

专 家 介 绍

顾宁,男,东南大学教授、博士生导师,教育部长江学者特聘教授,国家杰出青年基金获得者。江苏省生物材料与器件重点实验室主任,苏州纳米科技协同创新中心纳米药物与医用材料专业中心主任。主要从事分子功能薄膜、纳米加工以及纳米材料制备、表征、及其在生物医(药)学领域中应用的研究。

现任国家纳米科技协调指导委员会专家组成员、国家重大科学仪器设备研制专项技术专家组成员、国家自然科学基金委员会信息学部咨询专家组成员。中国生物医学工程学会常务理事及纳米医学与工程分会主任委员、中国真空学会常务理事、中国抗癌协会纳米肿瘤学分会候任主任委员、中国微米纳米技术学会理事、江苏省生物医学工程学会理事长、多个国家或部门重点实验室的学术委员等。曾任教育部留学回国人员科研启动基金评审专家、国家重大科学研究计划“纳米研究”专家组专家等。担任多个国际学术刊物的评审专家,《东南大学学报(自然科学版)》、《国际生物医学工程杂志》、《中国生物医学工程学报》、《中国材料进展》、《SCIENCE CHINA MATERIALS》等期刊编委。

已在国内外核心期刊上发表论文 200 余篇,发明专利授权近 60 项。获国家自然科学基金二等奖、国务院政府特殊津贴、教育部首届青年教师奖、省部级科技进步奖数项、以及江苏省“333 高层次人才培养工程”首批中青年科技领军人才等鼓励。

基于微气泡的超声分子影像探针及其研究进展

段磊^{1,2},张宇璠²,顾宁^{1*}

¹东南大学生物电子学国家重点实验室,江苏省生物材料与器件重点实验室,生物科学与医学工程学院,江苏 南京 210009;

²南京医科大学基础医学院生物医学工程系,江苏 南京 211166)

[摘要] 微气泡是超声成像的传统造影剂,从而也成为超声分子成像中最重要的一类探针载体,多模态、多功能、智能化是微气泡类分子探针的发展趋势。近年来一批设计新颖、功能多样的微气泡类分子探针陆续出现,文章在阐述传统微气泡分子探针发展状况的基础上,对融合多种成像方式的多模态微气泡分子探针、诊疗一体化的多功能微气泡分子探针、由特殊病理环境触发的刺激响应型超声分子探针及组织穿透力更强的纳米尺度超声分子探针,在设计思路及研究现状等方面进行了综述。

[关键词] 分子影像探针;超声造影剂;微气泡;多模态;诊疗一体化

[中图分类号] R318.08

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)02-129-10

doi: 10.7655/NYDXBNS20170201

Progress in ultrasound molecular imaging probe based on microbubbles

Duan Lei^{1,2}, Zhang Yufan², Gu Ning^{1*}

¹State Key Laboratory of Bioelectronics, Jiangsu Key Laboratory for Biomaterials and Devices, School of Biological Science and Medical Engineering, Southeast University, Nanjing 210009; ²Department of Biological Medical Engineering, School of Basic Medical Sciences, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** Microbubble is a kind of traditional contrast agent for ultrasound imaging and also one of the most important probe carriers for ultrasound molecular imaging. The developing trend of molecular probes on microbubbles is to multimodal,

*通信作者(Corresponding author), E-mail: guning@seu.edu.cn

multifunctional and intelligent. Now there have been lots of novel and multifunctional molecular probes developed based on microbubbles in recent years. This review summarized the design and application of different types of ultrasound molecular probes. It includes multimodal molecular probes of various imaging modes, multifunctional molecular probes of integration of diagnosis and therapy, stimulated response ultrasound molecular probes triggered by special pathological conditions and enhanced tissue penetration ultrasound molecular nano-probes.

[Key words] molecular imaging probe; ultrasound contrast agent; microbubbles; multimodality; integration of diagnosis and therapy

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(02): 129-138]

重大疾病尤其是肿瘤的早期精确诊断是提高患者治愈率的关键,发展高精度与高灵敏度的诊断技术显得尤为重要。分子影像学可在细胞与分子水平对活体状态下的生物学进程进行监测与分析,其核心是高灵敏度、高分辨率的影像手段与高特异性、高亲和力影像探针的结合,可极大提高各种影像学方法在生物体内检测的广度与深度,从而及时反映疾病发生发展过程中生物体分子水平的变化,在重大疾病的早期诊断、个体化治疗方案的选择及疗效评价方面发挥着越来越重要的作用^[1-2]。

作为分子影像学的重要组成部分,超声分子影像学是将超声成像技术与超声分子探针结合起来,对活体生物进行细胞和分子水平上的定性和定量研究。与其他成像技术相比,超声诊断相对安全、轻便、快速、检测费用低,是目前全世界应用最广泛的医学诊断技术^[3-4]。微气泡超声造影剂的引入进一步提高了超声成像技术的灵敏度与准确度,使其在各种脏器的组织灌注、血管成像、炎症检测和肿瘤检测等方面,获得广泛的研究和临床应用^[5-7]。在此基础上,人们在微气泡造影剂的表面修饰特异性靶向分子或蛋白,构成了超声分子探针,这种基于微气泡的分子探针进入生物体之后,会与靶部位受体特异性结合,并通过血液循环在靶部位不断累积,导致正常组织与靶部位超声信号的明显差异,从而实现了超声分子成像^[8-9]。

由于微气泡类分子探针在超声分子成像过程中的特殊重要性,近来人们对它进行了更加深入的研究。例如,将微气泡超声造影剂与其他类成像造影剂结合之后再修饰靶向分子,构成多模态分子探针,能综合不同成像方式的优点,获得病灶部位更丰富的影像信息;在微气泡膜壳内装载药物或其他活性物质之后与靶向物质结合,构成多功能分子探针,可实现诊疗一体化;更深入地,在超声场或者其他能量场的作用下,可通过微气泡的精巧设计和精确控制,使以上多模态多功能分子探针到达靶向部

位之后,原位产生气泡或释放药物,进行成像和某些适应证的治疗;或者突破某些生物屏障(如血脑屏障),进行更高效的靶向诊疗。

本文主要对微气泡类超声分子影像探针的研究进展进行综述,从传统的微气泡超声分子探针、多模态微气泡分子探针、多功能微气泡分子探针、以及一些设计新颖的诊疗一体化超声分子探针等几个方面展开详细介绍,并对微气泡超声分子探针的发展进行展望。

1 微气泡超声分子探针

微气泡超声分子探针由两部分物质结合而成,一部分是能够有效增强超声信号的微气泡造影剂,另一部分是能与待测靶标特异性结合的靶向物质,如多肽、蛋白、抗体等。这两部分物质的融合,使得超声分子探针可以快速准确地与靶标物质偶联并富集,精确地在靶部位进行超声信号的放大,极大提高了超声成像的敏感性和特异性。

1.1 微气泡造影剂

微气泡(microbubbles)在诊断超声频率下具有良好的超声回波反射能力,是一种常用的超声成像造影剂,由疏水气体和稳定的包膜材料形成,根据包膜材料的不同可以分为脂质微气泡、聚合物微气泡、表面活性剂微气泡和白蛋白微气泡。其在超声作用下增强图像的原理主要体现在增强背向散射信号、改变介质的声衰减信号、在超声场作用下产生丰富谐波信号等,可明显提高超声诊断图像的分辨率、敏感性和特异性^[10]。

传统的微气泡通常是指微米级气泡,粒径在 1~8 μm 之间,可通过毛细血管网进行血管成像,造影效果良好,但无法透过血管壁进入组织内部,因此限制了其应用范围。随着微气泡制备工艺的不断发展,出现了纳米级气泡造影剂^[11-14],其粒径通常在 700 nm 以下,有良好的体内稳定性,可透过血管内皮到达组织间隙,从而实现了组织成像,但由于粒

径减小,其对超声信号的增强作用大大降低^[15]。因此,需要根据不同的应用领域,综合考虑穿透能力和成像效果等多方面因素,选择合适粒径的造影剂进行超声图像增强。

1.2 靶向物质

为使微气泡造影剂进入生物体后,主动、迅速、高效、稳定地在靶部位成像,需要在其表面偶联靶向物质。由于常规微气泡的微米级尺寸,其更适用于进行血管和淋巴管的分子成像,因此靶向物质的选择也要与之相适应。肿瘤早期最重要的事件之一是肿瘤新生血管的生成,它是肿瘤细胞、血管内皮细胞与其微环境通过肿瘤血管生成因子发生相互作用的结果。研究表明,有两种具有代表性的靶向因子与肿瘤新生血管相关,一种是 VEGFR2,它是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)发挥促进肿瘤血管生成作用的主要受体^[16-17];另一种是整合素 $\alpha_v\beta_3$,它是一种跨膜黏附受体,主要表达在肿瘤的新生血管内皮和细胞上,能够与含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸核心序列的多肽相结合^[18-19]。因此,靶向于 VEGFR2 和 $\alpha_v\beta_3$ 的超声造影剂可实现肿瘤新生血管的分子造影,是目前肿瘤超声分子成像研究中的热点^[20]。例如全球首个用于临床实验的微气泡超声分子造影剂 BR55^[21-24],表面装载的即是可与 VEGFR2 特异结合且免疫原性极低的脂肽,将其应用于结肠癌的动物移植瘤实验,结果表明与没有靶向性的微气泡造影剂相比,可将超声信号强度提高 3 倍,且其在移植瘤中产生的超声信号强度是正常肌肉组织中的 20 倍,临床实验研究也显示 BR55 能够提高前列腺癌的检出率。

1.3 结合方式

微气泡与靶向分子的结合方式主要有共价结合、非共价结合两大类。共价结合是指当靶向分子为碳水化合物、激素、肽段等小分子配体时,可以通过离子键、偶联剂或桥连剂与微气泡结合。例如希望将 RGD 与微气泡偶联,可以在微气泡表面引入羧基,如此就可以在 NHS 与 EDC 的活化作用下,使微气泡表面的羧基与 RGD 上的氨基共价结合。研究表明,共价结合时,在微气泡外壳与靶向分子之间采用多聚物隔离臂(如聚乙二醇),可以使靶向分子充分暴露在微气泡表面,保证了靶向分子的完整性和活性,其靶向性优于将靶向分子直接连接到微气泡外壳的方式^[25]。非共价结合多采用生物素-亲和素复合体,适用于不能耐受微气泡制备过程中速度、温度等条件变化的抗体等大分子配体。生物素-

亲和素复合体可极大地提高检测敏感性,也能够一定程度延缓巨噬细胞对微气泡造影剂的清除作用,是一种非常有效的靶向结合系统。

1.4 应用领域

目前微气泡分子探针主要应用于肿瘤血管、血栓、缺血再灌注损伤、动脉粥样硬化斑块、炎症等方面的研究。Ellegala 等^[26]将能与 $\alpha_v\beta_3$ 发生特异性结合的物质偶联到脂质微气泡表面并应用于大鼠胶质瘤模型,显示出良好的肿瘤血管或肿瘤周边组织的靶向效果。为进一步提高超声分子成像的信号,人们还探索了双靶向乃至多靶向的超声造影微气泡,Willmann 等^[27]成功制备了同时携带抗 VEGFR2 单抗和抗 $\alpha_v\beta_3$ 单抗的双靶向微泡,其在动物移植瘤模型中的超声信号强度要明显强于单靶向超声微气泡。此外,将 E-选择蛋白、P-选择蛋白、细胞内黏附分子 ICAM-1 或 VCAM-1 连接到微气泡表面,可进行早期炎症反应或缺血再灌注损伤的早期诊断^[28-30]。

2 多模态微气泡分子探针

2.1 多模态成像分子探针

现有的各种分子影像技术各有优缺点,与各种分子成像技术相匹配的分子探针,在尺寸大小、靶向因子种类及偶联方式、穿透能力、分辨率方面也存在很大差异,如果能将不同种影像方法使用的造影剂联合装载,再选择合适的靶向分子与之结合,就可以实现在一种复合型分子探针平台上,进行多模态分子成像的目的,这样就可以综合不同影像学成像方式的优点,获得更为丰富、全面、准确的检测信息。微气泡超声造影剂具有可修饰的多功能膜壳结构,可方便地装载其他造影剂成分、靶向分子及药物,因此基于微气泡的多模态分子探针近年来获得了迅速发展。

2.2 超声/磁共振双模式成像

超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO) 纳米颗粒是一种磁共振成像常用造影剂,主要缩短磁共振成像的 T_2 弛豫时间,对 T_1 弛豫时间影响较小^[31-32],其造影效果受颗粒尺寸、表面修饰的物质等因素的影响^[33-34]。SPIO 纳米颗粒具有生物相容性好、表面修饰方便等优点,因而在临床医学中有良好的应用前景。目前已有多种 SPIO 被批准用于临床磁共振造影^[35-38]。

本课题组^[39]首次将 SPIO 嵌入到聚合物微气泡膜壳材料中,制备了可实现超声和磁共振双重显影

效果的微气泡造影剂,并证实通过优化微气泡膜壳中装载的 SPIO 纳米颗粒含量,能够保证微气泡在具有超声显影增强能力的前提下,进行更有效的磁共振增强显影。此后,又将 SPIO 装载于聚合物微气泡膜壳表面^[40-41],发现在 SPIO 种类、尺寸、数量相同的情况下,将其装载于微气泡膜壳表面比嵌入膜壳内部具有更强及更长效的超声/磁共振成像增强效果。进一步地,在这种表面装载 SPIO 的微气泡上偶联了一种可特异性结合肿瘤新生血管内皮细胞并诱导其凋亡的 RGD-L-TRIAL 蛋白,形成了磁性微气泡分子探针^[42],并将此探针应用于裸鼠结肠癌移植瘤的研究,证实了其体内超声/磁共振双模态成像、靶向及治疗肿瘤的功能。

2.3 超声/光学双模式成像

光学分子成像因具有无创、高安全、高敏感性等优点而得到了较为广泛的应用,近年来,基于荧光染料、金、银等贵金属纳米材料,量子点等的光学分子成像探针迅速发展起来,例如 Gao 课题组^[53]首先用偶联了特异性肿瘤靶向配体的量子点在荷瘤裸鼠体内进行了荧光成像,发现量子点能聚集到肿瘤组织周围,这样就可以通过荧光成像实时获得肿瘤大小及定位的信息,Baskakov 课题组^[54]首次将银纳米簇应用到光学成像领域;Liu 等^[55]将金纳米簇应用于人类干细胞双光子成像。

将光学分子探针与微气泡结合可构成光学/超声多模态成像探针,如结合了荧光染料的微气泡可以用于定量检测微气泡上活性物质的含量,也可以用于研究微气泡的体内分布,这些染料还可作为模型药物检测微气泡的包封率及药物释放情况。Fokong 等^[56]将两种性质不同的染料(一种是亲水罗丹明,一种是疏水香豆素)作为模型药物装载于聚合物微气泡膜壳中,并在微气泡表面修饰了靶向于 VEGFR2 的单抗,形成光学/超声多模态分子探针。荧光显微镜下可以清晰地从颜色区分出不同染料在微气泡膜壳的分布情况,在荷瘤动物体内试验中,也可以直观地通过成像颜色观察到微气泡在肿瘤内部及血管中的分布,以及超声场作用下微气泡破裂,染料从微气泡中释放的情况。Yang 等^[57]将银纳米颗粒装载到聚合物微气泡膜壳中制备了光学/超声双模式成像造影剂,研究表明纳米银的加入可以增强微气泡的超声成像效果,同时可在暗场下显影并具有拉曼增强的效果,当微气泡经超声破泡之后,携带的纳米银被特异性转移入细胞中后,细胞内的一些特异性分子还能够通过拉曼增强获得相

关分子信息。

2.4 超声/光声双模式成像

新近迅速发展起来的光声成像是一种以超声作为媒介的无损生物光子成像法。当短脉冲激光辐照到生物组织时,生物组织的光吸收域会产生超声信号,这种由光激发产生的超声信号就是光声信号。用超声探测器探测光声信号,可以重建生物组织的光吸收分布图像。光声成像综合了纯光学成像高对比度和纯超声成像强穿透性的优点,可得到高分辨率的组织图像。在光声成像过程中,结合光声成像探针可以有效增强光声影像的检测灵敏度,将原本以形态检测为主的结构成像扩展至功能性分子成像。目前用作光声成像探针的载体有金纳米棒、金纳米笼、碳纳米管、CuS 纳米颗粒等^[43-48]。

将光声成像与超声成像结合进行双模式成像的研究还处于起步阶段,Dixon 等^[49]近期将金纳米棒组装在微气泡的表面,在毫微秒脉冲激光的激发作用下,可以产生高强度的光声信号,将其应用于鼠肾脏模型,可以进行光声/超声双模式成像。此外,也有一些将超声与光声信号结合进行用于静脉血栓和前哨淋巴结成像的初步报道^[50-52]。

2.5 超声/核素双模式成像

PET/SPECT 是目前最成熟的分子影像技术,具有灵敏度高、可定量等优点,其探针是一些放射性核素,如 ¹⁸F-氟代脱氧葡萄糖。用放射性同位素标记的微气泡可以进行 PET/SPECT 及超声的联合成像,可应用于研究静脉注射后微气泡的体内分布情况^[58-60]。与光学成像相比,核素成像的影像结果更加精确可靠,Palmowski 等^[59]用 ¹¹¹In 标记了聚合物微气泡,研究了静脉注射 48 h 之内不同时间点,荷瘤鼠肝、脾、肺、肾、血液及肿瘤中的 SPECT/超声成像情况,用于评价微气泡的动力学代谢过程。Tartis 等^[58]将 ¹⁸F 标记在脂质类微气泡上,并进行了相似的双模态成像研究。

综上所述,微气泡超声造影剂,特别是聚合物及脂质类微气泡,由于具有相对较厚、易修饰、生物相容性良好的膜壳,可以被作为一个平台装载不同类型的造影剂,从而实现多模式成像。典型地,Teraphongphom 等^[61]将包括量子点、金、氧化铁在内的 3 种纳米粒子分别装载于聚合物微气泡的膜壳内,分别进行了光学/超声、CT/超声、磁共振/超声成像,从而获得了丰富的影像信息。同时,在多模态成像造影剂基础上偶联靶向分子,可以实现更精确的分子成像,这种集丰富性与精准性于一体的多模态分子

成像探针,是目前分子影像研究的热点。

3 多功能微气泡分子探针

3.1 微气泡的治疗功能

微气泡潜在的治疗功能近些年逐渐被研究者发掘,微气泡的治疗功能主要体现在两个层次,其一,微气泡适宜的膜壳结构不仅可以作为其他类型造影剂的载体,也可以装载药物、基因、蛋白等活性物质,这些物质或者嵌入膜壳内部,或者偶联在膜壳表面,甚至包裹于内部气体腔中,可随靶向微气泡到达病灶部位,这是微气泡实现治疗功能的基础。其二,研究表明,当在低声压(<0.1 MPa)作用下时,微气泡有规律的伸缩振动能对超声波进行回波反射,从而用于微气泡超声显影成像;当在高声压(>0.1 MPa)作用下时,微气泡会由于剧烈的伸缩振动而发生破裂,产生的能量导致微气泡周围的生物组织出现热效应、声穿孔等生物效应,从而阶段性地增强临近组织与细胞的通透性^[62]。因此,通过对超声能量的调节,可以使微气泡完成造影功能之后迅速破裂并释放出活性成分,在高强度超声能量介导的生物效应作用下,更方便地通过细胞膜进入细胞内,或者通过某些生物屏障(如血脑屏障)定向释放到局部病变组织,从而增强活性成分的渗透和吸收作用,发挥更好的治疗效果,这是微气泡治疗功能的有效保证。

3.2 诊疗一体化微气泡分子探针

将微气泡的超声成像与治疗功能结合起来,可形成诊疗一体化微气泡载体系统,对此系统的研究一开始集中于探索微气泡与药物结合的方式与方法,药物的结合效率及释放情况。聚合物类微气泡因具有更厚的壳膜被认为是更有效的药物传输载体,从而进行了较多研究。药物等有效治疗成分可以在微气泡制备过程中作为原料加入(一步法),也可以在微气泡合成之后进行偶联(二步法)。有研究证实了不论用一步法还是两步法,阿霉素和紫杉醇都可以有效装载到以 PLGA 为模材的聚合物微气泡上,并在体外用超声场介导了微气泡上两种药物的释放^[63-64]。Fokong 等^[56]将亲水性和疏水性的两种荧光染料作为模型药物分别装载于 PBCA 靶向微气泡膜壳内,通过光学成像清晰地观察到了药物在微气泡膜壳上的分布情况,及超声场介导下这些药物在荷瘤鼠体内的释放情况。此外,Kooiman 等^[65]将亲脂性的药物苏丹黑溶于十六烷油后置于聚合物微气泡的气体核中。另外一种比较新颖的载药方式是将

药物先装载于脂质体中,然后通过二步法偶联于微气泡表面,这种设计方法可以显著提高每个微气泡上的药物装载量^[66-67]。

近来,对微气泡载药体系的研究逐渐深入及多元化,人们开始探索不同类型的微气泡载药系统。Chih-Kuang Yeh 课题组建立了基于脂质微气泡的多功能载药平台,并在高强度聚焦超声的介导下将其应用于脑神经胶质瘤的诊疗,进行了一系列的研究^[68-70]。他们首先制备了能够高效包封卡莫司汀药物的脂质微气泡,并证实了在高强度聚焦超声的作用下,微气泡释放的药物可透过荷瘤动物的血脑屏障进入脑部病灶发挥药效,显著提高肿瘤抑制率^[68];接着,在这种载药脂质微气泡的表面偶联了靶向于 VEGFR2 的抗体,构建了特异性的分子探针,当高强度聚焦超声打开血脑屏障之后,载药微气泡可在特异性抗体的作用下迅速靶向肿瘤部位,进一步提高了化疗药物在瘤区的累积量和作用时间,取得了更好的治疗效果^[69];另一方面,他们还引入了多模态成像及磁靶向的概念,在载药微气泡膜壳上结合了超顺磁性氧化铁纳米颗粒 SPIO,这样的载药系统不仅具备了超声/磁共振双模态成像功能,还综合了磁场引导下靶向、超声场介导下药物可控释放的能力^[70],这种多功能的诊疗一体化脂质微气泡在脑部肿瘤的诊疗方面极具潜力。

随着体内试验的逐步展开,人们发现在复杂多变的体内微环境中,实现兼具高诊断灵敏性、高特异性及良好治疗效果的靶向系统是非常有挑战性的,特别是对于微米级的靶向系统,更需要对探针结构进行精细的设计和构建,充分发挥结构特点及综合利用各种外部能量,才能提高活性物质到达靶区的量。本课题组^[42]近来构建了一种 RGD-L-TRIAL 蛋白标记的多梯度连续靶向型磁性微气泡分子探针,并将其用于结肠癌的诊疗(图 1)。这种探针具有复杂而精细的多层结构:用于增强超声成像的气体内核,模壳上用于磁靶向及增强磁共振成像的 SPIO,及最外层具有特异性结合肿瘤新生血管内皮细胞并诱导其凋亡能力的 RGD-L-TRIAL。在体内实验过程中,首先,微气泡模壳表面的 SPIO 可以发挥磁靶向功能,而 SPIO 上修饰的 RGD-L-TRIAL 可以发挥分子靶向的作用,双重靶向作用下微米级的 RGD-L-TRIAL@MMBs 可迅速通过血液循环,聚集于肿瘤部位,此时可以进行实时的超声/磁共振双模式造影,提高诊断的准确型,这是一种微米尺度的靶向与诊断;其次,在微气泡破裂之后,其表面装载的 SPIO

被释放，在其纳米级尺寸带来的 EPR (enhanced permeability and retention effect) 效应和其上修饰的 RGD-L-TRAIL 蛋白的主动靶向作用下, SPIO 可以通过血管壁到达肿瘤组织, 再次发挥磁共振造影甚至是热疗的功能, 同时, RGD-L-TRAIL 也将有效地被肿瘤细胞通过整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的黏附作用内吞, 继而诱导肿瘤细胞凋亡, 从而提高肿瘤治疗的效果, 这

是一种纳米尺度的靶向与诊疗。同时, 由于 SPIO 仍然保留在肿瘤组织中, 此后不需要注射其他造影剂, 仍可以增强 MRI 成像质量, 来准确评价肿瘤的治疗效果。这种多梯度连续靶向型分子探针结构合理、载药剂量可调、作用目标精确、发挥效用时间可控, 为多功能微气泡分子探针的体内应用打下了基础。

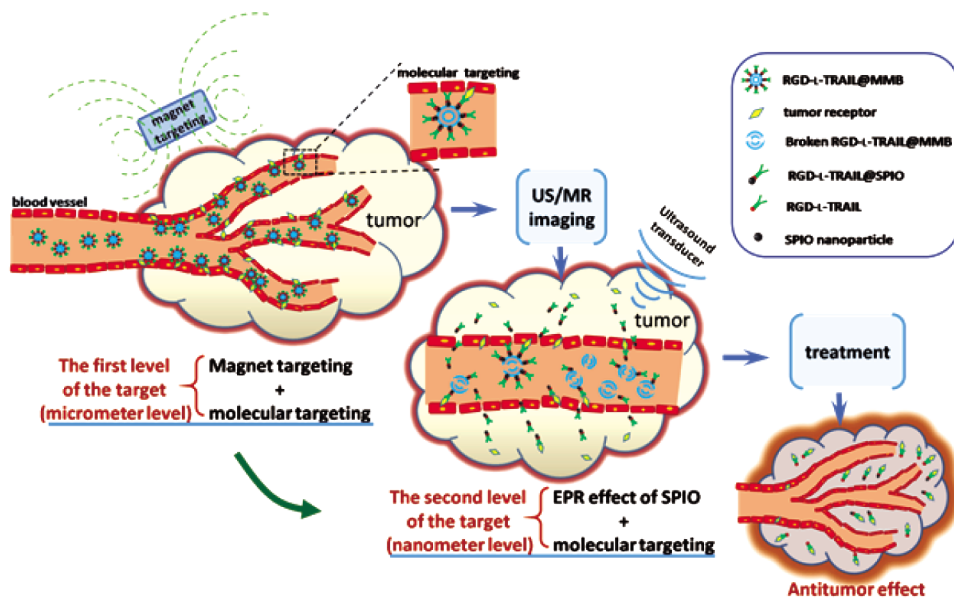


图 1 RGD-L-TRAIL 蛋白标记的多梯度连续靶向型磁性微气泡分子探针体内作用示意图^[42]

Figure 1 Schematic diagram showing multi-gradient targeting strategy of RGD-L-TRAIL@MMBs for the tumor diagnostics and therapy

4 其他新型超声分子探针

最近, 还出现了一些设计更为新颖, 由生物体内部的特殊病理环境触发, 从而在体或原位产生气泡进行超声成像、药物释放的多功能分子探针。例如, 疾病或外界物质的引入会引起人体内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生, H_2O_2 作为 ROS 的一种, 是某些疾病发生发展过程中的诊断标记物。研究发现普鲁士蓝纳米颗粒在中性环境条件下具有类过氧化氢酶的作用, 可催化 H_2O_2 产生氧气^[71], 当产生的氧气超过饱和浓度后能形成氧气自由气泡, 可增强超声成像效果, 加上普鲁士蓝纳米颗粒本身的磁共振显影作用, 可作为一种由疾病环境触发的超声/磁共振双模态成像系统^[72]。类似的, Wang 等^[73]构建了装载两种过氧化氢酶和 SPIO 的多功能载体系统, 两种酶会催化病理条件下体内的活性氧反应产生氧气, 从而进行超声成像, 同时反应环境的变化也增强了体系中 SPIO 的磁共振显影能力。本课题组^[74-75]近来构建一种内部装载 L-精氨

酸, 膜壳中结合 SPIO, 表面偶联葡萄糖氧化酶的复合微囊结构 (图 2), 它是一种葡萄糖和外磁场双响应的微囊输送系统, 首先微囊表面的葡萄糖氧化酶可与糖尿病患者体内的葡萄糖特异性反应, 减低葡萄糖浓度的同时生成 H_2O_2 和葡萄糖酸, 其次微囊膜壳中的磁性纳米颗粒在外磁场的作用下运动使膜壳产生空隙, 内部装载的 L-精氨酸与 H_2O_2 接触进一步发生特异性反应生成 NO。最终, 通过微囊结构对葡萄糖和磁场的双响应, 一方面, 有效减低高糖水平下的葡萄糖浓度, 另一方面, 生成的 NO 气体可发挥其超声成像和相应的疾病治疗功能, 再者, 系统中的 SPIO 除了响应外磁场, 也有 MRI 成像的功能。此系统可作为有效调控血糖的多功能载体平台。

此外, 为了进一步提高超声造影剂的组织穿透能力, 体积更小的纳米级超声分子探针开始进入人们视野, 然而尺寸减小会减弱其对超声信号的响应能力, 为了解决超声增强水平与组织穿透能力之间的矛盾, 出现了一些有益的设计思路。Lee 等^[76]制备了包裹液态氟碳的纳米液滴, 其中也装载了磁性纳

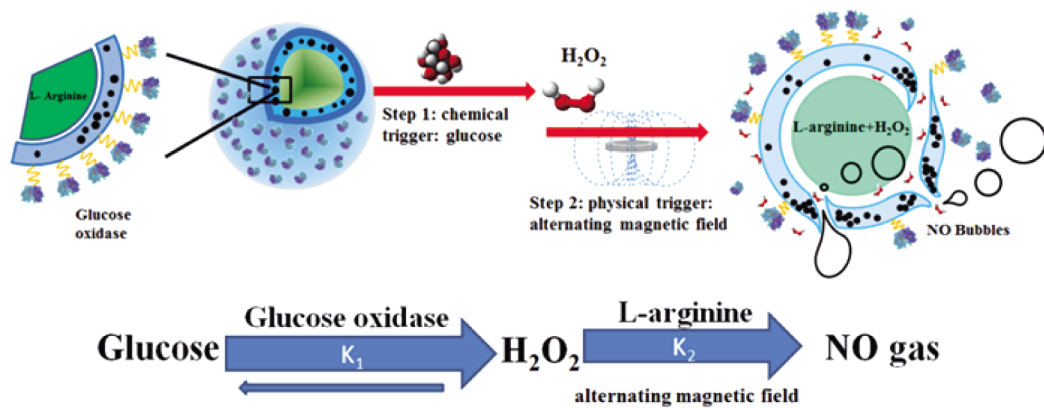


图 2 葡萄糖-磁场双响应一氧化氮气泡控制释放系统示意图^[75]

Figure 2 Schematic diagram of microvesicles encapsulated magnetic nanoparticles and glucose oxidase for dual-stimuli responsive programmable delivery model

米颗粒与脂溶性药物。这种多功能纳米液滴的特殊之处在于,外部环境不变时,其纳米级尺度和内部的液态环境使其保持了良好的稳定性和组织穿透能力,当到达病灶部位后,在超声能量介导、外界温度变化等条件下,其内部的液态氟碳会发生液相到气相的转变,体积也相应增加,从而产生良好的超声成像效果,最后气泡破裂,携带的药物还可以在靶区释放发挥协同治疗作用。

以上这些不同于传统的,设计巧妙精细的新型超声分子探针的出现,为超声成像领域的研究提供了新思路,推动了这一领域的蓬勃发展。

5 展 望

分子探针的特异性、灵敏度及智能化极大影响分子成像的效果。微气泡作为超声分子成像中最重要的一类探针载体,近年来受到了广泛关注与深入探索。综合了其他成像方式的多模态微气泡探针,及诊疗一体化的多功能微气泡探针,因为兼具多模态成像、靶向及治疗的功能更是目前研究的热点。此外,由特殊病理环境触发的刺激响应型超声分子探针及组织穿透力更强的纳米尺度超声分子探针也极具前景。

尽管多模态化、多功能化、智能化是此领域大势所趋,然而目前相关研究仍处于起步阶段。许多新颖的探针设计思路正被提出与尝试,但其功能的整合带来了结构上的复杂性,在体内复杂多变的微环境中,越复杂的结构存在越多风险,从而很难实现预期功能。因此,一方面需要对探针的制备进行深入研究与优化,提高其精细度、可控性与可重复性;另一方面需进一步探明探针结构对功能的影

响,如膜壳材料、尺寸、载药方式、靶标类型等对成像及靶向效果的影响;此外,需要进行更多的体内实验,明确探针在体内的传输、分布、靶向、释药物作用过程,为探针的临床应用积累丰富的佐证和依据。

可以预期的是,随着分子影像学和生物医学纳米技术的不断发展,必将会有更多设计新颖、功能更加强大的分子探针出现,进一步推动超声分子影像领域焕发新的活力。

[参考文献]

- [1] Weissleder R. Molecular imaging in cancer[J]. Science, 2006,312(5777):1168-1171
- [2] Herschman HR. Molecular imaging: Looking at problems, seeing solutions[J]. Science, 2003,302(5645):605-608
- [3] Metoki R, Moriyasu F, Kamiyama N, et al. Quantification of hepatic parenchymal blood flow by contrast ultrasonography with flash-replenishment imaging[J]. Ultrasound Med Biol, 2006,32(10):1459-1466
- [4] Jansson T, Persson HW, Lindstrom K. Estimation of blood perfusion using ultrasound[J]. Proc Inst Mech Eng H, 1999,213(2):91-106
- [5] Abramowicz JS. Ultrasonographic contrast media: Has the time come in obstetrics and gynecology[J]. J Ultras Med, 2005,24(4):517-531
- [6] Barua A, Abramowicz JS, Bahr JM, et al. Detection of ovarian tumors in chicken by sonography: A step toward early diagnosis in humans[J]. J Ultras Med, 2007,26(7):909-919
- [7] Roy C, Gengler L, Sauer B, et al. Role of contrast enhanced US in the evaluation of renal tumors[J]. J Radiol, 2008,89(11):1735-1744
- [8] Ellegala DB, Poi HL, Carpenter JE, et al. Imaging tumor

- angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to α (v) β (3)[J]. *Circulation*, 2003, 108(3):336-341
- [9] Jun HY, Park SH, Kim HS, et al. Long residence time of ultrasound microbubbles targeted to integrin in murine tumor model[J]. *Acad Radiol*, 2010, 17(1):54-60
- [10] Shoros V. Response of contrast agents to ultrasound[J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2008, 60(10):1117-1136
- [11] Yin T, Wang P, Zheng R, et al. Nanobubbles for enhanced ultrasound imaging of tumors[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7:895-904
- [12] Fan X, Wang L, Guo Y, et al. Experimental investigation of the penetration of ultrasound nanobubbles in a gastric cancer xenograft [J]. *Nanotechnology*, 2013, 24(32):325102
- [13] 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):1147-1158
- [14] Rapoport N, Gao Z, Kennedy A. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy[J]. *Natl Cancer Inst*, 2007, 99(14):1095-1106
- [15] Son S, Min HS, You DG, et al. Echogenic nanoparticles for ultrasound technologies; Evolution from diagnostic imaging modality to multimodal theranostic agent [J]. *Nano Today*, 2014, 9(4):525-540
- [16] Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(10):795-803
- [17] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor; Basic science and clinical progress[J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(4):581-611
- [18] Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin α v β 3 for angiogenesis[J]. *Science*, 1994, 264(5158):569-571
- [19] Hood JD, Cheresh DA. Role of integrins in cell invasion and migration[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(2):91-100
- [20] Somanath PR, Malinin NL, Byzova TV. Cooperation between integrin α (nu) β (3) and VEGFR2 in angiogenesis[J]. *Angiogenesis*, 2009, 12(2):177-185
- [21] Pochon S, Tardy I, Bussat P, et al. BR55: A lipopeptide-based VEGFR2-targeted ultrasound contrast agent for molecular imaging of angiogenesis[J]. *Invest Radiol*, 2010, 45(2):89-95
- [22] Tardy I, Pochon S, Theraulaz M, et al. Ultrasound molecular imaging of VEGFR2 in a rat prostate tumor model using BR55[J]. *Invest Radiol*, 2010, 45(10):573-578
- [23] Pysz MA, Foygel K, Rosenberg J, et al. Antiangiogenic cancer therapy; Monitoring with molecular US and a clinically translatable contrast agent (BR55)[J]. *Radiology*, 2010, 256(2):519-527
- [24] Bzyl J, Palmowski M, Rix A, et al. The high angiogenic activity in very early breast cancer enables reliable imaging with VEGFR2-targeted microbubbles(BR55)[J]. *Eur Radiol*, 2013, 23(2):468-475
- [25] Klibanov AL. Preparation of targeted microbubbles; ultrasound contrast agents for molecular imaging[J]. *Med Biol Eng Comput*, 2009, 47(8):875-882
- [26] Ellegala DB, Poi HL, Carpenter JE, et al. Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to α (v) β (3)[J]. *Circulation*, 2003, 108(3):336-341
- [27] 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
- [28] Takalkar AM, Klibanov AL, Rychak JJ, et al. Binding and detachment dynamics of microbubbles targeted to P-selectin under controlled shear flow[J]. *J Control Release*, 2004, 96(3):473-482
- [29] Weller GER, Villanueva FS, Klibanov AL, et al. Modulating targeted adhesion of an ultrasound contrast agent to dysfunctional endothelium[J]. *Ann Biomed Eng*, 2002, 30(8):1012-1019
- [30] Kiessling F, Foking S, Bzyl J, et al. Recent advances in molecular, multimodal and theranostic ultrasound imaging [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2014, 72:15-27
- [31] Weinmann HJ, Ebert W, Misselitz B, et al. Tissue-specific MR contrast agents[J]. *Eur J Radiol*, 2003, 46(1):33-44
- [32] Kubaska S, Sahani DV, Saini S, et al. Dual contrast enhanced magnetic resonance imaging of the liver with superparamagnetic iron oxide followed by gadolinium for lesion detection and characterization [J]. *Clin Radiol*, 2001, 56(5):410-415
- [33] Jun YW, Huh YM, Choi JS, et al. Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(16):5732-5733
- [34] Duan H, Kuang M, Wang X, et al. Reexamining the effects of particle size and surface chemistry on the magnetic properties of iron oxide nanocrystals; New insights into spin disorder and proton relaxivity [J]. *J Phys Chem C*, 2008, 112(22):8127-8131
- [35] Shamsi K, Balzer T, Saini S, et al. Superparamagnetic iron oxide particles (SH U 555 A); Evaluation of efficacy in three doses for hepatic MR imaging [J]. *Radiology*, 1998, 206(2):365-371
- [36] Gossein Y, Gillis P, Hocq A, et al. Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles [J]. *Wires Nanomed Nanobi*, 2009, 1(3):299-310

- [37] Roch A, Muller RN, Gillis P. Theory of proton relaxation induced by superparamagnetic particles [J]. *J Chem Phys*, 1999, 110(11): 5403–5411
- [38] Corot C, Robert P, Idee JM, et al. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58(14): 1471–1504
- [39] Yang F, Li Y, Chen Z, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-embedded encapsulated microbubbles as dual contrast agents of magnetic resonance and ultrasound imaging[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(23-24): 3882–3890
- [40] He W, Yang F, Wu Y, et al. Microbubbles with surface coated by superparamagnetic iron oxide nanoparticles[J]. *Mater Lett*, 2012, 68: 64–67
- [41] Duan L, Yang F, Song L, et al. Controlled assembly of magnetic nanoparticles on microbubbles for multimodal imaging[J]. *Soft Matter*, 2015, 11(27): 5492–5500
- [42] Duan L, Yang F, He W, et al. A multi-gradient targeting drug delivery system based on RGD-L-TRAIL-Labeled magnetic microbubbles for cancer theranostics[J]. *Adv Funct Mater*, 2016, DOI: 10.1002/adfm.201603637
- [43] Agarwal A, Huang SW, O'Donnell M, et al. Targeted gold nanorod contrast agent for prostate cancer detection by photoacoustic imaging [J]. *J Appl Phys*, 2007, 102(6): 064701
- [44] Li PC, Wang CRC, Shieh DB, et al. In vivo photoacoustic molecular imaging with simultaneous multiple selective targeting using antibody-conjugated gold nanorods[J]. *Opt Express*, 2008, 16(23): 18605–18615
- [45] Cai X, Li W, Kim CH, et al. In vivo quantitative evaluation of the transport kinetics of gold nanocages in a lymphatic system by noninvasive photoacoustic tomography [J]. *ACS Nano*, 2011, 5(12): 9658–9667
- [46] Kim C, Cho EC, Chen J, et al. In vivo molecular photoacoustic tomography of melanomas targeted by bioconjugated gold nanocages [J]. *ACS Nano*, 2010, 4(8): 4559–4564
- [47] De La Zerda A, Zavaleta C, Keren S, et al. Carbon nanotubes as photoacoustic molecular imaging agents in living mice [J]. *Nat Nanotechnol*, 2008, 3(9): 557–562
- [48] Ku G, Zhou M, Song S, et al. Copper sulfide nanoparticles as a new class of photoacoustic contrast agent for deep tissue imaging at 1 064 nm [J]. *ACS Nano*, 2012, 6(8): 7489–7496
- [49] Dixon AJ, Hu S, Klivanov AL, et al. Oscillatory dynamics and *in vivo* photoacoustic imaging performance of plasmonic nanoparticle-coated microbubbles [J]. *Small*, 2015, 11(25): 3066–3077
- [50] Xu RX. Multifunctional microbubbles and nanobubbles for photoacoustic imaging [J]. *Contrast Media Mol I*, 2011, 6(5): 401–411
- [51] Karpouk AB, Aglyamov SR, Mallidi S, et al. Combined ultrasound and photoacoustic imaging to detect and stage deep vein thrombosis: phantom and ex vivo studies [J]. *J Biomed Opt*, 2008, 13(5): 054061
- [52] Erpelding TN, Kim C, Pramanik M, et al. Sentinel lymph nodes in the rat: noninvasive photoacoustic and US imaging with a clinical US system [J]. *Radiology*, 2010, 256(1): 102–110
- [53] Gao XH, Cui YY, Levenson RM, et al. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(8): 969–976
- [54] Makarava N, Parfenov A, Baskakov IV. Water-soluble hybrid nanoclusters with extra bright and photostable emissions: A new tool for biological imaging [J]. *Biophys J*, 2005, 89(1): 572–580
- [55] Liu CL, Ho ML, Chen YC, et al. Thiol-functionalized gold nanodots: Two-photon absorption property and imaging *in vitro* [J]. *J Phys Chem C*, 2009, 113(50): 21082–21089
- [56] Fokong S, Theek B, Wu Z, et al. Image-guided, targeted and triggered drug delivery to tumors using polymer-based microbubbles [J]. *J Control Release*, 2012, 163(1): 75–81
- [57] Yang F, Wang Q, Gu Z, et al. Silver Nanoparticle-embedded microbubble as a dual-mode ultrasound and optical imaging probe [J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2013, 5(18): 9217–9223
- [58] Tartis MS, Kruse DE, Zheng H, et al. Dynamic microPET imaging of ultrasound contrast agents and lipid delivery [J]. *J Control Release*, 2008, 131(3): 160–166
- [59] Palmowski M, Morgenstern B, Hauff P, et al. Pharmacodynamics of streptavidin-coated cyanoacrylate microbubbles designed for molecular ultrasound imaging [J]. *Invest Radiol*, 2008, 43(3): 162–169
- [60] Lazarova N, Causey PW, Lemon JA, et al. The synthesis, magnetic purification and evaluation of Tc-99m-labeled microbubbles [J]. *Nucl Med Biol*, 2011, 38(8): 1111–1118
- [61] Teraphongphom N, Chhour P, Eisenbrey JR, et al. Nanoparticle loaded polymeric microbubbles as contrast agents for multimodal imaging [J]. *Langmuir*, 2015, 31(43): 11858–11867
- [62] Wu J, Nyborg WL. Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2008, 60(10): 1103–1116
- [63] Eisenbrey JR, Burstein OM, Kambhampati R, et al. Development and optimization of a doxorubicin loaded poly (lactic acid) contrast agent for ultrasound directed drug

- delivery[J]. *J Control Release*, 2010, 143(1):38-44
- [64] Cochran MC, Eisenbrey J, Ouma RO, et al. Doxorubicin and paclitaxel loaded microbubbles for ultrasound triggered drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2011, 414 (1-2): 161-170
- [65] Kooiman K, Bohmer MR, Emmer M, et al. Oil-filled polymer microcapsules for ultrasound-mediated delivery of lipophilic drugs [J]. *J Control Release*, 2009, 133 (2): 109-118
- [66] Lentacker I, Geers B, Demeester J, et al. Design and evaluation of doxorubicin-containing microbubbles for ultrasound-triggered doxorubicin delivery: Cytotoxicity and mechanisms involved [J]. *Mol Ther*, 2010, 18 (1): 101-108
- [67] Klibanov AL, Shevchenko TI, Raju BI, et al. Ultrasound-triggered release of materials entrapped in microbubble-liposome constructs: A tool for targeted drug delivery [J]. *J Control Release*, 2010, 148(1): 13-17
- [68] Ting CY, Fan CH, Liu HL, et al. Concurrent blood-brain barrier opening and local drug delivery using drug-carrying microbubbles and focused ultrasound for brain glioma treatment [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(2): 704-712
- [69] Fan CH, Ting CY, Liu HL, et al. Antiangiogenic-targeting drug-loaded microbubbles combined with focused ultrasound for glioma treatment [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(8): 2142-2155
- [70] Fan CH, Ting CY, Lin HJ, et al. SPIO-conjugated, doxorubicin-loaded microbubbles for concurrent MRI and focused-ultrasound enhanced brain-tumor drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(14): 3706-3715
- [71] Zhang W, Hu S, Yin JJ, et al. Prussian blue nanoparticles as multienzyme mimetics and reactive oxygen species scavengers [J]. *J Am Chem Soc*, 2016, 138 (18): 5860-5865
- [72] Yang F, Hu S, Zhang Y, et al. A hydrogen peroxide-responsive O₂ Nanogenerator for ultrasound and magnetic-resonance dual modality imaging [J]. *Adv Mater*, 2012, 24 (38): 5205-5211
- [73] Wang X, Niu D, Li P, et al. Dual-enzyme-loaded multifunctional hybrid nanogel system for pathological responsive ultrasound imaging and T₂-weighted magnetic resonance imaging [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(6): 5646-5656
- [74] Yang F, Chen P, He W, et al. Bubble microreactors triggered by an alternating magnetic field as diagnostic and therapeutic delivery devices [J]. *Small*, 2010, 6 (12): 1300-1305
- [75] Yang F, Li M, Liu Y, et al. Glucose and magnetic-responsive approach toward in situ nitric oxide bubbles controlled generation for hyperglycemia theranostics [J]. *J Control Release*, 2016, 228: 87-95
- [76] Lee JY, Carugo D, Crake C, et al. Nanoparticle-loaded protein-polymer nanodroplets for improved stability and conversion efficiency in ultrasound imaging and drug delivery [J]. *Adv Mater*, 2015, 27(37): 5484-5492

[收稿日期] 2016-12-23



欢迎投稿 欢迎订阅