载有 miRNA 的 PLGA-NP 粒径多为 100~150 nm,封装率可达 70%;即使在极高浓度下,均未见 PLGA-NP 对癌细胞和非癌细胞产生明显毒性。

另一方面,将 miRNA 或 miRNA 基因装载于微泡

内或微泡壳的装载技术较为复杂,目前用于递送 miRNA 至 HCC 细胞的微泡载体主要为相变阳离子 ND 及纳米级阳离子脂质微泡。ND 具有微泡声学特性,体内循环时间长,且靶向性、安全性和稳定性均较高。ND 粒径<400 nm,可经 EPR 外渗至周围肿瘤组织,并在循环中保持纳米级液态,直至被超声触发声波液滴汽化转变成微泡。GUO 等^[13]以超声触发相变且粒径改变的 ND 递送 miR-122 至 HCC 细胞,显著提高了基因递送效率。纳米级阳离子脂质微泡粒径<1 μm,气泡壳主要为脂类物质,微泡内填充氟烷乳剂或氟烷气体。载 miRNA 基因的质粒可通过静电作用吸附于微泡壳。载质粒纳米微泡可被动靶向肿瘤组织,由 EPR 介导滞留于肿瘤的时间更长,且纳米微泡易与组织中微气泡结合,进一步增强其声学特性和检测敏感度。

3 超声微泡介导 miRNA 应用于 HCC

3.1 miR-122/反义 miR-21 miR-122 在各阶段 HCC 均显著下降,因此上调 miR-122 可能减缓肿瘤细胞生长,提高肿瘤对阿霉素的敏感度^[14]。相反,miR-21 在 HCC 中高表达,以反义 miR-21 沉默 miR-21 可抑制 HCC 细胞增殖、迁移及侵袭,同时减轻其耐药性^[15]。CHOWDHURY 等^[12]将 miR-122、反义 miR-21 分别载入 PLGA-NP 并经尾静脉注射于小鼠体内,通过超声成像引导超声聚焦辐照小鼠一侧皮下肝癌移植瘤,发现多次重复治疗效果优于单次治疗,且联合应用两种互补的 miRNA 不仅可显著缩小肿瘤体积、降低 HCC 细胞增殖、侵袭及迁移,还可提高肿瘤对阿霉素的敏感度。

WISCHHUSEN 等^[16]观察超声微泡介导 miR-122、反义 miR-21 对免疫活性的 Hepa1-6 同基因 HCC 小鼠模型的免疫调节作用,发现超声靶向微泡破坏(ultrasound targeted microbubble destruction, UTMD)联合 miRNA 治疗可引起短暂性细胞因子风暴;miR-122 和反义 miR-21 通过降低肿瘤的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子水平而调节肿瘤近端淋巴结中促癌因子 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-5、IL-6 和抗肿瘤因子 IL-2、IL-12 水平,从而影响免疫微环境;UTMD 局部靶向治疗可明显降低治疗侧和对侧肿瘤淋巴结 IL-12 和 IL-17 浓度,提示局部治疗引起了系统反应。但该研究仅观察了 UTMD 介导 miRNA 释放后 24 h 内的细胞因子变化,为证实此类假设并了解反复治疗后 HCC 免疫微环境的长期变化,仍需对更多时间点及多种治疗条件下进行深入研究。除细胞因子谱外,免疫细胞群

的特征也可能有助于了解该疗法的免疫调节潜力。

3.2 miR-221/miR-199a miR-221 高表达与 HCC 临床分期、肿瘤包膜浸润及淋巴结转移显著相关^[17-18]。实验研究^[19]证明 miR-221 高表达与索拉非尼耐药相关。HCC 患者 miR-221 与细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 (cyclin-dependent kinase inhibitor, CDKN) 1B/p27、CDKN1C/p57 呈负相关, 可通过靶向 p27 和 p57 启动肿瘤发生。GUO 等^[13]以超声微泡将反义 miR-221 转染至人肝癌细胞 (human hepatoma cells, Hep)——G2 细胞, 发现 CDKN1B/p27 和 CDKN1C/p57 表达上调, HepG2 凋亡增加。HCC 患者 miR-199a 下降多提示预后不良。miR-199a 可通过靶向低氧诱导因子-1a、分化簇 44 及调节细胞周期, 抑制 HCC 细胞增殖。此外, miR-199a 可上调 CDKN1B/p27 和 CDKN1A/p21 抑制细胞周期, 诱导细胞凋亡。有学者^[13]通过超声微泡介导基因转染观察反义 miR-221、反义 miR-221 和 miR-199a 对 HepG2 细胞的影响, 发现 miR-199a 可在最大程度上抑制细胞增殖。

3.3 叉头状转录因子 P3-miRNA 叉头状转录因子 P3 (forkhead box p3, Foxp3) 可调控调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 的免疫抑制功能^[20]。SHI 等^[21]通过 UTMD 介导的 Foxp3-miRNA 转染 Treg, 以降低 Foxp3, 结果显示 Foxp3-miRNA 可下调 HCC 模型小鼠 Treg/T 细胞比例、IL-10、转化生长因子-β 及血管内皮生长因子水平, 并上调 IFN-γ 及 IL-2 水平, 提示其可在体外解除 Treg 对 HCC 的免疫抑制功能, 通过增强免疫功能和抑制血管内皮生长因子产生, 抑制肿瘤生长。目前尚不清楚 UTMD 介导的 Foxp3-miRNA 对免疫功能和肿瘤生长的长期影响, 并需进一步研究如何调控 Treg 细胞产生精确的免疫反应及减少 Treg 细胞, 以期增强对于肿瘤的免疫力, 而不引起严重的自身免疫反应。

3.4 抑制磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚基 α (phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA) 基因的前体 miRNA 编码 p110α 蛋白亚基的 PIK3CA 与多种肿瘤的发生、发展密切相关。HCC 患者生存率与 PIK3CA 表达水平相连紧密, HCC 中 PIK3CA 表达高于非瘤肝组织^[22], 因此, 抑制 PIK3CA 表达对于治疗 HCC 具有重要意义。DONG 等^[23]筛选出 4 种在 HCC 下调且抑制 PIK3CA 表达的 miRNA (miR-139、203a、378a 及 422a), 并构建了高表达载体 (前体 miRNA 质粒), 利用超声触发可相变的载质粒 ND, 在体外通过声穿孔传递基因治疗荷瘤裸

鼠, 结果显示前体 miR-139 和 miR-378a 可有效抑制肿瘤生长。目前应用前体 miRNA 联合超声微泡治疗 HCC 的研究较少。此外, 一种前体 miRNA 可产生不止一种成熟的 miRNA, 例如 miR-17-5p 和 miR-17-3p 均来自同一前体 miR-17, 靶向位点却不同, 可能出现不可预想的结果, 有待进一步研究可控性和可行性。

3.5 miR-206 联合可溶性程序性死亡因子 1 miR-206 是强大的肿瘤抑制因子。结合生物信息学预测和分子细胞方法, WU 等^[24]发现 miR-206 可通过抑制肝细胞生长因子受体 C-Met、细胞周期素 D1 和细胞周期蛋白依赖性激酶 6 表达而延缓 3 种不同 Hep 的细胞周期, 诱导其凋亡及抑制增殖。可溶性程序性死亡因子 1 (soluble programmed cell death 1, sPD-1) 是肿瘤免疫治疗的靶基因, 通过阻断程序性死亡因子 1 (programmed cell death 1, PD-1)/PD-1 配体 (PD-1 ligand, PD-L1) 的相互作用而激活机体免疫系统。HCC 中 miR-206 表达通常显著降低, 而靶基因 C-Met 表达增加。谭妍迪等^[25]利用超声介导载 miR-206 和 sPD-1 基因纳米微泡治疗小鼠 H22 肝癌皮下移植瘤, 发现 sPD-1 与 miR-206 联合治疗可有效阻断 PD-1 与 PD-L1 结合, 上调干扰素-γ 并下调 PD-L1, 解除 T 细胞的抑制, 提高 T 细胞及自然杀伤细胞活性, 进一步增强细胞毒性 T 淋巴细胞的抗肿瘤作用; 基因治疗后, 肿瘤组织中 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, BCL-2) 表达降低, BCL-2 相关 X 蛋白 (BCL-2 associated X, BAX) 表达增加, 以联合治疗后更为明显。上述结果进一步证实了 miR-206 可通过靶向 C-Met 促进 HCC 细胞凋亡; miR-206 与 sPD-1 联合可更有效地阻断 PD-1/PD-L1 信号通路, 表现出更好的抗肿瘤效果。

4 小结与展望

超声微泡介导 miRNA 治疗 HCC 相关研究虽已取得重大进展, 但在复杂多变的机体微环境中实现具有高诊断敏感度、高特异度和良好治疗效果的靶向系统仍面临诸多挑战: ①治疗基因的定位和靶向传递是治疗 HCC 的首要问题; ②对超声能量的安全强度、基因治疗的复杂性和不良反应及基因载体和微泡的毒性仍需深入研究; ③既往研究采用的超声参数、动物模型和微泡浓度均有所不同, 使得结果的可比性有限, 亟需开发在治疗期间可监测声学效应、估计靶组织中传递药物量的系统; ④进一步优化微泡制备方法, 提高其精度、可控性和重复性, 以实现标准化。

[参考文献]

- [1] 李艳,严胡铃,石瑛,等.肝细胞癌过继细胞免疫治疗研究进展[J].临床肝胆病杂志,2020,36(8):1852-1857.
- [2] 陈磊,陈诗,郑传胜.肝细胞癌经动脉化疗栓塞术后疗效预测的研究进展[J].影像诊断与介入放射学,2019,28(6):445-450.
- [3] 彭方慧,潘洁,冯留顺,等.miRNA在肝细胞癌中的研究进展[J].现代诊断与治疗,2019,30(3):356-358.
- [4] 谭妍迪,赵云,周军.超声微泡在心脏疾病诊治中的应用进展[J].天津医药,2019,47(1):104-108.
- [5] DIMCEVSKI G, KOTOPOULIS S, BJANES T, et al. A human clinical trial using ultrasound and microbubbles to enhance gemcitabine treatment of inoperable pancreatic cancer [J]. J Control Release, 2016,243:172-181.
- [6] 席佳达,夏国园,程祖胜.超声微泡携基因治疗肝脏疾病应用进展[J].中国医学影像技术,2018,34(12):1897-1900.
- [7] 杨环宇,杨扬,任建丽,等.低强度超声联合微泡治疗在肿瘤化疗及动脉溶栓研究进展[J].中国介入影像与治疗学,2018,15(4):247-250.
- [8] MULLICK CHOWDHURY S, LEE T, WILLMANN J K. Ultrasound-guided drug delivery in cancer [J]. Ultrasonography, 2017,36(3):171-184.
- [9] 陈芳,陶金,车晓航,等.肿瘤微环境的渗透性增强与肿瘤治疗[J].国际药学研究杂志,2016,43(2):264-267.
- [10] MALIK S, BAHAL R. Investigation of PLGA nanoparticles in conjunction with nuclear localization sequence for enhanced delivery of anti-miR phosphorothioates in cancer cells in vitro [J]. J Nanobiotechnology, 2019,17(1):57.
- [11] SOUSA A R, OLIVEIRA A V, OLIVEIRA M J, et al. Nanotechnology-based siRNA delivery strategies for metastatic colorectal cancer therapy [J]. Int J Pharm, 2019,568:118530.
- [12] CHOWDHURY S M, LEE T, BACHAWAL S V, et al. Longitudinal assessment of ultrasound-guided complementary microRNA therapy of hepatocellular carcinoma [J]. J Control Release, 2018,281:19-28.
- [13] GUO X, GUO S, PAN L, et al. Anti-microRNA-21/221 and microRNA-199a transfected by ultrasound microbubbles induces the apoptosis of human hepatoma HepG2 cells [J]. Oncol Lett, 2017,13(5):3669-3675.
- [14] 李艳,罗栩伟,朱冬梅,等.应用 UTMD 技术联合脂质体转染介导人肝癌细胞表达 miRNA-122 的研究 [J]. 川北医学院学报, 2019,34(6):667-671.
- [15] ZHANG T, YANG Z, KUSUMANCHI P, et al. Critical role of microRNA-21 in the pathogenesis of liver diseases [J]. Front Med (Lausanne), 2020,7:7.
- [16] WISCHHUSEN J C, CHOWDHURY S M, LEE T, et al. Ultrasound-mediated delivery of miRNA-122 and anti-miRNA-21 therapeutically immunomodulates murine hepatocellular carcinoma in vivo [J]. J Control Release, 2020,321:272-284.
- [17] FU Y, LIU M, LI F, et al. MiR-221 Promotes hepatocellular carcinoma cells migration via targeting PHF2 [J]. Biomed Res Int, 2019,2019:4371405.
- [18] HUANG S, ZHOU D, LI Y X, et al. In vivo and in vitro effects of microRNA-221 on hepatocellular carcinoma development and progression through the JAK-STAT3 signaling pathway by targeting SOCS3 [J]. J Cell Physiol, 2019,234(4):3500-3514.
- [19] FORNARI F, POLLUTRI D, PATRIZI C, et al. In hepatocellular carcinoma miR-221 modulates Sorafenib resistance through inhibition of caspase-3-mediated apoptosis [J]. Clin Cancer Res, 2017,23(14):3953-3965.
- [20] WING J B, TANAKA A, SAKAGUCHI S. Human FOXP3⁺ regulatory T cell heterogeneity and function in autoimmunity and cancer [J]. Immunity, 2019,50(2):302-316.
- [21] SHI C, ZHANG Y, YANG H, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction-mediated Foxp3 knockdown may suppress the tumor growth of HCC mice by relieving immunosuppressive Tregs function [J]. Exp Ther Med, 2018,15(1):31-38.
- [22] CHANDRASHEKAR D S, BASHEL B, BALASUBRAMANYA S A H, et al. UALCAN: A portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses [J]. Neoplasia, 2017,19(8):649-658.
- [23] DONG W, WU P, ZHOU D, et al. Ultrasound-mediated gene therapy of hepatocellular carcinoma using pre-microRNA plasmid-loaded nanodroplets [J]. Ultrasound Med Biol, 2020,46(1):90-107.
- [24] WU H, TAO J, LI X, et al. MicroRNA-206 prevents the pathogenesis of hepatocellular carcinoma by modulating expression of met proto-oncogene and cyclin-dependent kinase 6 in mice [J]. Hepatology, 2017,66(6):1952-1967.
- [25] 谭妍迪,赵云,刘朝奇,等.超声介导载 sPD-1 和 miR-206 基因纳米微泡协同抑制小鼠 H22 肝癌皮下移植瘤 [J]. 中国医学影像技术, 2019,35(9):1315-1320.