

ticosteroids for Duchenne muscular dystrophy[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2008(1):CD003725.

[34] Angelini C. The role of corticosteroids in muscular dystrophy: a critical appraisal[J]. Muscle Nerve, 2007, 36(4):424-435.

[35] Parreira SL, Resende MB, Zanoteli E, et al. Comparison of motor strength and function in patients with Duchenne

muscular dystrophy with or without steroid therapy[J]. Arq Neuropsiquiatr, 2010, 68(5):683-688.

[36] Shimomura H, Fujii T, Miyajima T, et al. Prednisolone treatment for Duchenne muscular dystrophy[J]. No To Hattatsu, 2011, 43(1):24-29.

(收稿日期:2012-01-11 修回日期:2012-02-22)

· 综 述 ·

超声微泡携基因治疗面神经损伤研究进展

叶枝依 综述, 骆文龙[△] 审校

(重庆医科大学附属第二医院耳鼻喉头颈外科 400010)

关键词: 面神经损伤; 基因疗法; 超声微泡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.14.035

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)14-1427-03

面神经由于其解剖结构及功能特殊, 容易因创伤、炎症、肿瘤或手术操作等受到损伤, 且神经再生是一个极为复杂的过程, 因此, 寻找新的修复方法提高神经的再生速度和质量是目前需要解决的问题。基因治疗从神经微环境入手, 对改善面神经损伤有很大作用, 但目前可用的载体(病毒、脂质体等)可能对身体产生潜在危害, 有必要探寻更合适的基因载体。近年来, 超声领域出现的新型载体——超声微泡造影剂在靶向治疗方面取得的可喜效果, 使其越来越受到医学界的关注。本文就超声微泡携基因治疗面神经损伤的现状 & 前景作简要的综述。

1 超声微泡造影剂

1968 年美国 Rochester 大学的 Gramiak 和 Shah^[1] 首次报道了超声微泡的应用, 在这之后的 40 余年来, 其声学特性不断地被人们认识熟悉并应用于实践, 至今已获得长足进步。早期的造影剂为无壳膜造影剂, 20 世纪 90 年代开始, 新型含空气微泡的壳膜造影剂问世, 之后出现了第 1、2、3 代新型微泡造影剂, 第 3 代微泡造影剂的出现大大拓宽了超声造影剂的应用领域, 从而可能建立一种安全、有效、无创的超声介导靶向传输系统。

1.1 超声微泡的构成 超声微泡造影剂由外壳和内充气体两部分组成, 能悬浮于液体中。内含气体大多为二氧化碳、氧气、六氟化硫气体、氟碳气体、空气等, 因氟碳气体及氟硫相对分子质量高、血液溶解度低、弥散度低, 因此在血液中稳定性好、循环时间长, 目前运用较多。而微泡造影剂外壳多为清蛋白、糖类、脂类物质、非离子表面活性剂、可生物降解的高分子多聚物等, 厚度为 10~200 nm。最初的超声微泡造影剂因其直径比较大不能到达微循环, 其使用范围较窄。1984 年, Feinstein 等^[2] 报道了可以通过肺毛细血管的微泡造影剂, 之后, 随着超声技术的不断发展, 目前, 超声微泡直径一般为 1~8 μm, 远远小于人体红细胞, 因而可经外周静脉注射后自由通过肺循环最终到达靶器官或者靶组织, 从而实现回声增强。

1.2 超声微泡的作用与机制 最初, 因微泡可增强超声显像而被作为一种诊断工具, 而后来人们逐渐发现超声微泡具有很好的运载作用, 是基因或者药物的可靠载体, 特别是第 3 代超声造影剂的问世, 因其具有相对无创性、高敏感性、高特异性等特点, 使超声微泡在治疗方面的优势日益明显, 并快速进入临

床应用。目前普遍认为的超声微泡的作用机制为: 将附有基因或药物的超声微泡造影剂经外周静脉注射进入全身血液循环后, 在靶区以一定条件的超声照射, 因在血液中的超声微泡具有一定的“可压缩性”^[3], 即微泡特有的先后产生不对称的“压缩-膨胀”性能, 使声场中的微小气泡会随着声波负压半周期膨胀, 而在正压半周期中破裂, 即产生空化效应, 在空化时产生的冲击波、高温、高压等导致细胞的质膜或核膜上出现了暂时性小孔, 使细胞外分子和颗粒通过小孔进入细胞内, 从而使细胞通透性增高, 进而使目的基因进入组织细胞, 实现基因的转染和表达(声孔效应)^[4]。超声微泡的稳定性好, 可减少基因或者药物在到达靶组织前的播散, 从而提高了基因或者药物的效用。

2 超声微泡携基因治疗在各个领域的研究

随着人类基因组计划的完成, 科学家希望通过治疗基因的转载、转染来修复人体细胞内的致病基因, 以达到从根本上治疗疾病的目的。超声造影剂是一种新型的基因载体, 将载有目的基因或者药物的超声微泡静脉注射后, 在靶细胞或组织给予一定条件的超声照射, 可明显提高体内细胞、局部组织的基因转染率^[5-6]。目前, 对超声微泡介导的基因转染已经涉及肿瘤、心脏、血管、肝脏、肾脏、神经系统等众多领域。

2.1 对肿瘤的诊断与治疗 对肿瘤的治疗一直是国内外广大学者研究的重点和热点。然而, 由于人体肝脏过度的摄取, 尽管采取了各种方法, 抗肿瘤药物治疗疗效仍不能令人满意。基于 20 年前脂质体运送抗肿瘤药物的研究, 人们有了超声微泡造影剂转运基因或者药物治疗肿瘤的设计。而随着超声微泡技术的不断发展和可携带药物、基因超声微泡造影剂的研制, 近年来靶向超声微泡在肿瘤诊断和治疗方面的研究进展十分迅速。肿瘤血管的生成是肿瘤发生的基础, 因此, 利用这一特点, 可以将血管内皮生长因子等作为微泡的作用靶点。Willmann 等^[7] 制作了定位于血管内皮生长因子受体-2 和 αVβ₃ 整合素双靶点微泡, 研究证实, 该微泡可更好地聚集于靶肿瘤, 且显像好。Miller 和 Song^[8] 通过向小鼠肾癌模型注射质粒, 同时注射微泡造影剂, 并以一定超声照射, 研究发现经超声照射的肿瘤停止生长且目的基因的表达比对照组明显增高。Aoi 和 Li^[9] 以超声微泡为载体, 将单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes

simplex virus thymidine kinase, HSV-TK) 基因/丙氧鸟苷 (ganciclovir, GCV) 成功导入肿瘤细胞中, 证明超声微泡作为一种新的基因递送方法用于肿瘤的基因治疗具有相当广泛的应用前景; Zhou 等^[10] 研究证实了包裹 HSV-TK/GCV 的超声微泡能显著增强对肿瘤组织的杀伤活性, 提高荷瘤动物的生存率。Ling 等^[11] 用超声微泡破坏技术将 shRNA 导入癌细胞, 通过基因沉默抑制 survivin 在细胞中的表达, 诱导细胞凋亡。

2.2 心血管的治疗 基因治疗越来越广泛地应用于心脏疾病, 超声微泡作为一种安全、高效的基因递送系统已成为心脏基因治疗的研究热点。李雪霖等^[12] 研究发现可在微泡表面黏附外源性血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial cell growth factor, VEGF) 基因, 通过超声波的作用使 VEGF 基因完成从微泡的表面到细胞和组织的传递, 促血管新生。Korpany 等^[13] 将超声微泡携带的编码质粒人类血管内皮生长因子 165 (human vascular endothelial growth factor 165, hVEGF-165) 由静脉注入大鼠体内, 结果发现, 通过超声微泡破坏能够非侵袭性地将 hVEGF-165 转移至大鼠心肌层, 并导致心肌毛细血管及动脉密度显著增加。盛妮妮等^[14] 研究显示, 超声激活携基因微泡可明显提高 bFGF 基因在鼠活体心肌的表达。促进血管新生。目前, 心血管领域基因治疗仍未进入临床研究, 有待进一步探索。

2.3 其他疾病的治疗 近年来, 超声微泡在肝脏的诊断与治疗的作用日见凸显, 受到重视。康娟等^[15] 研究发现, 载多西紫杉醇酯质超声微泡造影剂在超声作用下能延缓兔 VX2 肝癌的增殖、促进其凋亡, 对 VX2 肝癌具有显著的生长抑制作用。另外, 基因治疗在肾脏疾病治疗中的优势越来越受到关注。Koike 等^[16] 研究表明, 超声微泡介导的基因转移方法可以大大提高基因在大鼠肾脏的表达, 提出这种方法可能在肾脏疾病基因治疗中发挥作用。Azuma 等^[17] 以超声造影剂作为载体, 超声处理后成功地转染了 Wistar 大鼠同种异体移植, 研究证实, 这种方法介导的转染, 可以明显提高移植肾的存活期。

3 超声微泡携基因治疗面神经再生的可行性

自从分子外科 (即在分子水平进行基因操作以达到外科治疗目的的疗法) 概念的提出, 将分子外科和基因治疗应用到面神经损伤的修复, 可能为面神经损伤提供全新的治疗途径。超声微泡逐渐被一些学者用于神经疾病的基因治疗研究中。

3.1 在神经系统的应用前景 国内外的研究文献表明, 面神经的损伤修复和基因存在密切关系。因此, 神经系统的基因治疗逐渐成为研究的热点。Manome 等^[18] 通过向大鼠脑组织注入超声微泡对比剂后, 持续辐照 5 s 后发现, 大鼠脑组织切片中质粒 DNA 的转染率明显增加, 表明利用超声微泡能明显提高裸质粒 DNA 在神经系统的转染, 并且可能成为将外源性目的基因转移至神经系统靶细胞的一条重要途径。同样, 叶维霞等^[19] 研究显示, 以一定能量的超声介导 Pgp6/Neo 质粒转染大鼠神经干细胞, 当声强 1.0 W/cm^2 、辐照时间 30 s 时, 超声微泡介导质粒转染率最高, 转染率明显高于对照组, 且对细胞活性无明显影响。另外, 超声微泡在脊髓损伤修复中也受到关注。Shimamura 等^[20] 利用椎板切除术暴露损伤的大鼠脊髓节段, 再通过腰椎穿刺术注入裸露的质粒 DNA 和超声微泡混合物至脑脊液, 发现超声的辐照剂量能显著增加裸露质粒 DNA 在脊髓膜细胞的表达, 可见, 超声微泡携基因治疗神经系统损伤具有广阔的前景。

3.2 基因治疗面神经损伤的研究 面神经的损伤主要是由于炎症、肿瘤、创伤等因素造成, 面神经一旦损伤, 其功能修复较

为困难, 给患者身心带来严重影响。随着修复技术的提高, 损伤修复有一定的进展。目前, 面神经损伤修复的方法主要有: 外科治疗、药物治疗、物理疗法以及种子细胞与导管支架的应用等, 其中外科疗法主要包括神经移植和神经吻合。但是, 由于面神经功能解剖的特殊性, 目前修复后功能的恢复仍然不够理想。随着超声技术的进步, 超声微泡的出现以及基因对面神经损伤修复作用的不断研究, 超声微泡携基因治疗面神经损伤成为研究的热点, 并期望运用于临床中。研究表明, 应用神经营养因子、基因载体与嗅鞘细胞移植等治疗方法可保护修复面神经功能, 同时也可增加再生神经纤维的数量。张风河等^[21] 通过探讨 p75 神经营养蛋白受体 (p75 neurotrophin receptor, p75-NTR) 在面神经损伤后神经再生中的作用, 了解到 p75NTR 基因可以增强面神经的再生。赵莉等^[22] 研究证实, 胶质细胞源神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 基因体内转染对大鼠面神经损伤后的修复有促进作用, 为基因治疗面神经损伤提供依据。众所周知, 神经损伤后神经元内遗传物质的表达会发生改变, 如 c-fos、c-jun 等基因被证实面神经损伤后参与相关基因表达的调节, 促进 mRNA 合成水平的提高^[23]。Hui 等^[24] 以 Bcl-2 敲除小鼠为模型, 发现不同种类运动神经元对 Bcl-2 的敏感性有差异。刘稳等^[25] 研究证实, Bcl-2 和 Bax 干涉了面神经损伤后的凋亡。而在细胞分化中起重要作用的增生性瘢痕相关基因 P311^[26] 和个体发育中控制形态发生的 SHH 基因^[27] 也被证实有助于调控面神经的再生。

4 总 结

面神经损伤的基因治疗是当前研究热点, 选择合适的载体使其能应用于临床是工作的目标。超声微泡介导基因治疗的方法提高了靶向性, 降低了药物的不良反应, 增加了基因转染和表达。尽管目前超声微泡携基因治疗还存在一定的难题, 例如如何提高微泡在靶组织中的停留时间, 如何创造更好的超声辐射条件以进一步减少对组织细胞的损伤, 如何让基因更牢固地与微泡结合; 如何构建更小的微泡; 如何使目的基因在体内实现更高效、稳定、可调控的表达等问题, 但是超声微泡剂携基因治疗取得的研究进展仍然显示出了诱人的前景。因此, 可以预测, 随着超声医学、分子生物学和神经科学的发展, 超声微泡剂携基因治疗将为面神经的再生与修复提供新的途径, 有望成为面神经损伤修复的大的突破。

参考文献:

- [1] Gramiak R, Shah PM. Echocardiography of the aortic root [J]. Invest Radiol, 1968, 3(5):356-366.
- [2] Feinstein SB, Ten Cate FJ, Zwehl W, et al. Two-dimensional contrast echocardiography. I. In vitro development and quantitative analysis of echo contrast agents [J]. J Am Coll Cardiol, 1984, 3(1):14-20.
- [3] Dayton PA, Chomas JE, Lum AF, et al. Optical and acoustical dynamics of microbubble contrast agents inside neutrophils [J]. Biophys J, 2001, 80(3):1547-1556.
- [4] Weinman EC, Roche PC, Kasperbauer JL, et al. Characterization of antigen processing machinery and survivin expression in tonsillar squamous cell carcinoma [J]. Cancer, 2003, 97(9):2203-2211.
- [5] Delalande A, Bureau MF, Midoux P, et al. Ultrasound-assisted microbubbles gene transfer in tendons for gene therapy [J]. Ultrasonics, 2010, 50(2):269-272.

- [6] Klivanov 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.
- [7] 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.
- [8] Miller DL, Song J. Tumor growth reduction and DNA transfer by avitation-enhanced high-intensity focused ultrasound in vivo[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2003, 29(6): 887-893.
- [9] Aoi A, Watanabe Y, Mori S, et al. Herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy using nano/microbubbles and ultrasound[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2008, 34(3): 425-434.
- [10] Zhou S, Li S, Liu Z, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction mediated herpes simplex virus-thymidine kinase gene treats hepatoma in mice[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29(1): 170.
- [11] Ling X, Li F. Silencing of antiapoptotic surviving gene by multiple approaches of RNA interference technology[J]. *Biotechniques*, 2004, 36(3): 450-460.
- [12] 李雪霖, 王志刚, 凌智瑜, 等. 超声破坏微泡造影剂促使大鼠心肌血管新生的实验研究[J]. *中国超声医学杂志*, 2007, 23(1): 6-8.
- [13] Korpanty G, Chen S, Shohet RV, et al. Targeting of VEGF-mediated angiogenesis to rat myocardium using ultrasonic destruction of microbubbles[J]. *Gene Therapy*, 2005, 12(17): 1305-1312.
- [14] 盛妮妮, 王志刚, 刘地川, 等. 超声微泡介导碱性成纤维细胞生长因子基因转染鼠缺血心肌的实验研究[J]. *中国超声医学杂志*, 2009, 25(8): 725-727.
- [15] 康娟, 吴小翎, 张勇, 等. 载多西紫杉醇脂质超声微泡造影剂对兔 VX2 肝癌增殖和凋亡的作用[J]. *中国超声医学杂志*, 2009, 25(7): 642-645.
- [16] 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(1): 108-116.
- [17] Azuma H, Tomita N, Kaneda Y, et al. Transfection of NF-kappaB-decoy oligodeoxynucleotides using efficient ultrasound-mediated gene transfer into donor kidneys prolonged survival of rat renal allografts[J]. *Gene Ther*, 2003, 10(5): 415-425.
- [18] Manome Y, Nakayama N, Nakayama K, et al. Insonation facilitates plasmid DNA transfection into the central nervous system and microbubbles enhance the effect[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2005, 31(5): 693-702.
- [19] 叶维霞, 曹有德, 孙阳阳, 等. 超声微泡介导 Pgp6/Neoz 质粒转染大鼠神经干细胞的实验研究[J]. *中国超声医学杂志*, 2011, 27(5): 385-387.
- [20] Shimamura M, Sato N, Taniyama Y, et al. Development of efficient plasmid DNA transfer into adult rat central nervous system using microbubble-enhanced ultrasound[J]. *Gene Ther*, 2004, 11(20): 1532-1539.
- [21] 张风河, 张雪, 黄萍, 等. p75 神经营养蛋白受体基因敲除对小鼠面神经损伤后神经再生的影响[J]. *华西口腔医学杂志*, 2010, 28(1): 95-98.
- [22] 赵莉, 关宿东, 单增强, 等. GDNF 基因体内转染对大鼠面神经损伤后的修复作用[J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22(9): 785-789.
- [23] Kreutzberg GW. Principles of neuronal regeneration[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 1996, 66: 103-106.
- [24] Hui K, Kucera J, Henderson JT. Differential sensitivity of skeletal and fusimotor neurons to Bcl-2-mediated apoptosis during neuromuscular development[J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(4): 691-699.
- [25] 刘稳, 高志强, 神平, 等. 小鼠病毒性面神经炎模型中面神经元凋亡的研究[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2011, 46(9): 742-746.
- [26] Fujitani M, Yamagishi S, Che YH, et al. P311 accelerates nerve regeneration of the axotomized facial nerve[J]. *J Neurochem*, 2004, 91(3): 737-744.
- [27] Akazawa C, Kohsaka S. In vivo characterization of sonic hedgehog in the peripheral nerve regeneration[J]. *Brain Nerve*, 2007, 59(12): 1341-1346.

(收稿日期: 2012-01-15 修回日期: 2012-02-22)

· 综 述 ·

重症急性胰腺炎非手术治疗的研究现状

胡大碧 综述, 邱 明, 杨秀江[△] 审校

(重庆市大足区人民医院中心 ICU 402360)

关键词: 胰腺炎, 急性坏死性; 治疗; 研究

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.14.036

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)14-1429-03

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是常见的急腹症,发病率为(4.9~80)/10万,其中重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)的发生率为20%~30%,发病后常伴全身炎症反应,炎症介质和细胞因子进入血液循环后进一步激活其他

炎症细胞,释放更多的炎症介质,因此,形成恶性循环,加剧全身反应,病死率极高,总体病死率为9%~40%^[1-2]。SAP发病机制和治疗方法一直是近年来研究的难点和热点。随着现代医学的不断发展和进步,人们对SAP发病机制和临床研究的

[△] 通讯作者, Tel: 13908322928; E-mail: jiangshan00138@163.com。