

- [18] Ceni E, Crabb DW, Foschi M, et al. Acetaldehyde inhibits PPAR gamma via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated c-Abl activation in human hepatic stellate cells[J]. Gastroenterology, 2006, 131(4):1235-1252.
- [19] Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease[J]. Prog Lipid Res, 2009, 48(1):1-26.
- [20] Casini A, Galli A, Pignatelli P, et al. Collagen type I synthesized by pancreatic periacinar stellate cells (PSC) co-localizes with lipid peroxidation[J]. J Pathol, 2000, 192(1):81-89.
- [21] Holstege A, Bedossa P, Poynard T, et al. Acetaldehyde-modified epitopes in liver biopsy specimens of alcoholic and nonalcoholic patients: localization and association with progression of liver fibrosis[J]. Hepatology, 1994, 19(2):367-374.
- [22] Niemela O, Parkkila S, Yla-Herttuala S, et al. Sequential acetaldehyde production, lipid peroxidation, and fibrogenesis in micropig model of alcohol-induced liver disease[J]. Hepatology, 1995, 22(4 Pt 1):1208-1214.
- [23] Tuma DJ, Thiele GM, Xu D, et al. Acetaldehyde and malondialdehyde react together to generate distinct protein adducts in the liver during long-term ethanol administration[J]. Hepatology, 1996, 23(4):872-880.
- [24] Setschedi M, Wands JR, Monte SM. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease[J]. Oxid Med Cell Longev, 2010, 3(4):178-185.
- [25] Kharbanda KK, Todero SL, Shubert KA, et al. Malondialdehyde-acetaldehyde-protein adducts increase secretion of chemokines by rat hepatic stellate cells[J]. Alcohol, 2001, 25(2):123-128.
- [26] Olynyk JK, Khan NA, Ramm GA, et al. Aldehydic products of lipid peroxidation do not directly activate rat hepatic stellate cells[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2002, 17(7):785-790.
- [27] Zamara E, Novo E, Marra F, et al. 4-Hydroxynonenal as a selective pro-fibrogenic stimulus for activated human hepatic stellate cells[J]. J Hepatol, 2004, 40(1):60-68.
- [28] Roman J, Gimenez A, Lluís JM, et al. Enhanced DNA binding and activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1 by acetaldehyde in HEPG2 cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(19):14684-14690.

(收稿日期:2012-09-23 修回日期:2012-10-25)

· 综 述 ·

## 超声微泡在肿瘤分子成像和治疗中的应用研究

欧阳紫兰 综述, 邱丽华, 高 志 审核

(重庆医科大学附属口腔医院口腔颌面外科/重庆市口腔疾病与生物医学研究中心 400015)

关键词: 超声微泡; 超声分子成像; 肿瘤治疗

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.04.044

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)04-0466-03

随着现代生物医学工程的不断发展,人类对医学诊断及治疗的技术不断完善,同时对其要求也逐步提高。在超声医学领域,超声微泡(ultrasound microbubbles, UM)是近年来发展速度较快的新型超声造影剂(ultrasound contrast agent, UCA),其实质是一种内含气体的微球,通过改变组织的超声特性提高诊断的灵敏度和特异性,可实现从分子水平对疾病进行精确诊断<sup>[1-2]</sup>,现已成为超声医学的热门课题。

自1968年有学者首次报道用吲哚菁绿和生理盐水/葡萄糖水制作的小气泡可增强心脏超声显影以来,其研究历史已有40余年,现已用于多种器官造影成像的实验研究<sup>[3-4]</sup>。此外,UM还被证实是药物和基因的良好、有效载体。载药微泡能显著提高靶部位的药物浓度,减少全身毒副作用;载基因微泡则能明显提高局部组织细胞的基因转染和表达<sup>[5-6]</sup>。目前,利用UM造影剂对体内组织、器官的微观病变进行分子成像,对疾病诊断、治疗及药物递送系统的深入研究均具有非凡的意义<sup>[7-8]</sup>。

### 1 UM 概述

近年来,UM因其安全、高效、简便、无创等众多优点,在肿瘤显影与药物、基因治疗等方面展现了巨大的应用潜力及实用价值。随着纳米技术的发展,UM与纳米技术的结合已成为研

究热点。纳米级UM穿透性高、稳定性强,具有聚集成像特性,能增加转染效率,为肿瘤诊断及治疗带来新希望和新方向<sup>[9-11]</sup>。

“空化效应”是其最重要的作用机制,也是液体中高强度超声应用的基础。在超声波作用下,微泡向血管壁移动并黏附,高频声波可使微泡产生不对称的膨胀和收缩,然后破裂、振动,瞬间释放能量,从而使得周围组织细胞受损,细胞壁和细胞膜出现可逆或不可逆的穿孔<sup>[12]</sup>。研究表明,UM可增加超声辐照时肝癌组织微血管的通透性,而微泡破裂引起的毛细血管破裂则有利于药物载体在靶组织中克服内皮屏障。

### 2 超声微泡造影及其应用

超声分子成像主要是因为微泡内含气体,利用声波对气体的反射远大于液体及微泡的非线性声学效应显影,进而达到诊断疾病的目的。近年来,应用UM进行肿瘤的超声造影成像(contrast-enhanced ultrasound, CEUS)已成为临床超声诊断方法中不可缺少的一部分<sup>[13-14]</sup>,UM分子成像技术也备受关注<sup>[15]</sup>。研究表明<sup>[9]</sup>,UM造影技术能有效增强多实质器官的二维灰阶显像,提高超声多普勒对血流信号的敏感性,提高肿瘤的分辨率,在肿瘤良、恶性的鉴别诊断上有重大意义。最近,Willmann等<sup>[16]</sup>利用双靶点靶向UM进行小鼠卵巢癌的显影,

结果表明此种微泡能更多地聚集于靶区,增强肿瘤的成像效果,更利于肿瘤的及时诊断。

主动/特异性靶向 UM,是经修饰处理后携带具有识别能力的抗体或其他配体的造影剂,可选择性地识别靶点并准确、特异地结合,达到靶向显影、给药治疗的目的。超声介导靶向微泡造影剂相较于普通微泡,能更好地聚集、结合至靶点,避免体内快速稀释,因此超声成像效果好、特异性强。研究表明,当组织处于炎症状态时,常表现为血管内皮细胞表面标志物异常,如 P-、E-选择素表达迅速增多等,若能制备相应的抗体或配体,就能使超声微泡更高效地结合至靶点,从而达到无创性评价局部炎症程度的目的。

### 3 UM 在介导药物或基因治疗肿瘤方面的研究应用

超声介导微泡造影剂不仅可以增强肿瘤显像效果,还可以对肿瘤进行靶向治疗。超声介导载基因/药物微泡在超声辐照下产生破裂,增强周围微血管壁和细胞膜的通透性(EPR 效应),加强基因/药物传输效率,增强治疗效果,可用于人体多种恶性肿瘤的治疗<sup>[17-19]</sup>。

**3.1 超声介导微泡破坏(UTMD)** 研究表明,UTMD 能靶向载送有治疗作用的基因或药物,利用“空化效应”提高局部药物浓度及基因转染率,延长药物的半衰期,减少用药量,减轻全身毒副作用,是一种新型的无创性靶向控释技术,现已成为研究热点。有学者将载入脂溶性药物的纳米微泡加入到体外培养的 C32 黑色素瘤细胞中,结合超声辐照,结果实验组细胞胞质内的药物浓度是对照组的 2 倍。有报道指出,超声照射可使裸露 DNA 对血管内皮细胞的转染率增强 10 倍,倘若再联合 UM 造影剂则转染率可增强至 3 000 倍。

**3.2 UTMD 在肿瘤治疗中的应用** 超声破坏微泡的过程中会出现相应的生物学效应,可诱导肿瘤细胞凋亡或增强其对治疗的敏感性,在相同辐照条件下,超声波对乳腺癌细胞的杀伤效应与微泡浓度呈正比关系。Aoia 等<sup>[20]</sup>用超声波辐照使微泡破裂,结果将单纯疱疹胸腺激酶基因成功地导入肿瘤细胞中以利于肿瘤治疗。此外,UM 联合基因治疗能够改变恶性肿瘤的表型,抑制肿瘤生长,改善局部微环境,增强抗肿瘤系统的功能。

众所周知,肿瘤的生长、发展与血供的好坏有着直接关系,而阻断其毛细血管的形成可导致肿瘤细胞缺血、缺氧,进而促使肿瘤细胞凋亡,抑制其生长、转移。Emoto 等<sup>[21]</sup>指出,将携带 TNF470(血管生成抑制剂)的 UM 定位至肿瘤血管内皮细胞上,再结合超声辐照,其肿瘤治疗效果明显增强。也有学者指出,UM 在低频低功率的超声波辐照下,能促使血管内皮细胞破坏,导致血栓形成的活化,进一步引起血管堵塞,限制恶性肿瘤局部的血流,阻断组织供血。Duvshani 等<sup>[22]</sup>将血管发生因子抑制剂输送到前列腺癌细胞内,结合治疗性超声的长时间辐照(20 min),可明显抑制癌细胞的扩增并诱导其凋亡。

**3.3 UM 靶向治疗** UM 靶向治疗的研究目前多集中于肿瘤等疾病。UM 经修饰处理后结合具有靶向识别能力的抗体或其他配体,并通过各种方式携带药物、基因或细胞因子,然后特异地结合至靶器官或靶组织并释放,通过 UTMD 及“空化效应”能有效地增强其治疗效果,并减少毒副作用的发生,是当下超声医学研究的热点之一。Tinkov 等<sup>[23]</sup>将自制阿霉素的脂质微泡结合超声照射应用于人肾癌细胞系,结果细胞的抗增殖能力比单纯使用阿霉素提高了 3 倍。

### 4 舌癌转移淋巴结的超声诊断及治疗

众所周知,舌癌多数为鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma, SCC),是人类颌面部发病率最高的恶性肿瘤,且易发生颈

部淋巴结及晚期远处转移<sup>[24]</sup>。舌癌患者一旦发生颈部淋巴结转移,则严重影响肿瘤的预后、TNM 分期及治疗方案。目前临床上尚没有满意的诊断和治疗方法,尤其在治疗方面主要以破坏性手术为主,严重影响患者术后的生存质量。

国内外关于舌癌颈部淋巴结的无创定性检查一直备受关注,但关于 UM 在头颈部恶性肿瘤颈部淋巴结诊断中的应用研究却相对缺乏。在淋巴结的诊断方面,超声造影是临床上最常用的无创性影像学检查方法,经济简便,尤其在区分正常、炎性增生与肿瘤转移淋巴结方面有其独特优势。目前,已有国外报道指出,经皮注射 UM 可显影肿瘤转移的前哨淋巴结。这为今后研究舌癌颈部淋巴结提供了新思路及影像学基础。

如何维持转移灶内持续有效的药物浓度,一直是治疗口腔癌颈部转移淋巴结的重大课题。随着对超声介导靶向微泡载药物/基因的深入认识,行药物性颈淋巴结清扫的靶向化疗,即将淋巴靶向载抗癌药物/基因微泡运送到转移灶内,以提高局部化疗药物的浓度和持续作用时间,提高基因转染率,已成为肿瘤淋巴结治疗的研究热门。

### 5 展 望

随着 UM 作为新型载体可行性研究的逐步深入,UTMD 技术增强基因转染及药物浓度机制认识的不断加深,超声介导靶向微泡在肿瘤诊断、治疗领域中的应用亦不断扩展。超声介导基因/药物微泡具有高效、微创、低毒、低免疫原性、可重复使用等突出优点,已成为肿瘤治疗中相当有潜力的新技术。但目前,尚缺乏关于靶向微泡应用于肿瘤诊断及治疗的大型动物模型的研究报道。因此,如何控制微泡的浓度、载药量和超声辐射的各参数,如何确保目标基因/药物在靶点安全、稳定、高效的表达等都是作者需要进一步解决的问题。此外,UTMD 技术所产生的生物效应及机械效应对机体组织也会产生一定的不良反应。有报道指出<sup>[25]</sup>,微泡破坏会引起血管内溶血、局部组织出血以及含气组织与器官损伤等不良反应。另外,UM 用于肿瘤诊断与治疗的研究大多还处在实验阶段,而将其实际应用于临床前还需进一步观察并提高其安全性、靶向性及稳定性。

### 参考文献:

- [1] 吴心云,王占科. 超声微泡及其在分子影像诊断和靶向治疗中的应用[J]. 现代诊断与治疗, 2011, 22(6): 353-357.
- [2] 刘瑶,吴小翎,王志刚. 超声微泡造影剂在肿瘤治疗应用中的进展[J]. 临床超声医学杂志, 2008, 2(10): 111-112.
- [3] 王岩,张汉阳,杨宇丹,等. 超声介导微泡造影剂在临床诊断及治疗中的作用[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(9): 1607-1609.
- [4] 肖雁冰,赵敏,高毅. L-S 靶向超声造影微泡淋巴结造影的实验研究[J]. 中国超声医学杂志, 2011, 27(9): 773-776.
- [5] 王志刚. 超声造影剂基础研究现状与进展[J]. 中华医学超声杂志, 2011, 8(5): 924-926.
- [6] 李华梅,张东生. 超声微泡造影剂在肿瘤诊断与治疗中的研究进展[J]. 东南大学学报: 医学版, 2009, 28(5): 435-438.
- [7] 刘吉斌,王金锐. 超声造影显像[M]. 北京: 北京科学技术文献出版社, 2010: 6.
- [8] Weissleder R. Ultrasound U molecular imaging[J]. Radiology, 2001, 219(2): 316-333.
- [9] 张森,郭燕丽,谭开彬,等. 自制纳米级超声微泡体外基本特性和肿瘤造影增强显影的实验研究[J]. 中华超声影像

- 学杂志, 2011, 20(10): 894-897.
- [10] Diaz-Lopez R, Tsapis N, Santin M, et al. The performance of PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as an ultrasound contrast agent[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(5): 1723-1731.
- [11] 王平, 尹庭辉, 郑荣琴. 新型纳米微泡超声造影剂的制备及超声显像研究[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2011, 32(3): 327-330.
- [12] Aaron FHL, Mark AB, Paul AD, et al. Ultrasound radiation force enables targeted deposition of model drug carriers loaded on microbubbles[J]. *J Control Release*, 2006, 11(1/2): 128-134.
- [13] Wilson SR, Burns PN. Microbubble-enhanced US in body imaging: what role[J]. *Radiology*, 2010, 257(1): 24-39.
- [14] Danila M, Popescu A, Sirlu R, et al. Contrast enhanced ultrasound (CEUS) in the evaluation of liver metastases[J]. *Med Ultrason*, 2010, 12(3): 233-237.
- [15] Deshpande N, Needles A, Willmann JK. Molecular ultrasound imaging: current status and future directions[J]. *Clin Radiol*, 2010, 65(7): 567-581.
- [16] Willmann JK, Lutz AM, Paulmurugan R, et al. Dual targeted contrast agent for US assessment of tumor angiogenesis in vivo[J]. *Radiology*, 2008, 248(3): 936-944.
- [17] 劳翼. 超声微泡造影剂携带基因和药物靶向治疗的研究进展[J]. *医学影像学杂志*, 2007, 17(12): 1359-1361.
- [18] Dai J, Zou S, Pei Y, et al. Polyethylenimine-grafted copolymer of poly(L-lysine) and poly(ethylene glycol) for gene delivery[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(6): 1694-1705.
- [19] Yang X, Zhu B, Dong T, et al. Interactions between an anticancer drug and polymeric micelles based on biodegradable polyesters[J]. *Macromol Biosci*, 2008, 8(12): 1116-1125.
- [20] Aoia X, Watanabe Y, Mori S, et al. Herpes simplex virus thymidine kinase mediated suicide gene therapy using nanomicrobubbles and ultrasound[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2008, 34(3): 425-434.
- [21] Emoto M, Tachibana K, Iwasak H, et al. Antitumor effect of TNP 470, an angiogenesis inhibitor, combined with ultrasound irradiation for human uterine sarcoma xenografts evaluated using contrast color doppler ultrasound[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(6): 929-935.
- [22] Duvshani M, Machluf M. Efficient transfection of tumors facilitated by long term therapeutic ultrasound in combination with contrast agent: from in vitro to in vivo setting[J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(3): 306-315.
- [23] Tinkov S, Coester C, Serba S, et al. New doxorubicin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy: in vitro characterization[J]. *J Control Release*, 2010, 148(3): 368-372.
- [24] Thomas J, Jeffrey N. Current management of advanced resectable oral cavity squamous cell carcinoma[J]. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2011, 4(1): 1-10.
- [25] Hernot S, Klivanov AL. Microbubbles in ultrasound triggered drug and gene delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(10): 1153-1166.

(收稿日期: 2012-09-25 修回日期: 2012-10-15)

· 综 述 ·

## 循环肿瘤细胞 $\gamma$ -H2AX 检测评估化疗疗效研究进展\*

寿 涛<sup>1</sup>, 汪晓洁<sup>1</sup>, 平竹仙<sup>2</sup>, 李丽华<sup>1</sup>, 曾 蓉<sup>1</sup>综述, 严新民<sup>1</sup>审校

(昆明理工大学附属昆华医院: 1. 肿瘤内科; 2. 检验科, 昆明 650032)

**关键词:** 循环肿瘤细胞; H2AX; 肿瘤

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2013. 04. 045

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)04-0468-03

作为目前肿瘤治疗主要手段之一的化疗应用广泛, 对其疗效的评价依据基于影像学肿瘤缩小而设计的 RECIST 标准, 一般在 2~4 个周期化疗后进行评估。姑且不论在影像学图像如 CT 片上进行测量, 容易产生对可评价病灶毫米级的测量出入, 以及存在于测量者与测量者之间的差异; 这样的以“周期”为测量单位跨度占据患者 28~84 d 的时间, 有的患者可能在第 1 周期就耐药, 有的患者转移可能已经发生, 有的患者可能错过最佳治疗时机等。由于有诸多的“可能”会发生, 因此, 需要更敏感、即时且更早期的评价指标以监测化疗患者的疗效。药物基因组学已经关注到个体药物代谢过程差异的多个环节, 并在 mRNA 或蛋白表达水平有了很多富有吸引力的研究结果预测疗效<sup>[1-2]</sup>, 评估指标多数都要求组织标本。而晚期或多程

化疗的患者, 要重复取材, 并以化疗“周期”为测量单位进行影像学检查, 不容易满足早期评估要求, 临床可操作性低, 实用价值有限。在这样的背景下, 探索外周血化疗疗效敏感指标, 在化疗单次给药后以“d”为测量单位, 调整下一周期的治疗方案, 抑或即时手术, 这样的指标将极具实际应用价值, 成为目前肿瘤治疗学中的一个研究热点。

### 1 组蛋白 H2AX 和循环肿瘤细胞

DNA 损伤修复在肿瘤耐药中起着重要作用, 如果因个体代谢差异导致肿瘤细胞对 DNA 损伤药物敏感程度不同, 或存在 DNA 修复差异, 那么敏感或修复能力弱的肿瘤细胞将会更多地被杀死。基于这样的共识, 参与 DNA 损伤早期反应的 H2AX, 即组蛋白 H2A 变体, 成为候选评估 DNA 损伤修复的