

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.27.047

超声分子成像的研究进展*

缪昭华¹ 李光明² 柯亨特¹ 靳玉慎¹ 郭彩欣^{1△}

(1 哈尔滨工业大学 生命科学与技术学院 黑龙江 哈尔滨 150080;

2 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘要:超声成像无创、无放射性、低成本、实时成像的优点,使其成为目前世界上应用最广的成像手段之一。特别是超声造影剂引入之后,超声成像的图像分辨率和灵敏度得到了大大提高,使超声成像在临床上得到了进一步应用。近年来,随着分子生物学和超声成像技术的不断发展,人们提出了“超声分子成像”的概念。它是一项结合了分子靶向造影剂和超声影像技术的能在分子水平下观察病理变化的新兴技术,目前这一技术还处于研究初期阶段。但大量临床前的研究成果已表明超声分子成像在诊断血管生成、炎症和血栓三种疾病具有很大应用前景。本文主要综述了目前常用超声造影剂的种类以及超声分子成像技术的研究现状,并对该技术进行了讨论和展望。

关键词:超声分子成像;造影剂;炎症;血栓;血管生成

中图分类号:R318.08 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)27-5372-05

Advance in Ultrasound Molecular Imaging*

MIAO Zhao-hua¹, LI Guang-ming², KE Heng-te¹, JIN Yu-shen¹, GUO Cai-xin^{1△}

(1 School of Life Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang, 150080, China;

2 School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang, 150090, China)

ABSTRACT: Ultrasound imaging is one of the most widely used imaging techniques in the world due to its non-invasive, non-radioactive, cheap and real-time imaging features. The introduction of ultrasound contrast agents improves the sensitivity and resolution of ultrasonic images, further expanding the application of ultrasound imaging in clinical practice. In the recent years, the concept of ultrasound molecular imaging was put forward with the development of molecular biology and ultrasound imaging technology. This new technology, which combines ultrasound technology with molecule-targeted contrast agents for assessing the biological processes at the molecular level, is still in its infancy. However, many preclinical studies have showed that ultrasound molecular imaging showed prospect in assessing angiogenesis, inflammation, and thrombus. This review outlines the recent progress in ultrasound contrast agents and the potential applications of ultrasound molecular imaging in the clinical practice. The existing problems and future directions of ultrasound molecular imaging technology were also proposed at the end of the paper.

Key words: Ultrasound molecular imaging; Contrast agent; Inflammation; Thrombus; Angiogenesis

Chinese Library Classification (CLC): R318.08 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)27-5372-05

前言

与其他医学成像方式相比,超声成像具有自己独特优点:无创、非放射性、操作简单、低成本和实时成像,因而在医学成像领域得到了广泛应用^[1,2]。但由于超声成像方法自身的限制,其图像的分辨率和灵敏度远远不能满足先进的临床诊断要求,限制了其在临床上的进一步应用。随着超声造影剂(ultrasound contrast agent, UCA)的引入,其图像对比度大幅增强,超声成像进入了一个新时代^[3]。

近年来,随着现代分子生物学和超声成像技术的发展,超声分子成像作为一项非侵入性的能在分子水平观察疾病病变过程的技术,受到越来越多的重视。超声分子成像是通过将特

异性亲和分子连接到超声造影剂表面构筑靶向超声造影剂,使其能主动结合到靶区,进行特异性超声成像的新兴技术。它结合了超声成像低成本、非放射性、便携性和实时成像的优点以及靶向造影剂的特异性。一般来说,不同的病理过程会导致不同的抗原或受体分子的高表达,而在正常组织中这些分子往往不表达或低表达^[4]。利用这一特点,研究人员设计相应的特异性亲和分子,再与造影剂相连,得到相应的分子靶向造影剂,即可实现对病变组织和器官的靶向显影^[5],从而能帮助医生更好的了解疾病的发生过程及机制,提高治疗的效率和准确性。本文首先对超声造影剂的种类进行简单分类,接着针对血管内常见的三种疾病:血管生成、炎症和血栓的超声分子成像研究现状作了详细分析,最后对超声分子成像研究面临的难题和发展方

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81101094)

作者简介:缪昭华(1988-),男,硕士研究生,主要从事多功能造影剂的研究,电话:0451-86403192, E-mail: zhaohua_miao@163.com

△通讯作者:郭彩欣(1977-),女,博士,副教授,主要从事生物纳米医药及生物传感器研究, E-mail: 163gcx@sina.com

(收稿日期:2013-10-18 接受日期:2013-11-13)

向做了简单分析和预测。

1 超声造影剂分类

造影剂是超声分子成像基础^[6]。超声造影剂总的来说可以分为两类,一类是微米级造影剂;一类是纳米级造影剂(图1)。其中微米级超声造影剂是指临床上常用的微泡(microbubbles, MBs)造影剂,它由外层包膜壳层(磷脂、表面活性剂、高分子等)和内部包裹的气体(空气、氮气、全氟化碳、六氟化硫等)组成,具有较强的超声反射性能,能显著增强超声的显影效果^[7,8]。通过结合不同组分的壳层和内部气体,目前已研发了多种微泡超声造影剂。如聚乳酸微泡造影剂^[9],磷脂微泡造影剂^[10]等。为了满足临床上的要求,微泡的粒径通常要求在 1-7 μm ^[2,11]。而血管内皮间隙只允许粒径小于 700 nm 的颗粒穿过,因此微泡不能透过血管内皮细胞进入到血管外的组织间隙,只能进行血管内造影,限制了其对血管外疾病的诊断和治疗。

纳米级造影剂是粒径在 10-1000 nm 的液态或固态颗粒。由于粒径较小,这些造影剂较常规微泡造影剂具有更强的穿透力,能够进入血管外的组织,到达血管外造影的目的^[12]。由于粒子尺寸变小,超声效果减弱,但结合一些其他手段我们依旧能得到具有较好超声效果的纳米级超声造影剂。到目前为止,已报道的纳米级造影剂包括具有声反射特性的脂质体,液态氟烷乳剂,纳米级微泡以及固体纳米颗粒。

纳米级脂质体造影剂通常是由脂质双层和内部包含的气体或液体组成的,具有生物安全性高、给药高效的优点。Rahul 等设计了一种能同时装载药物和超声成像的诊断和化疗相结合的多功能脂质体,并在其表面连接上叶酸分子,实现对肿瘤组织的靶向作用^[13]。Buchanan 等则合成了一种具有声反射特性的脂质体造影剂,其原理是在脂质双分子层膜中的气体具有很好的超声反射性能^[14]。

纳米级氟烷乳剂的外层为脂质体,核心为氟烷液体,其粒径在 200 nm 到 400 nm 之间。这种组分使得其相对于以气体为核心的微泡具有更好的抗压能力和机械应力。当纳米级氟烷乳剂在组织或细胞表面大量聚集,才能有很好的超声显影效果。Amanda 等发现在细胞培养液孵育 2 h 后中实验中的 PFC 纳米

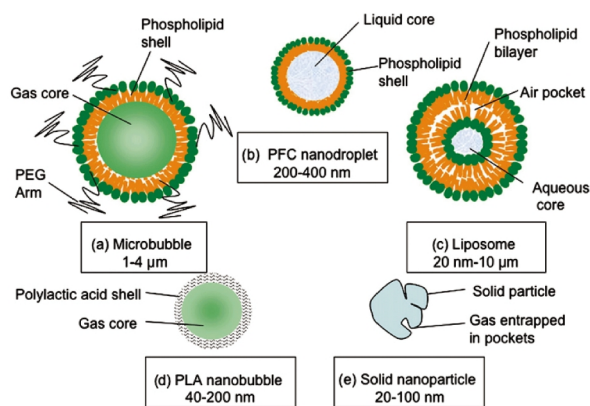


图1 超声造影剂的种类:(a) PEG 修饰的脂质体微泡;(b) 液态氟烷乳剂;(c) 脂质双层的微泡和纳泡;(d) 聚乳酸纳泡;(e) 固体纳米粒子

Fig. 1 Different types of ultrasound contrast agents. (a) gas-liquid microbubble coated with PEG, (b) PFC nanodroplet, (c) micro- or nano-bubble with phospholipid bilayers, (d) PLA nanobubble, (e) solid nanoparticle^[6]

粒子的粒径能有 0.26 μm 增长到 1.7 μm , 成功转变为微泡,进而能得到很好的超声效果^[15]。Lanza 等通过静脉注射一种纤维蛋白靶向的氟烷乳剂成功在狗的颈动脉上实现了血栓检测。氟烷乳剂滴静脉注射后,能在血栓表面富集,进而增加了血栓的回波反射性能^[16]。

纳米级微泡是气-液乳化物,通常是生物可降解的高分子聚合物如聚乳酸(PLA)作为壳层,其粒径也在 200 nm 到 400 nm 之间。由于包裹的是气体,相对于其他纳米级造影剂,其往往具有很好的超声成像效果。一个很好地例子就是 Rapoport 等实现了对小鼠皮下的超声成像及超声介导的阿霉素对肿瘤的治疗^[17]。本次实验中,装载了阿霉素的非靶向纳米级微泡通过 EPR (enhanced permeability and retention effect) 效应能在肿瘤部位富集。在温度升高时,这些纳米泡会发生融合形成微米级气泡,由于横截面积增加而具有更好地超声成像效果(图2)。此外,当用一定强度的超声处理时,那些气泡会破裂,在肿瘤组织区域释放阿霉素,从而达到局部治疗的目的。

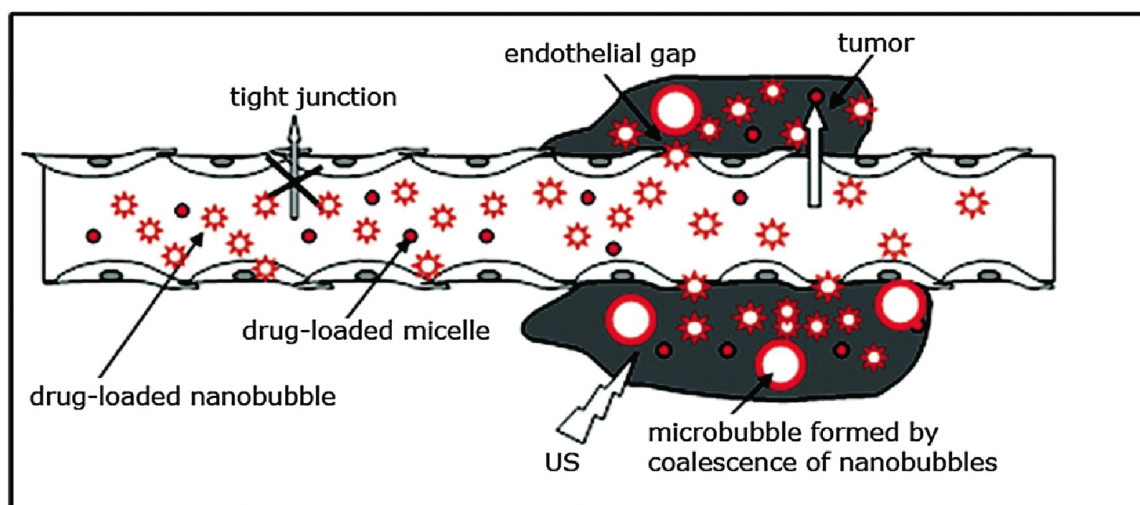


图2 药物利用超声给药系统通过有缺陷的肿瘤微血管系统的示意图

Fig. 2 Schematic representation of drug targeting through the defective tumor microvasculature using the echogenic drug delivery system^[17]

一些固体纳米颗粒如二氧化硅或四氧化三铁颗粒的孔隙中包含有气体,能在超声成像中具有较好的背向反射性能。Liu等^[18]将 100 nm 二氧化硅纳米粒子静脉注射到小鼠体内,结果发现小鼠的肾脏区域造影强度与背景对比增强了 30%,证明了这种二氧化硅纳米粒子具有较好的超声显影作用。此外,四氧化三铁纳米颗粒也被发现在大鼠的脑部成像具有较强超声造影效果^[19]。

相对于纳米级超声造影剂来说,微泡造影剂凭借其优异的超声造影性能,成为唯一一类在美国和欧洲能在临床上应用的超声造影剂。鉴于微泡超声造影剂在世界范围内的广泛研究和应用,在接下来的部分,我们也以微泡超声造影剂为例,综述超声分子成像技术在医学上的一些应用。

2 超声分子成像在医学上的应用

微泡造影剂的粒径通常在 1-7 μm ,不能透过血管内皮组织间隙,限制了微泡只能停留在血液系统中。因此,非常适合利用微泡对一些发生在血管内的病变如血管生成、血栓形成及炎症进行超声分子成像。

2.1 血管生成的超声分子成像

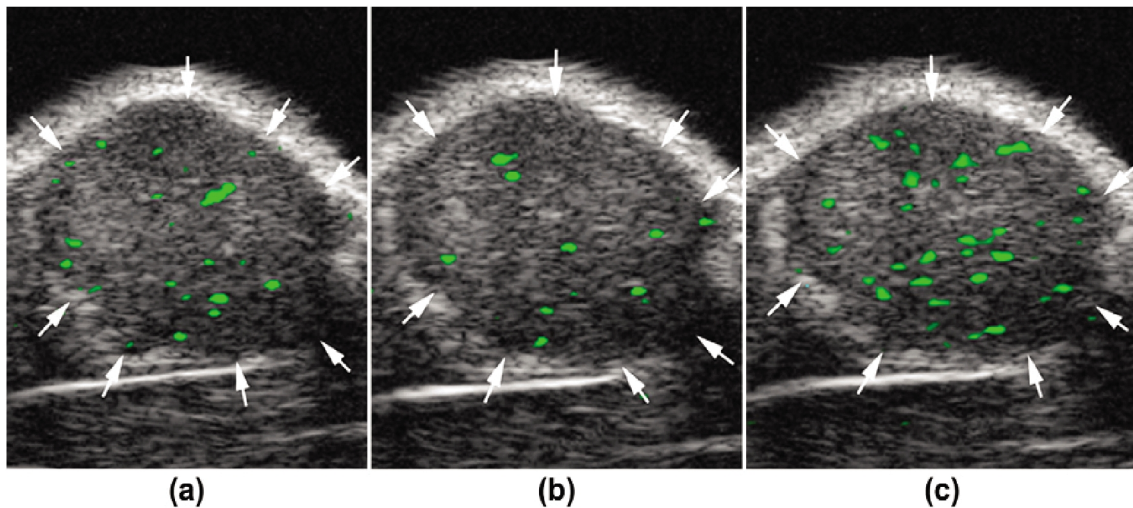


图 3 分别静脉注射了 VEGFR2(a)、 $\alpha\text{v}\beta 3$ (b)以及双重(c)靶向微泡后小鼠肿瘤区域的超声分子图像

Fig. 3 Molecular ultrasound images of a subcutaneous human ovarian adenocarcinoma xenograft tumour (arrows) in a nude mouse after intravenous administration of singly-targeted microbubbles, targeted at VEGFR2 (a) or $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin (b), and dual-targeted microbubbles (c) ^[22]

2.2 炎症病变的超声分子成像

炎症是机体对损伤因子做出的防御性反应的基本病理过程。同血管生成类似,炎症过程中也会过表达大量标记分子如 E- 和 P- 选择蛋白,细胞间粘附分子(ICAM-1)和血管细胞粘附分子(VCAM-1)等。这些分子标记物可以作为微泡的靶向物来定量超声诊断肾脏、心脏和结肠等器官中的炎症反应^[23]。炎症的一个共同特征是血液中白细胞的激活及白细胞向血管外区域转移。而白细胞的补充和转移是由白细胞上的粘附分子和内皮细胞的多种受体相互作用来介导的^[24,25]。根据这一特点,Ferrante 等构建了一个基于炎症过程中白细胞行为变化的超声造影平台^[26]。实验中为提高微泡在流动血液中的粘附力,设计了一种双重靶向的微泡(同时靶向 P- 选择蛋白和 VCAM-1)。结果证明这种双重靶向微泡在血液的粘附力得到了较大提高,能

肿瘤血管生成是在宿主已有的微血管床上由内皮细胞芽生成新的血管的过程。在这一过程中,会有多种血管生长因子和细胞粘附因子在肿瘤血管内皮细胞过表达^[20]。利用这一特点,研究人员开发了一系列能够靶向这些过表达标记物的微泡造影剂来进行超声分子成像。Sunitha 等就利用血管内皮生长因子受体 VEGFR2 靶向的微泡来增强小鼠乳癌的超声成像,提高了小鼠肿瘤诊断的准确性和可靠性,为将来实现乳癌的早期诊断奠定了基础^[21]。

为进一步提高超声造影效果,人们根据血管生成的标记物在不同的肿瘤类型及肿瘤不同的发展阶段表达不同的特点,设计了多靶点的微泡超声造影剂。Willmann 研究团队通过将 VEGFR2 和整合蛋白 $\alpha\text{v}\beta 3$ 同时连接到微泡表面,得到了这种具有双重靶向超声造影剂来增强皮下人卵癌异体移植小鼠的成像信号^[22]。实验中发现,与其中任何单一靶向微泡对比,双重靶向微泡具有更强的亲和能力,能更多地聚集在肿瘤区域,使得到的超声图像更为清晰准确(图 3)。这一技术将大大提高疾病的诊出率和诊断准确性,在肿瘤早期诊断中有重要潜在应用价值。

在病变部位大量聚集,提高了疾病诊断的准确性和敏感性,在医学领域具有广阔的应用前景。

超声分子成像不仅可以对炎症进行早期诊断,也能与一些治疗手段相结合,达到诊疗一体化的效果。这样不仅能去除炎症病人二次服药的痛苦及可能的副作用,也能极大缩短治疗时间,提高治疗效率和效果^[27]。克罗恩病是一种慢性胃肠炎症,传统的免疫药物治疗方法往往有很大副作用。为此,Jose 等构建了一个集超声分子成像和基因治疗技术为一体的新型平台^[28]。他们设计了一种能靶向 VCAM-1 和 MAdCAM-1 的脂质体微泡,并在微泡内装载上荧光素酶质粒。研究发现,经静脉注射后,该脂质体微泡能在小鼠炎症区域富集,使得该区域具有明显的超声造影增强效果。进一步提高超声强度之后,微泡发生破裂,释放的荧光素酶质粒成功进入到细胞内。证明该体系能

很好地将一些基因靶向输送到病变区域,达到基因治疗的目的。这一诊断治疗体系成功地将诊断和治疗两个过程融合在一起,使得在得到诊断结果的同时,也能及时对病变部位治疗,在今后疾病的诊断和治疗有很大的应用前景。

2.3 血栓形成的超声分子成像

血栓形成是指血液中有形成分析出、凝集形成血凝块的过程,受遗传和环境因素影响。急性血栓的血小板上往往含有大量的血小板糖蛋白(GP)IIb/IIIa受体,这类受体可与含有RGD序列的肽链或类似物相结合。尽管关于血栓形成的超声分子成像的研究还处于初级阶段,但已有一些研究成果表明靶向微泡在血栓形成的超声分子成像上有很大应用潜力。Schumann等制备了一种能靶向 GPIIb/IIIa 受体的脂质体微泡,体外细胞实验结果表明该脂质体微泡在流动相中能牢固地连接到血凝块上,而且在小鼠体内的超声分子显影结果也表明该微泡能很好

连接到小鼠辜提肌动脉和静脉的血块上,显著增强该区域的超声造影效果^[29],最终达到靶向显影的目的。

近来一些研究也表明,超声分子成像不仅能对血栓进行靶向显影,也可以判断溶栓过程是否成功。Wang^[30]等研究发现,将具有靶向性的连有 scFvs 抗体的微泡注射到 FeCl₃ 溶液处理过的小鼠体内,20 min 后,微泡大量聚集到血栓区域,使得靶组织的超声信号得到明显增强,证明了该微泡因具有靶向性而可用于血栓的定点超声诊断。随后,在用尿激酶对血栓进行处理,超声图像显示血栓发生了溶解,尺寸不断减小,结果如图 4 所示。这一研究结果表明我们可以利用靶向超声造影剂来对溶栓过程进行实时跟踪,并对溶栓成功与否进行判断。这一技术能帮助医生更好地评价血栓的治疗效果,提高了疾病治疗的准确性和效率。

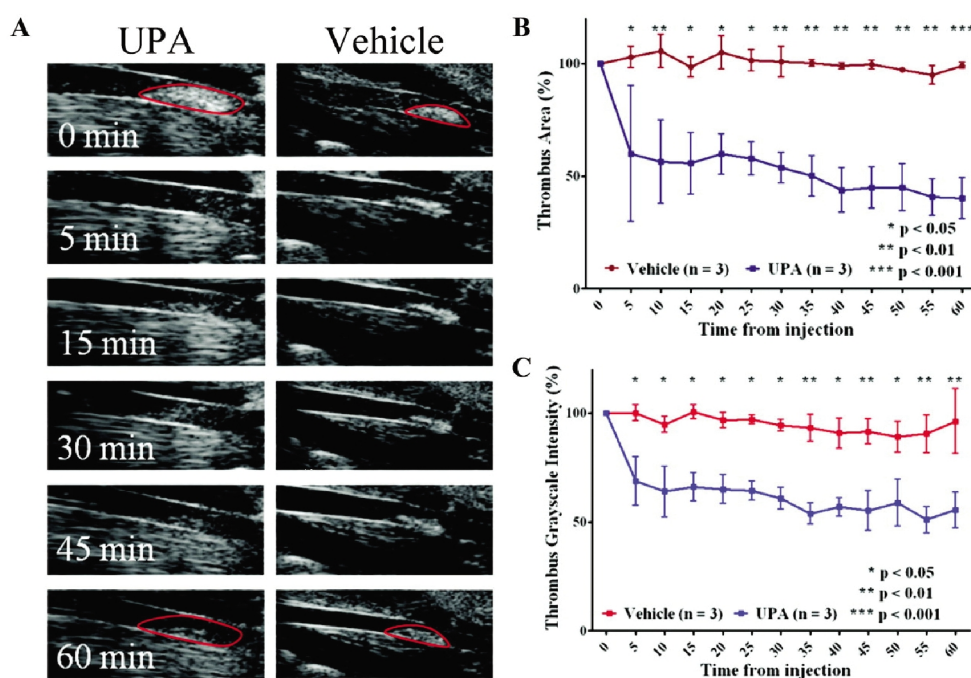


图 4 超声图像显示的血栓大小随时间的变化情况,(A)注射了生理盐水和尿激酶的两组小鼠的血栓代表性图片;(B)血栓面积的变化,注射前为 100%,5 min 测一次;(C)血栓灰度强度的变化,注射前为 100%,5 min 测一次

Fig. 4 Monitoring of thrombus size on pharmacological thrombolysis via ultrasound imaging. Representative images of thrombi from both vehicle (saline) - and pharmacological thrombolysis (urokinase plasminogen activator [UPA])- treated groups. (B) Baseline areas before the injection of UPA and vehicle were set to 100%, and areas were calculated every 5 minutes for 60 minutes. (C) Baseline areas before the injection of UPA and vehicle were set to 100%, and gray-scale intensity units were calculated every 5 minutes for 60 minutes^[30]

3 结论与展望

超声分子成像凭借无创、实时成像、非放射性和靶向性好等优点,已成为医学成像领域新的研究热点。然而目前超声分子成像还处于实验研究阶段,真正应用到临床上还存在一些亟待解决的问题:如何设计同时具有良好生物相容性和靶向作用的超声造影剂;如何量化评价超声造影效果;如何延长造影剂在血液中的停留时间。相信随着医学影像技术和现代分子生物学的进一步结合和发展,这些问题必将得到解决。

在过去十年来,超声分子成像技术取得了很大发展。靶向

超声造影剂的种类也越来越多,从微米级造影剂到纳米级造影剂,从单一靶点造影剂到多靶点造影剂,扩大了超声成像的应用范围和提高了超声诊断的准确性和效率。随着人们将其其他一些功能纳米粒子、药物或基因引入超声造影剂中,超声分子成像已不再是一项单纯的成像诊断技术,它正向“多模态成像”和“诊断一体化”方向发展,将在疾病的诊断和治疗中发挥重要作用。

参考文献 (References)

- [1] Schutt EG, Klein DH, Mattrey RM, et al. Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: The key role of

- perfluorochemicals [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42: 3218-3235
- [2] Cosgrove D. Ultrasound contrast agents: An overview [J]. *European Journal of Radiology*, 2006, 60: 324-330
- [3] Lencioni R. Impact of European federation of societies for ultrasound in medicine and biology (EFSUMB) guidelines on the use of contrast agents in liver ultrasound [J]. *Eur Radiol*, 2006, 16: 1610-1613
- [4] Siver AM, Ingrid SG, Rune H. Intravascular Targets for Molecular Contrast-Enhanced [J]. *Ultrasound Imaging Int J Mol Sci*, 2012, 13: 6679-6697
- [5] 余进洪, 王志刚. 超声分子成像的机制及研究现状 [J]. *中国医学影像技术*, 2009, 25(4): 709-711
- Yu Jin-hong, Wang Zhi-gang. Mechanism and research status of ultrasound molecular imaging [J]. *Chin J Med Imaging Technol*, 2009, 25(4): 709-711
- [6] Ryan G, Paul AD. Advances in Molecular Imaging with Ultrasound [J]. *Mol Imaging*, 2010, 9(3): 117-127
- [7] Hernot S, LKlibanov A. Microbubbles in Ultrasound-triggered Drug and Gene Delivery [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60: 1153-1166
- [8] El-Sherif DM, Wheatley MA. Development of a Novel Method for Synthesis of a Polymeric Ultrasound Contrast Agent [J]. *J of Biomedical Materials Research Part A*, 2003, 66A(2): 347-355
- [9] Ke HT, Wang JR, Dai ZF, et al. Gold-Nanoshelled Microcapsules: A Theranostic Agent for Ultrasound Contrast Imaging and Photothermal Therapy [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 1-6
- [10] Li P, Zheng Y, Ran H, et al. Ultrasound triggered drug release from 10-hydroxycamptothecin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy in mice [J]. *Journal of control release*, 2012, 162: 349-354
- [11] Calliada F, Campani R, Bottinelli O, et al. Ultrasound contrast agents: basic principles [J]. *Eur J Radiol*, 1998, 27: 157-160
- [12] 张勇, 王志刚. 纳米级超声造影剂的研究进展 [J]. *临床超声医学杂志*, 2007, 9: 105-106
- Zhang Yong, Wang Zhi-gang. Development of nanoscale ultrasound contrast agents [J]. *J Ultrasound in Clin Med*, 2007, 9: 105-106
- [13] Nahire R, Haldar MK, Paul S, et al. Polymer-Coated Echogenic Lipid Nanoparticles with Dual Release [J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14 (3): 841-853
- [14] Buchanan KD, Huang S, Kim H, et al. Echogenic liposome compositions for increased retention of ultrasound reflectivity at physiologic temperature [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007, 97(6): 2242-2249
- [15] Martin AL, Seo M, Williams R, et al. Intracellular Growth of Nanoscale Perfluorocarbon Droplets for Enhanced Ultrasound-Induced Phase-Change Conversion [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2012, 38: 1799-1810
- [16] Lanza GM, Wallace KD, Scott MJ, et al. A novel site-targeted ultrasonic contrast agent with broad biomedical application [J]. *Circulation*, 1996, 94 (12): 3334-3340
- [17] Rapoport N, Gao Z, Kennedy A. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumour imaging and targeted chemotherapy [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(14): 1095-1106
- [18] Liu J, Levine AL, Mattoon JS, et al. Nanoparticles as image enhancing agents for ultrasonography [J]. *Phys Med Biol*, 2006, 51 (9): 2179-2189
- [19] Nolte I, Vince GH, Maurer M, et al. Iron particle enhance visualisation of experimental gliomas with high resolution sonography [J]. *Am J Neuroradiol*, 2005, 26: 1469-1474
- [20] Folkman J. Angiogenesis [J]. *Annu Rev Med*, 2006, 57: 1-18
- [21] Sunitha V. Earlier Detection of Breast Cancer with Ultrasound Molecular Imaging in a Transgenic Mouse Model [J]. *Cancer Res*, 2013, 57: 1689-1698
- [22] Willmann JK, Lutz AM, Paulmurugan R, et al. Dual-targeted contrast agent for US assessment of tumour angiogenesis in vivo [J]. *Radiology*, 2008, 248(3): 936-944
- [23] Kaufmann BA, Lewis C, Xie A, et al. Detection of recent myocardial ischaemia by molecular imaging of P-selectin with targeted contrast echocardiography [J]. *Eur Heart J*, 2007, 28(16): 2011-2017
- [24] Kunkel EJ, Butcher EC. Plasma-cell homing [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3 (10): 822-829
- [25] Lindner JR, Song J, Xu F, et al. Noninvasive ultrasound imaging of inflammation using microbubbles targeted to activated leukocytes [J]. *Circulation*, 2000, 102(22): 2745
- [26] Ferrante EA, Pickard JE, Rychak J, et al. Dual targeting improves microbubble contrast agent adhesion to VCAM-1 and P-selectin underflow [J]. *J Control Release*, 2009, 140(2): 100-107
- [27] Sumer B, Gao J. Theranostic nanomedicine for cancer [J]. *Nanomedicine*, 2008, 3(2): 137-140
- [28] Tlaxca JL, Rychak JJ, Ernst PB, et al. Ultrasound-based molecular imaging and specific gene delivery to mesenteric vasculature by endothelial adhesion molecule targeted microbubbles in a mouse model of Crohn's disease [J]. *J Control Release*, 2013, 165(3): 216-225
- [29] Schumann PA, Christiansen JP, Quigley RM, et al. Targeted-microbubble binding selectively to GPIIb/IIIa receptors of platelet thrombi [J]. *Invest Radiol*, 2002, 37(11): 587
- [30] Wang X, Hagemeyer CE, Hohmann JD, et al. Novel single-chain antibody-targeted microbubbles for molecular ultrasound imaging of thrombosis: validation of a unique noninvasive method for rapid and sensitive detection of thrombi and monitoring of success or failure of thrombolysis in mice [J]. *Circulation*, 2012, 125: 3117-3126