

# 超声微泡作为基因或药物载体的研究进展

沈圆圆<sup>1</sup>, 高钟镐<sup>1\*</sup>, Natalya Rapoport<sup>2</sup>

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 2. 美国犹他大学生物工程学院, 盐湖城 84112)

**摘要:** 随着新型超声微泡造影剂的研究和应用, 超声微泡不仅能增强超声造影, 而且也能作为运送基因或药物的载体。在超声作用下, 含基因或药物的微泡能穿透血管内皮, 释放基因或药物, 达到靶向治疗目的。本文综述了超声微泡的生物学效应、制备和应用等方面的研究进展。

**关键词:** 超声微泡; 纳米; 药物递送; 靶向

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 09-0961-06

## Recent advances in the applications of ultrasonic microbubbles as gene or drug vectors

SHEN Yuan-yuan<sup>1</sup>, GAO Zhong-gao<sup>1\*</sup>, Natalya Rapoport<sup>2</sup>

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Department of Bioengineering and Pharmaceutics, University of Utah, Salt Lake City, 84112, USA)

**Abstract:** With the research and application of the new ultrasound microbubble contrast agents, ultrasonic microbubbles can not only help to image, but they can also be used as genes or drug carriers. The microbubbles as genes or drug carriers can pass across the endothelial cell barrier and release genes and drug under the action of ultrasound field, which achieve target treatment effect. Based on the relevant materials, the bioeffects, early successes with gene and drug delivery, and potential clinical applications are reviewed.

**Key words:** ultrasound microbubble; nanometer; drug delivery; target

自 Gramiak 等<sup>[1]</sup>将超声微泡造影剂应用于临床以来, 超声微泡的研究得到了很大的发展。特别是第3代微泡造影剂如 Optison<sup>®</sup>的出现, 以白蛋白、非离子表面活性剂、脂质或高分子多聚物为壳膜, 内含低弥散度的氟碳气体, 使微泡的稳定性大大提高。超声微泡辅助药物传输的观点提出后, 超声微泡作为运送基因或药物载体的研究比单纯的影像学研究吸引了更多的关注。超声波破坏微泡可作为一种新型的基因或药物定位释放技术, 为疾病的治疗提供了一种新型、无创、高效、简便的方法。

### 1 超声微泡及其生物学效应

超声微泡是内含气体的小球, 以高分子多聚物、脂质或白蛋白等物质为壳膜。微泡内气体与微泡外血

液的声阻抗有巨大差别, 因此含气体的微泡是高效的超声造影剂<sup>[2]</sup>。理想的超声造影剂应该安全、在血液循环中足够稳定、能够改变“感兴趣区”组织的超声特性。超声微泡作为基因或药物载体, 将超声微泡经静脉或局部注射到动物或人体内后, 在靶组织给予一定条件的超声照射, 微泡将破裂而释放基因或药物, 可明显提高局部组织、细胞的基因转染和表达或药物吸收。

微泡的生物学特性使其成为将基因或药物递送到细胞中的理想手段。研究显示微泡破裂能使细胞膜通透性增加。微泡破裂时产生的高能冲击波或微射流在内皮细胞膜上产生切应力增加其通透性<sup>[3]</sup>。这种通透性的增加可能是由于在质膜或核膜上出现了暂时性小孔。细胞膜上产生的暂时性非致命声孔使细胞外大分子和颗粒进入细胞内, 增强微泡对基因或药物

收稿日期: 2009-01-08.

\*通讯作者 Tel: 86-10-63028096, E-mail: zgao@imm.com.cn

的递送(声孔效应)。微泡在细胞表面的快速震荡(声学中称为微束)能增加DNA通过细胞膜<sup>[4]</sup>。

超声微泡介导基因或药物递送的机制主要有3种:第一,超声能量使基因或药物穿透各种组织。声强能把物质“推入”皮肤、血栓或其他组织;第二,超声对细胞膜直接作用,改变细胞膜的通透性或者细胞/组织对药物的吸收。第三,超声可以改变药物自身的化学性质。据报道,光敏性药物如血卟啉能被超声活化而杀死肿瘤细胞<sup>[5]</sup>。

## 2 超声微泡的制备

### 2.1 制备超声微泡的材料

超声微泡用于包裹气体的壳膜材料主要是高分子多聚物、脂质或白蛋白,在体内均可生物降解。用高分子多聚物(如聚乙二醇、聚乳酸、乳酸/羟基乙酸共聚物、聚己内酯等)为壳膜材料的微泡较脂质微泡更稳定,但是由于壳膜上高分子聚合物链的缠绕和共价键的直接结合导致减缓了气体核的振动,其声学响应性较低。以白蛋白为壳膜材料的超声微泡最先上市,如Albunex<sup>®</sup>和Optison<sup>®</sup>(GE Healthcare),是FDA批准的造影剂。但白蛋白具有热变性,易受温度的影响。用作微泡壳膜的脂质很多,如1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱(DPPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷脂酸-钠盐(DPPA)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷脂酸甘油基-钠盐(DPPG)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱(DSPC)等,通常为碳氢或碳氟化合物链与亲水基团通过丙三醇共价连接,因为这类磷脂高度饱和脂肪链长,与普通的卵磷脂相比具有更高的稳定性,药物的包封率高、渗漏率低。脂质作为微泡的壳膜虽不如高分子多聚物的稳定,但其声学响应性好,形成的微泡易产生回波;与白蛋白相比,脂质微泡在制备时不受严格的稳定控制,易于连接其他靶向配体。因此,多选择脂质作为超声微泡的壳膜材料。

超声微泡的气体核心多采用低弥散度、低血液溶解度的氟碳气体(C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>、C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>、C<sub>5</sub>F<sub>12</sub>等)或氟硫气体(如SF<sub>6</sub>),其在血液中的稳定性及循环时间明显高于空气核心的超声微泡,声学响应性也比空气核心微泡好。

### 2.2 超声微泡的制备方法

目前国内外常用的超声微泡的制备方法有界面聚合法、乳化法、机械匀化法、超声空化法和冷冻干燥法等。作者采用超声空化法,用可降解医用高分子聚乙二醇-聚乳酸(PEG<sub>2000</sub>-PLLA<sub>2000</sub>)和十二氟戊烷(PFP)制备得到粒径在200 nm以下的微泡<sup>[6]</sup>。Liu等<sup>[7]</sup>用机械震荡法制备的

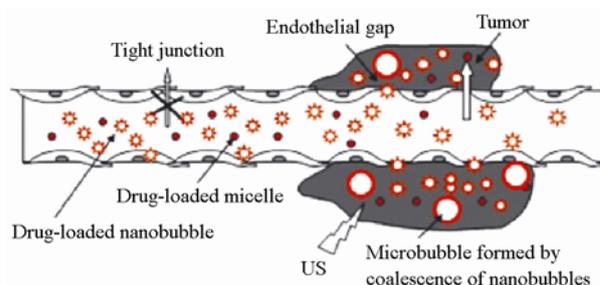
载竹红菌素脂质微泡粒径在1 μm左右,包封率大于85%。Zhao等<sup>[8]</sup>采用冷冻干燥法制备的脂质微泡,浓度较高,体内造影强度和持续时间与国外上市产品SonoVue<sup>®</sup>无明显差异。

### 2.3 超声微泡与基因或药物的结合方式<sup>[9]</sup>

超声微泡携带基因或药物的方式有多种:①将基因或药物直接黏附于微泡壳膜表面;②将基因或药物插入微泡壳膜中;③将基因或药物以非共价形式结合到微泡壳膜表面;④将基因或药物包裹入微泡内部;⑤将基因或药物包裹在双分子层微泡壳膜的内外层之间。

### 2.4 超声微泡的靶向性

近些年,国内外着眼于靶向超声微泡造影剂的相关研究,通过主动靶向和被动靶向作用,可以使超声微泡以更高的浓度聚集在靶组织,达到定向目标增强显影;同时,超声微泡作为一种载体,利用超声波与微泡的相互作用及所产生的生物学效应,可实现所携带基因或药物等向目标组织的转移释放,从而起到靶向治疗的作用。而近来出现的纳米级超声微泡,相比微米级超声微泡有更强的穿透力。通过在制备过程中参数的控制,可以达到750 nm以下的小粒径微泡。它能穿越肿瘤毛细血管内皮进入组织间隙(图1)<sup>[6]</sup>,实现靶向显影和靶向治疗的作用。纳米级超声微泡在体内血管中以纳米



**Figure 1** Schematic representation of a drug targeting through the defective tumor microvasculature using an echogenic drug delivery system. The system comprises polymeric micelles (small circles), nanobubbles (stars), and microbubbles (large circles). Micelles are formed by a biodegradable block copolymer (e.g. PEG-PLLA or PEG-PCL); bubbles are formed by perfluorocarbon (e.g. perfluoropentane) stabilized by the same biodegradable block copolymer. Lipophilic drug (e.g. doxorubicin) is localized in the micelle cores and the walls of nano/microbubbles. Tight junctions between endothelial cells in blood vessels of normal tissues do not allow extravasation of drug-loaded micelles or nano/microbubbles (indicated by cross). In contrast, tumors are characterized by defective vasculature with large gaps between the endothelial cells, which allow extravasation of drug-loaded micelles and small nanobubbles, resulting in their accumulation in the tumor interstitium. On accumulation in the tumor tissue, small nanobubbles coalesce into larger, highly echogenic microbubbles that release their drug load in response to therapeutic ultrasound (US)

颗粒形式存在, 以便透过毛细血管, 它不仅能够聚集在肿瘤组织中, 而且由于体内温度的升高纳米颗粒逐渐变成大的微泡而超声显影<sup>[10]</sup>。

物理化学相互作用可以增加靶向特异性, 最简单的例子就是表面电荷的作用。而在复杂的生理环境下, 仅靠静电作用特异性是不够的, 配体-受体的相互作用在生物介质中有更高的特异性。将配体接在微泡表面的基本方法有两种: 即通过共价键直接结合或通过生物素-亲和素结合。生物素-亲和素链接是一种线性链接, 生物素化配体与生物素化微泡通过亲和素桥配对。虽然生物素-亲和素链接对原理的验证和临床前靶向研究有用, 但是由于其免疫原性妨碍了它应用到人体。共价结合物更容易设计且能在微泡生成前或后附着于微泡壳上。在生成的微泡上结合配体的方法包括配体上的氨基与微泡壳膜上碳化二亚胺和 *N*-羟基硫代琥珀酰亚胺的羧基结合, 或者配体上的巯基与微泡壳膜上的马来酰亚胺结合。对于脂质微泡, 其优势在于使用现成的配体-脂质聚合物减少了微泡生产和病人给药之间的临床制备的步骤。通过对微泡的修饰会使配体的使用更有效。对化学结合方式和修饰次序的适当选择取决于配体的类型, 要重点考虑配体大小和它对生物利用度的影响<sup>[11]</sup>。

**2.5 超声微泡的稳定性** 超声微泡的稳定性发展经历了 3 个阶段。第 1 阶段为自由气体, 由于气-液界面表面张力的作用, 未经包裹的微泡几乎在刚形成的同时自发溶解, 不能经外周静脉注射; 加之微泡在血液循环中持续时间极为短暂、粒径太大、不能通过肺循环。第 2 阶段是以白蛋白、脂类或多糖等作为膜材包裹空气气泡, 这类微泡的膜材比较稳定, 直径较小 ( $< 8 \mu\text{m}$ ), 在血液中的持续时间明显延长, 经外周静脉注射可通过肺毛细血管显影左心腔及外周血管。欲使微泡具有合适的半衰期 (几天到几个月), 则微泡壳必须足够坚固以消除表面张力并传递显著的渗透阻力, 而高分子气体可增强壳渗透阻力。第 3 阶段是分子较大、溶解度和弥散度低的氟碳气体代替空气, 新的稳定性高的材料如磷脂、非离子表面活性剂及可生物降解的高分子多聚物等作为膜材, 使得微泡的粒径缩小并趋于一致, 理化性能稳定, 稳定性和抗压性进一步提高。

### 3 超声微泡的应用

超声微泡特别适合于局部给药, 因为它能够在几个几百微米到几厘米的小范围内瞬时振动。其中一种给药方式就是静脉注射给药时加入超声微泡, 然后在靶区超声。在小血管中, 微泡的振动会改变血管

壁, 使药物外渗<sup>[12]</sup>。微泡和钆同时给药后核磁共振成像显示钆的外渗<sup>[13]</sup>。将药物包入微泡中, 通过在靶区选择性地破碎微泡可以达到局部给药的目的。有报道证实微泡可以引起新生内膜减少、内皮转染和血栓溶解<sup>[14]</sup>。虽然载药微泡的体积不算很小, 但是微泡递送是一种很有希望的穿透血脑屏障的药物/基因递送系统, 因为几乎没有其他方法可以如此大范围的改变血脑屏障的渗透性<sup>[15]</sup>。就像预计的那样, 超声可以在破坏微泡前将其推入血管壁。与微泡进入血管壁类似, 通过破坏递送载体可将药物推进内皮。在体外实验中, 这种方法能够使荧光标记的油聚集到细胞比单用超声多 10 倍<sup>[16]</sup>。更多特异性药物递送系统可以通过在载药微泡表面接上直接靶向特定表面标记物的配体达到目的。内皮表面标记物作为血管增生区域过度表达的标记物, 靶向微泡就会附着在这些标记物上<sup>[17]</sup>。超声可以局部用在靶向微泡上使药物选择性地在这类表面标记物表达的区域递送。

**3.1 抗肿瘤治疗** 目前化疗药物主要是利用脂质体、微球等作为药物载体, 其中脂质体由于可体内降解、无毒、无免疫抑制作用等特点, 作为药物载体越来越受到人们的重视。但是脂质体也存在一定的局限性, 如一般脂质体的靶向性不明显, 包封率较低, 易渗漏, 尤其是到达靶位后释药较慢, 往往难以达到有效治疗浓度。而以超声脂质微泡作为药物载体, 不仅具有脂质体的众多优点, 而且在超声波的作用下可实现药物在靶区域的突释, 迅速达到治疗浓度。

多年来, 脂溶性抗癌药物都是包入载体中而避免全身毒性。可将疏水性药物包入微泡的脂质层中或将亲水性分子吸附于微泡壳上, 也可以将疏水性药物插入到声学响应脂质体 (AALs) 的油层中。毒性研究表明, 与未被包裹的紫杉醇相比, AALs 包裹的紫杉醇在全身静脉注射时毒性降低了 10 倍<sup>[18]</sup>。Nie 等<sup>[19]</sup>以 SonoVue 作为绿色荧光蛋白质 (pEGFP) 基因载体, 尾静脉注射到小鼠肝癌皮下移植瘤模型中, 结果显示载 pEGFP 微泡在超声照射后可明显提高 pEGFP 的转染率, 且对组织无损害。Liu 等<sup>[20]</sup>用自制的载紫杉醇超声微泡对人肝癌 HepG2 细胞进行体外实验, 结果表明载紫杉醇超声微泡经超声照射后对细胞的增殖抑制作用强于其他未超声组和对照组, 其对入肝癌细胞 HepG2 生长有明显抑制作用, 并诱导细胞凋亡。Rapoport 等<sup>[10]</sup>用聚合物胶束和十二氟戊烷 (perfluoropentane) 制备了携带阿霉素的纳米级超声微泡, 通过静脉注射对荷有药物敏感卵巢癌的裸鼠进行治疗, 结果表明纳米级微泡通过外渗选择

性地进入肿瘤间隙, 靶向聚集在肿瘤组织, 而几乎不滞留在肝、肾等其他器官, 且对肿瘤的生长有明显的抑制作用; 静脉注射到荷有耐药性乳腺癌的裸鼠治疗结果表明, 耐药性乳腺癌细胞吸收微泡中的药物强于胶束中的药物, 超声微泡使癌细胞增加了药物吸收 2 倍左右, 表明微泡是一种安全、能增强药物传递的载体。

血管生成是癌生长和扩散的基本过程。超声微泡在血管里容易接近与血管生成相关的内皮细胞及其受体。超声造影剂表面接上配体已经成功应用于造影目的。整合素, 特别是  $\alpha_v\beta_3$ , 在血管生成中的细胞黏附、细胞迁移、信号转导中发挥重要作用。Lindner 的团队<sup>[21]</sup>将能与  $\alpha_v$  整合素高度结合的单克隆抗体和 RGD 肽通过生物素-亲和素系统结合到微泡表面。在小鼠模型中, 超声检测到在  $\alpha_v$  整合素正调节的血管生成区域的微泡信号明显增强。Crowder 等<sup>[22]</sup>用全氟化碳脂质微泡进行了体外靶向药物研究, 将载入脂溶性药物的靶向微泡加到体外培养高表达的  $\alpha_v\beta_3$  的 C32 黑色素瘤细胞中, 结合超声照射, 可见细胞浆内脂溶性药物浓度是对照组的 2 倍。

Endoglin (CD105), 一种转化生长因子受体, 是增生相关的低氧诱导蛋白, 在血管生成的内皮细胞上高表达。用  $^{99m}\text{Tc}$  标记的靶向 endoglin 的单克隆抗体的免疫闪烁成像表明其被肿瘤大量摄取。最近, 提出一种将微泡上的单克隆抗体与 endoglin 特异结合的新方法。亲和素通过声裂法包入微泡壳, 然后通过生物素与单克隆抗体结合。体外实验表明微泡上的配体靶向 endoglin 而定向聚集<sup>[23]</sup>。如果能在微泡表面接上多肽和单克隆抗体, 可以预见靶向超声微泡可用于血管内皮生长因子 (VEGF), 成纤维细胞生长因子 (FGF) 和金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMPS) 的酪氨酸激酶受体的成像<sup>[24]</sup>。

**3.2 基因治疗** 基因治疗是近年来研究的热点, 基因治疗的关键问题是基因的转染与表达。目前常用基因运送载体是病毒载体, 病毒作为转基因的载体有着转染率高的优点, 但存在免疫原性和致突变性, 安全性差。非病毒载体较安全, 又存在转染率低、靶向性差等缺陷而影响其在体内作用的发挥。因此开发安全高效、简便实用的基因载体是基因治疗的关键。超声微泡在超声波作用下产生谐振效应, 依靠能量辐射作用使微泡破坏后释放的基因能够进入血管壁甚至组织间隙, 从而发挥靶向治疗作用。超声微泡介导的靶向基因治疗方法既可增强裸质粒 DNA 在细胞内的转染和表达, 又能提高基因治疗的靶向性, 减少全

身不良反应, 不会引起机体的免疫反应和病毒载体产生的突变, 是一种新型安全高效的基因转染技术。

靶向超声微泡是一种很有潜力的基因递送治疗方法。腺病毒或质粒载体可包入白蛋白类超声微泡中, 递送入心肌后在靶区域超声破坏微泡<sup>[25, 26]</sup>。携带编码 VEGF 质粒的微泡在超声作用下已经用于诱导大鼠心肌血管的生成。因传统微球带负电荷, 对同样带负电荷的 RNA 和 DNA 分子的细胞转染效率很低, Tiukinhoy 等<sup>[27]</sup>制备了一种带正电荷的声学响应脂质体, 用于血管内超声系统, 可以递送和检测人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 中表达的荧光素酶基因。Ren 等<sup>[28]</sup>用 HIV-1 Tat 蛋白转导域/质粒 DNA/liposome (TDL) 复合物和肝细胞生长因子 (HGF) 基因进行体外培养的 HUVEC 的转染实验, 发现 TDL 复合物联合超声微泡和超声照射的绿色荧光强度及转染率均高于对照组, 并对细胞活性无明显影响, 其 HGF mRNA 及 HGF 蛋白的表达也均高于对照组。Wang 等<sup>[29]</sup>在体外用超声微泡和 *MDR1* 基因进行转染兔骨髓单个核细胞实验, 结果表明低频超声波击碎微泡能促进以腺病毒为载体介导的外源性 *MDR1* 基因转染兔骨髓单个核细胞的效率, 且安全可行。DNA 和微泡共同孵育能使 DNA 融合到微泡外壳中, 使其易于共注射。Shohet 等<sup>[26]</sup>研究表明静脉注射外壳中包入质粒 DNA 的白蛋白类微泡, 并联合超声能将基因递送到心肌, 外壳中包入 DNA 的脂质微泡在静脉注射和超声后也有相似的局部转染。Chen 等<sup>[30]</sup>将脂质微泡和绿色荧光蛋白 (EGFP) 经裸鼠尾静脉注射并超声照射, 结果表明注射质粒和脂质微泡并联合超声组的裸鼠皮下移植瘤内有显著的 EGFP 表达, 均高于对照组 ( $P < 0.01$ ); 基因表达的最佳时间是第 3 天 ( $P < 0.01$ ); 无论有否超声照射, 裸鼠其他器官组织中均无明显的 EGFP 表达, 且未观察到明显的组织损伤。

静脉注射临床治疗浓度的微泡可实现治疗基因或药物递送。大鼠心脏基因转染需静注  $1 \times 10^9/\text{mL}$  的微泡  $1 \text{ mL}$ <sup>[25]</sup>。大鼠胰腺的治疗基因的有效递送需注射  $5 \times 10^9/\text{mL}$  的微泡  $1 \text{ mL}$ <sup>[31]</sup>。微泡的发展使其静注很小剂量便能成功转染, 这对将来基因翻译研究很重要。临床前研究发现肌内注射微泡, 质粒会产生一致的局部转染<sup>[32]</sup>。肌内注射质粒和微泡, 仅注射微泡没有超声就能增加转染。质粒 DNA 和微泡共注射到肾动脉并联合短时脉管压迫和超声能在肾脏中产生局部基因表达<sup>[33]</sup>。质粒 DNA 和微泡共注射到脑脊液并联合超声, 使 DNA 传递到大鼠中枢神经系统<sup>[34]</sup>。

**3.3 溶栓治疗** 第1个成功的靶向超声微泡是在90年代末通过生物素-亲和素结合制成的。发展了体内成像三步法<sup>[35]</sup>。首先,生物素(酰)化的单克隆抗体给药,与血块中的纤维蛋白联合。然后亲和素给药,其中生物素连接在单抗上。最后,生物素(酰)化的超声微泡给药,结合着暴露末端的亲和素分子。超声微泡的这种靶向方法使血块的声学响应性增加了4倍。

近来,Unger等<sup>[36]</sup>制备了一种靶向活化血小板的超声微泡MRX408。这种微泡表面直接接上精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸(RGD)分子。RGD与活化血小板表面的糖蛋白IIB/IIIA受体结合。MRX408被证实在体内外能增加血栓的可见性和更好确定血栓的范围。

无论微泡是否存在,超声都能增加血栓溶解,特别是与静注血栓溶解剂合用。1~2 MHz的超声频率被证实能有效溶栓且使治疗引起的出血最少。空化作用和血栓溶解剂联用比单用微泡和超声更能成功地溶解血栓。

**3.4 动脉粥样硬化治疗** 动脉粥样硬化最早期的标志之一是单核细胞活化和吸附到内皮细胞,这被白细胞黏附分子(LAMs)如细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的上调介导。1997年发现用于常规心脏超声造影的白蛋白超声微泡在某些病理条件下通过心脏时有一个缓慢循环时间<sup>[37]</sup>。在体外这些微泡优先黏附到表达LAMs的内皮细胞上。然后,接有靶向ICAM-1单抗的超声微泡在体内外显示有很好的结合率。Weller等<sup>[38]</sup>描述了一种有效靶向炎症部位的微泡,用微泡可靶向在炎症应答过程中活化的内皮细胞。Takalkar等<sup>[39]</sup>用一种平行板流动室测定被白介素-1 $\beta$ 人工活化的内皮细胞与抗-ICAM-1的微泡之间的黏附性。与非靶向的对照微泡相比,靶向微泡的黏附性大40倍。

在炎症和缺血-再灌注损伤部位其他白细胞黏附分子是正调节,特别有趣的是P-选择蛋白,在小鼠炎症模型中超声微泡对P-选择蛋白有靶向性。Rychak等<sup>[40]</sup>最近证明了变形微泡可以靶向黏附到P-选择蛋白。

## 4 展望

当前超声微泡作为药物/基因的递送还处在初级阶段。许多新的超声微泡在将来临床医学上的应用将更广泛。超声对基因表达有直接影响,也许可以在不使用外源性微泡的情况下增强基因表达。

这项技术在临床上的推广应用将依赖于此方面的需求。首先是微泡的发展,微泡要达到有效载药量且能被超声破坏。其次,微泡要能承受高切应力且表面能接上抗体或配体。由于微泡对病灶的靶向性仅与微泡表面接的配体的靶向性一致,因此靶向病灶的

特异性微泡的改进依赖于肿瘤或疾病上特异性抗原的识别和靶向这些抗原的抗体的发展。微泡的化学组成的改进要求微泡延长循环时间和避免被网状内皮系统清除。只有克服这些障碍,超声微泡才能在药物/基因的治疗递送的医学应用中发挥更大的作用。

## References

- [1] Gramiak R, Shah PM. Echocardiography of the aortic root [J]. *Invest Radiol*, 1968, 3: 356-366.
- [2] Lindner JR, Kaul S. Delivery of drug with ultrasound [J]. *Echocardiography*, 2001, 18: 329-337.
- [3] Dijkmans PA, Juffermans LJ, Musters RJ, et al. Microbubbles and ultrasound: from diagnosis to therapy [J]. *Eur J Echocardiogr*, 2004, 5: 245-256.
- [4] Frenkel V, Kimmel E, Iger Y. Ultrasound-induced cavitation damage to external epithelia of fish skin [J]. *Ultrasound Med Biol*, 1999, 25: 1295-1303.
- [5] Umemura S, Kawabata K, Sasaki K, et al. Recent advances in sonodynamic approach to cancer therapy [J]. *Ultrason Sonochem*, 1996, 3: S187-S191.
- [6] Gao Z, Kennedy AM, Christensen DA, et al. Drug-loaded nano/microbubbles for combining ultrasonography and targeted chemotherapy [J]. *Ultrasonics*, 2008, 48: 260-270.
- [7] Liu XB, Wang ZG, Xu CS, et al. Preparation of microbubbles containing hypocrelin and visualization to rabbit VX2 liver tumor [J]. *Chin J Med Technol (中国医学影像技术)*, 2008, 24: 1508-1510.
- [8] Zhao YZ, Lu CT, Mei XG. Optimization of the preparation of sonogenic phospholipids-based microbubbles by using central composite experimental design and response surface methodology [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 862-867.
- [9] Unger EC, Matsunaga TO, McCreery T, et al. Therapeutic applications of microbubbles [J]. *Eur J Radiol*, 2002, 42: 160-168.
- [10] Rapoport N, Gao Z, Kennedy A. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99: 1095-1106.
- [11] Lin JJ, Ghoroghchian PP, Zhang Y, et al. Adhesion of antibodyfunctionalized polymersomes [J]. *Langmuir*, 2006, 22: 3975-3979.
- [12] Miller DL, Quddus J. Diagnostic ultrasound activation of contrast agent gas bodies induces capillary rupture in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 10179-10184.
- [13] McDannold NJ, Vykhodtseva NI, Raymond S, et al. MRI-guided targeted blood-brain barrier disruption with focused ultrasound: histological findings in rabbits [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2005, 31: 1527-1537.
- [14] Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, et al. Local delivery

- of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound [J]. *Circulation*, 2002, 105: 1233–1239.
- [15] McDannold NJ, Vykhodtseva NI, Hynynen K. Microbubble contrast agent with focused ultrasound to create brain lesions at low power levels: MR imaging and histologic study in rabbits [J]. *Radiology*, 2006, 241: 95–106.
- [16] Shortencarier MJ, Dayton PA, Bloch SH, et al. A method for radiation-force localized drug delivery using gasfilled lipospheres [J]. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 2004, 51: 822–831.
- [17] Ellegala DB, Leong-Poi H, Carpenter JE, et al. Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to  $\alpha(v)\beta_3$  [J]. *Circulation*, 2003, 108: 336–341.
- [18] Tartis MS, McCallan J, Lum AF, et al. Therapeutic effects of paclitaxel-containing ultrasound contrast agents [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2006, 32: 1771–1780.
- [19] Nie F, Xu HX, Lu MD, et al. Effect of microbubble-enhanced ultrasound exposure on gene transfection of green fluorescent protein plasmid in hepatocellular carcinoma: experimental study [J]. *Chin J Ultrasound Med (中国超声医学杂志)*, 2007, 23: 95–97.
- [20] Liu Y, Kang J, Wu XL, et al. Paclitaxel loaded ultrasound contrast agents for proliferation inhibition and apoptosis induction of hepgtoma carcinoma cell strain HepG2 [J]. *Chin J Ultrasound Med (中国超声医学杂志)*, 2008, 24: 676–678.
- [21] Leong-Poi H, Christiansen J, Klivanov AL, et al. Noninvasive assessment of angiogenesis by ultrasound and microbubbles targeted to  $\alpha(v)$ -integrins [J]. *Circulation*, 2003, 107: 455–460.
- [22] Crowder KC, Hughes MS, Marsh JN, et al. Sonic activation of molecularly-targeted nanoparticles accelerates transmembrane lipid delivery to cancer cells through contact-mediated mechanisms: implications for enhanced local drug delivery [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2005, 31: 1693–1700.
- [23] Korpany G, Grayburn PA, Shohet RV, et al. Targeting vascular endothelium with avidin microbubbles [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2005, 31: 1279–1283.
- [24] Kulasegaram R, Giersing B, Page CJ, et al. *In vivo* evaluation of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-N-TIMP-2 in Kaposi sarcoma associated with HIV infection [J]. *Eur J Nucl Med*, 2001, 28: 756–761.
- [25] Bekeredian R, Chen SY, Frenkel PA, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart [J]. *Circulation*, 2003, 108: 1022–1026.
- [26] Shohet RV, Chen SY, Zhou YT, et al. Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium [J]. *Circulation*, 2000, 101: 2554–2556.
- [27] Tiukinhoy SD, Mahowald ME, Shively VP, et al. Development of echogenic, plasmid-incorporated, tissue-targeted cationic liposomes that can be used for directed gene delivery [J]. *Invest Radiol*, 2000, 35: 732–738.
- [28] Ren JL, Wang ZG, Xu CS, et al. Ultrasound microbubbles enhanced TDL compound mediated gene transfection *in vitro* [J]. *Chin J Ultrasound Med (中国超声医学杂志)*, 2008, 24: 385–388.
- [29] Wang Y, Guo ZH, Jin XQ, et al. Ultrasonic microbubbles enhance efficiency of adenovirus vector-mediated MDR1 gene transfection *in vitro* [J]. *Acta Acad Med Mil Tert (第三军医大学学报)*, 2009, 31: 67–70.
- [30] Chen ZY, Xie MX, Wang XF, et al. Experimental study of ultrasound-mediated lipid shell microbubble targeted delivery enhanced green fluorescent protein *in vivo* [J]. *Chin J Ultrasound Med (中国超声医学杂志)*, 2008, 24: 1057–1060.
- [31] Chen SY, Ding JH, Bekeredian R, et al. Efficient gene delivery to pancreatic islets with ultrasonic microbubble destruction technology [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 8469–8474.
- [32] Pislaru SV, Pislaru C, Kinnick RR, et al. Optimization of ultrasound-mediated gene transfer: comparison of contrast agents and ultrasound modalities [J]. *Eur Heart J*, 2003, 24: 1690–1698.
- [33] Koike H, Tomita N, Azuma H, et al. An efficient gene transfer method mediated by ultrasound and microbubbles into the kidney [J]. *J Gene Med*, 2005, 7: 108–116.
- [34] Shimamura M, Sato N, Taniyama Y, et al. Gene transfer into adult rat spinal cord using naked plasmid DNA and ultrasound microbubbles [J]. *J Gene Med*, 2005, 7: 1468–1474.
- [35] Lanza GM, Wallace KD, Fischer SE, et al. High frequency ultrasonic detection of thrombi with a targeted contrast system [J]. *Ultrasound Med Biol*, 1997, 23: 863–870.
- [36] Unger E, Metzger P, Krupinski E, et al. The use of a thrombus-specific ultrasound contrast agent to detect thrombus in arteriovenous fistulae [J]. *Invest Radiol*, 2000, 35: 86–89.
- [37] Villanueva FS, Jankowski RJ, Manaugh C, et al. Albumin microbubble adherence to human coronary endothelium: implications for assessment of endothelial function using myocardial contrast echocardiography [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1997, 30: 689–693.
- [38] Weller GER, Villanueva FS, Klivanov AL, et al. Modulating targeted adhesion of an ultrasound contrast agent to dysfunctional endothelium [J]. *Ann Biomed Eng*, 2002, 30: 1012–1019.
- [39] Takalkar AM, Klivanov 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: 473–482.
- [40] Rychak JJ, Lindner JR, Ley K, et al. Deformable gas-filled microbubbles targeted to P-selectin [J]. *J Control Release*, 2006, 114: 288–299.