

DOI: 10.13376/j.cbls/2021084

文章编号: 1004-0374(2021)06-0781-09

· 技术与应用 ·

超声联合微泡介导血脑屏障开放及其在中枢神经系统疾病治疗中的作用

韩茹茵, 王一卉, 孙悦, 王筱冰*

(陕西师范大学生命科学学院, 西安 710119)

摘要: 血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 是一种介于外周循环系统与中枢神经系统之间的动态结构, 起着守门员的作用, 在维持机体内环境稳定的同时也阻碍了大多数治疗性药物进入大脑。聚焦超声联合微泡以非侵入的方式瞬时、局部可逆开放 BBB, 有利于药物分子的跨脑转运和中枢神经系统疾病的多功能诊疗。该文详细介绍了血脑屏障的结构、功能以及超声与微泡的发展历程, 对聚焦超声联合微泡开放 BBB 的潜在机制、影响因素以及在脑部疾病中的最新研究进展进行了总结, 并对其在临床实践中的应用前景进行了展望。

关键词: 聚焦超声; 微泡; 血脑屏障; 中枢神经系统疾病

中图分类号: Q4-3; Q42; R741; R-331

文献标志码: A

Ultrasound combined with microbubbles mediating blood-brain barrier opening and its role in the treatment of central nervous system diseases

HAN Ru-Yin, WANG Yi-Hui, SUN Yue, WANG Xiao-Bing*

(College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

Abstract: The blood-brain barrier (BBB), a dynamic structure between the peripheral circulatory system and the central nervous system, acts as a gatekeeper, which maintains a stable internal environment but prevents most therapeutic drugs from entering the brain. At the same time, focused ultrasound combined with microbubbles can open BBB instantaneously and locally in a non-invasive way, which is conducive to the trans-brain transport of drug molecules and the multifunctional diagnosis and treatment of central nervous system diseases. In this review, the structure, function of BBB and the development of ultrasound and microbubbles are introduced in detail, and the potential mechanism, influencing factors and application of BBB opening by ultrasound in brain diseases are described. Finally, some problems in this area are proposed and the development potentials of this technology in clinical practice are prospected.

Key words: focused ultrasound; microbubbles; blood-brain barriers; CNS diseases

人的一切生命活动均受到大脑的精密调控, 脑部功能的受损必然会严重影响人们的正常生活。脑炎、脑中风和脑部肿瘤等疾病的发生发展均可以诱导机体脑功能的退化, 而帕金森病、阿尔兹海默病等神经退行性疾病亦严重影响着老年人的生活质量。据 GLOBOCAN 2018 数据统计显示, 脑部神经系统肿瘤的致死率位居世界第 13 位^[1]。由于脑部结构的复杂性, 使得中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 疾病在临床治疗中面临着巨大的挑战。

血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 是大脑神经血管单位的重要组成部分, 是控制大脑内物质交换的屏障, 其对维持脑内环境的稳态发挥着重要的作用, 但也正是由于这个“守门员”的存在, 阻挡了大部

收稿日期: 2020-11-27; 修回日期: 2021-01-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(81972900); 陕西省自然科学基金重点项目(2019JZ13)

*通信作者: E-mail: wangxiaobing@snnu.edu.cn

分治疗性药物进入脑实质,降低了脑部疾病的治疗效果。因此,亟需探索一种安全、高效、无创可逆开放 BBB 的新方法,以提升脑部疾病的治疗效果,改善患者的生存质量。2001年, Hynynen 等^[2]首次报道了超声靶向微泡爆破技术 (ultrasound-targeted microbubble destruction, UTMD) 对 BBB 的开放效果,证实了超声联合微泡能够安全、可逆、瞬时开放 BBB,且不会对脑部正常组织造成损伤,该研究为中枢神经系统疾病的临床应用提供了一种全新的治疗策略。

1 血脑屏障的结构与功能

1.1 血脑屏障的结构

早在 19 世纪末, Ehrlich^[3] 就发现将染料通过皮下注入不同动物体内,除脑部以外的其他器官均能被染色,提示脑部有特殊的组织结构存在。直到 1921 年, Stern 和 Gautier^[4] 在研究了大量分子(染料、离子和毒素)在脑部的渗透性后提出了“barrière hémato encéphalique”的概念,即 BBB。1967 年, Reese 和 Karnovsky^[5] 阐明了 BBB 的微观结构,证实了相邻内皮细胞之间的紧密连接 (tight junctions, TJs) 是构成血脑屏障的功能基础。

BBB 的核心结构是由紧密连接的内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 构成,周围有完整的基底膜,嵌入基底膜的大量周细胞和星形细胞足突以及少量的小胶质细胞、神经元共同构成了完整的 BBB 结构。BBB 的通透性由这些细胞及紧密连接蛋白的相互作用及一些信号转导途径共同调控,如 ECs 分泌的转化生长因子 β 可以激活周细胞上的同源受体,胶质细胞、周细胞和神经元通过多种配体和受体调节 ECs 的行为,进而激活下游信号通路 (Frizzled、GPR124、 β -连环蛋白、GLI、PI3K、SRC 和 p38 MAPK 等) 来调控连接蛋白和转运蛋白的表达以维持中枢神经系统的稳态^[6]。

1.2 血脑屏障的功能

BBB 作为中枢神经系统的“守门员”,在保护脑部组织功能、维持内环境稳态方面发挥了重要作用。BBB 的存在几乎阻止了所有的外来物质进入中枢神经系统,保护了其免受细胞毒素等物质的影响,同时, BBB 在结构上将中枢神经与外周神经池分开,减少了细胞间离子流的相互串扰^[7]。但 BBB 并不是一堵密不透风的“墙”,可以通过特定的离子通道来介导离子转运,维持中枢神经系统的离子平衡。内皮细胞可以通过表达一些转运蛋白来介导碳水化

合物、氨基酸等分子的运输,选择性肽等大分子蛋白也可以通过内吞作用穿过 BBB。此外,脑内皮细胞通过表达特有的转运体,如钠依赖性溶血磷脂酰胆碱转运体 1、葡萄糖转运体 1 和溶质载体有机阴离子转运体家族成员 1C1,分别介导长链脂肪酸、葡萄糖和有机阴离子等物质穿过 BBB^[6,8]。

作为脑部独特的屏障结构, BBB 既很好地保护了脑部结构的独立性,又实现了与外界环境的有效沟通,但其中枢神经系统疾病的治疗中却是阻碍药物在脑靶区富集的最大障碍。目前,临床上促进药物跨 BBB 递送的方式可分为侵入性和非侵入性,侵入性手段主要包括鞘内给药、经鼻给药和对流增强等,但这些治疗方式实施起来困难且会引发一系列的并发症。例如,在深部脑刺激治疗帕金森病时,需要将神经刺激器连接到植入电极上,这存在严重的并发症及脑损伤等风险。因此,该侵入性的治疗方式在临床上的应用受到了极大的限制^[9]。非侵入性治疗手段主要包括通过对药物进行化学修饰^[10]以提升药物的转运效率,或者用外泌体^[11]、病毒^[12]等作为载体来促进药物跨 BBB 转运,但这些方法有一定的神经毒副作用,因此在临床上也没有得到大范围推广和应用。

2 超声与微泡在 BBB 开放中的应用

2.1 聚焦超声用于 BBB 开放

超声 (ultrasound) 是一种弹性机械波,具有良好的生物组织穿透性,在传播过程中可产生机械效应、热效应、化学效应及空化作用,引起机体的结构和功能变化。超声在临床上已被广泛用于疾病的成像诊断,其具有无创、辐射低、操作方便等诸多优势。近年来,随着研究的深入,超声在脑部肿瘤、帕金森病、阿尔兹海默病、肌萎缩侧索硬化症以及抑郁症等神经系统疾病的治疗中也显示出其独特的潜能。

20 世纪 50 年代, Bakay 等^[13] 利用高强度聚焦超声辐照猫的脑组织后,发现猫的脑实质受损的同时也检测到 BBB 的短暂开放,提示高强度聚焦超声可以改变 BBB 的通透性。1960 年, Ballantine 等^[14] 通过改变超声参数,实现了在不损伤脑组织的前提下操控 BBB 的开放,这为脑部疾病的治疗提供了重要的方向和思路。但由于脑部结构的复杂性,且聚焦超声容易被颅骨反射,使超声能量大幅度衰减,又给利用超声开放 BBB 治疗脑部疾病带来了一定的挑战。

2.2 微泡的发展及应用

20世纪60年代初, Gramiak 和 Shah^[15]首次报道了将微小气泡用于心脏显影的研究, 造影剂在超声刺激下可产生非线性散射回波信号, 为疾病的诊断提供了有意义的生理和病理信息。早期的超声造影剂多为游离气泡, 其存在半衰期短、尺寸不确定及无法通过肺循环等缺点因而未得到广泛的应用。此后, 研究者通过增加相对分子质量、降低溶解度、掺入低扩散性气体(如氮或全氟化碳)以及使用可生物降解的膜壳材料(如白蛋白、磷脂或聚合物)等措施不断优化造影剂的参数及合成工艺, 最终获得了半衰期长、粒径大小合适、稳定性良好的微泡(microbubbles, MBs)^[16]。目前, 临床上应用的超声造影剂主要包括 Definity、Optison、Sonazoid 和 SonoVue 等, 这些微米级微泡主要被用于血池造影成像。随着纳米技术的快速发展, 通过光热或高强度聚焦超声等技术可以实现微泡的微纳转换, 从而进行血管外组织成像^[17]。2017年, Willmann 等^[18]首次将超声分子影像技术应用于乳腺癌和卵巢癌临床试验, 发现超声分子影像信号与免疫组化的实验结果高度吻合, 提示超声联合微泡能够为疾病诊疗一体化的实现提供一种有效的手段。

2.3 超声联合微泡开放BBB

2001年, Hynynen 等^[2]首次将超声与微泡联合用于兔脑 BBB 的开放研究, 发现在超声处理前注射一定剂量的微泡, 可以在较低的声压下实现 BBB 的无创、靶向、可逆开放, 且重复性较好, 不会对脑组织造成永久性损伤。MBs 的使用极大降低了超声开放 BBB 的声强阈值, 有效减少了超声热效应对脑组织的损伤。此后, 超声联合微泡被广泛应用于纳米载药系统、基因和其他小分子物质的跨 BBB 转运。Ting 等^[19]的研究表明, MBs 包裹卡莫司汀可以实现药物的靶向递送, 并延缓了药物半衰期, 在超声作用下, 卡莫司汀的释放量增加了 4.2 倍, 从而显著延长了胶质瘤患者中位生存期。

硼中子俘获治疗(boron neutron capture therapy, BNCT)是目前临床治疗多形性胶质母细胞瘤的一种放射治疗方法, 但 BBB 的存在限制了 BNCT 药物的渗透。Fan 等^[20]将超声联合微泡开放 BBB 与放疗结合起来, 通过将硼阴离子纳米颗粒与阳离子微泡进行吸附, 在聚焦超声辅助下, 实现了在 BBB 安全开放的同时提高了硼在肿瘤部位的转运效率, 改善了其在脑肿瘤部位的富集量, 达到增强治疗脑胶质瘤的效果。此外, 超声联合微泡开放 BBB 在

小动物及非人类灵长类中已被证实是安全可靠的, 且多次超声刺激也没有导致明显的脑组织损伤^[21]。

超声联合微泡技术开创了 BBB 开放的新局面, 不仅克服了单独超声时存在的高强度超声处理与组织损伤之间的矛盾, 还可充分利用 MBs 的载药功能, 使其在脑部疾病的治疗中具有极大的应用潜能。

3 超声联合微泡开放BBB的作用机制

超声联合微泡可以在毛细血管壁上产生稳态空化和瞬态空化等机械作用, 诱导 BBB 的短暂破裂。稳态空化主要指在低声压下, MBs 在声场中以对称的方式稳定震荡, 产生谐波或超谐波, 对周围的流体和细胞施加剪切力, 在高剪应力作用下, 内皮细胞会脱离, 从而影响细胞膜的完整性; 同时, 超声对物体通过施加辐射力, 使 MBs 在声波传播方向上的响应足以引起 BBB 的开放, 稳定震荡的 MBs 会带动血管扩张和内陷实现对血管内壁的“推-拉”作用, 从而将 ECs 之间的紧密连接打开以增强 BBB 的通透性^[22]。瞬态空化是指在高声压作用下导致的 MBs 瞬间爆破, 产生局部高温、高压并伴有微射流及大量自由基, 无论是自由基还是高压射流都会改变 BBB 的通透性, 但瞬态空化也会造成红细胞外渗或者组织的微出血现象^[23]。

内皮细胞间的紧密连接是影响 BBB 通透性改变的关键结构, 其由多种蛋白组成, 包括 Occludin、Claudins、连接黏附分子和钙黏蛋白, 任何一种蛋白的缺失均会影响 BBB 的通透性。有研究报道, 聚焦超声会下调或直接破坏紧密连接蛋白 Occludin、Claudin-5 和 ZO-1 的表达, 打开细胞旁通路, 在超声作用 24 h 后, 这些蛋白表达逐渐恢复到正常水平^[24], 提示紧密连接的结构中断可能导致了 BBB 的开放, 且此过程是短暂可逆的。此外, BBB 通透性的增加也与超声联合微泡介导的多药耐药 P-糖蛋白表达下调^[25]及内皮细胞上空泡、囊泡、开窗和跨细胞通道数量的增加有关^[26]。

目前认为, 超声联合微泡介导 BBB 开放主要归结于空化作用, 包括其对紧密连接的中断导致的“快速”渗漏以及细胞转运增加而导致的“缓慢”渗透, 但其更为确切的分子机制还有待进一步研究。

4 超声联合微泡开放BBB的影响因素

超声联合微泡诱导 BBB 开放的同时会导致局部靶组织温度的升高, 造成微出血、血管破裂、脑水肿等副作用, 通过磁共振成像(magnetic resonance

imaging, MRI)、组织学变化及分子诊断等方法,可以在开放 BBB 的同时进行安全性评估,也可以利用被动空化检测的声反馈控制器来实时监控超声开放 BBB 的安全性^[27]。目前,在实验水平上,主要通过伊文思蓝的渗透情况以及 MRI 来评估 BBB 的开放程度,在临床上则通过 MRI 实现实时监测以确保 BBB 开放的有效性 & 安全性。

针对研究模型的不同,超声联合微泡介导 BBB 的开放程度主要取决于超声参数及 MBs 的特性。超声频率、超声强度、作用时间、脉冲长度和脉冲重复频率等参数对于 BBB 的开放及药物的跨 BBB 递送至关重要。BBB 的开放程度随声压的增加而增加,其 BBB 开放阈值与机械指数有关。虽然超声频率范围广泛,但低频率超声引发空化效应所需要的超声能量相较于高频超声要小,并且低频率超声在组织内衰减较弱,更适合用于开放 BBB。随着脉冲重复频率和脉冲长度以及超声处理时间的增加, BBB 开放程度也明显增加,但高强度的超声会造成红细胞外渗及水肿^[28]。BBB 开放程度达到某种状态后,不再随声压、脉冲重复频率和脉冲长度的增加而增加,即达到“饱和”状态。为减少超声在颅骨处的衰减和避免由于颅骨不规则形状及高声阻抗而使超声相位发生改变,选择具有最佳性能的超声设备显得尤为重要。Horodyckid 等^[29]曾报道了一种植入式超声装置,可在最大程度上减小超声能量的衰减,提高 BBB 开放程度,其在灵长类动物中已被证实可重复开放 BBB。

MBs 是影响超声开放 BBB 的另一个重要因素, MBs 的类型、浓度等都会影响 BBB 的开放程度及持续时间。McDannold 等^[30]对比了膜中含有变性白蛋白的 Optison® 和具有脂质外壳的 Definity® 对 BBB 开放程度的影响,发现 Optison® 具有更强的生物学效应。Wu 等^[31]对比了三种微泡 (SonoVue®、Definity® 和 USphere®) 在相同超声参数及 MBs 浓度下对 BBB 开放的影响,发现三种 MBs 诱导的 BBB 开放效应和持续性接近, BBB 开放持续时间与 MBs 的降解动力学有关。除了 MBs 类型, MBs 的浓度及粒径大小也影响 BBB 开放的程度,当 MBs 浓度一致时,粒径较大的 MBs (6~8 μm) 比粒径小的 MBs (1~2 μm) 更易破坏 BBB,且粒径较小的 MBs 会缩短 BBB 的恢复时间^[32]。Song 等^[33]将 MBs 粒径及浓度统一为一个剂量参数,即微泡气体体积,证实 BBB 的开放程度与微泡内气体的体积成正比。

此外,一些其他因素也会影响 BBB 开放程度,如 MBs 注射速率、MBs 给药后超声作用时间的延迟、超声作用的靶点等^[34-35]。因此,优化超声设备、筛选针对不同动物模型的超声参数、MBs 剂量范围及关键影响因素的作用方式,对于超声联合微泡介导的 BBB 开放应用于更多的疾病治疗及临床转化有着非常重要的意义。

5 超声联合微泡在脑部疾病中的应用

相对健康人群,脑肿瘤患者的 BBB 在结构上显示出更高的渗透性,但在功能上仍发挥着屏障作用。在脑瘤患者中,通过核磁共振成像和正电子发射断层扫描观察到 BBB 的完整性已被破坏,在肿瘤部位形成了血-瘤屏障 (blood-tumour barrier, BTB),但仍有 ECs 和外排转运体的表达,保留着 BBB 的关键功能。BBB/BTB 在同一病变微环境和不同肿瘤亚型中具有结构和功能异质性^[6],尤其对于脑转移瘤来说,其仍受到具有正常功能 BBB 的“保护”作用,使得治疗性药物无法在转移灶部位有效聚集,这也是造成肿瘤复发的关键因素之一。因此,如何有效开放 BBB,提高药物转运效率并降低毒副作用,是中枢神经系统疾病治疗的关键。超声联合微泡开放 BBB 所具有的非侵入式、安全、可逆等优点使之已被应用于临床前实验研究和临床测试阶段,多种治疗性药物在该技术辅助下已成功递送至脑部病灶区域,被用于肿瘤、帕金森病等 CNS 疾病的治疗 (表 1)。

5.1 超声联合微泡在脑胶质瘤治疗中的应用

脑胶质瘤目前的临床治疗手段主要是最大面积的手术切除配合化疗及放疗,但由于脑胶质瘤浸润性生长的特点,难以准确识别肿瘤边界并实现完全切除。随着纳米医学技术的快速发展,多种纳米颗粒在乳腺癌、肺癌等肿瘤诊疗中已表现出良好的效果,但在脑胶质瘤中的作用却微乎其微,其主要原因是 BBB 的存在阻挡了大部分治疗性药物及纳米颗粒到达颅内病灶部位,而超声联合微泡开放 BBB 有利于纳米粒子进入颅内,从而提升脑胶质瘤的治疗效果。

脑胶质瘤细胞对替莫唑胺等化疗药物产生耐药性也是影响其治疗效果的重要因素之一。Papachristodoulou 等^[46]通过 MRI 影像指导的低强度超声联合微泡开放 BBB,增加了携带六氧甲基鸟嘌呤 -DNA- 甲基转移酶 (O6-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT) 灭活剂的脂质体在小鼠恶

表1 超声联合微泡在中枢神经系统疾病中的应用

脑胶质瘤					
递送种类	研究模型	超声及微泡处理参数	载体	备注	参考文献
Ce6 羟基氯喹	GL261	自制微泡: 20 μ L/只 负载功率: 1 W, 处理时间: 60 s	脂质体	抑制肿瘤细胞线粒体自噬, 增强了声动力对脑胶质 瘤细胞的杀伤效应	[36]
DVDMS	C6	自制微泡: 20 μ L/只 频率: 1.0 MHz, 占空比: 20%, 爆裂 间隔时间: 1 s, 处理时间: 1 min, 负载功率: 1 W	脂质体	有效地延长小鼠的生存时 间, 改善了小鼠的生存 状态	[37]
紫杉醇	MES83 GBM12	Lumason®: 7.5 mL/kg 重复频率: 1 Hz, 声压: 0.3 MPa 处理时间: 120 s		紫杉醇在脑部的富集量增 加了3~5倍	[38]
阿霉素	GL261	自制微泡: 20 μ L/只 频率: 1 MHz, 负载功率: 1 W, 处理时间: 1 min	外泌体	外泌体在脑部的富集量增 加了4.45倍	[39]
曲妥珠单抗/ 培妥珠单抗	BT-474 /MDA- MB-361	Optison: 100 μ L/kg 功率: 0.4~0.7 W/cm ² , 声压: 0.46~ 0.62 MPa, 脉冲长度: 10 ms, 重 复频率: 1 HZ, 处理时间: 60 s		中位生存期由137天延长至 144天	[40]
帕金森病					
GDNF	6-OHDAP 小鼠	微泡: 3 \times 10 ⁵ MB/g 频率: 1.15 MHz, 声压: 0.6 MPa	BPN	恢复了多巴胺水平和多巴 胺能神经元密度, 逆转了 PD-相关运动功能障碍	[41]
pGDNF	MPTP小鼠	超声频率: 1 MHz, 声压: 100~500 KPa, 重复频率: 1 Hz, 处理时间: 1 min	聚乙烯亚 胺修饰 的超顺 磁性氧 化铁/自 制MBs	多巴胺能神经元的恢复增 加3.2倍	[42]
NTN	MPTP小鼠	自制微泡(C ₄ F ₁₀): 0.11 μ L/g 声压: 0.45 MPa, 重复频率: 10 HZ, 处理时间: 60 s		多巴胺神经元表达增加 20%~25%	[43]
阿尔兹海默病					
GSK-3抑制剂	APP ^{swe} /PSEN1- dE9转基因小鼠	SonoVue®: 10 μ L 声压: 0.41 Ma, 重复频率: 1 HZ, 脉冲长度: 10 ms, 处理时间: 60 s		A β 斑块减少了20%	[44]
槲皮素修饰硫 纳米粒子	APP/PS1双转基 因小鼠	声压: 1000 KPa, 处理时间: 5 min	自制MBs	小鼠AD行为障碍得到改善	[45]

注: Ce6: 二氢卟吩 e6; HCQ: 羟基氯喹; DVDMS: 华卟啉钠; Lumason®: 六氟化硫脂质微球; α -syn: α 突触核蛋白; pGDNF: 胶质细胞源性神经营养因子质粒; NTN: 神经营养因子; GSK-3: 糖原合成酶激酶-3; SonoVue®: 声诺维

性胶质瘤中的富集量, 导致体内 MGMT 耗竭, 从而增强了替莫唑胺对耐药性脑胶质瘤的治疗效果。大量临床前研究结果也表明, 超声联合微泡开放 BBB 可以有效增加治疗性药物在脑部靶点组织的递送效率。Mainprize 等^[47]使用核磁共振引导的聚焦

超声系统对 5 名胶质瘤患者进行治疗, 患者在进行超声治疗前一天静脉注射阿霉素或口服替莫唑胺, 通过核磁共振成像显示 BBB 的开放情况, 实验结果显示安全性良好, 未见脑出血等不良反应, 20 h 后 BBB 恢复正常。Idbaih 等^[48]对 19 名复发性胶质

母瘤患者进行了临床治疗,发现治疗后患者的耐受性较好,无不良反应,且生存期较之前报道的数据均有所增加。Chen等^[49]通过对患者注射微泡并超声辐照,评估了NaviFUS治疗复发性胶质母细胞瘤的安全性和可行性。目前将此技术用于脑胶质瘤的临床试验的研究共计13项,其中处于招募阶段的有11项,将超声联合微泡开放BBB与卡铂(NCT-04440358)及紫杉醇(NCT04528680)等化疗药物联合治疗,以研究超声联合微泡开放BBB的有效性及其化疗药物的有效富集。

此外,超声联合微泡也能够触发肿瘤局部免疫反应。超声联合微泡介导的BBB开放可以促进IL-12、免疫检查点抑制剂等大分子进入肿瘤微环境,改变肿瘤免疫抑制环境^[50]。BBB的开放与损伤相关分子模式表达增加及NF- κ B途径介导的无菌炎症反应有关,超声处理后24h内,炎症因子及热休克蛋白的表达会暂时升高,激活小胶质细胞、星形胶质细胞和自然杀伤细胞,促进巨噬细胞的迁移,增强树突状细胞和其他抗原提呈细胞在肿瘤中的浸润能力^[51]。此外,Chen等^[52]发现正常大鼠经超声处理后,T细胞群并无显著变化,而C6胶质瘤大鼠经超声处理后CD3⁺、CD8⁺在肿瘤中的浸润性明显增强,且超声与IL-12联合治疗后的CTL/Treg比值明显增加。BBB的开放可以促进免疫细胞进入肿瘤微环境,实现“冷”肿瘤向“热”肿瘤的转化^[22]。总之,超声联合微泡介导的BBB开放过程能够同时触发先天免疫和适应性免疫,进而影响免疫调节剂在肿瘤微环境中发挥作用。

5.2 超声联合微泡在帕金森病研究中的应用

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种神经退行性疾病,其主要病理特征为多巴胺能神经元的选择性丧失,目前的临床治疗以口服左旋多巴胺为主,但不能彻底治愈。胶质细胞源性神经营养因子(glial cell-line derived neurotrophic factor, GDNF)和脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)^[53]等神经营养因子、抗 α -突触核蛋白抗体和 α -突触核蛋白短发夹RNA均被报道可以缓解PD的症状。MBs可作为载体,将神经营养因子的基因递送至大脑^[54],但MBs承载能力有限。为克服载药量较低的问题,Lin等^[55]将MBs与脂质体融合构筑了一种超声响应型的载药体系,在超声刺激触发BBB开放的同时将GDNF基因或BDNF基因递送到PD小鼠脑部,降低了凋亡蛋白Caspase-3的表达,增强了神经营养因子的合成并提升了神经

保护作用。也有学者研究了MBs介导的声、磁联合作用对PEI-SPIO携带的DNA的递送效率,发现该系统的基因转染率比普通试剂高2.2倍,与对照组相比,小鼠的多巴胺能神经元恢复能力增加了3.2倍,运动行为提高了3.9倍,提示该递送策略在神经退行性疾病治疗中具有极大的应用潜力^[42]。关于超声开放BBB对PD患者的治疗正在临床研究当中(NCT03608553),研究者对10例轻度至中度PD患者首先进行了小面积的BBB开放(9 mm \times 9 mm),之后通过MRI观察BBB的开放程度,并进行后期随访,若未出现不良反应则将BBB面积扩大到2.5~3.0 cm,以确定BBB开放的安全性、可逆性^[56]。

5.3 超声联合微泡在阿尔兹海默病治疗中的应用

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种由淀粉样 β (amyloid β -protein, A β)斑块异常聚集引起的弥漫性神经退行性疾病,临床表现为认知和记忆障碍^[57]。超声可以诱导机体产生轻微的免疫反应,激活小胶质细胞,使淀粉样蛋白内化,从而有助于斑块减少。Hsu等^[44]将超声联合MBs诱导的BBB开放与GSK-3抑制剂联合应用于AD治疗,发现BBB开放可以增强GSK-3抑制剂的递送效率,提升AD治疗效果。超声联合微泡开放BBB能够有效促进分子药物的递送,提高AD治疗效果。Liu等^[45]利用超声刺激微泡产生空化作用的原理,将槲皮素修饰的硫纳米粒子(Qc@SNPs)嵌入到微泡中,在超声导致BBB开放的同时,MBs破裂,Qc@SNPs释放出来并在脑内迅速积聚,减少了内质网应激介导的神经元凋亡、炎症反应、钙稳态失衡和氧化应激,保护了神经细胞,达到提升AD治疗的效果。此外,有学者通过在MRI引导下对小鼠双侧海马区进行重复超声,经治疗1个月后,小鼠A β 斑块数量及大小均有所减少,且海马区新生神经元的数量增加了2.5倍;同时,AD小鼠在Y迷宫、新物体识别等测试中的记忆能力也得到了明显改善^[58]。

目前的临床试验结果表明,超声可以安全、无创、可重复、短暂地开放人海马及内嗅皮质用于AD的治疗,这为其临床应用转化提供了重要依据^[59]。自2016年以来,已有六项超声联合微泡技术被用于早期AD患者的临床试验。其中,在一项临床试验中,研究者对5名轻度AD患者的额叶小面积白质进行了两次(间隔一个月)超声处理,结果发现,在重复开放BBB的过程中,患者未出现明显的不良反应^[60]。后续的临床试验正在进行之中(NCT-03671889、NCT03739905和NCT04526262),这将为

评估核磁共振引导的聚焦超声 (MR-guided focused ultrasound, MRgFUS) 导致的 BBB 开放在治疗 AD 中的可行性、安全性和有效性提供重要的研究价值^[61-63]。

6 总结与展望

迄今为止, BBB 仍然是脑部疾病治疗中影响药物递送的主要障碍之一, 而超声联合微泡可以通过时空控制的方式开放 BBB, 实现了 MRI 引导下的药物靶向递送和监测。此外, 将超声联合微泡介导 BBB 开放与化疗、基因治疗及免疫治疗联合, 可为脑肿瘤、帕金森病、阿尔兹海默病以及其他中枢神经系统性疾病的治疗提供重要的治疗手段。随着研究的深入, 针对不同的脑部疾病及 BBB 损伤程度的不同, 如何优化不同模型中 BBB 开放的超声参数是临床转化中亟需解决的关键问题, 这将为超声联合微泡开放 BBB 在中枢神经系统疾病治疗中提供重要的科学意义和研究价值, 并促进其在临床应用中的转化。

[参 考 文 献]

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68: 394-424
- [2] Hynynen K, McDannold N, Vykhodtseva N, et al. Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits. *Radiology*, 2001, 220: 640-6
- [3] Ehrlich P. Das sauerstoff-bedürfnis des organismus. eine farbenanalytische studie. Berlin: Hirschwald, 1885, 40: 433-96
- [4] Stern L, Gautier R. Recherches sur le liquide céphalo-rachidien: I.-les rapports entre le liquide céphalo-rachidien et la circulation sanguine. *Arch Internat Physiol*, 1921, 17: 138-92
- [5] Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*, 1967, 34: 207-17
- [6] Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20: 26-41
- [7] 李进丹, 许泽艳, 王瑞, 等. 聚焦超声在脑部疾病的应用进展. *中国医学影像技术*, 2019, 35: 439-42
- [8] Sabbagh MF, Heng JS, Luo C, et al. Transcriptional and epigenomic landscapes of CNS and non-CNS vascular endothelial cells. *Elife*, 2018, 7: e36187
- [9] Baizabal Carvallo JF, Mostile G, Almaguer M, et al. Deep brain stimulation hardware complications in patients with movement disorders: risk factors and clinical correlations. *Stereotact Funct Neurosurg*, 2012, 90: 300-6
- [10] He Q, Liu J, Liang J, et al. Towards improvements for penetrating the blood-brain barrier-recent progress from a material and pharmaceutical perspective. *Cells*, 2018, 7: 24
- [11] Colao IL, Corteling R, Bracewell D, et al. Manufacturing exosomes: a promising therapeutic platform. *Trends Mol Med*, 2018, 24: 242-56
- [12] Sun S, Schaffer DV. Engineered viral vectors for functional interrogation, deconvolution, and manipulation of neural circuits. *Curr Opin Neurobiol*, 2018, 50: 163-70
- [13] Bakay L, Ballantine HT Jr, Hueter TF, et al. Ultrasonically produced changes in the blood-brain barrier. *AMA Arch Neurol Psychiatry*, 1956, 76: 457-67
- [14] Ballantine HT, Bell E, Manlapaz J. Progress and problems in the neurological applications of focused ultrasound. *J Neurosurg*, 1960, 17: 858-76
- [15] Gramiak R, Shah PM. Echocardiography of the aortic root. *Invest Radiol*, 1968, 3: 356-66
- [16] Frinking P, Segers T, Luan Y, et al. Three decades of ultrasound contrast agents: a review of the past, present and future improvements. *Ultrasound Med Biol*, 2020, 46: 1-17
- [17] 郑海荣, 邱维宝, 王丛知, 等. 超声成像与治疗技术进展与趋势. *中国科学: 生命科学*, 2020, 50: 1256-67
- [18] Willmann JK, Bonomo L, Testa AC, et al. Ultrasound molecular imaging with BR55 in patients with breast and ovarian lesions: first-in-human results. *J Clin Oncol*, 2017, 35: 2133-40
- [19] 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. *Biomaterials*, 2012, 33: 704-12
- [20] Fan CH, Wang TW, Hsieh YK, et al. Enhancing boron uptake in brain glioma by a boron-polymer/microbubble complex with focused ultrasound. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 11144-56
- [21] Horodyckid C, Canney M, Vignot A, et al. Safe long-term repeated disruption of the blood-brain barrier using an implantable ultrasound device: a multiparametric study in a primate model. *J Neurosurg*, 2017, 126: 1351-61
- [22] Beccaria K, Sabbagh A, de Groot J, et al. Blood-brain barrier opening with low intensity pulsed ultrasound for immune modulation and immune therapeutic delivery to CNS tumors. *J Neurooncol*, 2021, 151: 65-73
- [23] Chen KT, Wei KC, Liu HL. Theranostic strategy of focused ultrasound induced blood-brain barrier opening for CNS disease treatment. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 86
- [24] Sheikov N, McDannold N, Sharma S, et al. Effect of focused ultrasound applied with an ultrasound contrast agent on the tight junctional integrity of the brain microvascular endothelium. *Ultrasound Med Biol*, 2008, 34: 1093-4
- [25] Choi H, Lee EH, Han M, et al. Diminished expression of P-glycoprotein using focused ultrasound is associated with JNK-dependent signaling pathway in cerebral blood vessels. *Front Neurosci*, 2019, 13: 1350
- [26] Sheikov N, McDannold N, Vykhodtseva N, et al. Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles. *Ultrasound Med*

- Biol, 2004, 30: 979-89
- [27] McDannold N, Zhang Y, Supko JG, et al. Acoustic feedback enables safe and reliable carboplatin delivery across the blood-brain barrier with a clinical focused ultrasound system and improves survival in a rat glioma model. *Theranostics*, 2019, 9: 6284-99
- [28] O'Reilly MA, Waspe AC, Ganguly M, et al. Focused-ultrasound disruption of the blood-brain barrier using closely-timed short pulses: influence of sonication parameters and injection rate. *Ultrasound Med Biol*, 2011, 37: 587-94
- [29] Horodyckid C, Canney M, Vignot A, et al. Safe long-term repeated disruption of the blood-brain barrier using an implantable ultrasound device: a multiparametric study in a primate model. *J Neurosurg*, 2017, 126: 1351-61
- [30] McDannold N, Vykhodtseva N, Hynynen K. Use of ultrasound pulses combined with definity for targeted blood-brain barrier disruption: a feasibility study. *Ultrasound Med Biol*, 2007, 33: 584-90
- [31] Wu SK, Chu PC, Chai WY, et al. Characterization of different microbubbles in assisting focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening. *Sci Rep*, 2017, 7: 46689
- [32] Samiotaki G, Vlachos F, Tung YS, et al. A quantitative pressure and microbubble-size dependence study of focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening reversibility *in vivo* using MRI. *Magn Reson Med*, 2012, 67: 769-77
- [33] Song KH, Fan AC, Hinkle JJ, et al. Microbubble gas volume: a unifying dose parameter in blood-brain barrier opening by focused ultrasound. *Theranostics*, 2017, 7: 144-52
- [34] Aryal M, Arvanitis CD, Alexander PM, et al. Ultrasound-mediated blood-brain barrier disruption for targeted drug delivery in the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 72: 94-109
- [35] Meng Y, Pople CB, Lea-Banks H, et al. Safety and efficacy of focused ultrasound induced blood-brain barrier opening, an integrative review of animal and human studies. *J Control Release*, 2019, 309: 25-36
- [36] Qu F, Wang P, Zhang K, et al. Manipulation of mitophagy by "All-in-One" nanosensitizer augments sonodynamic glioma therapy. *Autophagy*, 2020, 16: 1413-35
- [37] Sun Y, Wang H, Wang P, et al. Tumor targeting DVDMS-nanoliposomes for an enhanced sonodynamic therapy of gliomas. *Biomater Sci*, 2019, 7: 985-94
- [38] Zhang DY, Dmello C, Chen L, et al. Ultrasound-mediated delivery of paclitaxel for glioma: a comparative study of distribution, toxicity, and efficacy of albumin-bound versus cremophor formulations. *Clin Cancer Res*, 2020, 26: 477-86
- [39] Bai L, Liu Y, Guo K, et al. Ultrasound facilitates naturally equipped exosomes derived from macrophages and blood serum for orthotopic glioma treatment. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 14576-87
- [40] Kobus T, Zervantonakis IK, Zhang Y, et al. Growth inhibition in a brain metastasis model by antibody delivery using focused ultrasound-mediated blood-brain barrier disruption. *J Control Release*, 2016, 238: 281-8
- [41] Mead BP, Kim N, Miller GW, et al. Novel focused ultrasound gene therapy approach noninvasively restores dopaminergic neuron function in a rat Parkinson's disease model. *Nano Lett*, 2017, 17: 3533-42
- [42] Wu CY, Huang RY, Liao EC, et al. A preliminary study of Parkinson's gene therapy via sono-magnetic sensing gene vector for conquering extra/intracellular barriers in mice. *Brain Stimul*, 2020, 13: 786-99
- [43] Karakatsani ME, Wang S, Samiotaki G, et al. Amelioration of the nigrostriatal pathway facilitated by ultrasound-mediated neurotrophic delivery in early Parkinson's disease. *J Control Release*, 2019, 303: 289-301
- [44] Hsu PH, Lin YT, Chung YH, et al. Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening enhances GSK-3 inhibitor delivery for amyloid- β plaque reduction. *Sci Rep*, 2018, 8: 12882
- [45] Liu Y, Gong Y, Xie W, et al. Microbubbles in combination with focused ultrasound for the delivery of quercetin-modified sulfur nanoparticles through the blood brain barrier into the brain parenchyma and relief of endoplasmic reticulum stress to treat Alzheimer's disease. *Nanoscale*, 2020, 12: 6498-511
- [46] Papachristodoulou A, Signorell RD, Werner B, et al. Chemotherapy sensitization of glioblastoma by focused ultrasound-mediated delivery of therapeutic liposomes. *J Control Release*, 2019, 295: 130-9
- [47] Mainprize T, Lipsman N, Huang Y, et al. Blood-brain barrier opening in primary brain tumors with non-invasive MR-guided focused ultrasound: a clinical safety and feasibility study. *Sci Rep*, 2019, 9: 321
- [48] Idbah A, Canney M, Belin L, et al. Safety and feasibility of repeated and transient blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound in patients with recurrent glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 2019, 25: 3793-801
- [49] Chen KT, Lin YJ, Chai WY, et al. Neuronavigation-guided focused ultrasound (NaviFUS) for transcranial blood-brain barrier opening in recurrent glioblastoma patients: clinical trial protocol. *Ann Transl Med*, 2020, 8: 673
- [50] Curley CT, Sheybani ND, Bullock TN, et al. Focused ultrasound immunotherapy for central nervous system pathologies: challenges and opportunities. *Theranostics*, 2017, 7: 3608-23
- [51] Cohen-Inbar O, Xu Z, Sheehan JP. Focused ultrasound-aided immunomodulation in glioblastoma multiforme: a therapeutic concept. *J Ther Ultrasound*, 2016, 4: 2
- [52] Chen PY, Hsieh HY, Huang CY, et al. Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening to enhance interleukin-12 delivery for brain tumor immunotherapy: a preclinical feasibility study. *J Transl Med*, 2015, 13: 93
- [53] Karakatsani ME, Blesa J, Konofagou EE. Blood-brain barrier opening with focused ultrasound in experimental models of Parkinson's disease. *Mov Disord*, 2019, 34: 1252-61
- [54] Lin CY, Hsieh HY, Chen CM, et al. Non-invasive, neuron-specific gene therapy by focused ultrasound-induced

- blood-brain barrier opening in Parkinson's disease mouse model. *J Control Release*, 2016, 235: 72-81
- [55] Lin CY, Lin YC, Huang CY, et al. Ultrasound-responsive neurotrophic factor-loaded microbubble-liposome complex: preclinical investigation for Parkinson's disease treatment. *J Control Release*, 2020, 321: 519-28
- [56] HM Hospitales Puerta del Sur-CINAC. A evaluate temporary blood brain barrier disruption in patients with Parkinson's disease dementia. 2018, NCT03608553
- [57] Madav Y, Wairkar S, Prabhakar B. Recent therapeutic strategies targeting β amyloid and tauopathies in Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*, 2019, 146: 171-84
- [58] Leinenga G, Götz J. Scanning ultrasound removes amyloid- β and restores memory in an Alzheimer's disease mouse model. *Sci Transl Med*, 2015, 7: 278-33
- [59] Rezai AR, Ranjan M, D'Haese PF, et al. Noninvasive hippocampal blood-brain barrier opening in Alzheimer's disease with focused ultrasound. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 9180-2
- [60] Lipsman N, Meng Y, Bethune AJ, et al. Blood-brain barrier opening in Alzheimer's disease using MR-guided focused ultrasound. *Nat Commun*, 2018, 9: 2336
- [61] Weill Corneal Medicine, The Ohio State University-Wexner Medical Center, West Virginia University-Rockefeller Neuroscience Center. ExAblate blood-brain barrier (BBB) disruption for the treatment of Alzheimer's disease. 2018, NCT03671889
- [62] Division of Neurosurgery, Sunnybrook Health Sciences Centre. ExAblate blood-brain barrier opening for treatment of Alzheimer's disease. 2018, NCT03739905
- [63] Department of Neurosurgery, Yonsei University College of Medicine. Assessment of initial efficacy and safety of high intensity focused ultrasound "ExAblate 4000 Type 2" for blood brain barrier disruption in patients with Alzheimer's disease. 2020, NCT04526262