

靶向超声造影剂在干细胞移植中的研究进展

香丽萍, 穆玉明

(新疆医科大学第一附属医院心脏超声诊断科, 新疆 乌鲁木齐 830011)

【摘要】 近年来, 干细胞移植技术在心肌梗死的治疗中应用越来越广泛。实验研究发现, 靶向超声微泡技术能够有效增强心肌梗死区域局部血管的通透性、提高该区域内相关细胞因子的表达效率、增加梗死区新生血管的形成, 从而促进干细胞靶向归巢、改善心功能, 提高干细胞移植的成功率。因此, 本文通过整理总结相关资料, 对将超声联合微泡技术应用于干细胞移植治疗急性心肌梗死过程中的研究进展做一综述。

【关键词】 超声微泡; 干细胞移植; 急性心肌梗死; 靶向性

【中图分类号】 R458 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2015)06-0843-04

Research development of targeted ultrasound contrast agent in stem cell transplantation. XIANG Li-ping, MU Yu-ming. Department of Cardiac Ultrasonography, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang, CHINA

【Abstract】 In recent years, stem cell transplantation technology is more and more widely applied in the treatment of myocardial infarction. Experimental studies have found that, targeted ultrasound microbubble technology can effectively enhance local vascular permeability, improve efficiency of relevant cytokines expression and increase for-

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81271590)

通讯作者: 穆玉明。E-mail: mym1234@126.com

讨 miR-508 和 miR-502-5p 作为潜在结肠癌诊断分子标记物的可能性。

参考文献

- [1] Onouchi S, Matsushita H, Moriya Y, et al. New method for colorectal cancer diagnosis based on SSCP analysis of DNA from exfoliated colonocytes in naturally evacuated feces [J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(1A): 145-150.
- [2] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [3] Liu J, Carmell MA, Rivas FV, et al. A role for the P-body component GW182 in microRNA function [J]. *Nat Cell Biol*, 2005, 7(12): 1261-1266.
- [4] Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(5): 517-529.
- [5] Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis [J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(6): 776-780.
- [6] Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, et al. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress [J]. *Cell*, 2006, 125(6): 1111-1124.
- [7] Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs [J]. *Genes Dev*, 2003, 17(4): 438-442.
- [8] Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex [J]. *Science*, 2002, 297(5589): 2056-2060.
- [9] Zeng Y, Cullen BR. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells [J]. *RNA*, 2003, 9(1): 112-123.
- [10] Scaria V, Hariharan M, Maiti S, et al. Host-virus interaction: a new role for microRNAs [J]. *Retrovirology*, 2006, 3: 68.
- [11] Wienholds E, Plasterk RH. MicroRNA function in animal development [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(26): 5911-5922.
- [12] Habbe N, Koorstra J, Mendell J, et al. MicroRNA miR-155 is a bio-

marker of early pancreatic neoplasia [J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(4): 340-346.

- [13] Yang N, Kaur S, Volinia S, et al. MicroRNA microarray identifies Let-7i as a novel biomarker and therapeutic target in human epithelial ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(24): 10307-10314.
- [14] Mattie MD, Benz CC, Bowers J, et al. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies [J]. *Mol Cancer*, 2006, 5: 24.
- [15] Liu T, Tang H, Lang Y, et al. MicroRNA-27a functions as an oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin [J]. *Cancer Lett*, 2009, 273(2): 233-242.
- [16] Guo J, Miao Y, Xiao B, et al. Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(4): 652-657.
- [17] Ueda T, Volinia S, Okumura H, et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(2): 136-146.
- [18] Domingo E, Belmonte I, Nieto L, et al. Evaluation of PIK3CA mutation as a predictor of benefit from nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy in colorectal cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(34): 4297-4305.
- [19] Greenberg E, Besser MJ, Ben-Ami E, et al. A comparative analysis of total serum miRNA profiles identifies novel signature that is highly indicative of metastatic melanoma: a pilot study [J]. *Biomarkers*, 2013, 18(6): 502-508.
- [20] Juneja M, Ilm K, Schlag PM, et al. Promoter identification and transcriptional regulation of the metastasis gene MACC1 in colorectal cancer [J]. *Mol Oncol*, 2013, 7(5): 929-943.

(收稿日期: 2014-09-18)

mation of new blood vessels in myocardial infarction areas, and thereby promote stem cell targeting homing, improve cardiac function and increase success rate of stem cell transplantation. Therefore, this article makes a review on the research progress of application of ultrasound combined with microbubble technology in the process of stem cells transplantation in treatment of acute myocardial infarction.

【Key words】 Ultrasound microbubble; Stem cell transplantation; Acute myocardial infarction; Targeting

目前,诸多国内外学者均对干细胞移植技术进行了研究,干细胞移植技术能够把供体干细胞移植到损伤的心肌组织中,修复损伤坏死的心肌细胞,同时还能在局部积聚诱导血管新生。该技术为急性心肌梗死的有效治疗指明了一个崭新的方向^[1],但其效果会受到移植干细胞存活率、分化率以及靶向性等限制^[2]。有研究表明,超声造影剂中微气泡可加强空化效应,从而促进超声生物效应,利用超声微介导术能够提高移植干细胞存活率、分化率以及促进心肌梗死区域内血管的新生,其主要机理在于超声介导微泡空化效应靶向传输。本文就靶向超声造影剂的组成、理化特性、制备方式、靶向分子成像及联合超声微泡造影剂促进干细胞移植的研究进展综述如下,为进一步研究靶向超声造影剂在基础研究及临床应用方面提供了理论基础,使其能够在干细胞移植技术治疗心肌梗死的过程中发挥更积极的作用。

1 靶向超声微泡造影剂的组成、理化特性和制备方式

靶向超声造影剂是在超声造影剂的表面连接上特异性配体,使其能够自动和靶器官或靶组织上相应的受体结合,并产生的特异性影像,在分子水平上直观地反映出病变位置的变化。

1.1 靶向超声造影剂的组成 超声造影剂主要成分是微气泡,一般直径为 2~10 μm ,由核心及外壳包膜构成。其中,超声造影剂微泡的核心可以是氟碳类的气体,也可以是磷脂或者是氟烷类的液体;超声造影剂微泡的外壳包膜则多为脂类、多聚体或者白蛋白。外壳包膜成分的区别造成超声造影剂微泡的理化性质也存在一定的差别^[3],主要有脂质类外壳包膜和白蛋白及多聚体等构成外壳包膜两种,其中脂类化合物外壳包膜则较薄,仅有 1~3 nm,因此脂质类物质制成的外壳包膜更容易进行靶向修饰,制备的靶向超声造影剂具有偶联配体的生物学活性,更有利于靶向超声微泡技术的应用,在国内被广泛使用。

特异性的靶向超声造影剂作为一种理想的基因或药物递送载体,具有连接配体和其相应的靶向组织的能力。超声靶向分子成像就是利用这种特性将造影剂聚集在靶器官或者靶组织,然后利用超声显影技术在分子水平上呈现出靶器官或者靶组织的病理变

化,最后实现特异性增强靶向区域信号以加强局部治疗的作用。同时,靶向超声造影剂和靶向微泡造影技术,通过介导微泡内的药物或基因,可以定位到病灶部位细胞表达的特异性抗原或受体上,达到靶向性定位治疗的效果。

1.2 靶向微泡超声造影剂的制备方法 靶向超声造影剂外壳包膜与其特异性配体的连接方法主要有两种:①非吸附性非共价键结合的免疫化学固定方法,该方法利用生物素-亲和素系统较强的亲和力,将生物素配体与超声造影膜的外壳包膜连接在一起,将其生物素化,却不改变其生物活性和生理特性,应用较为广泛的有亲血栓性靶向超声造影剂等;②直接化学连接法,首先需要将这类小分子配体与外壳包膜的分子进行结合(直接或间接结合),之后通过使用普通造影剂的制作方法来获得具有稳定黏附配体的超声造影剂。

2 UTMD 改善干细胞微环境可能的原理

2.1 UTMD 可以引起心肌梗死区的炎症反应 最佳的心肌微环境可增加干细胞的分化、存活,但尚未明确,一般认为适度的炎症反应可促进其干细胞归巢。粘附分子及生长因子的表达有利于干细胞的黏附、增殖及分化;反之,过于强烈的炎症反应不利于干细胞的存活。UTMD 引起炎症细胞聚集,IL-1 等炎症因子的释放,并且有利于干细胞向心肌内移行;在血管内皮受到损伤以后内皮细胞粘附分子的表达增多,从而促使循环中的干细胞被黏附分子作用而更牢固的黏附在受损的血管内皮上。Zhong 等^[4]观察到 UTMD 处理组犬心肌组织 VEGF、SDF-1、VCAM-1 和 IL-1b 的表达比非治疗犬明显增高,表明 UTMD 可能通过改变犬心肌微环境促进 MSCs 归巢。随后的病理学结果表明,在 1 MHz 的频率和 1.0 W/cm² 的强度下,UTMD 能引起炎症反应,且仅有轻度心肌损伤。

2.2 UTMD 可以改善局部微循环 心肌梗死后心脏重建尚包括新生血管和重建血运系统。在自然愈合的损伤区域,由循环骨髓衍生细胞生成的血管内皮细胞无法再生出足够的微血管网络。因此提高局部血管生长因子浓度,促进治疗性血管新生,恢复梗死区血供,是干细胞移植后能否存活的关键问题。血管生长因子包括 VEGF、成纤维细胞生长因子(FGF)、

HGF 等。一定能量的超声波辐照微泡后产生的辐射压力可使移植的干细胞推向血管壁,并使之在局部积聚。声致孔隙效应通过增宽毛细血管内皮细胞间隙,增加细胞膜的通透性,使外源性大分子进入组织间隙或细胞中来提高基因转染效率及干细胞移植率,导致局部组织微血管破裂,提高内源性血管生长因子分泌量,从而改善局部微循环。

3 超声联合微泡促进干细胞移植在心肌梗死区的归巢

3.1 超声联合微泡提高局部血管通透性 超声波的生物学效应^[5]是具有热效应、空化效应和机械效应等。增强空化效应^[6]是指通过外源性给予超声微泡来增加空化核的数目、降低超声的空化阈值来实现的。“空化核”是指液体中存在的微小气泡。空化效应是指产生高温、高压、冲击波来增宽内皮细胞间隙、提高细胞膜的通透性,使细胞膜发生短暂性可逆的小孔,增加微泡破裂周围组织生物屏障的通透性。通过相关分析,徐琢等^[7]利用干细胞移植来进行猪急性心肌梗死的治疗试验中发现,利用超声来对微泡的破坏进行传导可以明显的提高干细胞在心肌梗死区的靶向移植效率,提示超声破坏微泡产生机械作用和空化效应,使内皮细胞收缩,内皮间隙增宽,同时促使干细胞向梗死的心肌组织细胞进行迁移。此外,也有报道显示,超声介导微泡破坏对靶向血管的通透性有一定的影响,有利于干细胞的迁移,从而提高干细胞的移植效率。心脏功能的逐步完善也从另一方面证明了声孔效应的作用^[8]。

3.2 超声与微泡的刺激作用产生相关细胞因子,促进干细胞归巢 当进行干细胞移植时,首先需要将干细胞通过静脉注射的方式注入体内,然后要增加干细胞在心肌梗死区域和周边组织的聚集数量,从而提高治疗的成功率。干细胞归巢过程中重要的相关因子是趋化因子、生长因子及黏附分子等。趋化因子中基质细胞衍生因子-1 (SDF-1)及其受体(CXCR4)的 SDF-1/CXCR4 轴是促进 MSCs 向损伤组织归巢最重要的生物轴,组织损伤时局部受损组织 SDF-1 表达上调,使得表面表达 CXCR4 的 MSCs 向受损组织趋化归巢^[9]。而生长因子如肝细胞生长因子(HGF)及受体的 HGF/c-met 轴、干细胞因子(Stem cell factor, SCF)及受体的 SCF/c-kit 轴、粒细胞集落刺激因子、胰岛素样生长因子、血小板衍生因子(PDGF)等均与 MSCs 的归巢相关。

Fujii 等^[10]通过超声靶向微泡技术的使用来把 VEGF 和干细胞因子基因通过转染转入试验小鼠的

梗死心肌细胞中,通过与对照组进行对比发现,实验组小鼠的血管密度、蛋白表达和祖细胞的归巢方面都有明显的提高,同时对心肌灌注和心室功能的完善具有明显的改善作用。此外,Fujii 在^[11]后续的研究中通过超声辐照携干细胞因子与基质细胞衍生因子-1 α 基因的微泡造影剂来治疗心肌缺血的实验大鼠,在这项实验当中,为了更显著的研究治疗效果特意增加了治疗的过程并进行多次治疗,在治疗的过程中对心肌的损害进行研究。实验结果发现,在使用这两种技术进行心肌缺血的治疗过程中,对缺血心肌的血管密度有明显的增加作用,从而进一步减小了心肌梗死的范围,在试验中发现,重复治疗的次数达到6次是实验大鼠的心肌血管密度达到最大,而心肌灌注功能与心室功能也随着治疗次数的增加而逐渐完善。

4 超声结合微泡促进梗死区心肌血管新生

在近些年关于超声微泡和干细胞移植的研究中发现,这两者对血管的新生有很好的促进作用。研究发现,由超声微泡作用所引起的梗死区血管新生其作用机理主要是通过炎症反应来促进血管新生同时通过外源性基因的介导来实现血管的新生^[12]。梗死区血管新生需要多种因子对其进行调控,是一个很复杂的过程。现已发现能促进血管新生的因子是 VEGF、bFGF、HGF、表皮生长因子、白细胞介素-8、PDGF 等^[13]。Xu 等^[14]使用超声辐照微泡造影剂来促进干细胞向试验兔缺血心肌组织的迁移,通过与对照组进行对比发现,实验组动物的心脏功能得以明显的改善,心肌组织内毛细血管数量明显增多,心肌纤维化的范围明显减小。Yuan 等^[15]通过向实验犬的心脏进行 HGF 质粒与微泡造影剂的注射并联合超声辐照来促进基因的表达和血管的新生。Ghanem 等^[16]、Xu 等^[14]的研究发现,在超声联合微泡干预后 VEGF 表达都升高。除 VEGF 外,有多项研究也成功的应用超声造影剂这种新型的基因转移载体转染 bFGF^[17]、HGF^[18] 及 HIF-1 α ^[19] 等基因,然后将此类基因转移到受损的心肌组织中,从而提高干细胞的转染效率,以促进心肌细胞的再生,从而改善心肌缺血的情况。

5 目前存在的问题及展望

随着超声靶向破坏微泡技术在提高干细胞移植中的靶向归巢、促进心功能改善和联合基因中的应用不断发展与进步,同时也向我们提出了一些问题:(1)超声辐照介导的微泡破坏可能引起一些不良反应,如血管内容血、组织出血及器官损伤等,这些都与超声的机械参数密切相关。(2)超声介导微泡的靶向破坏虽然可以提高干细胞治疗心肌梗死的移植率,但是在

这一治疗过程中,超声参数的选择和使用目前还没有相对统一的结论。Vancraeynest 等^[20]在实验研究中发现,如果使用的超声参数过高会导致试验动物的左心室出现功能障碍,同时有短暂的 ST 段抬高从而导致心肌收缩带的坏死。因此,微泡介导的相关超声参数需要被大量、重复、系统地研究,以求将不良反应降到最低而治疗效果最佳。(3)超声介导微泡破坏的时间窗:在急性的心肌梗死发生时,机体早期的炎症反应可以促使干细胞向梗死心肌组织迁移,但是有最佳的时间段,而目前的很多研究都没有在这一研究中达到统一^[21]。随着新型超声微泡的不断发展,目前面临的挑战主要有:(1)通过对干细胞的特点进行分析来构建专一性的靶向超声微泡,从而在活体内更好的追踪干细胞,对于急性心肌梗死发生后的干细胞作用机制进行研究。(2)为了更好的提高干细胞移植的治疗效果,构建出活体内大容量的特异性微泡。我们有理由相信,在医疗技术的不断发展中,微泡的构建技术与干细胞移植技术的不断发展,多学科多领域的交叉融合和研究表明,靶向超声微泡造影剂必将在干细胞移植治疗急性心肌梗死的作用中发挥更大的优势,拥有更加广阔的发展前景。

参考文献

- [1] Zhu WZ, Hauch KD, Xu C, et al. Human embryonic stem cells and cardiac repair [J]. *Transplant Rev (Orlando)*, 2009, 23(1): 53-68.
- [2] Quattrocchi M, Cassano M, Crippa S, et al. Cell therapy strategies and improvements for muscular dystrophy [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(8): 1222-1229.
- [3] Sirsi S, Borden M. Microbubble compositions, properties and biomedical applications [J]. *Bubbles Sci Eng Technol*, 2009, 1(1-2): 3-17.
- [4] Zhong SG, Shu SY, Wang ZG, et al. Enhanced homing of mesenchymal stem cells to the ischemic myocardium by ultrasound-targeted microbubble destruction [J]. *Ultrasonics*, 2012, 52(2): 281-286.
- [5] Miller DL, Averkiou MA, Brayman AA, et al. Bioeffects considerations for diagnostic ultrasound contrast agents [J]. *Ultrasound Med*, 2008, 27(4): 611-632.
- [6] Stride EP, Coussios CC. Cavitation and contrast: the use of bubbles in ultrasound imaging and therapy [J]. *Proc Inst Mech Eng H*, 2010, 224: 171-191.
- [7] 徐 琢,冯 毅,童嘉毅,等. 超声微泡辅助干细胞移植治疗急性心肌梗死的实验研究[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2008, 27(3): 192-194.
- [8] Song X, Zhu H, Jin L, et al. Ultrasound-mediated microbubble destruction enhances the efficacy of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation and cardiac function [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009, 36(3): 267-271.
- [9] Shen L, Gao Y, Qian J, et al. A novel mechanism for endothelial progenitor cells homing: The SDF-1/CXCR4-Rac pathway may regulate endothelial progenitor cells homing through cellular polarization [J]. *Med Hypotheses*, 2011, 76(2): 256-258.
- [10] Fujii H, Sun Z, Li SH, et al. Ultrasound-targeted gene delivery induces angiogenesis after a myocardial infarction in mice [J]. *ACC Cardiovasc Imaging*, 2009, 2(7): 869-879.
- [11] Fujii H, Li SH, Wu J, et al. Repeated and targeted transfer of angiogenic plasmids into the infarcted rat heart via ultrasound targeted microbubble destruction enhances cardiac repair [J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(16): 2075-2084.
- [12] 杨 彦,陈庆伟. 超声微泡在缺血性血管疾病诊断与治疗中的研究进展[J]. *中华超声影像学杂志*, 2010, 19: 1082-1084.
- [13] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis [J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 298-307.
- [14] Xu YL, Gao YH, Liu Z, et al. Myocardium-targeted transplantation of mesenchymal stem cells by diagnostic ultrasound-mediated microbubble destruction improves cardiac function in myocardial infarction of New Zealand rabbits [J]. *Int J Cardiol*, 2010, 138(2): 182-195.
- [15] Yuan QY, Zhu ZW, Wang Z, et al. A novel method of augmenting gene expression and angiogenesis in the normal and ischemic canine myocardium [J]. *Heart Vessels*, 2011, 21(3): 316-326.
- [16] Ghanem A, Steingen C, Brenig F, et al. Focused ultrasound-induced stimulation of microbubbles augments site-targeted engraftment of mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction [J]. *Mol Cell Cardiol*, 2009, 47(3): 411-418.
- [17] Chappell JC, Song J, Burke CW, et al. Targeted delivery of nanoparticles bearing fibroblast growth factor-2 by ultrasonic microbubble destruction for therapeutic arteriogenesis [J]. *Small*, 2008, 4(10): 1769-1777.
- [18] Li X, Wang Z, Ran H, et al. Experimental research on therapeutic angiogenesis induced by hepatocyte growth factor directed by ultrasound-targeted microbubble destruction in rats [J]. *Ultrasound Med*, 2008, 27(3): 453-460.
- [19] Xie J, Liao Y, Yang L, et al. Ultrasound molecular imaging of angiogenesis induced by mutant forms of hypoxia-inducible factor-1 α [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 92(2): 256-266.
- [20] Vancraeynest D, Havaux X, Pasquet A, et al. Myocardial injury induced by ultrasound-targeted microbubble destruction: evidence for the contribution of myocardial ischemia [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2009, 35(4): 672-679.
- [21] Lasala GP, Minguell JJ. Bone marrow-derived stem/progenitor cells: their use in clinical studies for the treatment of myocardial infarction [J]. *Heart Lung Circ*, 2009, 18(3): 171-180.

(收稿日期:2014-10-09)