文章编号:1000-5404(2013)22-2439-04

论著

微泡增强的超声空化效应对兔肌肉和肺微血管的损伤作用

李 莎,张金龙,崔 海,刘 政 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院超声科)

[摘要] **目的** 研究微泡增强的超声空化技术可能对兔肌肉和肺微血管产生的损伤作用。**方法** 将15只新西兰大白兔联合静脉注射微泡的同时予以CZ-960超声空化治疗仪辐照任意一侧腿部肌肉及右肺各5 min,其中5只兔于治疗后即刻获取肌肉和肺进行病理检查,其余10只兔于治疗前,治疗后即刻、30、60 min和48 h行兔腿部肌肉超声造影,视觉观察并测量各时间点造影峰值强度(contrast peak intensity, PI)变化。48 h造影后,再获取其中5只动物的肌肉和肺进行病理检查。**结果** 超声空化作用后,靶区兔肌肉和肺表面均产生点状或小片状出血。空化作用前后各时间点肌肉造影PI值无明显差异($P>0.05$)。光镜下可见经空化作用后即刻,肌束间有微小的局灶性出血、水肿,无坏死情况,肺间质可见弥漫的微小血管出血;空化作用48 h后,肌束间出现微小灶性坏死,坏死灶面积占视野总面积的1%~2%。肺间质出现散在的微小出血灶。**结论** 微泡增强的超声空化效应在即刻空化治疗中可致肌肉和肺微小出血灶形成,肺损伤范围局限,对肌肉的整体血流灌注无明显影响。故超声空化治疗对肌肉和肺正常微血管的损伤作用不大。

[关键词] 超声空化;微泡;肌肉;肺微血管
[中图法分类号] R322.13;R322.74;R454.3 [文献标志码] A

Microbubble-enhanced ultrasound cavitation induces microvascular impairment in muscle and lung of rabbit

Li Sha, Zhang Jinlong, Cui Hai, Liu Zheng (Department of Ultrasonography, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the injury of microbubble-enhanced ultrasound cavitation on microvessles in muscle and lung of rabbit. **Methods** Leg muscles and right lungs of 15 New Zealand rabbits were treated for 5 min using a pulsed therapeutic ultrasound device (CZ-960) with intravenous injection of lipid microbubble. The muscles and right lungs of 5 rabbits were harvested for pathological examination immediately after treatment. Contrast enhanced ultrasound (CEUS) was performed before and after the treatment at 0 min, 30 min, 60 min and 48 h in the rest 10 rabbits. Contrast peak intensity (PI) was quantified to assess the muscle blood perfusion. The muscles and right lungs of 5 rabbits were collected for pathological examination after 48 h of contrast enhancement. **Results** Petechial haemorrhage occurred in gross muscles and lung surfaces immediately after the treatment. No significant CEUS PI difference of muscle was found before and after treatment. We found microvascular rupture in the form of focal hemorrhage and edema in muscle and lung immediately after the treatment. In 48 h later, most focal hemorrhage and edema disappeared and were replaced by minute focal necrosis in muscle. **Conclusion** Microbubble-enhanced ultrasound cavitation can induce regional and limited microvascular hemorrhage in muscle and lung, with no impact on muscular blood perfusion. Therefore, the treatment has little effect on the microvessles in the muscle and lung.

[**Key words**] ultrasound cavitation; microbubble; muscle; lung microvessle

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 program, 2012AA022702) and the Key Tackling Project of Sci & Tech Research of Chongqing (CSTC2011GGB10002). Corresponding author: Liu Zheng, E-mail: liuzhengs@hotmail.com

微泡增强的超声空化效应治疗技术已经在肿瘤治疗、肝创伤止血和前列腺增生消融等疾病中显示出潜在的临床应用前景[1-4]。但是,针对超声空化可能对正常组织产生的副作用研究却仅限于心脏、小肠和肾

[基金项目] 国家高科技研究发展计划(863计划,2012AA022702);重庆市科技攻关重点项目(CSTC2011GGB10002)
[通信作者] 刘 政,E-mail: liuzhengs@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131014.1127.022.html(2013-10-14)

脏等少数器官[5-8]，因此，要发展产生超声空化治疗技术必须全面了解其生物学副作用。肌肉和肺是超声空化治疗腹部肿瘤（特别是肝癌）不可避免涉及的脏器或组织，本研究拟采用正常兔肺、肌肉作为空化治疗对象，希望了解两者在超声空化治疗中可能产生的空化损伤。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

约5月龄健康新西兰大白兔15只，雌雄不限，体质量2.0~3.0 kg，由第三军医大学新桥医院实验动物中心提供。经CZ-960超声空化治疗仪辐照后，通过查询随机表的方法，获取辐照后即刻进行肌肉和肺病理检查的5只实验兔，剩余10只实验兔经48 h超声造影后，再选取其中5只实验兔进行肌肉和肺的病理检查。

1.2 设备与试剂

美国GE公司Logiq 9彩色多普勒超声诊断仪，配有9 L高频线阵探头，频率5~9 MHz，采用编码脉冲反向谐波技术进行低机械指数造影（MI 0.07）。仪器配有TIC时间-强度分析软件。

超声空化治疗采用CZ-960型脉冲式超声空化治疗仪（绵阳索尼克电子有限责任公司）。该治疗仪发射脉冲式、弱聚焦式、高声压超声信号，治疗头频率831 kHz，峰值负压4.8 MPa，平均声强（I_{SPTA}）1.25 W/cm^2。该超声治疗仪以间歇式发射，即发射6 s、间歇6 s。

脂氟显脂质微泡由第三军医大学新桥医院超声科自行研制，外观呈乳白色凝乳状，核心气体为全氟丙烷，微泡浓度为$(4~9)\times10^9$/mL，98%粒径<8 μm，平均2 μm。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物准备 所有实验动物采用经耳缘静脉注射2%戊巴比妥钠（1.5 mL/kg）麻醉。建立耳缘静脉通道后，一侧腿部肌肉及右侧胸部脱毛暴露皮肤。

1.3.2 超声空化治疗方法 将麻醉动物固定后，超声治疗头直接经无菌耦合剂与腿部肌肉接触，然后启动超声空化治疗仪辐照肌肉5 min。在治疗的同时，将剂量为0.1 mL/kg的微泡稀释至3 mL生理盐水中，经静脉通道匀速推注微泡约4 min，然后继续缓慢滴注生理盐水冲洗管道1 min。肺部治疗区域位于右侧胸部腋中线，治疗程序与肌肉相同。5只动物在超声治疗后即刻，使用2%的戊巴比妥钠120 mg/kg处死动物，获取靶区肌肉和肺组织进行大体观察和照相，然后置于10%甲醛溶液固定24 h，石蜡包埋，制成常规HE染色切片，最后行光镜观察。

1.3.3 超声造影 其余10只动物在空化治疗前后均实施腿部肌肉超声造影，用于判断治疗前后靶区肌肉血流灌注变化。造影时间点分别在治疗前、治疗后即刻、治疗后30 min、治疗后60 min和治疗后48 h。超声造影时仪器参数设置固定不变，采取同一肌肉切面。脂氟显脂质造影剂经耳缘静脉团注（剂量0.02 mL/kg），存储动态造影图像。动态记录治疗前后各时间点靶区肌肉血流灌注变化后，使用TIC时间-强度分析软件分析，造影感兴趣区置于靶区中央（椭圆形，大小0.5 cm×1.0 cm）分析PI值，其声学单位为分贝（dB）。超声造影结束后，使用2%的戊巴比妥钠120 mg/kg处死动物后，随机选取10只动物中的5只，获取靶区肌肉和肺组织进行大体观察和照相，然后置于10%甲醛溶液固定24 h，石蜡包埋，制成常规HE染色切片，最后行光镜观察。

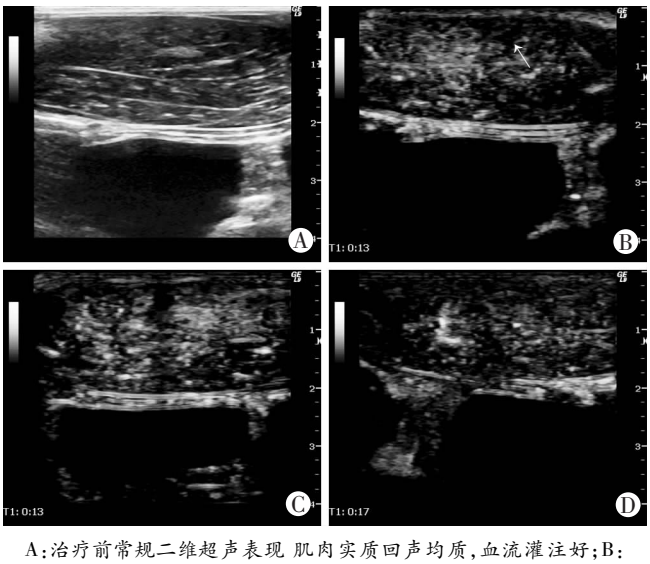
1.4 统计学分析

应用SPSS 13.0统计软件，数据以$\bar{x}\pm s$表示，各时间点之间的比较采用重复测量数据的单因素方差分析。

2 结果

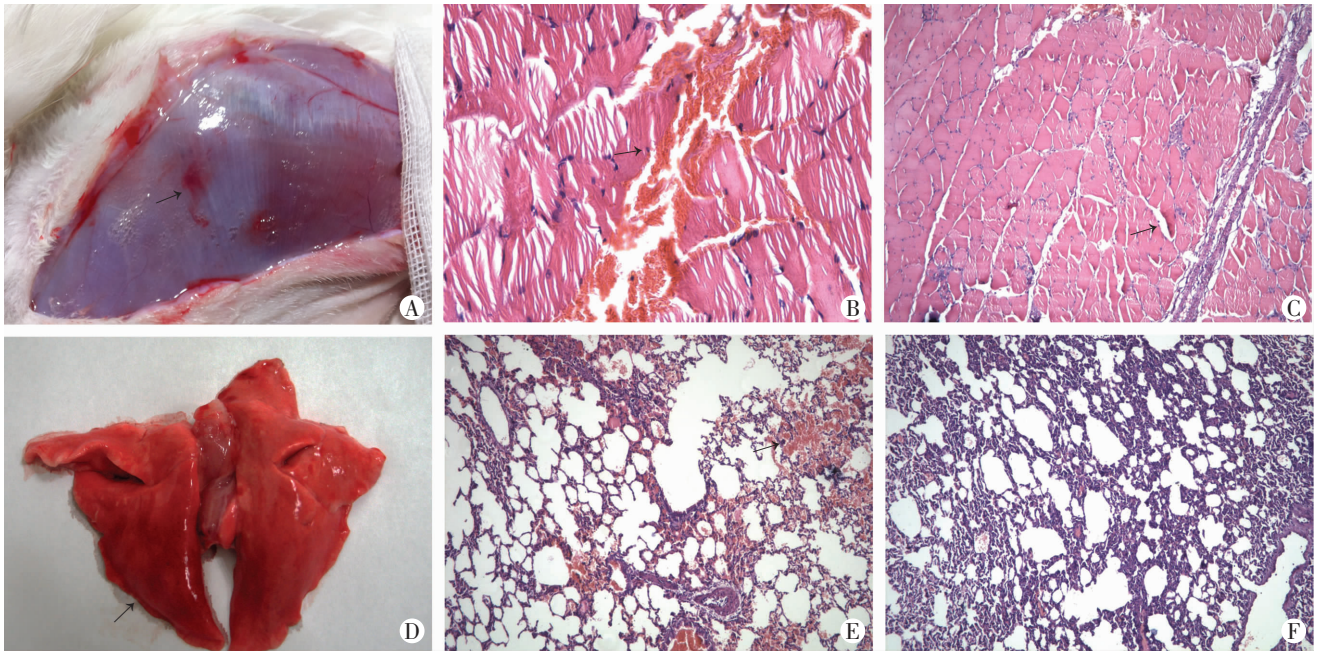
2.1 肌肉超声造影结果

10只用于超声造影的实验兔实验全程生命体征平稳，均顺利完成实验。超声造影血流灌注情况：治疗前腿部肌肉超声造影表现为肌肉实质较均匀增强，血流灌注良好，无充盈缺损（图1A），治疗后即刻及治疗后30 min靶区造影增强无明显变化（图1B），较治疗前区别不大；治疗后60 min和48 h，视觉观察肌肉造影强度与同治疗前水平无明显差异（图1C、D）。超声造影PI值治疗后有轻微上升（表1），但治疗前后PI值无统计学差异（$P>0.05$），治疗后PI值上升幅度分别为3%（治疗后即刻）、6%（治疗后30 min）、2%（治疗后60 min）、5%（治疗后48 h）。根据实验设计方法，重复测量数据单因素方差对各时相的PI值进行分析，显示不同的时间点PI之间的差异没有统计学意义（$P=0.391$）。不同时间进行重复测量峰值强度数据不具有“球对称”，统计量$\chi^2=18.539$，$P=0.033\ 3$，在不满足“球对称”假设时，校正后的统计量$F=0.813$，采用一元方差分析，各时间点的不同峰值强度总体均值间两两差异也无统计学意义（$P>0.05$）。



A：治疗前常规二维超声表现 肌肉实质回声均质，血流灌注好；B：治疗后30 min 无明显充盈缺损（↑），较治疗前区别不大；C：治疗后60 min 视觉血流灌注超过治疗前水平；D：治疗后48 h 血流灌注良好

图1 兔肌肉超声空化各时间点超声造影观察



A:兔经辐照 5 min 后大腿肌肉大体观　肌肉表面出现小范围的点状(↑)或片状出血,范围仅限于治疗靶区;B:空化治疗后即刻光镜观察大腿肌肉　肌束之间的毛细血管内可见到明显的出血、水肿(↑)(HE ×400);C:治疗 48 h 后光镜观察大腿肌肉　肌束间可见到散在分布的,微小坏死灶(↑)(HE ×100);D:兔肺大体观察　右肺下叶表面可见到明显的充血和出血(↑),色泽较正常区域暗红;E: 空化治疗后即刻光镜观察肺间质　可见到弥漫的微小血管出血形成的血肿(↑)(HE ×100);F: 治疗 48 h 后光镜观察肺间质　可见到微小出血灶和血管充血(HE ×100)

图 2　兔肌肉和肺超声空化治疗后大体与光镜改变

表 1　兔肌肉超声空化治疗前后超声造影 PI 值比较 (dB, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

时间	PI 值
治疗前	−50.6 ±6.1
治疗后即刻	−49.0 ±3.7
治疗后 30 min	−47.2 ±4.6
治疗后 60 min	−49.5 ±2.4
治疗后 48 h	−48.1 ±5.8

2.2　病理检查结果

2.2.1　肌肉　　超声空化治疗后即刻,大体可见兔肌肉小范围的点状或片状出血,轻度红染且界限清晰(图 2A),48 h 后观察出血区颜色变浅,有吸收倾向。光镜下,治疗后即刻可见肌束间有微血管破裂,微小的局灶性出血,无坏死情况(图 2B);48 h 后肌束间出现散在的微小灶性坏死,个别动物出现肌束间水肿。坏死灶面积大小占光镜下总视野面积的 1% ~2%(图 2C)。

2.2.2　肺　　超声空化治疗后即刻,大体可见兔右肺上叶表面光滑,色浅红,未见出血,右肺叶下段或中段不规则充血和出血,与上叶相比,色泽较暗红(图 2D)。48 h 后观察肺表面光滑,色浅红,辐照的部分区域与即刻处理兔相比颜色变浅。光镜下:治疗后即刻靶区肺间质出现较弥漫的微小血管出血、破裂,少量血浆蛋白渗出 (图 2E);48 h 后出血大部分吸收,仅可见到散在的微小出血灶和血管充血(图 2F)。损伤的范围均在肺表面 1 ~2 mm 内。

3　讨论

微泡增强的超声空化效应证实对心脏、肾脏、小肠等脏器的微小血管具有机械性损伤的副作用,具体表现为:心律失常[5]、微小血管破裂、出血瘀斑甚至血肿形成等[7-10]。以往空化损伤的研究不仅多局限于心脏、小肠和肾脏等器官,而且主要研究损伤的急性机制方面、多采用超声诊断仪实施空化[7-8,11]。当前微泡增强的超声空化效应治疗技术已经在肿瘤治疗、肝脏止血和前列腺消融等方面成为一个潜在的新型超声治疗方法[2-4],但是对治疗级超声的安全性或者生物学副作用却研究不足,因为治疗超声在声压、声强和工作占空比方面均显著高于诊断超声,因此可能产生更显著的生物学副作用研究。

目前治疗超声联合微泡对肌肉和肺可能产生的空化损伤仍然为研究空白。为此,本实验针对肝脏超声空化治疗涉及的正常器官组织——肌肉和肺,展开空化治疗后急性损伤和治疗 48 h 后损伤的研究。研究结果显示,受即刻空化损伤的肌肉和肺组织也出现了局限性的微小血管破损、出血、微小血肿形成等病理变化,与心脏、小肠等损伤结果类似[5,7-8]。

超声造影已经成为判断组织血流灌注的准确影像

学方法,本实验针对兔肌肉的超声造影发现,治疗前后各个时间点血流灌注的视觉观察和峰值强度均未见明显的改变。本研究数据结果分析,治疗后即刻、30、60 min PI数值有轻微上升的趋势,该现象在以前肿瘤实验中也出现过,表现为肿瘤周边肌肉造影强度轻度上升[12],主要与肌肉微血管的超声空化损伤有关。前期研究中,声压4.8 MPa的脉冲式超声可以显著阻断动物肿瘤微循环,主要是因为肿瘤新生血管发育具有缺陷性,结构薄弱,缺乏平滑肌层,对于微泡空化的攻击敏感而造成微血管的毁损[13]。相比之下正常的微血管发育完善,结构完整,受到的空化损伤程度较轻。虽然大体和镜下都发现肌肉有小片状出血,但是范围局限,而且损伤仅限于微米级的微小血管,并未造成严重的出血副作用,因此不会造成类似肿瘤微循环阻断的情况。相反由于肌肉微血管损伤诱发无菌性炎症反应,可以造成血管扩张和充血,因此治疗后肌肉超声造影轻度增强可以用炎症反应解释。损伤后48 h的观察,出血明显吸收,仅发现镜下肌束有微小的灶性坏死和轻微组织水肿,其坏死面积仅占视野总面积的1% ~2%,因此超声空化对肌肉组织的损伤微小而且恢复较快。

肺组织因含气、超声不能穿透,理论上超声空化损伤只可能局限于肺表面。实验结果也证实了我们的推测:大体上,仅在辐照靶区肺叶中下段表面有少量片状充血,范围局限。镜下,空化治疗造成的肺血管损伤仅局限在肺组织浅表层,在1 ~2 mm以内,肺间质内可见散在的微小血管破裂,轻微水肿和微小的血肿形成,48 h以后血肿明显吸收。以上结果说明超声空化对肺组织整体损伤小,恢复较快,故副作用也不大。

尽管微泡增强的超声空化效应在4.8 MPa水平对肌肉和肺损伤程度较小,但本研究没有评价空化对肌肉功能和肺功能的损伤;本研究对空化损伤副作用的观察仅限于治疗后即刻至48 h,没有进行1周甚至更长时间的观察;本实验只采用了声压为4.8 MPa水平的超声进行实验,应进一步比较不同声压产生的治疗效果和生物学损伤效应,从而在治疗效果和生物学副作用方面找到平衡点。

在声压4.8 MPa水平,微泡增强的超声空化效应对兔肌肉和肺微血管有局限性损伤,对于肌肉血流灌注无明显的降低作用。48 h后微血管出血吸收恢复较快。

参考文献:

[1] Liu Z, Gao S, Zhao Y, *et al*. Disruption of tumor neovasculature by microbubble enhanced ultrasound: a potential new physical therapy of anti-angiogenesis[J]. Ultrasound Med Biol, 2012, 38(2): 253 - 261.

[2] Zhao X, Li L, Zhao H, *et al*. Liver haemostasis using microbubble-enhanced ultrasound at a low acoustic intensity[J]. Eur Radiol, 2012, 22(2): 379 - 386.

[3] 吴盛正, 何景光, 区文财, 等. 脉冲式治疗超声联合微泡对犬前列腺血流灌注的影响[J]. 中国超声医学杂志, 2012, 28(3): 204 - 206.

[4] 高文宏, 钟渝, 乔璐, 等. 微泡双重击破效应对裸鼠HepG2肿瘤微血管的损伤作用[J]. 中华超声影像学杂志, 2013, 22(2): 166 - 169.

[5] Xie F, Tsutsui J M, Gao L, *et al*. Interaction of transthoracic ultrasound and intravenous microbubbles with cardiac mechanoreceptors [J]. Ultrasound Med Biol, 2007, 33(1): 136 - 144 .

[6] Li P, Cao L Q, Dou C Y, *et al*. Impact of myocardial contrast echocardiography on vascular permeability: an *in vivo* does response study of delivery mode, pressure amplitude and contrast dose[J]. Ultrasound Med Biol, 2003, 29(9): 1341 - 1349.

[7] Miller D L, Gies R A. The influence of ultrasound frequency and gas-body composition on the contrast agent-mediated enhancement of vascular bioeffects in mouse intestine[J]. Ultrasound Med Biol, 2000, 26(2): 307 - 313.

[8] Miller D L, Dou C, Wiggins R C, *et al*. An *in vivo* rat model simulating imaging of human kidney by diagnostic ultrasound with gas-body contrast agent[J]. Ultrasound Med Biol, 2007, 33(1): 129 - 135.

[9] 刘德英, 刘政, 李秋颖, 等. 超声造影显像模式对实验兔心肌血管通透性的影响[J]. 临床超声医学杂志, 2006, 8(10): 577 - 580.

[10] 李秋颖, 刘政, 李佩倞, 等. 微泡介导下脉冲式聚焦超声空化导致血管损伤的实验研究[J]. 中国超声医学杂志, 2008, 24(4): 297 - 299.

[11] Xie F, Lof J, Everbach C, *et al*. Treatment of acute intravascular thrombi with diagnostic ultrasound and intravenous microbubbles[J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2009, 2(4): 511 - 518.

[12] 高顺记, 李佩倞, 赵洋, 等. 微泡增强的超声空化阻断肿瘤微循环的初步研究[J]. 中国超声医学杂志, 2010, 26(2): 110 - 112.

[13] 钟渝, 刘政, 朱梅, 等. 新型超声空化技术毁损大鼠Walker-256肿瘤微血管的研究[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(7): 487 - 490.

(**收稿**:2013-08-15;**修回**:2013-09-08)

(编辑 王 红)