

# 超声微泡造影剂携基因或药物治疗眼科疾病的研究进展

马大卉, 黄丽娜, 申晓丽

作者单位: (518020) 中国广东省深圳市, 暨南大学附属深圳眼科医院

作者简介: 马大卉, 男, 在读硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 白内障及青光眼。

通讯作者: 黄丽娜, 女, 博士后, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 白内障及青光眼. bensma@163.com

收稿日期: 2012-06-04 修回日期: 2012-08-09

## Research progress of ultrasound microbubble contrast agent with drug and gene targeting therapy in ophthalmology

Da-Hui Ma, Li-Na Huang, Xiao-Li Shen

Jinan University Affiliated Shenzhen Eye Hospital, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China

Correspondence to: Li - Na Huang. Jinan University Affiliated Shenzhen Eye Hospital, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China. bensma@163.com

Received: 2012-06-04 Accepted: 2012-08-09

### Abstract

• The ultrasound microbubble contrast agent to carry the drug and gene targeting therapy system is a new hot research field. In recent years, it is widely used in targeted therapy of cardiovascular diseases, liver cancer and other illnesses while still a beginning in basic study and clinical disease treatment of ophthalmology. This review summarizes the current research of ultrasound microbubble contrast agent with drug and gene targeting therapy in basic study and clinical treatment of ophthalmology.

• KEYWORDS: ultrasound microbubble contrast agent; carry genes/drug; targeted therapy; ophthalmology

Citation: Ma DH, Huang LN, Shen XL. Research progress of ultrasound microbubble contrast agent with drug and gene targeting therapy in ophthalmology. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(10):1904-1906

### 摘要

超声微泡造影剂携带药物和基因的靶向治疗系统是新兴的热门研究领域, 目前已经在心血管疾病、肝肿瘤等疾病的靶向治疗方面得到了满意的研究成果, 但在眼科的基础研究和临床疾病治疗方面尚处于初始阶段。我们就超声微泡造影剂携药物和基因靶向治疗在眼科基础研究和临床治疗方面的研究现状作一综述。

关键词: 超声微泡造影剂; 携基因/药物; 靶向治疗; 眼科

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.10.24

引用: 马大卉, 黄丽娜, 申晓丽. 超声微泡造影剂携基因或药物

治疗眼科疾病的研究进展. 国际眼科杂志 2012;12(10):1904-1906

### 0 引言

近年来, 生物和生化技术的发展促进了新剂型和新技术的发展, 而超声微泡剂介导的靶向携带基因或药物的系统也随之成为目前研究较为热门的领域之一。超声与生物体组织的相互作用机制主要有三种: (1) 机械效应; (2) 热效应; (3) 空化效应 (cavitation)。其中的空化效应在超声微泡造影技术中利用最多, 它可以明显提高超声微泡所携带基因在体内局部组织细胞的转染和表达<sup>[1,2]</sup>; 同时, 超声微泡剂也可以携带药物, 而且可在超声波的作用下实现药物在靶位的突然释放, 迅速达到治疗浓度<sup>[3]</sup>。由于微泡在血循环的稳定性好, 减少了基因或药物到达靶器官前在体内的破坏。它已经被广泛运用于临床研究, 如肝肿瘤治疗<sup>[4,5]</sup>、血栓治疗<sup>[6]</sup>。近来, 可携带基因和药物的超声微泡造影剂在眼科的基础研究和眼科临床疾病的治疗方面也展示了广阔的前景, 我们就这一领域的研究进展做综述。

### 1 角膜方面的研究

角膜是眼球的重要组成部分, 是眼光学系统中重要的一环。角膜疾病是致盲的主要原因之一, 保持角膜的透明则是角膜疾病治疗首要解决的问题。目前, 基因治疗成为研究的热点, 而基因治疗需要有安全而有效的载体以达到基因高效、定向的转染目的, 超声微泡被证明其是具有这些特点的新型体内基因转染载体<sup>[1,7]</sup>。许多研究者考虑到超声破坏微泡对角膜可能产生生物学效应并加以观察, 以明确其安全性。胡文静等<sup>[8]</sup>采用不同的声强 (0.5W/cm<sup>2</sup>, 1.0W/cm<sup>2</sup>, 2.0W/cm<sup>2</sup>) 和辐照时间 (30s, 60s, 120s) 的超声作用于微泡干扰的兔眼角膜, 并对角膜进行定量分析和病理组织观察, 发现超声声强 1.0W/cm<sup>2</sup>, 2.0W/cm<sup>2</sup> 与 0.5W/cm<sup>2</sup> 组比较, 角膜组织损害严重, 内皮细胞密度和六角形细胞比例差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 超声辐照时间 120s 与 30s, 60s 比较内皮细胞密度和六角形细胞比例差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。初步发现选择超声声强 0.5W/cm<sup>2</sup>, 辐照时间为 30s 或 60s 可能对角膜组织是合适的。胡文静等<sup>[8,9]</sup>以之前的筛选实验为基础, 进一步进行探讨超声微泡介导 pEGFP 质粒 DNA 转染新生血管性角膜组织的可行性及效率。将 24 只新西兰大白兔采用缝线法诱导角膜新生血管成功后, 利用随机分组法将其分为 A, B, C, D 共 4 组: A 组为裸质粒组; B 组为质粒加超声辐照组 (超声声强 0.5W/cm<sup>2</sup>, 辐照时间 60s); C 组为质粒-微泡复合组; D 组为质粒-微泡复合物加超声辐照组 (超声声强 0.5W/cm<sup>2</sup>, 辐照时间 60s)。质粒转染后 HE 染色观察角膜组织病理变化, 并采用激光共聚焦显微镜观察质粒 DNA 荧光蛋白表达强度, 发现 D 组与其他三组比较, 兔角膜组织无明显损伤, 而绿色荧光蛋白表达量与其他三组比较有统计学意义 ( $F = 23.56, P < 0.05$ ), 其他三组之间差异无统计学意义。这说明在一定的声强和时间辐照下, 超声微泡能有效提高质粒 DNA 在兔新生血管性角膜组织的基因转染率。Sonoda 等<sup>[7]</sup>也通过实验筛选出角膜转染的

最佳超声辐照条件为声强  $0.5 \sim 1.0 \text{ W/cm}^2$ 、微泡浓度 20%、辐照时间 60 ~ 120s、空占比 50%。并在离体实验和活体实验中都验证了超声联合微泡能显著提高质粒 DNA 在兔角膜组织的基因转染率。作者认为,胡文静等和 Sonoda 等分别在新生血管性兔角膜和正常兔角膜下进行实验,得出相似的结论,这不是偶然的,是证明超声微泡确实是运载治疗性基因的安全而有效的载体系统,为治疗角膜性疾病提供了一条新的基因治疗途径。Yamashita 等<sup>[10]</sup>使用一种新型脂质微泡+超声介导 GFP 基因转染体外培养的兔角膜上皮细胞(RC-1),并与传统微泡作比较,结果表明该新型脂质微泡组基因转染效率明显高于其他对照组,同时未见明显的细胞损伤。并进一步在活体实验中也发现该新型脂质微泡+超声能更为高效介导 GFP 基因转染至活体大鼠的结膜下组织,并且未引起明显的副作用。

在另一方面,角膜作为眼表系统的组成部分,是眼科药物治疗的主要通路,超声辐照可以增加角膜对不同复合物(如 B-阻滞剂、荧光素酶)的通透性。Zderic 等<sup>[11]</sup>研究了频率为 20kHz 的超声辐照下,角膜对四种亲油性青光眼药物(阿替洛尔、卡替洛尔、噻吗洛尔、倍他洛尔)通透性的改变。在超声辐照 10 ~ 30min 后,处理组和对照组之间角膜对四种药物通透性改变的差异有统计学意义。在离体实验中,经 60min 超声辐照后,兔眼角膜对上述药物的通透性分别提高了 2.6, 2.8, 1.9, 4.4 倍。但是,超声辐照同时使角膜上皮细胞破裂和角膜基质结构改变。因此,必须进行更多的实验,对超声辐照参数进行优化后才能将其能促进角膜对药物通透性的作用运用于临床上。

## 2 视网膜神经节细胞和视神经保护方面的研究

随着人类对生命本质认识的不断加深,生命科学在不断的进步,许多治疗性基因已被发现,利用基因治疗视网膜视神经疾病成为一个新的研究热点,而安全有效的基因运送载体是临床基因治疗成功的基石。目前,传统的基因运送载体包括脂质体和病毒等,但因其存在不安全性、靶向性差、给药方式较复杂等局限性而制约了基因治疗的发展。Taniyama 等<sup>[12]</sup>早已通过离体和在体实验证实,超声微泡造影剂可以作为运送基因安全而有效的载体。在此基础上,不断有研究者们进行更为深入的研究,在离体实验方面,李伟等<sup>[13]</sup>探讨了超声微泡介导绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因在视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的转染情况。实验证明在超声频率 300kHz,声强  $1.25 \text{ W/cm}^2$ ,连续波,辐照时间 60s,微泡浓度  $45 \mu\text{g/mL}$ ,质粒浓度  $50 \mu\text{g/mL}$  的条件下基因转染率较高而对 RGCs 无毒副作用。李伟等<sup>[14]</sup>还通过在体外混合培养 Long Evans 大鼠 RGCs,并建立 N-甲基-D 天冬氨酸(NMDA)损伤的 RGCs 凋亡模型的分组实验,证明超声微泡介导 Be1-xl 基因抗视网膜神经节细胞凋亡有一定的作用,为视网膜视神经疾病的基因治疗提供一种新的思路。

近几年来,研究者在活体研究方面也取得很大的进展。Xie 等<sup>[15]</sup>在超声微泡造影剂促进重组腺相关病毒载体基因转染视网膜神经节细胞的体内实验中,对比分析后得出结论,在低频率和一定能量的超声和微泡造影剂的作用下, rAAV2 介导 EGFP 基因转染体内的 RGC 的效率能够安全、有效地提高,这为青光眼的视神经保护提供了一条新颖的基因治疗途径。刘敏等<sup>[16]</sup>则在最近的实验中观察了超声微泡造影剂介导睫状神经营养因子(CNTF)基因转染视神经损伤大鼠对视功能及 RGCs 存活影响,发现超

声微泡组 CNTF mRNA 表达量明显高于正常对照组、假损伤组、单纯损伤组、单纯质粒组和质粒+超声组,表明了超声微泡能增强 CNTF 基因在眼内的转染及表达,对视神经损伤大鼠 RGCs 早期有明显的保护作用,可有效促进视功能的恢复。傅铁等<sup>[17]</sup>则进一步通过实验观察到超声微泡造影剂介导脑源性神经营养因子(BDNF)联合转染视网膜和视皮质区细胞能抑制视神经损伤后 RGC 凋亡,提高 RGC 存活数,保护其视功能。也有研究者侧重于超声微泡实现和增强基因转染率的机制,如 Kowalczyk 等<sup>[18]</sup>通过实验发现通过超声联合微泡使基因转染睫状肌肉具有可行性,并提示声孔效应可以允许眼内可治疗炎症、血管生成和/或退行性视网膜疾病的蛋白质的表达。Zheng 等<sup>[19]</sup>发现,超声介导微泡破裂相对单纯超声辐照更能有效促进脂质体 2000 介导裸露 siRNA 转染活体视网膜色素上皮细胞,而且没有导致视网膜细胞或者组织的破坏。这提示,超声联合微泡形成的空化效应能安全地实现并增强基因的转染和表达。

此外,超声微泡造影剂在携带药物治疗眼科疾病的研究方面也取得了可喜的进步,杨静菲等<sup>[20]</sup>进行 Sprague-Dawley 雄性大鼠实验中发现,在建立视神经钳夹伤模型后,玻璃体腔注射美金胺加超声微泡组的 RGC 数明显高于玻璃体腔只注入生理盐水组和单纯注入美金胺组,差异具有统计学意义。据此,研究者认为超声微泡造影剂联合美金胺能抑制视神经损伤后大鼠 RGC 的丢失,促进其视神经功能的恢复,对视神经损伤大鼠的 RGC 具有保护作用。

## 3 眼科肿瘤方面研究

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)是婴幼儿最常见的眼内恶性肿瘤。目前国内治疗普遍采用的眼球或眼眶内容物摘除术、放射疗法及化学疗法等,但均不能明显改善预后,而 RB 的远期影响往往带来局部的破坏性后果。以超声微泡造影剂为基因载体介导治疗基因转染 RB 细胞,为 RB 的治疗及预后的改善带来了契机,具有传统方法不可比拟的优势。

周希瑗等<sup>[21]</sup>利用实验将超声微泡介导 EGFP 质粒转染 RB 细胞与传统转染方法效率对比。研究者将 RB 细胞分为 6 组,1 组以一定能量的超声波辐照,2 组加适当剂量的微泡造影剂,3 组加入质粒,4 组加入质粒与微泡,5 组加入质粒、微泡,并用一定能量的超声辐照,6 组予脂质体与质粒。转染 24 ~ 48h 后观察 EGFP 表达,并用 RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)进行检测。同时对 1, 2 组予以染色。研究结果表明:利用超声微泡介导的 DNA 质粒对 RB 细胞的转染效率与脂质体介导的质粒转染效率相似,明显高于其它实验组。使用一定能量和时间的超声波辐照及适当浓度的微泡,对 RB 细胞的活性无明显抑制。初步表明,利用低频率和一定能量的超声击碎携带 EGFP 质粒的超声微泡造影剂,能够有效地提高 DNA 质粒在 RB 细胞中的转染效率。刁林琼等<sup>[22]</sup>进行更为具体的实验,将 12 只 BAIB/C(nu/nu)裸小鼠玻璃体腔接种 HXO-Rb44 细胞,造模成功后,将动物随机分为两组,第 1 组于尾静脉注入含质粒的微泡造影剂;第 2 组尾静脉注射质粒与微泡的混合液,并立即以  $0.5 \text{ W/cm}^2$  的超声波辐照小鼠眼球 60s,工作时间控制为 20% (即辐照 4s,停 24s,共用时间 60s)。转染 7d 后,处死动物,摘除眼球,用 RT-PCR 检测 wtp53 基因的表达情况。结果显示,超声照射组动物肿瘤的组织均检测到 wtp53 mRNA 表达,而未照射组则无此表达。由此可见,超声微泡能使外源性

基因 wtp53 高效地转染小鼠的 RB 肿瘤组织。证明超声微泡造影剂可能成为一种新型的基因运载工具,为今后基因治疗 RB 提供一种安全、有效的靶向基因载体。

Luo 等<sup>[23]</sup>则通过进一步进行实验,不仅证明在超声微泡组和脂质组 wtp53 能成功转染 RB 细胞,更通过流式细胞计数法定量计算 RB 肿瘤细胞的凋亡率,证明相对于脂质体组(19.3%)和单纯超声辐照组、空白对照组(<10%),超声微泡组的细胞凋亡率(25.58%)为各组最高。这为开拓新的潜在的 RB 基因治疗的途径提供了初步的证据。

#### 4 脉络膜新生血管方面研究

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是眼底常见的微血管病变,其基本病理改变是血-视网膜屏障的破坏、CNV 的形成。其传统的治疗方法是视网膜激光光凝术、玻璃体切割手术、光动力疗法等,但这些方法存在复杂、昂贵、副作用大、疗效欠稳定等缺点<sup>[24]</sup>。近年来,有研究表明血管内皮生长因子(VEGF)与眼底血管性疾病的发生发展呈密切相关<sup>[25,26]</sup>。故近年 VEGF 抑制剂成为治疗 CNV 治疗的新方向。现已证明:抗 VEGF 单克隆抗体 bevacizumab(商品名 Avastin)对新生血管的发生、发展有抑制作用<sup>[27]</sup>。近来,研究者则进一步考虑将超声微泡与 Avastin 结合起来,以提高该药的治疗效果和减少副作用。龚潇等<sup>[28]</sup>通过超声爆破微泡联合抗 VEGF 单克隆抗体 bevacizumab 对兔 CNV 的实验证明超声微泡造影剂联合 bevacizumab 注射能够通过抑制 VEGF 的表达来增强对 CNV 的治疗效果。这提示我们超声微泡联合 VEGF 抑制剂治疗眼底血管性疾病有望成为新的治疗途径。另一方面,研究者也试图从基因治疗方面来研究治疗 CNV。李涛等<sup>[29]</sup>将超声联合靶向微泡介导增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因转染 CNV,结果表明,超声联合靶向微泡可高效、靶向地将质粒 DNA 输送至 CNV,这为 CNV 的基因治疗进一步研究展示了良好的前景。

#### 5 不足及展望

近年来,众多学者将超声微泡造影剂引入眼科,并进行超声破坏微泡实现基因和药物的靶向治疗的研究,取得了可喜的成就,表明其具有潜在的应用价值。但也存在不少问题,如超声辐照时间的控制、微泡停留在治疗区域的时间、微泡载药或基因能力的提高等都是亟待解决的问题。另外,超声破坏微泡各种相关的超声参数也要进行更深入的优化,尽管有关参数优化的研究时有报道,但缺乏系统性,也未达到广泛的共识。尽管目前还存在许多难题,但已取得的研究进展已显示出广阔的前景。虽然离临床应用还有一定距离,但是随着分子生物学、超声医学和眼科学的发展,超声介导微泡的靶向治疗即将取得突破性进展,为眼科疾病提供一种新的治疗途径。

#### 参考文献

- 1 Su H, Liu S, Wang ZG, et al. *In vivo* transfection of enhanced green fluorescent protein in rat retinal ganglion cells mediated by ultrasound-induced microbubbles. *Neural Regeneration Research* 2009;4(6):413-417
- 2 Li W, Liu S, Xiong H, et al. Gene transfection to retinal ganglion cells mediated by ultrasound microbubbles *in vitro*. *Acad Radiol* 2009;16(9):1086-1094
- 3 Rapoport NY, Gao Z, Kennedy AM. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2007;99(14):1095-1106
- 4 聂芳,徐辉雄,吕明德,等.微泡造影剂联合超声辐照介导的绿色荧光蛋白质粒转染小鼠肝癌的实验研究. *中国超声医学杂志* 2007;23(2):95-97

- 5 Lentacker I, Vandenbroucke RE, Lucas B, et al. New strategies for nucleic acid delivery to conquer cellular and nuclear membranes. *J Control Release* 2008;132(3):279-288
- 6 Shaw GJ, Bavani N, Dharni A, et al. Effect of mild hypothermia on the thrombolytic efficacy of 120 kHz ultrasound enhanced thrombolysis in an *in vitro* human clot model. *Thromb Res* 2006;117(5):603-608
- 7 Sonoda S, Tachibana K, Uchino E, et al. Gene transfer to corneal epithelium and keratocytes mediated by ultrasound with microbubbles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(2):558-564
- 8 胡文静,张良珂,李攀,等.超声联合微泡对正常兔角膜组织的生物学效应. *中国医学影像技术* 2009;25(1):21-24
- 9 胡文静,周善璧,王志刚,等.超声定位辐照载 pEGFP 质粒 DNA 超声微泡转染新生血管性角膜组织的实验研究. *中华超声影像学杂志* 2009;18(8):722-725
- 10 Yamashita T, Sonoda S, Suzuki R, et al. A novel bubble liposome and ultrasound-mediated gene transfer to ocular surface: RC-1 cells *in vitro* and conjunctiva *in vivo*. *Exp Eye Res* 2007;85(6):741-748
- 11 Zderic V, Vaezy S, Martin RW, et al. Ocular drug delivery using 20-kHz ultrasound. *Ultrasound in Med Biol* 2002;28(6):823-829
- 12 Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, et al. Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Therapy* 2002;9(6):372-380
- 13 李伟,刘苏,王志刚.超声微泡介导绿色荧光蛋白基因在视网膜神经节细胞表达的实验研究. *中华超声影像学杂志* 2007;16(4):353-356
- 14 李伟,刘苏,王志刚.超声微泡介导 bcl-x1 基因抗视网膜神经节细胞凋亡作用的实验研究. *中国医学影像技术* 2006;22(8):1147-1150
- 15 Xie W, Liu S, Su H, et al. Ultrasound microbubbles enhance recombinant adeno-associated virus vector delivery to retinal ganglion cells *in vivo*. *Acad Radiol* 2010;17(10):1242-1248
- 16 刘敏,刘苏,王志刚,等.超声微泡介导 CNTF 基因眼内转染对视神经损伤大鼠作用的研究. *中华实验眼科杂志* 2011;29(4):303-307
- 17 傅轶,刘苏,王志刚,等.超声微泡造影剂介导脑源性神经生长因子联合转染视网膜和视皮层对视神经损伤后视网膜神经节细胞的保护作用. *中华眼底病杂志* 2011;27(1):65-69
- 18 Kowalczyk L, Boudinet M, El Sanharawi M, et al. *In vivo* gene transfer into the ocular ciliary muscle mediated by ultrasound and microbubbles. *Ultrasound Med Biol* 2011;37(11):1814-1827
- 19 Zheng X, Ji P, Hu J. Sonoporation using microbubbles promotes lipofectamine-mediated siRNA transduction to rat retina. *Bosn J Basic Med Sci* 2011;11(3):147-152
- 20 杨静菲,刘苏,王志刚,等.超声微泡造影剂联合美兰胺增强视神经损伤大鼠视网膜神经节细胞保护作用. *中华眼底病杂志* 2011;27(6):567-572
- 21 周希媛,邓鑫,王志刚.超声微泡介导 EGFP 质粒对视网膜母细胞瘤细胞与传统转染方法效率对比. *中国超声医学杂志* 2006;22(8):564-566
- 22 刁林琼,周希媛.超声微泡介导野生型 P53 基因转染鼠视网膜母细胞瘤的实验研究. *激光杂志* 2008;29(3):91-93
- 23 Luo J, Zhou X, Diao L, et al. Experimental research on wild-type p53 plasmid transfected into retinoblastoma cells and tissues using an ultrasound microbubble intensifier. *J Int Med Res* 2010;38(3):1005-1015
- 24 Bhisitkul RB. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol* 2006;90(12):1542-1547
- 25 Takagi H. Molecular mechanisms of retinal neovascularization in diabetic retinopathy. *Intern Med* 2003;42(3):299-301
- 26 Sydorova M, Lee MS. Vascular endothelial growth factor levels in vitreous and serum of patients with either proliferative diabetic retinopathy or proliferative vitreous retinopathy. *Ophthalmic Res* 2005;37(4):188-190
- 27 Cohen AF, van Bronswijk H. New medications: bevacizumab. *Ned Tijdschr Geneesk* 2006;150(40):2194-2195
- 28 龚潇,周希媛,王志刚.超声爆破微泡联合抗血管内皮生长因子单克隆抗体 bevacizumab 治疗激光诱导的兔眼脉络膜新生血管. *中华眼底病杂志* 2010;26(1):19-22
- 29 李涛,张虹,陈志祺,等.超声联合靶向微泡介导 EGFP 基因转染脉络膜新生血管. *眼科新进展* 2010;30(9):805-808