文章编号:1000-5404(2007)18-1749-03

论著

两种不同开放血脑屏障方法的比较

童林艳[1],胡长林[1],李晋芳[1],王志刚[2],程 远[3] (重庆医科大学附属第二医院:[1]神经内科,[2]超声影像学研究所,[3]神经外科,重庆 400010)

提 要:目的 比较超声波诱导微泡破坏和甘露醇渗透性开放两种方法对大鼠血脑屏障通透性的影响。**方法** 大鼠分为2个实验组和1个对照组,1个实验组大鼠经股静脉注入微泡造影剂后,采用频率43 kHz、声强1.2 W/cm^{2}的超声波经大鼠颅骨照射3 min;另1个实验组大鼠经颈内动脉注入20%甘露醇。干湿重法测定脑水含量,荧光显微镜观察伊文思蓝的渗出。**结果** 两种方法都可以可逆开放血脑屏障,利用超声波诱导微泡破坏法开放血脑屏障较甘露醇渗透性开放法局限且持久。**结论** 超声波诱导微泡造影剂破坏是一种无创和具靶向性开放血脑屏障的新方法。

关键词:超声波;微泡造影剂;血脑屏障;伊文思蓝
中图法分类号:R331.54;R445.1 **文献标识码**:A

Permeability of blood-brain barrier by ultrasound-induced microbubble destruction or mannitol osmotic opening in rats

TONG Lin-yan[1], HU Chang-lin[1], LI Jin-fang[1], WANG Zhi-gang[2], CHENG Yuan[3] ([1]Department of Neurology, [2]Ultrasonography Institute, [3]Department of Neurosurgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: **Objective** To compare the permeability of blood-brain barrier (BBB) by 2 different opening methods, ultrasound-induced microbubble destruction and mannitol osmotic opening in rats. **Methods** Totally 80 Wistar rats were divided into ultrasound group (A, $n=35$), mannitol group (B, $n=35$) and saline group (C, $n=10$). The rats of group A were sonicated by ultrasound (43 kHz, 1.2 W/cm^2) for 3 min after microbubbles injected through femoral vein, and those from group B received an injection of 20% mannitol into the internal carotid artery, those of group C got saline injection into femoral vern. Brain water content was determined by dry-wet weight method. Evans blue dye exudation in the brain was observed with fluorescence microscopy. **Results** Two methods opened BBB reversibly, and the effects of ultrasound-induced microbubble destruction in opening BBB were more localized and durable than mannitol osmotic opening. **Conclusion** Ultrasound-induced microbubble destruction is a promising method for noninvasively and targeted opening BBB.

Key words: ultrasound; microbubble; blood brain barrier; evans blue

有关血脑屏障的研究已有一个多世纪的历史。这一保护性屏障的存在使许多中枢神经系统疾病的潜在治疗药物在应用中受到限制。寻求一种能够快速、可逆、靶向性的开放血脑屏障、促进药物对中枢神经系统疾病治疗的方法,一直是众多学者多年来努力的方向。近年来,在对微泡造影剂生物学效应的研究中,国外学者发现,注入微泡造影剂后,选择参数合适的超声波照射可以可逆的开放血脑屏障[1,2]。本研究以甘露醇渗透性开放血脑屏障作对比,探讨这一方法的可行性及特点。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

健康成年Wistar大鼠80只(重庆医科大学实验动物中心提供),雌雄不限,体质量250~300 g。分为3组:超声微泡组35只(A组)、甘露醇组35只(B组)、对照组10只(C组)。

1.2 药物和材料

伊文思蓝(Evans blue, EB) Fluka进口分装;微泡造影剂——全氟显(南方医科大学南方医院医学系提供),微泡直径2.0~4.0 μm,浓度(0.8~1.8)×10^9/ml;Olympus-BH2荧光显微镜。

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30430230)
Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30430230)

作者简介:童林艳(1975-),女,四川省攀枝花市人,硕士,主治医师,主要从事超声微泡与血脑屏障方面的研究。电话:13996231151,(023)63812801,E-mail: tongly889@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-09-29;修回日期:2007-03-22

1.3 实验方法

①超声微泡组：大鼠以3.5%水合氯醛(100 mg/kg)麻醉，俯卧于手术台上，以8%的硫化钠水溶液脱去大鼠头顶毛发，股静脉注入全氟显0.2 ml，继以1 ml生理盐水快速冲管后，立即用频率43 kHz、声强1.2 W/cm^{2}的超声波辐照大鼠右顶3 min。②甘露醇处理组：麻醉大鼠仰卧固定于手术台上，分离右侧颈内及颈外动脉，通过颈外动脉置管到颈内动脉。将颈外动脉远心端结扎，以0.25 ml·kg^{-1}·s^{-1}的速率经单侧颈内动脉注射20%甘露醇，持续时间30 s。取出导管，结扎颈外动脉近心端，缝合伤口。③对照组：仅股静脉注入1.2 ml生理盐水，不做其他处理。

1.4 荧光显微镜观察

各组处理完毕，A、B实验组分别于2 min、1 h、6 h、12 h，对照组于2 min，各取5只大鼠经股静脉注入2%伊文思蓝(3 ml/kg)，30 min后用生理盐水左心室灌注至右心耳流出清亮液体后，以4 ℃ 4%多聚甲醛灌注固定。迅速断头取脑组织浸入4%的多聚甲醛固定72 h，随后用20%的蔗糖固定24 h，10 μm冰冻切片，荧光显微镜B激发状态下观察。每片选取10个连续视野计算红色荧光光斑数。

1.5 脑水含量测定

A、B实验组分别于2、6、12 h，对照组于2 h，各取5只大鼠，以干湿重法测定脑水含量。脑组织含水量(%)=(湿重-干重)÷湿重×100%。

1.6 统计学分析

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件，组间比较行单因素方差分析。

2 结果

2.1 EB观察

超声微泡组大鼠右侧脑组织中2 min、1 h均可以观察到明显的卵圆形红色荧光光斑(图1)，6 h光斑稀少，12 h及对侧脑组织中未见荧光光斑。甘露醇组2 min双侧脑组织中均可见红色荧光光斑，光斑呈条柱状，右侧多于左侧，1 h光斑数量减少(图2)，6 h荧光显微镜下未见光斑。对照组脑组织中未见光斑出现。见表1。

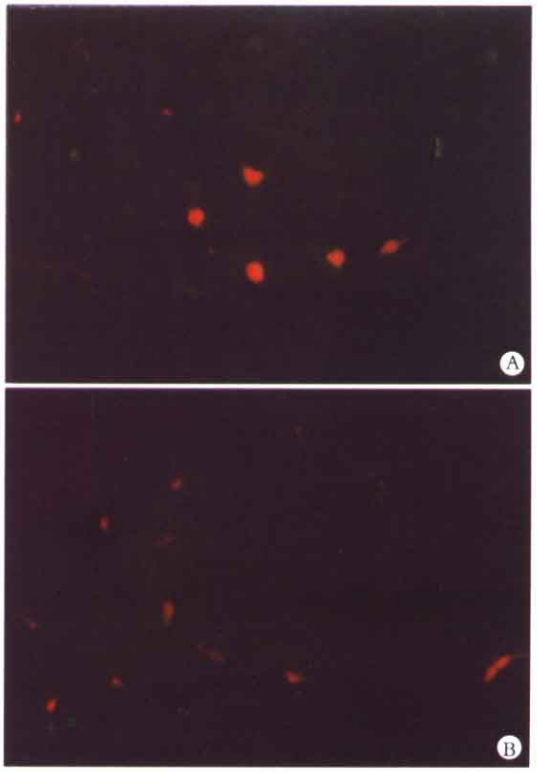
表1 两组不同时相点右侧脑组织每10个高倍镜视野EB光斑数(n=5)

组别	2 min	1 h	6 h	12 h
超声微泡组	53.75±2.75	62.25±3.50	7.64±2.16	0
甘露醇组	71.50±4.04[a]	27.75±6.85[a]	0.25±0.50[a]	0

a：$P<0.01$，与同一时相点超声微泡组比较

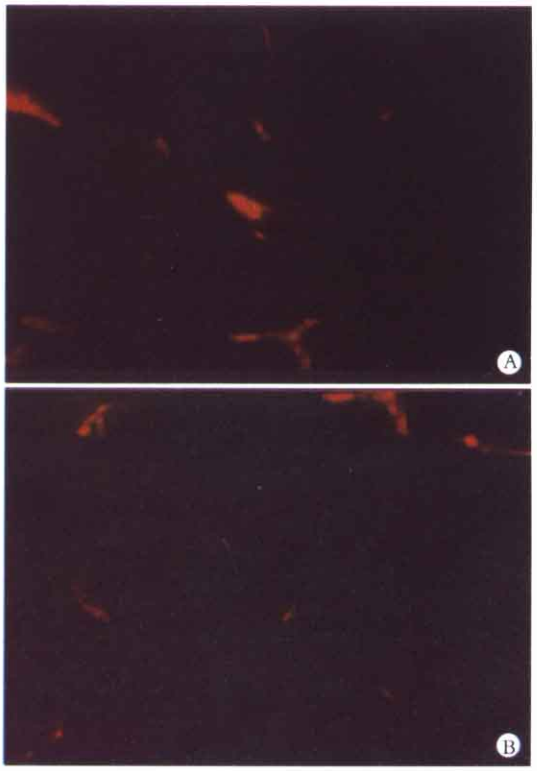
2.2 脑水含量

超声微泡组右侧脑水含量从2 h开始增加，6 h达高峰，12 h开始下降，各时点均高于对照组($P<0.05$)，左侧脑水含量无明显变化。甘露醇组脑水含量在2 h时已达高峰，6 h开始下降，左右两侧半球均有增加。右侧脑水含量从6 h开始，甘露醇组低于超声微泡组，各时点比较差异有显著性($P<0.05$)。见表2。



A：2 min；B：1 h

图1 超声微泡组2 min、1 h EB光斑 (荧光显微镜×200)



A：2 min；B：1 h

图2 甘露醇组2 min、1 h EB光斑 (荧光显微镜×200)

表 2　两组不同时相点脑水含量比较（$n=5$，%）

组别	2 h		6 h		12 h	
	左侧	右侧	左侧	右侧	左侧	右侧
对照组	77.05 ±0.25	77.11 ±0.35	–	–	–	–
超声微泡组	77.13 ±0.13[b]	79.94 ±0.16[ab]	77.17 ±0.24[b]	80.03 ±0.26[ab]	77.14 ±0.27	78.42 ±0.18[ab]
甘露醇组	79.08 ±0.22[a]	80.26 ±0.26[a]	77.94 ±0.11[a]	78.56 ±0.10[a]	77.19 ±0.15	77.68 ±0.31[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与甘露醇组比较

3　讨论

血脑屏障是保证脑的内环境高度稳定的重要结构，也是治疗脑部疾病时所面临的最大阻碍。在病理情况下，血脑屏障的完整性受到破坏、通透性增高，又是加重脑损害的原因[3]。因此任何理想的开放血脑屏障的方法，都必须具有靶向、可逆、安全、易操作的特点，对血脑屏障开放所产生的继发性脑损伤应该最小。

颈动脉内灌注高渗溶液是目前研究最多并证明能够有效和可逆开放血脑屏障的方法。在动物实验和临床上已被证实可以提高化疗药物通过血脑屏障的量，延长脑肿瘤患者的生存期。我们采用颈内动脉推注甘露醇的方法，与超声波诱导微泡破坏开放血脑屏障进行对比研究。结果表明，两种方法均可使血脑屏障立即开放。但甘露醇渗透性开放血脑屏障需经颈内动脉插管，临床操作复杂，易造成治疗创伤。同时血脑屏障开放的范围较广，限制了其临床应用。超声波诱导微泡破坏对血脑屏障的开放，仅出现在有超声波照射的区域，具有更强的靶向性，且操作方法更简单，创伤性小，重复性好。

国外对超声波诱导微泡破坏开放血脑屏障的研究，多采用高强度聚焦超声波，常常需要去除颅骨和复杂的超声波发射装置。我们利用颅骨对低频超声波衰减少的特性，采用简单的低频超声波装置，且在不需要去除颅骨的条件下，同样实现了血脑屏障的开放。超声波具有许多较好的物理性能，通过控制其频率、强度、照射部位、时间、聚焦深度等条件，利用超声空化效应，有可能实现对血脑屏障的靶向开放，解决治疗药物通过血脑屏障而进入中枢神经系统的难题。

关于超声波诱导微泡破坏开放血脑屏障的机制目前尚不清楚，多数学者认为主要与超声波的空化作用有关。Sheikov 等[4]研究发现，应用微泡的同时，辐以低能量超声波照射（0.55 W/cm^2），不会损伤细胞的超微结构，大分子可能通过以下途径透过血脑屏障：①胞吞转运增加；②内皮细胞细胞质开放-开窗和通道形成；③部分紧密连接开放。以较高能量的超声波（3 W/cm^2）照射时，可以观察到细胞结构损伤，此时可能是通过损伤内皮处的自由转运实现血脑屏障的跨膜转运。该研究提示我们在应用这一方法时，控制好超声波的频率、强度对于减轻脑损伤极为重要。本研究中，超声微泡组血脑屏障开放的时间较甘露醇组长，是否此声强仍能引起内皮损伤，未作进一步研究。

近年来的研究表明，作为造影剂的微泡是一种良好的药物和基因载体[5,6]。当携带有药物的微泡在超声波照射下破坏后，能在病变部位释放大量的药物，从而提高局部的药效，而不产生全身副作用。同时，利用微泡在声场中被超声波破坏时产生的空化效应能够促进血栓溶解和基因转染[7]。对微泡造影剂的研究给中枢神经系统疾病的治疗带来新的希望。如果利用微泡可以携带药物和基因的特点，采用体外超声照射，破坏靶区的微泡，使其诱导血脑屏障开放，则可以使药物和外源基因通过血脑屏障进入脑内发挥治疗作用。但这一领域的研究才刚刚起步，对于超声波诱导微泡破坏开放血脑屏障的条件，血脑屏障开放的时相和机制，对脑组织的影响等都需要作进一步的研究，才能真正成为一种有效的治疗手段。

参考文献：

[1] McDannold N, Vykhodtseva N, Hynynen K, *et al*. Targeted disruption of the blood-brain barrier with focused ultrasound: association with cavitation activity[J]. Phys Med Biol, 2006, 51(4): 793 – 807.

[2] Hynynen K, McDannold N, Vykhodtseva N, *et al*. Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits[J]. Radiology, 2001, 220(3): 640 – 646.

[3] 谢宗义，马　颖，程　远. 大鼠蛛网膜下腔出血后血脑屏障通透性变化[J]. 第三军医大学学报，2007，29(9)：834 – 836.

[4] Sheikov N, McDannold N, Vykhodtseva N, *et al*. Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles[J]. Ultrasound Med Biol, 2004, 30(7): 979 – 989.

[5] Unger E C, Hersh E, Vannan M, *et al*. Local drug and gene delivery through microbubbles[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2001, 44(1): 45 – 54.

[6] Mayer S, Grayburn P A. Myocardial contrast agents: recent advances and future directions[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2001, 44(1): 33 – 44.

[7] 童林艳. 微泡造影剂在中枢系统的研究进展[J]. 临床超声医学杂志，2004，6(5)：291 – 292.

（编辑　龙　亮）