

## ❖ 实验研究

## Inhibitory role of ABCG2 on the lethal effect of sonodynamic therapy on glioma stem cells: An experimental study

XU Zhong-ye<sup>1,3</sup>, LI Xiao-qing<sup>2</sup>, CHEN Wei-fu<sup>1</sup>, CHENG Yuan<sup>1</sup>, WANG Zhi-gang<sup>3\*</sup>

(1. Department of Neurosurgery, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Department of Ultrasound, Cancer Research Institute of Chongqing, Chongqing 400030, China; 3. Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the inhibition role of ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2) on the lethal effect of sonodynamic therapy (SDT) on glioma stem cells (GSCs). **Methods** GSCs were isolated and cultured from glioma cells in the suspend culture medium. The expression of ABCG2 on GSCs was analyzed by flow cytometry and immunocytochemical assay. The exocytosis of ABCG2 on Photofrin were studied by ABCG2 specific inhibitor fumitremorgin C (FTC). The reactive oxygen species (ROS) production, cell viability as well as cell apoptosis were measured to assess the effect of FTC on SDT. **Results** GSCs were successfully isolated and cultured, on which ABCG2 was overexpressed demonstrated by flow cytometry and immunocytochemical assay. FTC could effectively inhibit the Photofrin excretion caused by ABCG2. FTC increased ROS production through inhibition of Photofrin excretion, which lead to the enhancement effect on SDT-induced cell viability reduction and apoptosis increase. **Conclusion** The overexpression of ABCG2 in GSCs results in efflux of Photofrin. ABCG2 specific inhibitor can improve the lethal effect of SDT on GSCs.

**[Key words]** Glioma; Tumor stem cells; Sonodynamic therapy; ATP-binding cassette transporter G2

## ABCG2 蛋白抑制声动力治疗对体外胶质瘤干细胞的杀伤作用

徐忠烨<sup>1,3</sup>, 李小青<sup>2</sup>, 陈维福<sup>1</sup>, 程 远<sup>1</sup>, 王志刚<sup>3\*</sup>

(1. 重庆医科大学附属第二医院神经外科, 重庆 400010; 2. 重庆市肿瘤研究所超声科, 重庆 400030; 3. 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010)

**[摘要]** **目的** 探讨三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2(ABCG2)对声动力治疗(SDT)杀伤体外胶质瘤干细胞(GSCs)的影响及其机制。**方法** 以悬浮培养法自胶质瘤细胞中分离和培养 GSCs;以流式细胞术、免疫荧光细胞化学染色方法分析 ABCG2 蛋白在 GSCs 上的表达;利用 ABCG2 蛋白特异性阻断剂 Fumitremorgin C(FTC)分析其对细胞内声敏剂 Photofrin 的外排作用;通过检测细胞内 ROS 产量、细胞存活率、细胞凋亡率,分析 FTC 对 SDT 治疗效果的影响。**结果** 成功分离和培养了 GSCs;ABCG2 蛋白在 GSCs 上过表达;FTC 可抑制 ABCG2 蛋白对细胞内 Photofrin 的外排作用;FTC 通过提高细胞内 Photofrin 的浓度而提高细胞内 ROS 的产量,进而增强 SDT 导致的细胞存活率下降和凋亡率升高作用。**结论** ABCG2 蛋白在 GSCs 上过表达;抑制 ABCG2 蛋白的药物外排作用可提高 SDT 对 GSCs 的杀伤作用。

**[关键词]** 胶质瘤;肿瘤干细胞;声动力治疗;三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2

**[中图分类号]** R73-36; TB559 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2013)05-0673-05

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2011CB707900)、重庆市卫生局医学科研计划(2012-2-065)。

**[作者简介]** 徐忠烨(1977—),男,辽宁抚顺人,博士,主治医师。研究方向:恶性胶质瘤的综合治疗。E-mail: xuzhongye1977@163.com

**[通讯作者]** 王志刚,重庆医科大学超声影像学研究所,400010。E-mail: wzg62942443@163.com

**[收稿日期]** 2012-12-20 **[修回日期]** 2013-03-07

声动力治疗(sonodynamic therapy, SDT)是近年来兴起的一种肿瘤治疗技术,通过聚焦超声激活聚集于肿瘤细胞内的声敏剂,产生具有细胞毒性的活性氧物质(reactive oxygen species, ROS),从而靶向杀伤快速增殖的肿瘤细胞<sup>[1]</sup>。最近的研究<sup>[2-4]</sup>表明,SDT可在体外和体内有效杀伤胶质瘤细胞,且不影响瘤周正常脑组织,使得 SDT 在恶性胶质瘤治疗领域备受关注。胶质瘤干细胞(glioma stem cells, GSCs)是胶质瘤内具有干细胞特性的细胞,尽管数量少,但却是恶性胶质瘤形成和发展的“种子细胞”,也是恶性胶质瘤对化疗和放疗不敏感的根本原因,目前很多学者以其为治疗靶细胞进行研究<sup>[5]</sup>。笔者在前期工作中发现,与胶质瘤细胞相比,GSCs 对 SDT 有抵抗作用<sup>[6]</sup>。三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2(ATP-binding cassette transporter G2, ABCG2)是存在于多种干细胞表面一种具有卟啉类化合物(多数声敏剂)外排作用的转运体蛋白。本研究探讨 ABCG2 蛋白在 GSCs 上的表达及其对 SDT 治疗的影响。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂 胶质瘤细胞为本实验室保存细胞系,DMEM/F12 细胞培养液、N2 细胞培养液、B27 细胞培养液、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、人白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)、2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)、ABCG2 蛋白特异性阻断剂 fumitremorgin C(FTC)、MTT、Photofrin(声敏剂,卟啉衍生物)购于 Sigma 公司,FITC 标记的 ABCG2 抗体和 CD133 抗体购于 Santa Cruz 公司,TRITC 二抗购于北京中杉公司,FITC 标记的 TUNEL 凋亡检测试剂盒购于 Roche 公司。

1.2 GSCs 的体外培养及鉴定

胶质瘤细胞以  $1 \times 10^6$ /ml 密度接种于 DMEM/F12 培养液(含  $20 \mu\text{g/L}$  EGF 及 bFGF、 $10 \mu\text{g/L}$  LIF、1% N<sub>2</sub>、2% B27)中悬浮培养,每 3~4 天换液一次,7 天传代一次。将传代 3 次后获得的“细胞球”制备成单细胞悬液,4℃ 下与 FITC 标记的 CD133(GSCs 特异性抗原标志物)抗体孵育 30 min 后,以流式细胞仪检测 CD133 的表达。

1.3 ABCG2 蛋白表达分析 对悬浮生长的“细胞球”行 ABCG2 免疫荧光细胞化学染色,ABCG2 一抗的使用浓度为 1:1000。对染色后的细胞行 DAPI 复染,于激光共聚焦显微镜下观察 ABCG2 蛋白的表达;将“细胞球”分离成单细胞悬液后,4℃ 下与 FITC 标记的 ABCG2 抗体孵育 30 min,以流式细胞仪检测 ABCG2 蛋白的表达。

1.4 分析 ABCG2 蛋白对 Photofrin 的外排作用 将 GSCs 以  $1 \times 10^6$ /ml 密度接种于 6 孔板中,培养 12 h 后分为对照组、Photofrin 组和 FTC 组。Photofrin 组细胞于 Photofrin 终浓度为  $20 \mu\text{g/ml}$  的培养液中避光孵育 6 h,FTC 组细胞于 FTC 终浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$  的培养液中孵育 1 h 后,再于 Photofrin 终浓度为  $20 \mu\text{g/ml}$  的培养液中孵育。收集各组细胞,充分裂解后取上清液,以荧光分光光度计检测吸光度,激发和发射波长分别为 403 nm 和 625 nm,根据标准曲线计算细胞内 Photofrin 含量。

1.5 FTC 对 SDT 治疗作用的影响 将 GSCs 以  $1 \times 10^6$ /ml 密度接种于 6 孔板中过夜培养,分为 5 组:对照组,不施加干预因素;超声辐照组,以 1.0 MHz,  $0.5 \text{ W/cm}^2$  声强,辐照细胞 1 min;超声辐照 + FTC 组,细胞于 FTC 终浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$  培养液中孵育 1 h 后行超声辐照(参数同前);SDT 治疗组,加入 Photofrin 终浓度为  $20 \mu\text{g/ml}$  的培养液,避光孵育,6 h 后行超声辐照(参数同前);SDT 治疗 + FTC 组,细胞于 FTC 终浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$  培养液中孵育 1 h 后再行 SDT 治疗(参数同前)。

1.6 细胞存活率分析 采用 MTT 法分析细胞存活情况,收集各实验组细胞,以  $2 \times 10^4$  个/L 密度接种于 96 孔板中,每孔加入  $5 \mu\text{l}$  MTT,置于  $37^\circ\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 4h 后,离心,弃去上清液,加入  $15 \mu\text{l}$  二

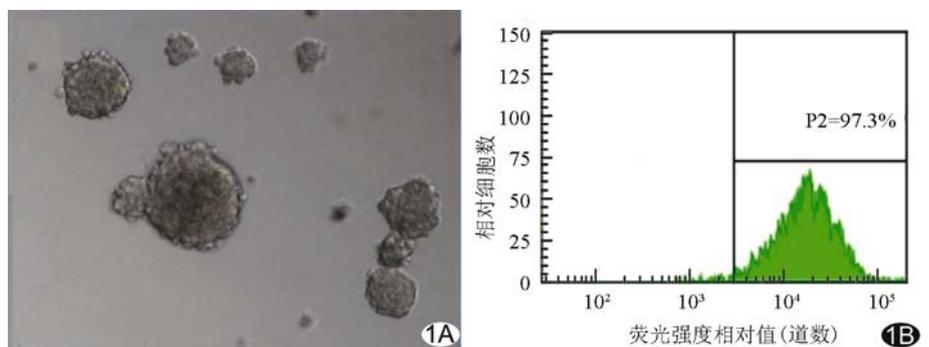


图 1 GSCs 体外培养及鉴定 A. 倒置显微镜示 GSCs 悬浮生长形成“胶质瘤干细胞球”(×100); B. 流式细胞术示 CD133 阳性表达 (P2:CD133 阳性细胞)

甲基亚枫震荡 5 min,应用酶标仪于 490 nm 波长处测定各孔光密度值(OD 值),根据标准曲线分析细胞存活情况。

1.7 细胞凋亡分析 各实验组细胞继续培养 12 h 后,以 4%多聚甲醛固定,PBS 冲洗 5 min 3 次,0.1% Triton X-100 室温孵育 5 min 后,与 FITC 标记的 TUNEL 染色剂 37℃孵育 1 h,行 DAPI 复染后,于激光共聚焦显微镜下观察。

1.8 细胞内 ROS 相对产量分析 收集上述各组细胞,避光条件下于 37℃ 在 DCFH-DA 终浓度为 10 μmol/L 的培养液中孵育 3 h,PBS 冲洗后,以流式细胞仪进行检测,激发波长为 488 nm,发射波长为 530 nm。应用 Cell Quest 3.2 软件进行数据采集和分析,ROS 相对产量为表达绿色荧光的细胞数与对照组细胞数之比。

1.9 统计学分析 采用 SPSS 12.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 GSCs 的体外培养及鉴定 胶质瘤细胞悬浮培养 7 天后形成由数个至数十个细胞组成的“胶质瘤干细胞球”(图 1A);流式细胞术检测证明“胶质瘤干细胞球”中的细胞绝大多数为 CD133 阳性细胞,符合 GSCs 的免疫学特性(图 1B)。

2.2 GSCs 上 ABCG2 蛋白表达分析 荧光免疫细胞化学染色证明,“胶质瘤干细胞球”中的绝大多数细胞为 ABCG2 阳性细胞(图 2A~D);流式细胞仪检测亦证明“胶质瘤干细胞球”中大部分细胞为 ABCG2 阳性细胞(图 2E)。

2.3 FTC 抑制 ABCG2 蛋白对 Photofrin 的外排作用 对照组

细胞中无 Photofrin,FTC 干预组细胞内 Photofrin 含量明显高于 Photofrin 组,分别为  $(0.89 \pm 0.13) \mu\text{g}$  和  $(0.32 \pm 0.07) \mu\text{g}$  ( $P < 0.05$ )。

2.4 细胞存活率和凋亡(图 3、4) 超声单独作用即可降低细胞存活率;超声辐照组与超声辐照+FTC 组间细胞存活率无明显差异,说明 10 μmol/L FTC 对细胞存活率无明显影响,且超声也不会激活 FTC 产生细胞毒性作用。与超声辐照组相比,SDT 治疗组和 SDT 治疗+FTC 组中细胞存活率均明显下降,且 SDT 治

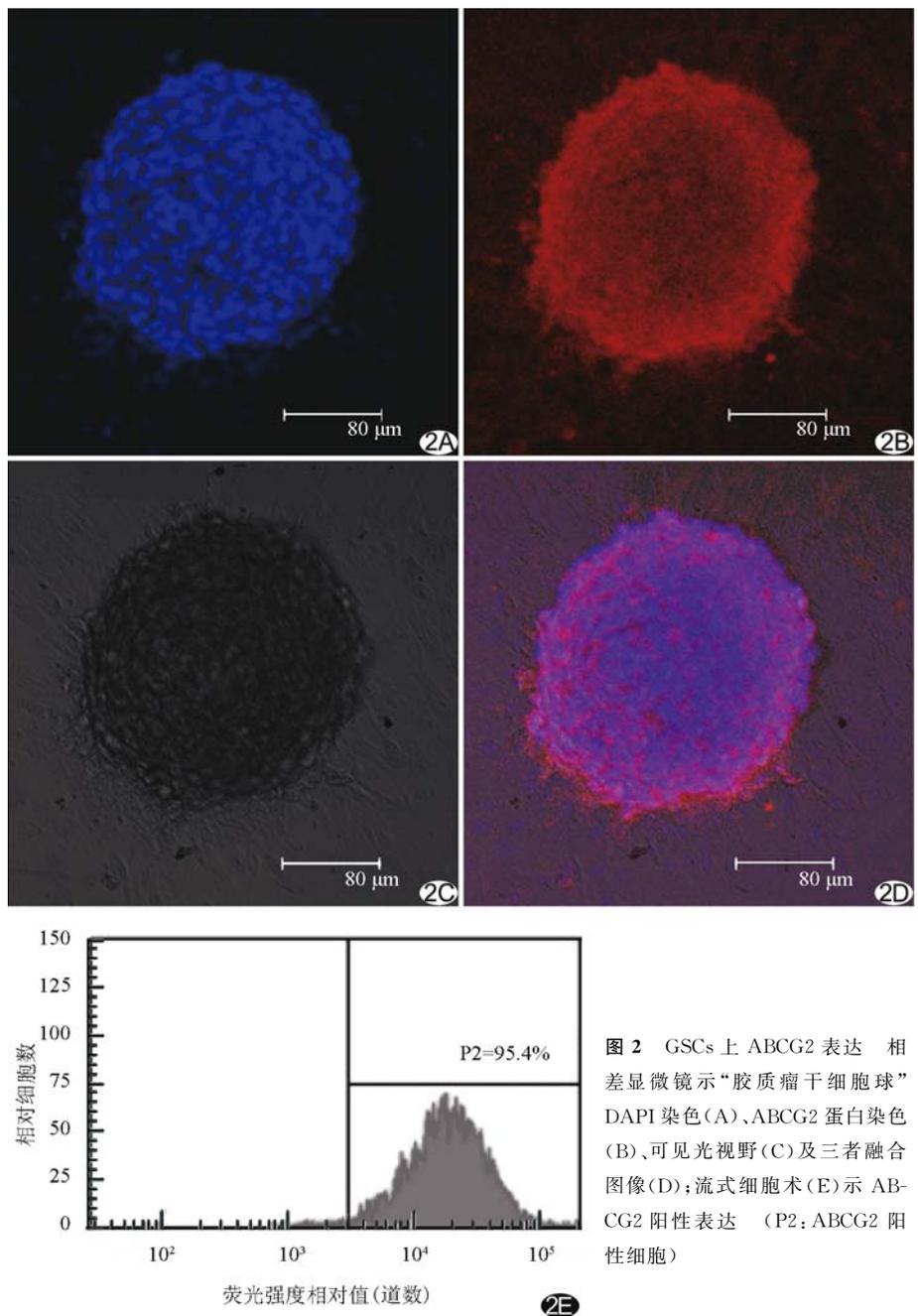


图 2 GSCs 上 ABCG2 表达 相差显微镜示“胶质瘤干细胞球”DAPI 染色(A)、ABCG2 蛋白染色(B)、可见光视野(C)及三者融合图像(D);流式细胞术(E)示 ABCG2 阳性表达 (P2: ABCG2 阳性细胞)

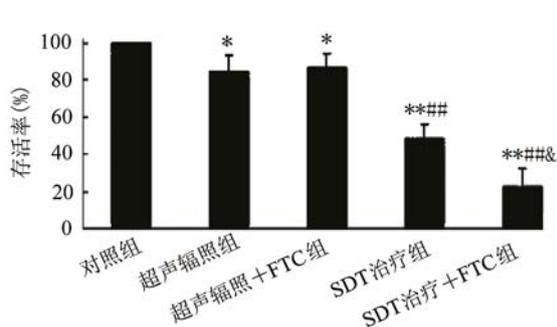


图 3 细胞存活率 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; ##: 与超声辐照组比较,  $P < 0.01$ ; &: 与 SDT 治疗组比较,  $P < 0.05$

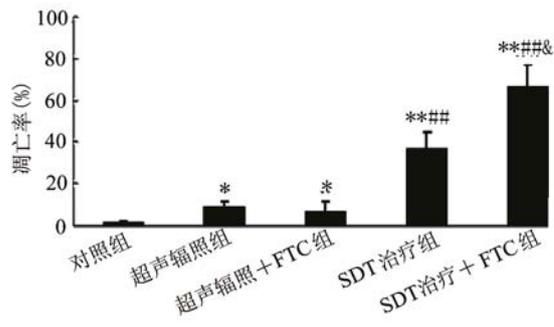


图 4 细胞凋亡分析结果 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; ##: 与超声辐照组比较,  $P < 0.01$ ; &: 与 SDT 治疗组比较,  $P < 0.05$

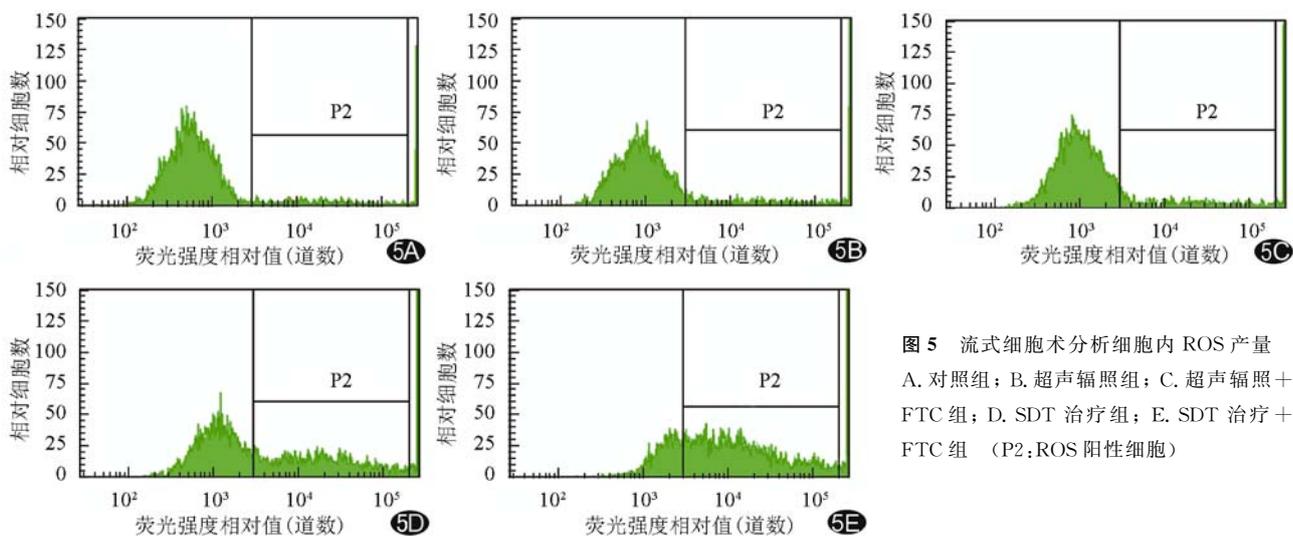


图 5 流式细胞术分析细胞内 ROS 产量  
A. 对照组; B. 超声辐照组; C. 超声辐照 + FTC 组; D. SDT 治疗组; E. SDT 治疗 + FTC 组 (P2: ROS 阳性细胞)

疗+FTC 组内的细胞存活率 $[(22.47 \pm 9.64)\%]$ 明显低于 SDT 治疗组 $[(48.35 \pm 7.83)\%, P < 0.05]$ 。超声单独作用和超声辐照+FTC 均可诱导细胞凋亡,两者间无明显差异。SDT 和 SDT+FTC 均有较强的致细胞凋亡作用,SDT 治疗组细胞凋亡率为 $(66.71 \pm 10.31)\%$ ,SDT 治疗+FTC 组的细胞凋亡率为 $(36.56 \pm 8.07)\% (P < 0.05)$ 。表明 SDT 治疗对 GSCs 具有明确的杀伤效应,且 FTC 可明显提高这种治疗作用。

2.5 细胞内 ROS 相对产量分析(图 5、6) 与对照组相比,超声辐照组和超声辐照+FTC 组中细胞内 ROS 产量无明显变化,而 SDT 治疗组和 SDT 治疗+FTC 组中细胞内 ROS 产量均明显增加,且 SDT 治疗+FTC 组细胞内 ROS 产量明显高于 SDT 治疗组细胞内的 ROS 产量,分别增加了 6.63 倍和 2.93 倍( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

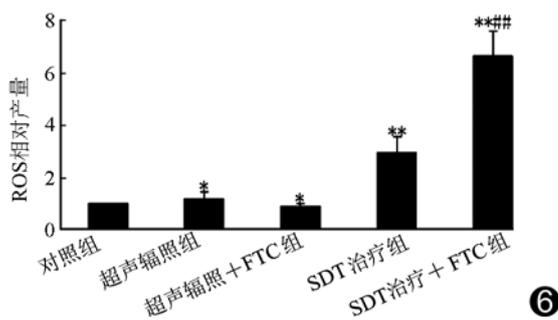


图 6 ROS 相对产量 与对照组比较, \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ ; ##: 与 SDT 治疗组比较,  $P < 0.01$

GSCs 是恶性胶质瘤发生、发展和术后复发的“种子细胞”。因此,探讨恶性胶质瘤治疗方法时,应将 GSCs 作为治疗靶目标,并以此作为疗效评价的标准<sup>[6]</sup>。本实验培养的 GSCs 在体外可长期分裂增殖,表达 GSCs 的特异性抗原标记 CD133,符合 GSCs 的基本生物学特性和免疫学特征,为继续深入研究 SDT

对 GSCs 的治疗作用奠定了实验基础。

SDT 通过超声激活聚集于细胞内的声敏剂产生 ROS, 达到杀伤恶性肿瘤细胞的目的; 与传统的辅助治疗相比, 其靶向性强, 安全性高, 可多机制协同抗肿瘤。Li 等<sup>[2-3]</sup>发现超声激活血卟啉单甲醚可产生 ROS, 进而影响细胞周期而发挥抗肿瘤作用; Nonaka 等<sup>[4]</sup>证明声敏剂经静脉注射后可在大鼠脑胶质瘤内选择性聚集, 以 1 MHz、25 W/cm<sup>2</sup> 强度超声在硬脑膜外辐射 5 min, 可以明显缩小胶质瘤体积, 且不损伤瘤周正常脑组织。上述研究均以胶质瘤细胞为治疗靶细胞, 未检测 SDT 对 GSCs 的杀伤作用。笔者在既往研究<sup>[5]</sup>中观察 SDT 对 GSCs 的治疗效果, 发现 GSCs 对 SDT 治疗的敏感性明显低于胶质瘤细胞, 而 ABCG2 蛋白可能是影响 SDT 治疗的核心机制。

研究<sup>[7]</sup>表明, 超声参数相同时, 细胞内的声敏剂含量越高, SDT 治疗效果越好。既往研究<sup>[5]</sup>提示, 在相同浓度声敏剂孵育下, GSCs 内的声敏剂含量明显低于胶质瘤细胞, 因而导致 GSCs 对 SDT 的敏感性降低。ABCG2 是近年来新发现的一类三磷酸腺苷结合盒转运蛋白, 定位于细胞膜, 具有三磷酸腺苷依赖性药物外排作用。最近的研究<sup>[8]</sup>表明 ABCG2 在各种肿瘤干细胞表面均高度表达, 很可能与其保护干细胞免遭外源性及内源性毒素的侵害有关; 另有研究<sup>[9]</sup>表明, 在低氧情况下, 肿瘤干细胞上的转运蛋白仅 ABCG2 的表达特异性升高, 通过泵出内源性卟啉维持干细胞的稳定, 抵抗缺氧环境引起的损害; 当周围环境中存在较高浓度的卟啉类化合物时, 细胞主要通过 ABCG2 外排进入细胞内的外源性卟啉类化合物, 从而保护细胞免受氧化损伤的影响<sup>[10]</sup>; 因而推测 GSCs 内声敏剂含量较低可能与 GSCs 细胞膜上 ABCG2 蛋白有关。本研究证实 ABCG2 蛋白在 GSCs 表面过表达, 而 ABCG2 蛋白的特异性抑制剂 FTC 可抑制 ABCG2 蛋白对 Photofrin 的外排作用, 且与超声共同作用时不会协同产生细胞毒性作用; 另外, FTC 通过增加 GSCs 内 Photofrin 的含量而提高超声辐射后 GSCs 内 ROS 的

产量, 增强 SDT 的抗肿瘤效应。

总之, ABCG2 对卟啉类化合物的外排作用是影响 SDT 对 GSCs 治疗效果的核心机制, 抑制 ABCG2 的功能将提高 SDT 的抗肿瘤效果。

#### [参考文献]

- [1] Tsuru H, Shibaguchi H, Kuroki M, et al. Tumor growth inhibition by sonodynamic therapy using a novel sonosensitizer. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53(3):464-472.
- [2] Li JH, Song DY, Xu YG, et al. In vitro study of haematoporphyrin monomethyl ether-mediated sonodynamic effects on C6 glioma cells. *Neurol Sci*, 2008, 29(4):229-235.
- [3] Dai S, Hu S, Wu C. Apoptotic effect of sonodynamic therapy mediated by hematoporphyrin monomethyl ether on C6 glioma cells in vitro. *Acta Neurochir (Wien)*, 2009, 151(12):1655-1661.
- [4] Nonaka M, Yamamoto M, Yoshino S, et al. Sonodynamic therapy consisting of focused ultrasound and a photosensitizer causes a selective antitumor effect in a rat intracranial glioma model. *Anticancer Res*, 2009, 29(3):943-950.
- [5] Xu ZY, Li XQ, Chen S, et al. Glioma stem-like cells are less susceptible than glioma cells to sonodynamic therapy with photofrin. *Technol Cancer Res Treat*, 2012, 11(6):615-623.
- [6] Hu Y, Fu L. Targeting cancer stem cells: A new therapy to cure cancer patients. *Am J Cancer Res*, 2012, 2(3):340-356.
- [7] Zhu B, Liu Q, Wang Y, et al. Comparison of accumulation, sub-cellular location, and sonodynamic cytotoxicity between hematoporphyrin and protoporphyrin IX in L1210 cells. *Chemotherapy*, 2010, 56(5):403-410.
- [8] Ding XW, Wu JH, Jiang CP. ABCG2: A potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. *Life Sci*, 2010, 86(17-18):631-637.
- [9] Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, et al. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem*, 2004, 279(23):24218-24225.
- [10] Robey RW, Steadman K, Polgar O, et al. ABCG2-mediated transport of photosensitizers: Potential impact on photodynamic therapy. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(2):187-194.

## ❖ 实验研究

## Correlation between left ventricular systolic function and cardiomyocyte apoptosis in rabbit models of hyperthyroid cardiomyopathy

WANG Wei-dong, LI Guang-sen\*, WANG Ya-juan, BI Wen-jun, ZHANG Jie

(Department of Ultrasonic Diagnosis, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

**[Abstract]** **Objective** To assess the relationship between left ventricular systolic function and cardiomyocyte apoptosis of different geometric patterns with hyperthyroid cardiomyopathy in rabbit models evaluated with tissue tracking (TT). **Methods** Thirty New Zealand purebred rabbits were stochastically divided into experiment group ( $n=20$ ) and control group ( $n=10$ ). Hyperthyroidism models were established by peritoneal injection of levothyroxine in experimental group, while the same dose of saline was given to rabbits in control group for 4 weeks. Conventional echocardiographic parameters were obtained at the ending of the 4th week in both groups. According to the changes of ultrasound parameters, the rabbits of experimental group were divided into concentric hypertrophy (CH) subgroup and eccentric hypertrophy (EH) subgroup. The systolic mitralannular displacement (Ds) was measured using TT. Apoptotic cardiomyocytes and the expression of bcl-2 and bax were also detected. **Results** There was no apoptotic cardiomyocyte in control group. However, the index of apoptotic cardiomyocytes increased significantly in CH subgroup and EH subgroup (both  $P<0.01$ ). The index of apoptotic cardiomyocytes in EH subgroup was higher than that in CH subgroup ( $P<0.01$ ). Compared with the control group, the expression of bcl-2 protein was significantly lower in CH subgroup and EH subgroup (both  $P<0.01$ ), and the expression of bcl-2 protein in EH subgroup was lower than that in CH subgroup ( $P<0.01$ ). The expression of bax protein was considerably higher in CH subgroup and EH subgroup (both  $P<0.01$ ), and the expression of bax protein in EH subgroup was higher than that in CH subgroup ( $P<0.01$ ). Bcl-2/bax was significantly lower in CH subgroup and EH subgroup than that in the control group (both  $P<0.01$ ). Compared with the control group, the average Ds determined with TT was slightly lower in CH subgroup and EH subgroup (both  $P<0.01$ ), which was lower in EH subgroup than that in CH subgroup ( $P<0.01$ ). Ds of both subgroups negatively correlated with the index of apoptotic cardiomyocytes and bax ( $r=-0.53, -0.74$ , both  $P<0.05$ ), while positively correlated with bcl-2 ( $r=0.82, P<0.01$ ). **Conclusion** Cardiomyocyte apoptosis may be an important mechanism of the decreasing left ventricular systolic function of hyperthyroid cardiomyopathy in rabbit models.

**[Key words]** Apoptosis; Tissue tracking; Hyperthyroidism; Cardiomyopathies; Rabbits

## 兔甲状腺功能亢进性心肌病模型心肌细胞凋亡与左心室收缩功能的相关性

王伟东, 礼广森\*, 王亚娟, 毕文君, 张 洁

(大连医科大学附属第二医院超声科, 辽宁 大连 116027)

**[摘要]** **目的** 评价兔甲状腺功能亢进(简称甲亢)性心肌病模型左心室收缩功能的变化与心肌细胞凋亡的相关性。

**[基金项目]** 辽宁省科技厅科技计划项目(2009225009-7)。

**[作者简介]** 王伟东(1987—),男,吉林长春人,在读硕士。研究方向:超声诊断。E-mail: wangweidong108@163.com

**[通讯作者]** 礼广森,大连医科大学附属第二医院超声科,116027。E-mail: liguangsen09@163.cn

**[收稿日期]** 2012-11-11 **[修回日期]** 2013-02-11

**方法** 将 30 只纯种新西兰大白兔分为两组, 实验组 20 只, 对照组 10 只。对实验组兔每日腹腔注射左旋甲状腺素  $45 \mu\text{g}/\text{kg}$  体质量, 共 4 周, 建立甲亢动物模型; 对照组兔腹腔注射同等剂量生理盐水。于第 4 周末行常规超声心动图, 依据所测参数将实验组分为向心性肥厚亚组(CH 亚组)和离心性肥厚亚组(EH 亚组); 以组织追踪法(TT)测量兔心脏二尖瓣瓣环的收缩期位移峰值(Ds), 检测各组兔凋亡心肌细胞及 bcl-2、bax 的表达。**结果** 对照组未见凋亡心肌细胞; CH 亚组、EH 亚组细胞凋亡指数明显升高( $P < 0.01$ ), 其中 EH 亚组凋亡指数明显高于 CH 亚组( $P < 0.01$ )。CH 亚组、EH 亚组 bcl-2 表达明显低于对照组( $P < 0.01$ ), EH 亚组 bcl-2 表达明显低于 CH 亚组( $P < 0.01$ )。CH 亚组、EH 亚组 bax 表达明显高于对照组( $P < 0.01$ ), EH 亚组 bax 表达明显高于 CH 亚组( $P < 0.01$ )。CH 亚组、EH 亚组 bcl-2/bax 明显低于对照组( $P < 0.01$ )。CH 亚组的 Ds 低于对照组, EH 亚组的 Ds 明显低于对照组及 CH 亚组( $P < 0.01$ )。CH 亚组、EH 亚组 Ds 与心肌细胞凋亡指数呈负相关( $r = -0.53, P < 0.05$ ), 与 bax 呈显著负相关( $r = -0.74, P < 0.01$ ), 与 bcl-2 呈显著正相关( $r = 0.82, P < 0.01$ )。**结论** 心肌细胞凋亡可能为兔甲亢性心脏病左心室收缩功能减低的重要机制之一。

**[关键词]** 细胞凋亡; 组织追踪法; 甲状腺功能亢进症; 心脏病; 兔

**[中图分类号]** R-332; R540.45 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2013)05-0678-05

甲状腺功能亢进(简称甲亢)是一种可以导致多系统损伤的代谢性疾病; 甲状腺功能亢进性心脏病(简称甲亢性心脏病)是甲亢的严重并发症之一, 甲状腺激素可诱导心室重构。本实验应用组织追踪法(tissue tracking, TT)评价兔甲亢性心脏病模型左心室收缩功能的变化, 以电镜及免疫组化方法观察不同左心室构型的心肌细胞凋亡及相关基因(bcl-2、bax)的表达并分析其与心功能的相关性, 探讨心肌细胞凋亡在甲亢性心脏病中的作用。

## 1 材料与方法

1.1 动物分组及给药 纯种新西兰大白兔(大连医科大学动物实验中心提供)30 只, 雌雄不限, 分为实验组 20 只, 对照组 10 只, 体质量  $1.8 \sim 2.2 \text{ kg}$ 。实验组每日腹腔注射左旋甲状腺素(生理盐水溶解为  $5 \text{ ml}$  混悬液)  $45 \mu\text{g}/\text{kg}$  体质量至实验结束, 对照组每日腹腔注射  $5 \text{ ml}/\text{只}$  生理盐水, 共 4 周。于第 4 周末, 参照 Ganau 等<sup>[1]</sup>的标准, 将实验组动物分为向心性肥厚(concentric hypertrophy, CH)亚组[左心室质量指数(left ventricular mass index, LVMI)增加, 相对室壁厚度(relative wall thickness, RWT)  $\geq 0.42$ ]和离心性肥厚(eccentric hypertrophy, EH)亚组(LVMI 增加, RWT  $< 0.42$ )。

1.2 仪器与方法 采用 GE Vivid7 彩色超声诊断仪, 探头频率  $4 \sim 8 \text{ MHz}$ , 配有 QTVI 显像技术。在二维超声引导下, 获取胸骨旁左心室长轴切面 M 型超声图像, 测量左心室舒张末期内径(left ventricular end diastolic dimension, LVDd)、室间隔厚度(inter-ventricular septal thickness at end diastole, IVSTd)、左心室后壁厚度(posterior wall thickness at end diastole, PWTd), 按公式计算左心室质量(left ventricular mass, LVM):  $LVM = 1.04 \times [(LVDd + PWTd +$

$IVSTd)^3 - LVDd^3]$ <sup>[2]</sup>;  $LVMI = LVM/BW$ ;  $RWT = (PWTd + IVSTd)/LVDd$ , 其中 BW 为体质量。

二维超声组织速度成像条件下, 连接心电图并进行心率校正, 于四腔心切面下采集 5 个完整稳定的心动周期的动态图像, 存储, 脱机后在 GE EchoPac 工作站对图像进行测量分析。将速度取样点分别置于二尖瓣环后间隔与左侧壁, 记录二尖瓣瓣环长轴方向两个位点连续 3~5 个完整稳定的心动周期, 测量收缩期位移峰值(systolic mitral annular displacement, Ds)取均值, 计算两个位点平均 Ds 值。

1.3 透射电镜下调亡心肌细胞形态特征 超声测量后, 采用空气栓塞法处死所有实验动物, 开胸取出心脏, 剖开左心室并剪取部分游离壁心肌组织, 生理盐水冲洗, 固定, 脱水、常规石蜡包埋, 每个标本取 3 个不同部位的切片, 常规醋酸双氧铀染色, 于透射电镜下观察。

1.4 凋亡细胞原位末端转移酶标记技术检测 取石蜡标本切片(厚度  $4 \mu\text{m}$ ), 按照原位细胞凋亡检测试剂盒(Roche 公司)说明书, 采用凋亡细胞原位末端转移酶标记技术对凋亡细胞进行标记。镜下调亡心肌细胞核呈深浅不一的紫黑色颗粒, 正常心肌细胞核呈浅红色。用计算机图像分析仪计算细胞凋亡指数(apoptotic indexes, AI), 400 倍视野下, 每张切片随机选择 5 个无重叠阳性视野, 每个视野计数 200 个细胞, 计算  $AI = \text{凋亡阳性细胞数}/\text{细胞总数} \times 100\%$ 。

1.5 bcl-2、bax 表达的免疫组化染色检测 取石蜡标本连续切片, 脱蜡水化, 按 bcl-2、bax 免疫组化试剂盒(Santa Cruz 公司)说明书操作, 用抗 bcl-2、抗 bax 的抗体行免疫组化染色。采用 MPIAS2500 多媒体彩色病理图文分析系统检测, 400 倍光镜下, 每张切片随机选择 5 个视野, 以镜下细胞呈棕黄色为阳性细胞, 分别

测定 bcl-2、bax 表达阳性细胞染色面积,然后计算平均染色面积百分数,取平均染色面积百分数作为切片测定值,以其作为 bcl-2、bax 表达水平的半定量参数标准。

1.6 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件,先行正态性检验,正态分布计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用单因素方差分析进行统计学处理,组间比较采用 LSD 法,两参数之间的相关性采用直线相关分析法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

实验组兔于第 2、3 周各死亡 1 只。最终实验组 18 只兔进入结果分析,其中 CH 亚组 7 只,体质量  $(2.04 \pm 0.14)$  kg, EH 亚组 11 只,体质量  $(2.00 \pm 0.16)$  kg。

2.1 常规超声心动图检查参数 CH 亚组 RWT 和 LVMI 与对照组比较明显增加 ( $P$  均  $< 0.01$ ), EH 亚组 LVMI 与对照组及 CH 亚组比较均明显增加 ( $P$  均  $< 0.05$ ),但 EH 亚组 RWT 与对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见表 1。

表 1 各组兔常规超声心动图测量参数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	RWT	LVMI(mg/g)
CH 亚组 ( $n=7$ )	$0.47 \pm 0.06^*$	$1.99 \pm 0.47^*$
EH 亚组 ( $n=11$ )	$0.39 \pm 0.02^\Delta$	$2.40 \pm 0.42^* \Delta$
对照组 ( $n=10$ )	$0.36 \pm 0.04$	$1.21 \pm 0.14$

注: \* :与对照组比较,  $P < 0.01$ ;  $\Delta$ :与 CH 亚组比较,  $P < 0.05$

2.2 心肌细胞病理学改变 透射电镜下,对照组心肌细胞排列整齐,肌丝完整,未见溶解及断裂。CH 亚组、EH 亚组可见心肌细胞核肥大,核仁明显,可见核内染色质积聚(凋亡小体),线粒体显著增多,部分水肿、空泡化及退化,内质网扩张,大量肌丝溶解、断裂,部分肌原纤维束变细、退化(图 1)。

2.3 心肌细胞 AI 检测 对照组未见心肌细胞凋亡。CH 亚组和 EH 亚组心肌细胞的 AI 分别为  $(2.61 \pm 0.56)\%$  和  $(13.90 \pm 2.15)\%$ ,与对照组相比明显升高,且 EH 亚组 AI 明显高于 CH 亚组 ( $P$  均  $< 0.01$ )。

2.4 心肌组织 bax、bcl-2 表达 对照组各参数无变

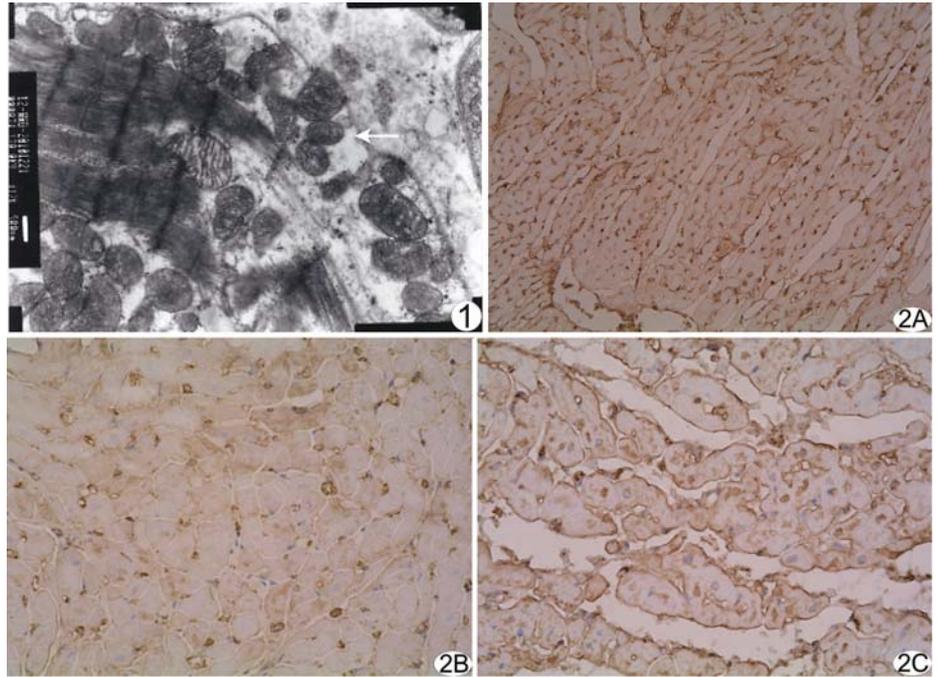


图 1 透射电镜观察兔心肌细胞凋亡 线粒体(箭)增多,排列不规则( $\times 5000$ ) 图 2 兔心肌组织 bcl-2 蛋白表达(免疫组化染色,  $\times 400$ ) A. 对照组; B. CH 亚组; C. EH 亚组

化。CH 亚组、EH 亚组 bax 蛋白表达明显高于对照组,且 EH 亚组 bax 表达明显高于 CH 亚组 ( $P$  均  $< 0.01$ )。与对照组相比,CH 亚组、EH 亚组心肌细胞 bcl-2 蛋白表达明显减低,且 EH 亚组 bcl-2 表达明显低于 CH 亚组,CH 亚组和 EH 亚组 bcl-2/bax 的比值均显著降低 ( $P$  均  $< 0.01$ );EH 亚组 bcl-2/bax 的比值与 CH 亚组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 表 2, 图 2)。

表 2 各组兔 bcl-2、bax 蛋白表达的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	bcl-2(%)	bax(%)	bcl-2/bax
CH 亚组 ( $n=7$ )	$13.44 \pm 1.95^*$	$2.52 \pm 0.78^*$	$5.92 \pm 2.41^*$
EH 亚组 ( $n=11$ )	$7.62 \pm 2.65^* \Delta$	$6.01 \pm 1.24^* \Delta$	$1.38 \pm 0.70^*$
对照组 ( $n=10$ )	$17.40 \pm 3.10$	$0.59 \pm 0.07$	$30.46 \pm 8.09$

注: \* :与对照组比较,  $P < 0.01$ ;  $\Delta$ :与 CH 亚组比较,  $P < 0.01$

2.5 TT 结果 对照组、CH 亚组及 EH 亚组 Ds 值分别为  $(4.24 \pm 1.06)$  mm、 $(3.97 \pm 0.96)$  mm、 $(2.49 \pm 1.07)$  mm。CH 亚组的 Ds 低于对照组,且 EH 亚组的 Ds 与对照组及 CH 亚组比较均明显减低 ( $P$  均  $< 0.01$ )。

2.6 心脏收缩功能指数与凋亡相关性分析 CH 亚组、EH 亚组 Ds 与心肌细胞 AI 呈负相关 ( $r = -0.53$ ,  $P < 0.05$ ),与 bax 呈显著负相关 ( $r = -0.74$ ,  $P <$

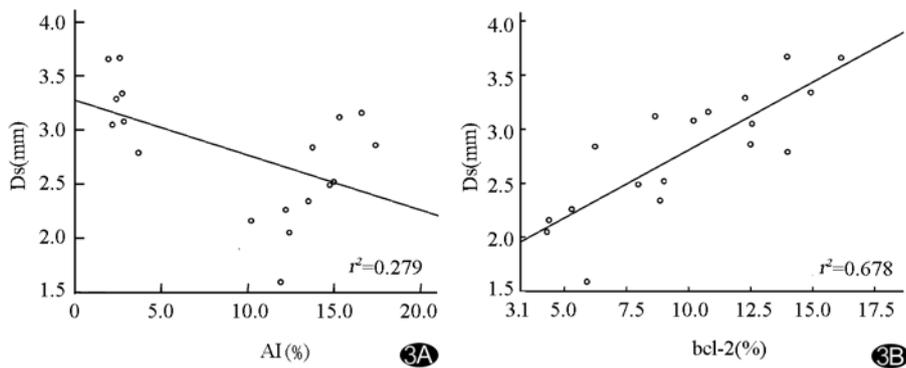


图3 Ds与AI、bcl-2相关性分析 A. Ds与AI相关性散点图; B. Ds与bcl-2相关性散点图

0.01),与bcl-2呈显著正相关( $r=0.82$ ,  $P<0.01$ ,图3)。

### 3 讨论

TT是一种可以精确反映组织各时相运动速度以及位移变化的超声技术,可对心肌节段进行取样,在长轴方向同步获取心肌各节段的速度及位移曲线<sup>[3]</sup>。Ds评价左心室收缩功能不受图像质量的影响,有较好的应用性<sup>[4]</sup>。有研究<sup>[5-6]</sup>报道TT测量二尖瓣环收缩期位移能够反映心肌纤维在长轴方向上的缩短,进而评价左心室收缩功能,与左心室射血分数有良好的相关性。本实验运用TT观察兔甲亢性心肌病过程中左心室收缩功能的变化,发现TT测得的不同左心室构型Ds与对照组相比有不同程度减低,对其机制分析如下。

从宏观上看,甲亢过程中过量的甲状腺激素作用于心血管系统,导致其离子通道特征、心肌收缩性和对激素的反应性等发生变化<sup>[7]</sup>。甲状腺激素对心血管系统活动有明显促进作用,可使心脏负荷明显增加,心率增快及血容量增加等,导致高代谢症状和体征;超声可表现为心腔扩大,室间隔及左心室游离壁增厚、运动增强,瓣膜关闭不全等,使心肌细胞相对供氧不足,左心室收缩功能下降,最终导致心力衰竭<sup>[8]</sup>。另外,甲亢时体内肾素-血管紧张素-醛固酮系统活性增加,使心肌细胞及平滑肌细胞增生,导致心肌肥大<sup>[9]</sup>。以上原因促进心室重构及心肌纤维化的发生,导致心脏整体功能减低,尤其是收缩功能减低。

从微观上看,生物体的凋亡是程序性的细胞死亡,是由基因控制的有序化主动死亡过程,在生物体内广泛存在;其主要特征为细胞皱缩、染色质固缩、凋亡小体形成等<sup>[10]</sup>。本研究中电镜下CH亚组、EH亚组均可见心肌纤维肥大,肌丝溶解,部分心肌细胞核肥大,核仁明显,细胞核内染色质沉积,出现凋亡小体,CH

亚组、EH亚组AI明显高于对照组,免疫组化结果显示bcl-2明显减低,而bax明显增加,均提示心肌细胞发生凋亡,且不同左心室构型之间凋亡程度有差异。心肌细胞凋亡由多种凋亡因子参与,其中备受关注的是bcl-2、bax基因对凋亡过程的调控。bcl-2广泛分布于以细胞凋亡为特点的组织中,具有促进细胞生存、抗细胞凋亡的作用。bax蛋白是bcl-

2蛋白的同源蛋白,但具有促进细胞凋亡的作用。因此,bcl-2/bax在很大程度上影响着细胞凋亡的发生<sup>[11]</sup>。甲亢时,机体处于高代谢状态,心血管系统表现为心率增快、心搏力增加、心肌肥厚等,使心脏负荷加重,心肌细胞相对缺血缺氧;同时心肌细胞代偿性肥厚,细胞外基质胶原沉积和纤维化,心室重构,促进心肌细胞凋亡的发生。由于大量心肌细胞凋亡,影响到心肌细胞的正常代谢,最终使左心室功能发生变化。因此心肌细胞凋亡可能为导致甲亢性心肌病左心室收缩功能减低的发病机制之一。

本实验中CH亚组、EH亚组心肌细胞AI与Ds呈负相关,bax与Ds呈显著负相关,bcl-2与Ds呈显著正相关,提示甲亢性心肌病模型心肌细胞凋亡与左心室功能变化密切相关,推测bcl-2、bax基因共同参与并调控甲亢性心肌病动物左心室收缩功能减低的

变化过程。心肌细胞凋亡生理及病理过程复杂,除bcl-2、bax外,很多因素均可引起。本实验属小样本动物实验,具有一定局限性;对于甲亢性心肌病心肌细胞凋亡的作用机制还有待深入研究。

### [参考文献]

- [1] Ganau A, Devereux RB, Roman MJ, et al. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *Am Coll Cardiol*, 1992, 19(7):1550-1558.
- [2] Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, et al. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation*, 1994, 89(1):345-354.
- [3] 朱慧,张平洋,方玲玲,等.腺苷负荷超声下定量组织速度成像和组织追踪技术检测老年心肌梗死患者存活心肌的研究. *中华医学超声杂志(电子版)*, 2011, 8(2):282-287.
- [4] Yuda S, Inaba Y, Fujii S, et al. Assessment of left ventricular

ejection fraction using long-axis systolic function is independent of image quality: A study of tissue Doppler imaging and M-mode echocardiography. *Echocardiography*, 2006, 23(10):846-852.

[5] 毕小军, 邓又斌, 杨好意, 等. 应用组织追踪法评价犬左室收缩功能的研究. *中国医学影像技术*, 2004, 20(3):371-374.

[6] 礼广森, 任卫东, 张卓, 等. 组织追踪法评价阿霉素致兔心脏毒性左心室收缩功能影响的研究. *中国医学影像技术*, 2007, 23(3):346-348.

[7] Dhal P, Danzi S, Klein I. Thyrotoxic cardiac disease. *Curr Heart Fail Rep*, 2008, 5(3):170-176.

[8] Chu CH, Lee JK, Keng HM, et al. Hyperthyroidism is associated with higher plasma endothelin-1 concentrations. *Exp Biol Med*

(Maywood), 2006, 231(6):1040-1043.

[9] Diniz GP, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves ML. Angiotensin type1 (AT1) and type2 (AT2) receptors mediate the increase in TGF-beta1 in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. *Pflugers Arch*, 2007, 454(1):75-81.

[10] Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*, 1996, 74(1):86-107.

[11] Yao M, Nguyen TV, Pike CJ, et al. Beta-amyloid-induced neuronal apoptosis involves c-Jun N-terminal kinase-dependent downregulation of Bcl-w. *J Neurosci*, 2005, 25(5):1149-1158.

## Echocardiographic diagnosis of papillary muscle myxoma in left ventricle: Case report

### 超声心动图诊断左心室乳头肌黏液瘤 1 例

郑光美<sup>1</sup>, 朱方成<sup>2</sup>, 白 姣<sup>1</sup>, 杨 波<sup>1</sup>

(1. 湖北医药学院附属人民医院超声科, 湖北 十堰 442000;

2. 湖北医药学院法医学教研室, 湖北 十堰 442000)

[Key words] Myxoma; Echocardiography [关键词] 黏液瘤; 超声心动描记术

[中图分类号] R540.45; R541 [文献标识码] B [文章编号] 1003-3289(2013)05-0682-01

患者女, 30 岁, 因“活动后心慌、胸闷 8 余年, 加重 1 周”入院; 3 年前曾因“脑栓塞”在当地医院接受治疗。体格检查: 心界无扩大, 心率 83 次/分, 窦性心律, 心尖部可闻及 III/6 级舒张期隆隆样杂音; 右侧肢体肌力差, 右手不能持物, 右下肢难以负重; 余无特殊。入院后超声心动图: 二尖瓣腱索近后乳头肌处见实性斑片状回声附着, 大小约 4.0 cm × 3.7 cm × 2.2 cm, 呈不规则分叶状, 基底部较细(图 1), 随心动周期摆动, 并于收缩期和舒张期均可部分堵塞二尖瓣口, 二尖瓣口血流束变细, 左心稍大。超声提示: 左心室内实性回声团(附着于二尖瓣腱索近后乳头肌处), 黏液瘤可能性大。

术中所见: 左心扩大, 心包腔内少量淡黄色积液; 左心室可见胶冻状葡萄形肿块, 大小约 4 cm × 5 cm × 5 cm, 表面不光滑, 蒂位于二尖瓣后瓣乳头肌顶端, 部分后瓣乳头肌腱索被瘤体包绕, 瘤体堵塞二尖瓣瓣口, 二尖瓣前瓣见冲击斑。遂完整切除瘤体, 反复冲洗心腔, 行二尖瓣成形术; 之后注水试验效果不满

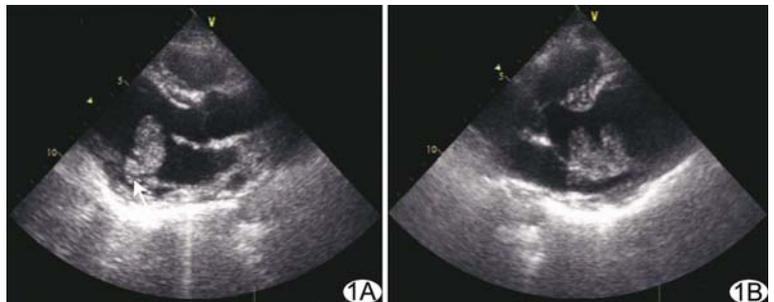


图 1 左心室内黏液瘤 A. 胸骨旁左心长轴切面示二尖瓣腱索近后乳头肌处实性斑片状回声(箭); B. 非标准四腔心切面示左心室内分叶状回声

意, 最终行二尖瓣置换术。术后病理诊断: (二尖瓣) 瓣膜组织玻璃样变, 部分黏液变性; (左心室内) 黏液瘤。

讨论 黏液瘤是来源于心内膜下层、具有分化潜能的原始间充质细胞的真性良性肿瘤, 95% 发生于心房, 发生于心室者瘤蒂多附着于室间隔及心室游离壁, 附于腱索及乳头肌者罕见。典型黏液瘤声像特点如下: 轮廓清晰, 内部回声较均匀、疏松, 基底窄, 多有细长瘤蒂, 活动度大。本例超声心动图表现符合以上特点, 但瘤蒂附着于乳头肌顶端处, 且部分瘤体包绕腱索及乳头肌生长, 增加了手术难度。因此, 对于拟诊黏液瘤患者, 尤其是心腔内靠近瓣膜结构的黏液瘤, 术前需多切面细致扫查, 追踪其瘤蒂附着点, 为选择合理术式提供参考依据。

[作者简介] 郑光美(1978—), 女, 湖北十堰人, 硕士, 主治医师。

E-mail: zgm\_4m@163.com

[收稿日期] 2013-01-08 [修回日期] 2013-01-20

## ❖ 实验研究

## Manganese chloride tetrahydrate enhanced MRI for biliary obstruction in rat models

YAO Nan<sup>1</sup>, GAO Meng<sup>1</sup>, ZHANG Jian<sup>1</sup>, JIANG Cui-hua<sup>1</sup>, SUN Sheng-lu<sup>2</sup>,  
LI Yue<sup>1</sup>, HUANG De-jian<sup>2\*</sup>, NI Yi-cheng<sup>3</sup>

(1. Laboratory of Translational Medicine, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 2. Department of Radiology, Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, China; 3. Department of Radiology, University of Leuven, Leuven 3000, Belgium)

**[Abstract]** **Objective** To assess the effectiveness of manganese chloride tetrahydrate as an oral manganese-based contrast agent for biliary obstruction in rat models, and to compare it with Gd-DTPA. **Methods** Thirty-two male Sprague Dawley (SD) rats were divided into 4 groups; Group 1, bile duct ligated+manganese chloride tetrahydrate; group 2, bile duct ligated+Gd-DTPA; group 3, sham+manganese chloride tetrahydrate; group 4, sham+Gd-DTPA. T1WI were obtained before and 12 h, 24 h, 48 h after the administration of manganese chloride tetrahydrate (2 mmol/kg) in group 1 and group 3. Group 2 and group 4 were examined with plain T1W and T1W+contrast enhanced T1W MR scanning, while T1WI was obtained again 24 h after intravenous injection of Gd-DTPA. **Results** In sham group, the signal intensities obtained from the livers returned to plain values 24 h after intragastric administration of manganese chloride tetrahydrate. The liver intensities in model group with manganese chloride tetrahydrate increased at all scanning time, of which the signals reached the highest level after 24 h. In sham and model group, the liver intensities all increased at T1W+contrast enhanced after intravenous injection of Gd-DTPA and normalized after 24 h. **Conclusion** The signal enhancement in the liver by manganese chloride tetrahydrate in rats is stronger than that of Gd-DTPA. MR scanning can be performed 24 h after oral administration of manganese chloride tetrahydrate to diagnose biliary obstruction of rat models.

**[Key words]** Manganese chloride tetrahydrate; Contrast media; Common bile duct ligation; Magnetic resonance imaging

## 四水合二氯化锰增强 MR 观察大鼠胆管梗阻

姚楠<sup>1</sup>, 高萌<sup>1</sup>, 张健<sup>1</sup>, 蒋翠花<sup>1</sup>, 孙胜禄<sup>2</sup>, 李玥<sup>1</sup>, 黄德健<sup>2\*</sup>, 倪以成<sup>3</sup>

(1. 江苏省中医药研究院转化医学实验室, 江苏南京 210028; 2. 江苏省中西医结合医院放射科, 江苏南京 210028; 3. 比利时鲁汶大学医学院放射科, 比利时鲁汶 3000)

**[摘要]** **目的** 观察口服锰 MR 对比剂主要成分四水合二氯化锰对大鼠胆管梗阻的造影效果, 并与钆喷酸葡胺进行比较。 **方法** 将 32 只 SD 大鼠分为 4 组, 分别给予不同处理: 组 1, 造模+四水合二氯化锰灌胃; 组 2, 造模+钆喷酸葡胺注射; 组 3, 假手术+四水合二氯化锰灌胃; 组 4, 假手术+钆喷酸葡胺注射。对组 1、组 3 灌胃之前和之后 12、24、48 h 行 T1W 扫描。组 2、组 4 先行平扫 T1W 及钆喷酸葡胺增强 T1W 扫描, 24 h 后再行 T1W 平扫。 **结果** 假手术组(组 3、组 4)四水合二氯化锰灌胃 24 h 后肝脏信号强度基本恢复到造影前水平, 造模组(组 1、组 2)四水合二氯化锰灌胃后延迟 MRI 中肝脏信号均显著增强, 其中 24 h 信号强度达峰值; 注射钆喷酸葡胺立即增强扫描, 假手术组和造模组肝脏信号均强化, 24 h 后信号均恢复正常。 **结论** 四水合二氯化锰灌胃对大鼠肝脏的增强效果优于静脉注射钆喷酸葡胺; 四水合二氯化锰

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81071828)、江苏省国际科技合作项目(BZ2010042)、江苏省自然科学基金(BK2010594)。

**[作者简介]** 姚楠(1982—), 女, 江苏南京人, 硕士, 助理研究员。研究方向: 药理学研究。E-mail: yaonan\_nj@163.com

**[通讯作者]** 黄德健, 江苏省中西医结合医院放射科, 210028。E-mail: dejianhuang@163.com

**[收稿日期]** 2012-11-20 **[修回日期]** 2013-03-01

灌胃后 24 h 是 MR 诊断大鼠胆管梗阻的最佳时间点。

[关键词] 四水合二氯化锰;对比剂;胆管梗阻;磁共振成像

[中图分类号] R445.1; R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2013)05-0683-05

与钆元素相比,锰元素为毒性较小的人体必需微量元素,可被肝细胞特异性摄取,具有顺磁性,使 T1 缩短,有望成为安全可靠的新型 MR 对比剂<sup>[1]</sup>;有关口服锰对比剂 CMC-001(主要造影成分为四水合二氯化锰)对诊断肝脏系统疾病的有效性已获得了一些临床验证<sup>[2-5]</sup>,Ⅱ、Ⅲ期试验多集中在肝脏肿瘤诊断方面<sup>[6-7]</sup>。口服四水合二氯化锰被肠道吸收后主要通过肝细胞主动分泌,经胆管随胆汁排入肠道<sup>[8]</sup>;发生胆管梗阻时,由于锰的清除受阻,肝脏中的锰排泄延迟,理论上可能造成对比剂在肝脏中滞留,使肝脏 MRI 信号持续升高,因此可能具有诊断胆管梗阻引发的肝功能受损的潜在临床应用价值。本研究观察四水合二氯化锰对于大鼠胆管梗阻模型的肝脏造影效果,并与钆类对比剂钆喷酸葡胺比较。

### 1 材料与与方法

1.1 实验动物 32 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 250~330 g,平均(300±20)g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限责任公司[动物质量合格证号:SCXK(沪)2008-0016]。

1.2 药品与试剂 四水合二氯化锰(分析纯,西陇化工股份有限公司,090201);异氟烷(河北九派制药有限公司,110501);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,20090922);钆喷酸葡胺(广州先灵药业有限公司,052A11);丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、总胆红素(total bilirubin, T-Bil)、直接胆红素(direct bilirubin, D-Bil)试剂盒皆购于上海科华东菱诊断用品有限公司。

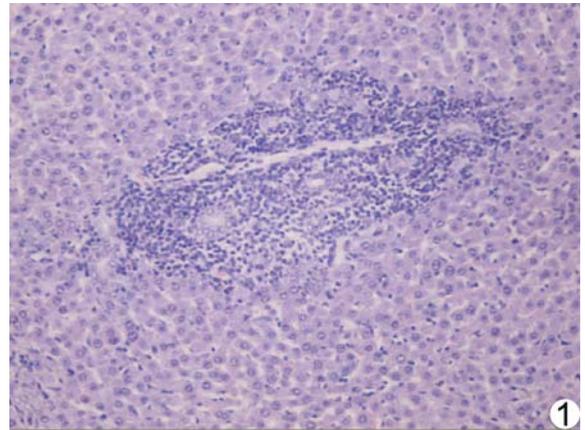


图 1 大鼠总胆管结扎 24 h 后肝脏病理图 汇管区可见小胆管增生和炎细胞浸润(HE, ×200)

1.3 仪器 采用 GE EchoSpeed 1.5T MR 仪,GE AW 4.3 工作站;Matrix VMP 小动物麻醉机(北京吉安得尔科技有限公司);全自动生化分析仪(Hitachi 7060)。

### 1.4 方法

1.4.1 模型制作<sup>[9]</sup>与分组 将 SD 大鼠随机分为造模组(组 1、组 2)和假手术组(组 3、组 4),每组 16 只。所有大鼠术前停饲 12 h。以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,剑突下上腹部备皮、消毒,于正中切口暴露胆总管,在肝右叶下缘与胆总管交点处分离胆总管。造模组以 5-0 丝线单线结扎大鼠胆总管,假手术组只分离胆总管,不结扎。术后关腹,动物回笼饲养。

将造膜和假手术大鼠随机各分为四水合二氯化锰灌胃和钆喷酸葡胺注射 2 组,每组 8 只。造模+四水合二氯化锰灌胃组(组 1)和假手术+四水合二氯化锰灌胃组(组 3)术后 24 h 吸入异氟烷麻醉,仰卧位保定,

表 1 造模组和假手术组大鼠术后 24 h 血清生化检测结果(μmol/L,  $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	ALT	AST	ALP	T-Bil	D-Bil
造模组					
组 1	1423.38±208.18*	2457.50±372.84*	1436.50±313.91*	107.11±19.18*	68.59±14.24*
组 2	1533.25±237.59#	2556.75±302.85#	1486.50±198.60#	112.35±18.91#	67.88±9.18#
假手术组					
组 3	52.00±5.50	120.38±10.20	221.38±30.06	1.91±0.53	1.06±0.24
组 4	56.38±6.52	126.00±17.15	226.88±43.91	2.01±0.39	1.11±0.34

注: \* :与组 3 比较, P<0.01; # :与组 4 比较, P<0.01

用 3 inch 表面线圈行肝脏 MR 扫描;扫描结束后以四水合二氯化锰灌胃,剂量 2 mmol/kg 体质量,体积为 10 ml/kg 体质量,分别于灌胃后 12 h、24 h 和 48 h 行肝脏 MR 扫描。

造模+钆喷酸葡胺注射组(组 2)和假手术+钆喷酸葡胺注射组(组 4)术后 24 h 吸入异氟烷麻醉,仰卧位保定,用 3 inch 表面线圈行肝脏 MR 扫描。扫描结束后经尾静脉注入 0.3 mmol/kg 体质量钆喷酸葡胺,立即行 T1 增强扫描,24 h 后再次行肝脏 MR 平扫。

1.4.2 MR 检查<sup>[10]</sup> 使用 GE Excite Echospeed HD 1.5T 超导 MR 仪,3 inch 表面线圈检查。冠状面定位,常规行轴位 T1W 扫描,层厚 3 mm,间隔 0.2 mm,FOV 10 cm×10 cm,矩阵 224×192, NEX 2。T1W SE 序列:TR/TE 550 ms/24 ms。尾静脉注入 0.3 mmol/kg 体质量钆喷酸葡胺后采用 SE 序列行增强扫描,参数:TR/TE 600 ms/27 ms。

1.4.3 MRI 分析<sup>[10]</sup> 在每只大鼠的 SE-T1WI 上选取肝脏面积较大、图像清晰的 3 个连续层面,在 GE AW 4.3 后处理工作站上,避开较大血管和胆管,在肝实质区域选取 2~3 个直径为 10 mm 的 ROI,计算该层的肝脏信号强度(signal intensity, SI),取连续 3 层 SI 的平均值,作为肝脏的 SI。计算肝脏 SNR:SNR=SI<sub>肝脏</sub>/N<sub>背景噪声</sub>;肝脏信号增加百分率(%)=(SNR<sub>增强后</sub>-SNR<sub>增强前</sub>)/SNR<sub>增强前</sub>×100%。

1.4.4 血清生化检测 造模后 24 h 经眼眶取血,分离血清,以全自动生化分析仪测定血清 ALT、AST、ALP、T-Bil、D-Bil。

1.4.5 病理检查 最后一次 MR 扫描结束后,处死大鼠,取出

肝脏,置于 10% 甲醛溶液中固定,石蜡包埋,制成厚约 5 μm 切片,行 HE 染色,于光学显微镜下观察。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件包,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

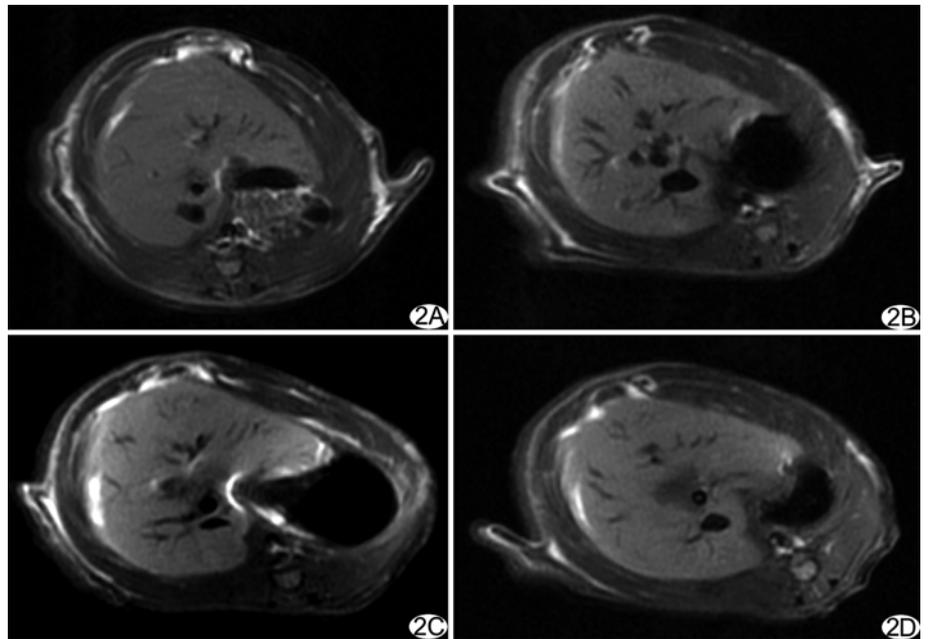


图 2 造模组大鼠四水合二氯化锰灌胃前、后肝脏 MR T1WI A. 肝脏增强前平扫; B. 四水合二氯化锰灌胃后 12 h, 肝脏信号增高; C. 四水合二氯化锰灌胃后 24 h, 肝脏信号进一步增高; D. 四水合二氯化锰灌胃后 48 h, 肝脏信号开始降低

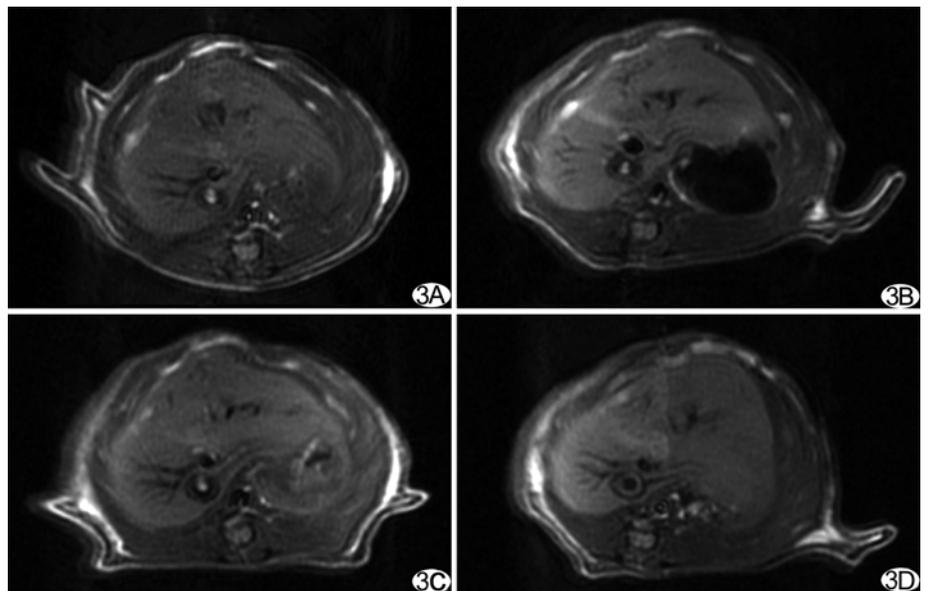


图 3 假手术组大鼠四水合二氯化锰灌胃前、后肝脏 MR T1WI A. 肝脏增强前平扫; B. 四水合二氯化锰灌胃后 12 h, 肝脏信号略有增高; C. 四水合二氯化锰灌胃后 24 h, 肝脏信号开始回落; D. 四水合二氯化锰灌胃后 48 h, 肝脏信号基本恢复到增强前水平

## 2 结果

### 2.1 造模结果

2.1.1 肝功能指标 造模组血清 ALT、AST、ALP、T-Bil、D-Bil 均明显升高,表明总胆管结扎后造成了急性胆汁淤积性肝损伤;假手术组相关血清指标均无异常(表 1)。

2.1.2 病理学检查 造模组大鼠肝细胞浊肿变性,肝小叶边缘点状坏死,汇管区间质水肿,小胆管和结缔组织增生,并有炎细胞浸润(图 1)。

### 2.2 肝脏 MR 扫描结果

2.2.1 四水合二氯化锰对胆管梗阻模型大鼠 MR 诊断时间的确定 四水合二氯化锰增强后 12 h,与假手术组相比,造模组 T1WI 图像信号开始增高( $P < 0.05$ ),增强后 24 h 和 48 h 的肝脏 SNR 与假手术相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),其中增强 24 h 后造模组的肝脏 SNR 达峰值,且与假手术组相比,SNR 差异最大,48 h 造模组的肝脏 SNR 开始降低(表 2,图 2、3)。

表 2 组 1 和组 3 大鼠四水合二氯化锰灌胃后各时间点肝脏 SNR( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	即刻	12 h	24 h	48 h
组 1	13.68±1.23	19.03±2.41*	22.44±1.78**	19.17±1.53**
组 3	13.46±0.87	16.54±1.21	14.80±1.59	14.35±1.32

注:与组 3 比较,\* : $P < 0.05$ ,\*\* : $P < 0.01$

造模大鼠四水合二氯化锰灌胃后 24 h T1WI 信号增强尤为显著,可与正常肝区区分,提示 24 h 可作为诊断大鼠胆管梗阻模型的时间点。

表 3 各组大鼠四水合二氯化锰和钆喷酸葡胺增强前、后肝脏 SNR( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	MR 平扫	增强 T1WI	24 h 后 MR 平扫	24 h 增强率 (%)
组 1	13.68±1.23	—	22.44±1.78	64.81±16.04
组 2	13.47±0.94	17.59±1.67	14.21±0.94*	5.59±4.87*
组 3	13.46±0.87	—	14.80±1.59**	9.92±8.16*
组 4	13.18±1.05	17.07±1.11	13.74±1.30*	4.16±3.63*

注:与组 1 比较,\* : $P < 0.05$ ,\*\* : $P < 0.01$

2.2.2 四水合二氯化锰和钆喷酸葡胺对胆管梗阻模型大鼠 24 h 延迟扫描结果 造模组 T1W 平扫与假手术组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。注射钆喷酸葡胺后立即行 T1W 扫描,假手术组和造模组肝脏的信号强度较平扫均明显升高,但两组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ );钆喷酸葡胺增强后 24 h,假手术组和造模组肝脏的信号强度均基本恢复至平扫水平(表 3,图 4、5),而此时造模组四水合二氯化锰 24 h 延迟图像中肝脏信号强度达到最高,与其他 3 组的肝脏 T1 SNR 和信号增强百分率相比差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

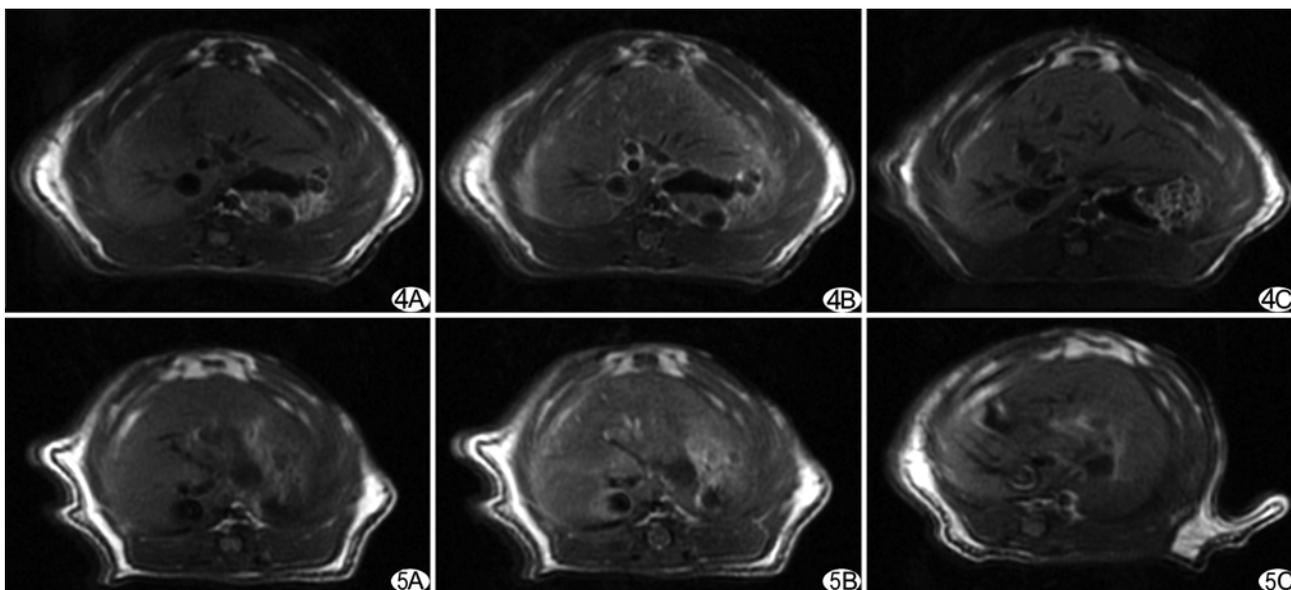


图 4 造模组大鼠静脉注射钆喷酸葡胺前、后肝脏 MR T1WI A. 肝脏增强前平扫; B. 注射钆喷酸葡胺后即刻增强扫描,肝脏信号明显增强; C. 注射钆喷酸葡胺后 24 h 扫描,肝脏信号基本恢复到增强前水平 图 5 假手术组大鼠静脉注射钆喷酸葡胺前、后肝脏 MR T1WI A. 肝脏增强前平扫; B. 注射钆喷酸葡胺后即刻增强扫描,肝脏信号明显增强; C. 注射钆喷酸葡胺后 24 h,肝脏信号基本恢复到增强前水平

### 3 讨论

临床含钆对比剂引起肾源性系统纤维化疾病 (nephrogenic systemic fibrosis, NSF) 的病例不断增多。最近美国 FDA 正式要求减少使用目前临床广泛应用的钆喷酸葡胺等钆类对比剂<sup>[11]</sup>, 由此引发了其他金属离子作为 MR 对比剂的研究热潮<sup>[12]</sup>。

口服含锰 MR 对比剂成为继钆之后一种很有前景的 MR 对比剂<sup>[13]</sup>。口服制剂中的锰被肝细胞特异性摄取后, 主要通过胆汁排泄, 胆管梗阻会导致二氯化锰在肝脏毛细胆管甚至肝细胞中蓄积, 表现为肝脏 MRI 信号发生改变, 因此可能用于诊断胆管梗阻性疾病。

血清胆红素和 ALP 是判定黄疸的重要依据, 也是检测肝脏功能代谢是否正常的指标<sup>[9]</sup>。本研究中胆总管结扎后 24 h 大鼠血清 T-Bil、D-Bil、ALP 升高, 并伴随肝细胞损伤指标 ALT 和 AST 升高, 结合 HE 染色结果, 表明结扎大鼠胆总管 24 h 可造成急性胆管梗阻。

本研究对胆管梗阻模型大鼠于灌胃四水合二氯化锰后的 3 个延迟时间点行 MR 扫描, 发现在 T1W 序列上, 造模组大鼠肝脏信号强度较假手术组大鼠达到峰值的时间明显延迟, 在灌胃后 24 h 达到峰值, 48 h 信号回落, 但仍高于增强前; 而假手术组大鼠 24 h 延迟扫描图像中肝脏的信号强度基本已恢复至增强前水平, 表明造模组大鼠肝脏对锰的清除速率减慢。增强扫描结果显示, 钆喷酸葡胺对造模组和假手术组的即刻增强效果一致, 无法对胆管梗阻做出诊断; 24 h 时钆喷酸葡胺增强效果基本消失, 失去诊断意义。

本实验结果表明, 四水合二氯化锰灌胃后 24 h 的 MR 检查可用于诊断大鼠胆管梗阻, 其对大鼠肝脏的增强效果优于钆喷酸葡胺。

### [参考文献]

- [1] Jørgensen JT, Rief M, Brismar TB, et al. A new manganese-based oral contrast agent (CMC-001) for liver MRI: Pharmacological and pharmaceutical aspects. *Acta Radiologica*, 2012, 53(7):707-713.
- [2] Thomsen HS, Barentsz JO, Burcharth F, et al. Initial clinical experience with oral manganese (CMC-001) for liver MR imaging. *Eur Radiol*, 2007, 17(1):273-278.
- [3] Albiin N, Kartalis N, Bergquist A, et al. Manganese chloride tetrahydrate (CMC-001) enhanced liver MRI: Evaluation of efficacy and safety in healthy volunteers. *MAGMA*, 2012, 25(5):361-368.
- [4] Chabanova E, Thomsen HS, Løgager V, et al. Effects of new manganese agent on tissue intensities in human volunteers: Comparison of 0.23, 0.6 and 1.5 T MRI, a part of a phase I trial. *MAGMA*, 2004, 17(1):28-35.
- [5] Møller JM, Santoni-Rugiu E, Chabanova E, et al. Magnetic resonance imaging with liver-specific contrast agent in primary amyloidosis and intrahepatic cholestasis. *Acta Radiol*, 2007, 48(2):145-149.
- [6] Chabanova E, Logager V, Møller JM, et al. Imaging liver metastases with a new oral manganese-based contrast agent. *Acad Radiol*, 2006, 13(7):827-832.
- [7] Brismar TB, Kartalis N, Kylander C, et al. MRI of colorectal cancer liver metastases: Comparison of orally administered manganese with intravenously administered gadobenate dimeglumine. *Eur Radiol*, 2012, 22(3):633-641.
- [8] Thomsen HS, Svendsen O, Kjastrup S. Increased manganese concentration in the liver after oral intake. *Acad Radiol*, 2004, 11(1):38-44.
- [9] 元海成, 秦鸣放, 邹富胜, 等. 大鼠胆总管结扎后不同时间点的生化指标变化. *中国中西医结合外科杂志*, 2011, 17(6):583-585.
- [10] 王佩娟, 姚楠, 黄德健, 等. 大鼠子宫内位异位症模型的磁共振表现. *中国中药杂志*, 2012, 37(20):22-25.
- [11] Thomsen HS. Recent hot topics in contrast media. *Eur Radiol*, 2011, 21(3):492-505.
- [12] Semelka RC, Helmberger TK. Contrast agents for MR imaging of the liver. *Radiology*, 2001, 218(1):27-38.
- [13] Rief M, Huppertz A, Asbach P, et al. Manganese-based oral contrast agent for liver magnetic resonance imaging: Evaluation of the time course and dose response of liver signal intensity enhancement. *Invest Radiol*, 2010, 45(9):565-571.

[1] Jørgensen JT, Rief M, Brismar TB, et al. A new manganese-

## Impact of microbubbles combined with diagnostic ultrasound on tumor microcirculation

ZHONG Yu<sup>1</sup>, CHEN Zhong<sup>2</sup>, CHEN Li-bo<sup>1</sup>, LIAO Ming-song<sup>2</sup>, DENG Dan<sup>2\*</sup>

(1. Department of Ultrasound, No. 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020, China;

2. Department of Ultrasound, General Hospital of Chengdu Military Region of PLA, Chengdu 610083, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of high mechanical index diagnostic ultrasound combined with microbubbles on the neovasculature of Walker-256 tumor in rats. **Methods** Twenty-nine SD rats bearing subcutaneous Walker-256 tumor were randomly divided into 3 groups: Ultrasound+microbubbles group ( $n=15$ ), ultrasound group ( $n=7$ ) and the sham group ( $n=7$ ). CEUS was performed to acquire the baseline tumor blood perfusion of all the tumors. During the procedure, the tumors were insonated with 20 times of continuous acoustic radiation force impulse imaging. At the same time of ARFI performance, 0.04 ml microbubbles was instantly injected into the tail vein. The ultrasound group and sham group were applied with only diagnostic ultrasound exposure or microbubbles injection, respectively. CEUS was repeated to observe the changes of perfusion before insonation and 0, 10 and 20 min after insonation. Three rabbits were harvested randomly in every group for histological examination immediately after insonation. **Results** The mean peak intensity (PI) values of ROI displayed significant decreases from 25.17% to 12.01% in ultrasound+microbubbles group ( $P<0.01$ ). In the ultrasound group and sham group, media was filling quickly and perfusion was good. In ultrasound+microbubbles group, the blood flow recovered gradually, but PI still reduced after 10 min, the blood flow of tumor recovered basically complete and showed high perfusion phase after 20 min ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Microbubbles enhanced high mechanical index diagnostic ultrasound can temporally decrease the microcirculation of Walker-256 tumor in rats.

**[Key words]** Ultrasonography; Microbubbles; Contrast media; Neoplasms; Microcirculation

## 诊断超声联合微泡对肿瘤微循环的作用

钟 渝<sup>1</sup>, 陈 重<sup>2</sup>, 陈礼波<sup>1</sup>, 廖明松<sup>2</sup>, 邓 旦<sup>2\*</sup>

(1. 中国人民解放军第 324 医院超声科, 重庆 400020; 2. 中国人民解放军成都军区总医院超声科, 四川 成都 610083)

**[摘要]** **目的** 探讨高机械指数诊断超声联合微泡对大鼠 Walker-256 肿瘤微循环的作用。 **方法** 将 29 只皮下荷 Walker-256 肿瘤 SD 大鼠随机分为超声微泡组 ( $n=15$ )、单纯超声组 ( $n=7$ ) 和假照组 ( $n=7$ )；对超声微泡组采用声辐射力脉冲 (ARFI) 成像模式下诊断超声连续激励 20 次辐照肿瘤，同时经尾静脉推注微泡 0.04 ml；对单纯超声组在行超声辐照的同时以等量生理盐水代替微泡；对假照组则采用假照方式，仅推注等量微泡溶液，但不发射超声能量。对所有动物于辐照前、辐照后即刻、10、20 min 行 CEUS 检查。最后每组随机选取 3 只动物获取肿瘤组织标本，行病理学检查。 **结果** 辐照后即刻，超声微泡组辐照区几乎无造影剂充填，呈阴性显影，肿瘤区平均造影峰值强度 (PI) 由 25.17% 减低至 12.01% ( $P<0.01$ )；单纯超声组及假照组辐照后即刻可见造影剂快速充填，灌注良好 ( $P>0.05$ )。10 min 后，超声微泡组造影可

**[基金项目]** 成都军区总医院院管课题 (424121AH)。

**[作者简介]** 钟渝 (1986—)，女，重庆人，硕士，医师。研究方向：肿瘤的超声诊断与治疗。E-mail: zhongyu-26@163.com

**[通讯作者]** 邓旦，中国人民解放军成都军区总医院超声科，610083。E-mail: dengdan\_888@126.com

**[收稿日期]** 2012-12-12 **[修回日期]** 2013-03-15

见血流逐渐恢复,但 PI 仍降低;20 min 后肿瘤血流基本完全恢复,呈高灌注( $P>0.05$ )。结论 高机械指数诊断超声联合微泡能特异性地暂时降低大鼠 Walker-256 皮下移植瘤的微循环。

[关键词] 超声检查;微泡;造影剂;肿瘤;微循环

[中图分类号] R445.1; R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2013)05-0688-05

微泡增强的超声空化治疗技术可以选择性地毁损大鼠 Walker-256 肿瘤的新生血管,从而达到阻断肿瘤微循环的目的<sup>[1-2]</sup>;原因可能是肿瘤新生血管具有先天性的发育缺陷,其管壁结构比较薄弱<sup>[3-5]</sup>,易受到微泡增强的超声空化造成的机械性损伤。高顺记等<sup>[6]</sup>发现,以峰值负压为 4.8 MPa 的脉冲式治疗超声联合微泡可以阻断恶性肿瘤微循环长达 24 h,而声压降至 2.6 MPa 却只能造成约 1 h 的肿瘤循环阻断。当诊断超声的机械指数大于 1.3 时,其峰值负压处于 2.0~3.0 MPa 范围<sup>[7]</sup>;是否可以利用诊断超声激励的微泡空化效应特异性地降低恶性肿瘤血流灌注成为热点问题。本研究采用目前诊断超声中的高能量模式——声辐射力脉冲(acoustic radiation force impulse, ARFI)成像联合微泡的方法作用于大鼠 Walker-256 皮下移植瘤,探讨其对肿瘤微循环的作用。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物与设备、材料 SD 近交系大鼠 40 只,雄性,体质量 180~200 g,由第三军医大学新桥医院实验动物中心提供,饲养环境为清洁级。

Siemens S2000 彩色多普勒超声诊断仪,4C1、9L4 高频线阵探头,频率分别为 1.0~4.5 MHz 和 4.0~9.0 MHz。ARFI 模式下 4C1 探头的驱动频率为 2.67 MHz,实时 CEUS 采用 CPS 技术,配有造影定量分析软件 ACQ。

造影剂微泡由第三军医大学新桥医院超声科研制,其核心气体为全氟丙烷,外观呈乳白色凝乳状;平均粒径 2  $\mu\text{m}$ ,浓度约为  $4\sim 9\times 10^9/\text{ml}$ 。

1.2 造模及分组 参照王红卫等<sup>[8]</sup>的方法,将 Walker-256 细胞于 37℃ 水浴箱中复苏,经磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)多次冲洗离心后,加入适量含 10% 标准胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,在 37℃、含 5%  $\text{CO}_2$  的孵箱中培养、传代、增殖至细胞悬液浓度为  $1\times 10^7$  个/ml。于大鼠右大腿外侧区备皮,常规消毒,取 Walker-256 肿瘤细胞悬液 0.2 ml 接种于大鼠皮下。注射后,以碘伏棉球压迫穿刺点止血,防止肿瘤细胞悬液渗漏。待肿瘤生长直径达到 1.0 cm 时,将大鼠随机分为超声微泡组、单纯超声组和假照组。

## 1.3 实验方法

1.3.1 常规超声及 CEUS 检查 用 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,剂量为 30 mg/kg 体质量,仰卧位保定,常规备皮消毒暴露辐照区,建立尾静脉通路。造影前先行常规二维超声检查,观察肿瘤大小、数目、回声特征以及中心有无坏死区;再用 CDFI 观察其血供情况,选择血流信号显示丰富的肿瘤切面,切换到造影模式,机械指数 0.04, TGC 置于中值,图像深度、总增益在整个实验过程中保持不变。造影时经尾静脉团注 0.04 ml 脂氟显微泡,并跟注 1 ml 无菌生理盐水,数字化储存动态造影影像。

1.3.2 肿瘤辐照方法 按选取的超声切面方向辐照,对超声微泡组采用 ARFI 模式下诊断超声连续激励 20 次辐照肿瘤,同时经尾静脉推注微泡溶液(0.2 ml/kg 体质量);对单纯超声组则注射等量无菌生理盐水,超声辐照方式不变;假照组则采用超声假照的方式不发射能量辐照肿瘤,仅推注等量微泡溶液(0.2 ml/kg 体质量)。为避免循环中残余微泡的影响,对单纯超声组于 CEUS 后 2 h 后开始辐照。辐照后即刻、10、20 min 再次行 CEUS 检查。

1.3.3 辐照前、后 CEUS 峰值强度(peak intensity, PI)定量分析 使用仪器自带的声学定量软件分析各组各时间点的 PI。通过两次勾画 ROI,获得整体 PI,并进行比较。

1.4 病理学检查 造影结束后,各组随机选取 3 只大鼠,腹腔注射过量麻醉剂后分离切取肿瘤,行 HE 染色,于光镜下观察。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件包。各组辐照前、后 PI 以  $\bar{x}\pm s$  表示。组内辐照前、后 PI 比较采用重复测量数据方差分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

40 只雄性 SD 大鼠中,33 只建模成功,实验过程中死亡 4 只,余 29 只有完整的实验数据。接种部位实体肿瘤呈椭圆形,肿瘤最大径 0.9~1.2 cm。4 只大鼠在实验过程中死亡,解剖发现死因可能与麻药过量或空气栓塞有关。29 只大鼠中,超声微泡组( $n=15$ )、假照组( $n=7$ )及单纯超声组( $n=7$ )。

表 1 各组辐照前、后 CEUS 平均 PI 对比(%,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	辐照前	辐照后		
		即刻	10 min	20 min
超声微泡组	25.17±6.90	12.01±4.63*	22.47±6.03	23.87±5.89
单纯超声组	26.63±6.69	25.31±5.91	27.63±7.11	26.44±6.39
假照组	23.96±7.64	24.82±6.14	23.61±5.86	22.20±8.19

注: \* :与单纯超声组比较,  $P < 0.01$

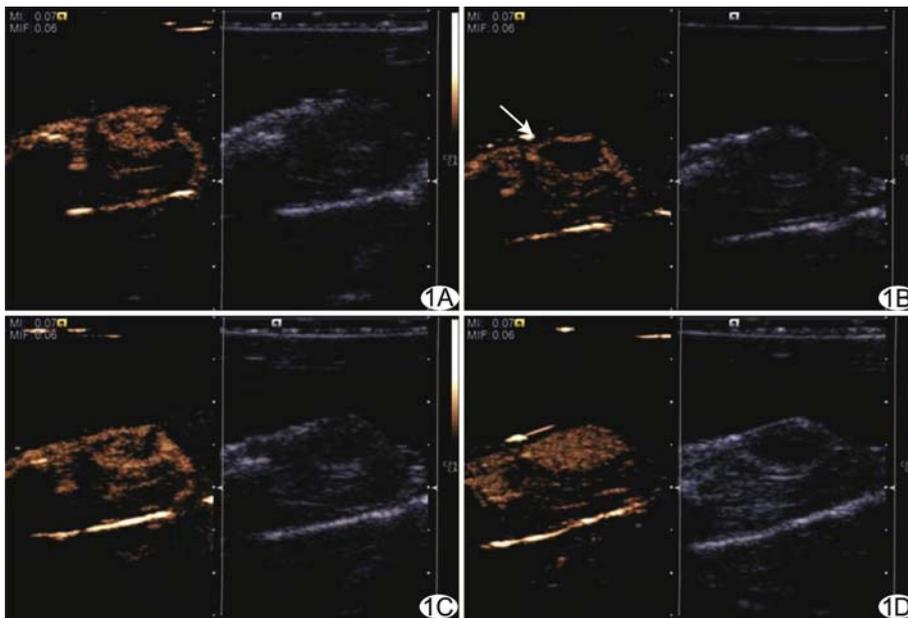


图 1 超声微泡组肿瘤辐照前、后各时间点造影图 A. 辐照前肿瘤血流灌注丰富; B. 辐照后即刻肿瘤血流灌注显著下降(箭); C. 辐照后 10 min 肿瘤血流逐渐恢复; D. 辐照后 20 min 肿瘤血流灌注基本完全恢复

2.1 超声检查 辐照前 CEUS 显示肿瘤血供丰富,呈高灌注,未见明显充盈缺损区(图 1A、2A)。辐照后即刻 CEU 显示超声微泡组肿瘤区几乎无造影剂灌注,呈负性显影(图 1B),PI 由 25.17% 减至 12.01% ( $P < 0.01$ , 表 1),降低了约 52.28%。单纯超声组和假照组辐照后即刻仍呈高灌注(图 2B),辐照前、后 PI 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 10 min 后,超声微泡组肿瘤 PI 大面积恢复(图 1C),20 min 后 PI 基本完全恢复 ( $P > 0.05$ , 图 1D)。单纯超声组辐照后 10、20 min 肿瘤血流灌注见图 2C、2D。

2.2 病理学检查 大体观:各组肿瘤均呈类圆形或椭圆形,长径约 1.0~1.2 cm,边界较清楚,周边可见结缔组织包绕。辐照前、后各组荷瘤部位皮下均未见明显改变。

光镜观察:肿瘤细胞大小不一,排列紧密,呈癌巢样分布,细胞核大深染,核分裂象多见。假照组肿瘤血管内皮连续完整,微血管轻度扩张,偶可见少量红细胞

渗出(图 3A);超声微泡组可见肿瘤微血管显著扩张,弥漫性充血和出血,组织间高度水肿,多发空泡形成等(图 3B~D)。

### 3 讨论

超声空化效应是热效应之外另一种超声的主要物理效应,主要表现为机械性剪切撕裂、冲击波和微射流等<sup>[9]</sup>。既往认为超声空化随机性强,不易控制,不适用于超声治疗。作为外源性空化核,超声微泡造影剂进入生物体后使超声空化的声环境发生显著变化,理论上常规造影剂量可使空化峰值负压阈值下降 50%<sup>[10]</sup>。因微泡直径为 2~4  $\mu\text{m}$ ,仅限于血管腔内流动,不能渗透入组织间隙,故超声空化损伤主要集中在血管壁。近年来,国内外均有研究<sup>[11-14]</sup>发现超声造影剂微泡联合治疗超声作用可造成血管壁机械性损伤。Wood 等<sup>[11-12]</sup>采用低能量理疗超声联合静脉注射微泡作用于小鼠皮下移植性黑色素瘤,发现超声治疗后肿瘤血流灌注下降,无灌注区域面积比治疗前增大了 82%。Liu 等<sup>[1-2]</sup>在经静脉注射脂质微泡造影剂后,采用低声强 ( $I_{\text{SPTA}} = 1.36 \text{ W/cm}^2$ ) 脉冲式聚焦超声辐照兔 VX2 肿瘤或大鼠 Walker-256 肿瘤,发现肿瘤微血管被机械性毁损,并发生肿瘤循环被阻断现象;CEUS 显示肿瘤呈完全灌注充盈缺损区,与周边正常灌注组织分界形成鲜明对比,因为与周边正常血管相比,肿瘤新生血管结构的薄弱性可能对空化的攻击更为敏感。基于上述研究,利用诊断超声联合微泡特异性降低恶性肿瘤微循环灌注成为一个值得探讨的问题。

与良性占位病变和正常组织血管相比,肿瘤新生血管生长迅速,具有发育不全、内皮细胞间隙大、基底膜不完整、缺乏平滑肌层和周细胞疏松等特点<sup>[3-5,14]</sup>。高顺记等<sup>[6]</sup>发现,在经静脉注射脂质微泡造影剂后,采用低功率脉冲式聚焦超声(频率 1.22 MHz,峰值声压 4.6 MPa,占空比 0.5%)照射辐照兔 VX2 肿瘤,肿瘤微血管可以被机械性毁损,发生肿瘤循环被阻断,30、

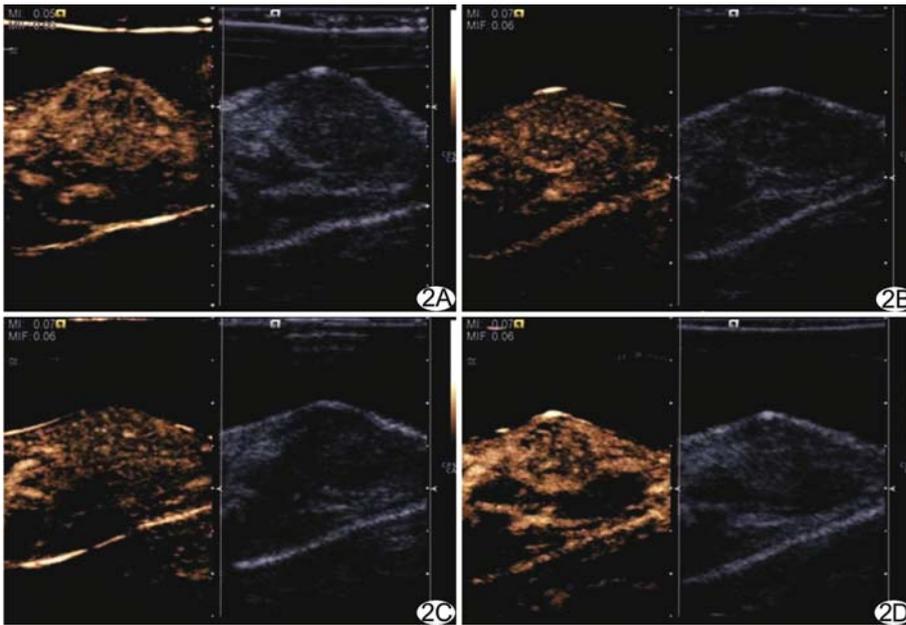


图 2 单纯超声组肿瘤辐照前、后各时间点造影图 A. 辐照前肿瘤血流灌注丰富; B. 辐照后即刻肿瘤血流灌注未见明显降低; C. 辐照后 10 min 肿瘤血流仍呈高灌注相; D. 辐照后 20 min 肿瘤血流灌注无明显下降

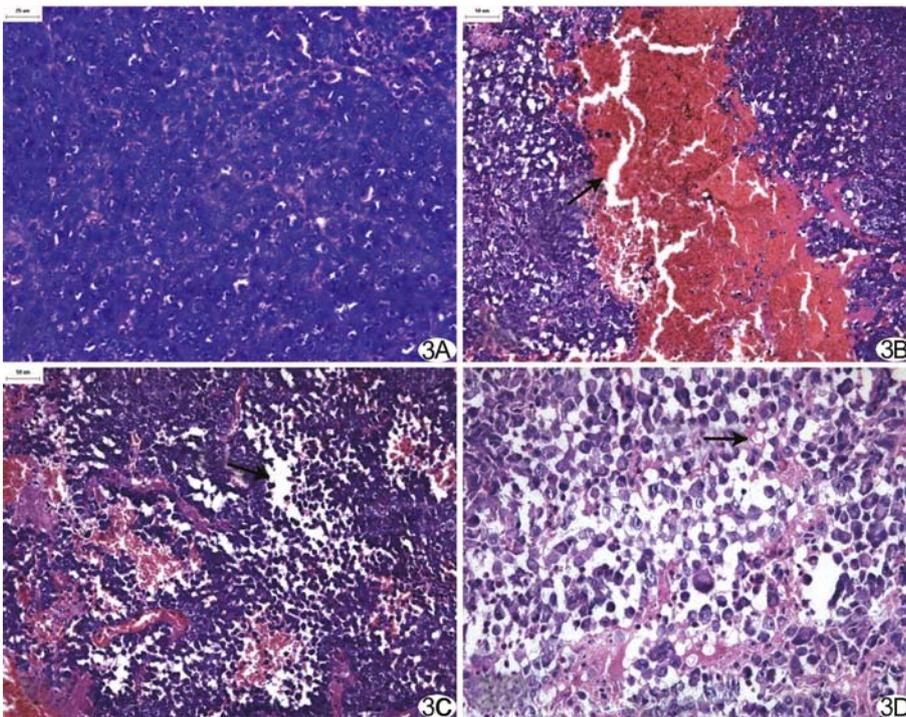


图 3 病理图(HE, ×200) A. 假照组肿瘤组织内细胞排列紧密, 未见明显出血, 水肿; B. 超声微泡组肿瘤弥漫性出血, 大量红细胞渗出(箭); C. 超声微泡组肿瘤组织间液漏出, 高度水肿(箭); D. 超声微泡组肿瘤多发空泡形成(箭)

60 min 观察仍无明确灌注, 最长延至约 24~48 h; 但在其他参数不变的情况下, 峰值声压 2.6 MPa 的治疗超声只能造成 1~2 h 的循环阻断。当诊断超声的机械指数大于 1.3 时, 其峰值负压处于 2~3 MPa 范围<sup>[7]</sup>。

郑元义等<sup>[14]</sup>采用机械指数为 1.4 的诊断超声联合微泡仅破坏了兔 VX2 肿瘤新生血管超微结构, 但光镜下未见明显肿瘤血管改变。

本研究采用目前诊断超声中的高能量模式——ARFI 联合微泡空化攻击肿瘤新生血管, 造成肿瘤血流灌注显著降低, 肿瘤区平均 PI 由辐照前 25.17% 减低到辐照后的 12.01%, 下降约 52.28%。ARFI 模式可能是目前唯一可感知的、较高声压的诊断超声, 其驱动频率为 2.67 MHz, 机械指数为 1.4。频率 2~3 MHz 的超声是粒径约 2 μm 的微泡的最佳谐振频率, 2 MPa 以上的超声可以激励微泡产生显著的惯性空化, 从而产生与治疗超声类似的血流阻断效应。本研究中光镜检查肿瘤标本可见显著的肿瘤血管病理改变, 主要表现为微小血管壁基底膜断裂, 内皮细胞高度肿胀, 红细胞渗出, 肿瘤组织间液增多等, 与前期治疗超声产生的肿瘤血管毁损术的机制基本一致。因此, 此方法本质上也属于血管毁损术。由于采用高机械指数诊断超声的脉冲宽度偏窄, 平均声强低于一般治疗超声, 故病理毁损程度较治疗超声有所降低。辐照后 10、20 min 的再次造影显示血流灌注的快速恢复, 也进一步证实血流阻断的程度较治疗超声弱, 但具体的再通机制尚不明确。

[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. *Ultrasound Med Biol*, 2012, 38(2):253-261.  
 [2] 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. *中华医学杂志*, 2012, 92(7):487-491.

[3] Folkman J. Angiogenesis and apoptosis. *Semin Cancer Biol*, 2003, 13(2):159-167.

[4] McDonald DM, Foss AJ. Endothelial cells of tumor vessels: Abnormal but not absent. *Cancer Metastasis Rev*, 2000, 19(1-2): 109-020.

[5] Kerbel RS. Tumor Angiogenesis. *N Engl J Med*, 2008, 358(19): 2039-2049.

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

[7] Williams AR, Wiggins RC, Wharram BL, et al. Nephron injury induced by diagnostic ultrasound imaging at high mechanical index with gas body contrast agent. *Ultrasound Med Biol*, 2007, 33(8): 1336-1344.

[8] 王红卫,卓忠雄,赵树文,等.大鼠 Walker-256 皮下移植瘤模型的建立及其超声评价. *临床超声医学杂志*, 2007, 9(2):68-71.

[9] 冯若. 超声空化与超声医学. *中华超声影像学杂志*, 2004, 13(1): 63-65.

[10] Sassaroli E, Hynynen K. Cavitation threshold of microbubbles in gel tunnels by focused ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, 2007, 33(10):1651-1660.

[11] Wood AK, Ansaloni S, Ziemer LS, et al. The antivasular action of physiotherapy ultrasound on murine tumors. *Ultrasound Med Biol*, 2005, 31(10):1403-1410.

[12] Wood AK, Bunte RM, Cohen JD, et al. The antivasular action of physiotherapy ultrasound on a murine tumor: Role of a microbubble contrast agent. *Ultrasound Med Biol*, 2007, 33 (12): 1901-1910.

[13] Nesbit M. Abrogation of tumor vasculature using gene therapy. *Cancer Metastasis Rev*, 2000, 19(122):45-49.

[14] 郑元义,王志刚,冉海涛. 诊断超声加微泡造影剂对新生血管的作用. *中国医学影像技术*, 2004, 20(3):349-351.

## 《中国医学影像技术》杂志 2013 年征订启事

《中国医学影像技术》杂志于 1985 年创刊,是由中国科学院主管,中国科学院声学研究所主办的国家级学术期刊,主编为李坤成教授、姜玉新教授。刊号:ISSN 1003-3289, CN 11-1881/R。是百种中国杰出学术期刊、中国精品科技期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库核心期刊、《中文核心期刊要目总览》收录期刊、荷兰《医学文摘》收录源期刊、英国《科学文摘》收录源期刊、俄罗斯《文摘杂志》收录源期刊、波兰《哥白尼索引》收录源期刊、《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》(JSTChina)收录期刊。

《中国医学影像技术》杂志刊登放射、超声、核医学、介入治疗、影像技术学、医学物理与工程学等方面的基础研究及临床实验研究最新成果,信息量大、发刊周期短,注重医、理、工相结合,是影像医学发展和学术交流的良好平台,本刊论文是医学影像专业人员晋升中、高级职称和完成硕士、博士学业的重要依据,也是图书馆必备的学术刊物。

《中国医学影像技术》为月刊,160 页,大 16 开本,彩色印刷。单价 20 元,全年定价 240 元。订户可随时向当地邮局订阅,邮发

代号 82-509;亦可向编辑部直接订阅,免邮寄费(欢迎通过银行转账,附言栏请注明订阅杂志名称)。

联系电话:010-82547903 传真:010-82547903

E-mail: cjmit@mail. ioa. ac. cn 网址: www. cjmit. com

编辑部地址:北京市海淀区北四环西路 21 号大猷楼 502 室 邮编:100190

银行账户名:《中国医学影像技术》期刊社 账号:110907929010201

开户行:招商银行北京分行清华园支行 联系人:孟辰凤



❖ 实验研究

## Ultrasonic wave intensity examination of carotid artery and conventional echocardiography in assessment of cardiac functional damage in rabbit

ZHANG Hui<sup>1,3</sup>, ZHENG Rong-qin<sup>1,3\*</sup>, QIAN Xiao-xian<sup>2</sup>,  
HAO Bao-shun<sup>2</sup>, ZHANG Cheng-xi<sup>2</sup>

(1. Department of Ultrasound, 2. Department of Cardiology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 3. Institute of Diagnostic and Interventional Ultrasound, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**[Abstract]** **Objective** To compare ultrasonic wave intensity (WI) examination of carotid artery and conventional echocardiography in estimating rabbit's cardiac function damage. **Methods** Sixty-eight healthy male New Zealand rabbits were chosen and divided into study group ( $n=64$ ) and control group ( $n=4$ ). Doxorubicin was intravenous injected every week for 8 weeks for rabbits in study group. When the administration was stopped, observation was performed for another 8 weeks. Echocardiography, carotid artery WI examination and cardiac pathology examination were performed at the end of every week. **Results** After administration, the first peak of WI curve ( $WI_1$ ) values decreased statistically at the 3rd weekend, got bottom at the 9th weekend, and then raised gradually and reached the higher level at the 15th weekend. After administration, ejection fraction (EF) value decreased significantly at 7th weekend, reached the bottom at 8th weekend. EF at 8th weekend had no statistical difference compared with that later. After administration, apoptosis index (AI) value increased significantly at the 1st weekend, reached the peak at the 9th weekend, and then declined gradually. AI value at the 9th weekend had no statistical difference compared to that at the 13th weekend. **Conclusion** Ultrasound WI examination of carotid artery can reflect the change of cardiac function damage better than EF.

**[Key words]** Ultrasonography; Ejection fraction; Carotid arteries; Wave intensity; Doxorubicin

## 颈动脉超声瞬时波强度检查与常规心脏超声评估兔心功能损害

张 辉<sup>1,3</sup>, 郑荣琴<sup>1,3\*</sup>, 钱孝贤<sup>2</sup>, 郝宝顺<sup>2</sup>, 张成喜<sup>2</sup>

(1. 中山大学附属第三医院超声科, 2. 心内科, 广东 广州 510630;  
3. 中山大学超声诊断与介入超声研究所, 广东 广州 510630)

**[摘 要]** **目的** 比较颈动脉超声瞬时波强度法(WI)检查与常规心脏超声在兔心功能损害评估中的作用。**方法** 选择雄性健康新西兰大白兔 68 只, 分为实验组 64 只, 对照组 4 只; 实验组兔经静脉注射多柔比星 8 周, 停药后继续观察 8 周; 每周末进行常规超声检查、颈动脉 WI 检查及病理学检查。**结果** WI 曲线中第一个正向峰( $WI_1$ )值从第 3 周末起明显降低, 第 9 周末下降至最低, 此后逐步上升, 第 15 周末达到较高水平。射血分数(EF)在给药后第 7 周末明显下降, 第 8 周时

[基金项目] 广东省科技计划项目基金(2011B061300005)。

[作者简介] 张辉(1974—), 男, 安徽蚌埠人, 博士, 主治医师。研究方向: 心血管超声。E-mail: gsg9commando@yahoo.cn

[通讯作者] 郑荣琴, 中山大学附属第三医院超声科, 510630; 中山大学超声诊断与介入超声研究所, 510630。E-mail: zhengrongqin123@163.com

[收稿日期] 2012-10-15 [修回日期] 2012-11-11

下降至最低, 给药 8 周后 EF 与第 8 周末比较差异无统计学意义。心肌细胞凋亡指数(AI)在给药后第 1 周末明显上升, 第 9 周末达到高峰, 之后逐步下降, 第 13 周末与第 9 周末的 AI 值比较差异有统计学意义。结论 相对于常规超声, 颈动脉超声 WI 检查能够更好地反映兔心功能损害发生和发展情况。

[关键词] 超声检查; 射血分数; 颈动脉; 瞬时波强度; 多柔比星

[中图分类号] R-332; R445.1 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2013)05-0693-04

多种原因造成的心肌损害均可引起左心室收缩功能障碍, 继而导致左心功能衰竭。左心室收缩功能检测对于了解心脏损害程度、指导治疗和评价预后具有重要意义<sup>[1]</sup>。超声瞬时波强度(wave intensity, WI)技术可通过外周动脉的参数检测评价心脏收缩功能变化, 其理论基础是左心室收缩引起前向传导的压缩波, 在动脉内波的净强度提供血液所携带的能量转移信息, 反映在后负荷影响下心脏收缩瞬时的工作状态。关于外周动脉 WI 检测与心功能的关系的研究已有报道<sup>[2-5]</sup>。本研究建立兔多柔比星慢性心脏毒性模型, 分别对其采用颈动脉超声 WI 检查及常规心脏超声检查, 观察给药前、后左心室收缩功能随时间的变化情况。

1 材料与方

1.1 研究对象 选择雄性健康新西兰大白兔 68 只(广东省实验动物中心提供), 约 4 月龄, 体质量 2.0~2.5 kg, 平均(2.3±0.2)kg; 分为实验组 64 只, 对照组 4 只。

1.2 实验方法 参照文献<sup>[6-7]</sup>方法, 实验组经兔耳缘静脉注射多柔比星溶液(汕头明治医药有限公司), 每次注射剂量 2 mg/kg 体质量, 每周 1 次, 共 8 周, 总量 16 mg/kg 体质量。停药后继续观察 8 周, 共计 16 周。于每周末设置检查点, 在给药前及给药后每周末随机选择 4 只兔进行超声和心脏病理检查。

1.2.1 超声检查 选用 Aloka Prosound α10 数字化超声诊断仪, 5412 型高频探头, 频率 5~13 MHz。采用改良双平面 Simpson 法测量左心室收缩功能。将取样容积置于左侧颈总动脉分叉前约 13 mm 处, 实验过程中仪器增益、深度等设置尽可能不变, 描记并选择≥5 个心动周期的稳定波形用于分析并计算颈动脉 WI

曲线中的第一个正向峰(WI<sub>1</sub>)值, 通过 WI 分析软件计算颈动脉僵硬指数(β)。

1.2.2 病理检查 每周末随机选择 4 只兔在超声检查后处死, 取得心脏和颈动脉标本(图 1), 行 HE 染色后于光镜下观察, 并通过透射电镜观察心肌细胞肌原纤维的肌小节、线粒体、肌浆网和心肌细胞核结构及颈动脉内皮细胞形态结构、平滑肌细胞、弹力纤维形态和排列情况。按照组织芯片方式脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)检测心肌细胞凋亡, 计算心肌细胞凋亡指数(apoptosis index, AI)。

1.2.3 血液黏滞度检查 在给药前、第 8 周末、第 16 周末通过耳中央动脉抽取全血 5 ml 注入枸橼酸钠抗凝管中, 测定各项血液黏滞度指标。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用多重比较分析每周

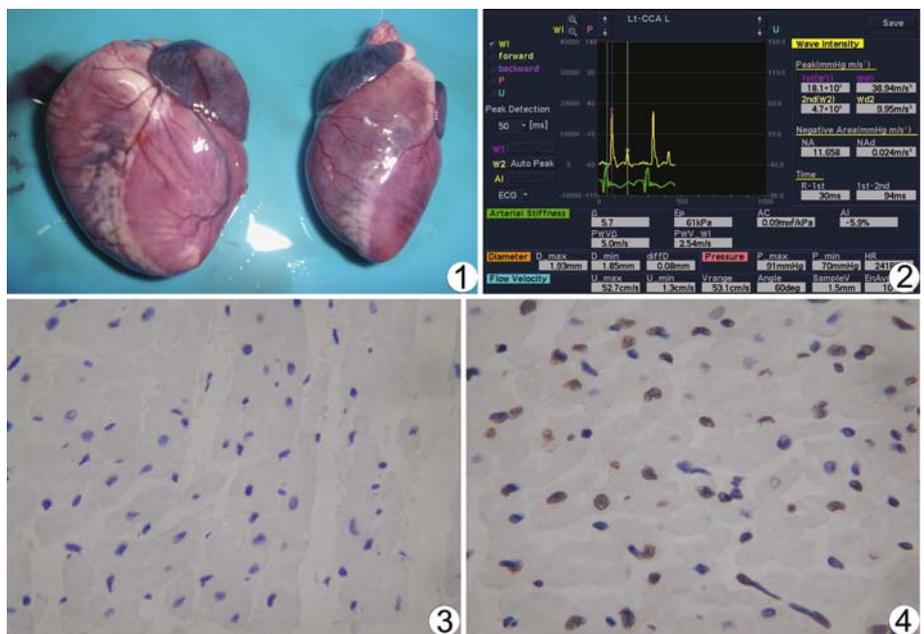


图 1 兔心脏大体形态改变 右侧为给药前, 左侧为给药后第 8 周末, 心脏明显增大 图 2 超声颈动脉 WI 检查界面, 可以获得 WI<sub>1</sub> 和 β 值, 其中黄色曲线为 WI 曲线 图 3 给药前 TUNEL 法检查显示无明显受损心肌细胞(HE, ×400) 图 4 第 9 周末 TUNEL 法检查显示大量心肌细胞受损(HE, ×400)

的  $WI_1$  测量值、左心室射血分数 (ejection fraction, EF)、心肌细胞 AI,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 心脏指标检测结果及镜下改变 EF 值在给药后第 7 周末出现明显下降, 与给药前比较差异有统计学意义 ( $P = 0.007$ ), 第 8 周末 EF 值下降至最低; 给药 8 周后 EF 测量值呈波动趋势, 但第 9 周末及第 10 周末的 EF 值与给药 8 周末比较差异均无统计学意义。  $WI_1$  值在给药后第 3 周末起明显下降 [ $(22\ 730 \pm 3230) \text{ mmHg} \cdot \text{m/s}^3$ ], 与给药前比较差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 第 9 周末  $WI_1$  下降至最低点, 此后呈现逐步上升趋势, 第 15 周末达到较高水平, 与第 9 周比较差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。心肌细胞 AI 在给药后第 1 周末明显上升 ( $P < 0.001$ , 图 2), 在第 9 周末达到高峰, 之后 AI 呈现下降趋势, 第 13 周末达到较低水平, 与第 9 周末比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 见表 1。

表 1 各项测值随时间的变化 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

时间点	$WI_1(\text{mmHg} \cdot \text{m/s}^3)$	EF(%)	AI(%)
给药前	28450±3550	60.65±5.93	2.60±1.77
给药后			
第 1 周末	26 630±2580	56.55±3.86	24.25±0.70
第 2 周末	24 800±2050	58.18±3.26	26.30±1.33
第 3 周末	22 730±3230	59.25±8.35	27.30±1.31
第 4 周末	18 600±2160	57.25±5.27	30.20±0.83
第 5 周末	17 280±2760	58.30±3.77	30.65±1.08
第 6 周末	14 880±1330	58.25±2.86	33.00±1.41
第 7 周末	14 280±3670	49.98±1.42	38.75±2.75
第 8 周末	14 580±1650	24.68±4.32	50.00±2.09
第 9 周末	12 430±1650	48.45±7.83	50.50±3.11
第 10 周末	16 780±2970	32.73±3.90	43.80±2.82
第 11 周末	17 600±5070	40.73±8.91	43.95±1.46
第 12 周末	17 380±750	33.38±5.46	43.20±5.16
第 13 周末	18 000±1500	35.08±7.31	32.60±1.84
第 14 周末	17 150±2690	41.10±3.00	30.85±3.13
第 15 周末	18 480±1980	48.65±4.79	34.15±1.15
第 16 周末	17 450±1670	49.28±4.58	29.80±1.37

光镜下观察, 给药前心肌细胞结构正常 (图 3); 给药后第 1 周末心肌细胞发生不同程度地退行性变; 第

9 周末心肌细胞广泛空泡变性, 肌原纤维溶解, 灶性心肌坏死, 部分心肌细胞核固缩、变形, 组织间质严重水肿, 间质纤维组织增多, 少量炎性细胞浸润 (图 4); 停药后心肌细胞空泡变性和组织间质水肿减轻。

电镜下观察, 给药前心肌细胞超微结构正常; 给药后第 1 周末心肌细胞线粒体肿胀, 嵴断裂或消失, 肌浆网扩张, 肌丝排列紊乱或消失, 肌节长短不一, 出现异常收缩带, 可见凋亡细胞, 间质细胞和纤维增生; 给药第 9 周末上述病变范围更加广泛, 呈弥漫分布; 停药后上述病变有所减轻, 范围缩小。

2.2 相关影响因素检测结果 血液黏滞度各项指标在给药前、给药第 8 周末、给药第 16 周末的差异均无统计学意义 (表 2)。颈动脉僵硬指数  $\beta$  值在给药前 ( $7.40 \pm 1.21$ )、给药第 8 周末 ( $7.23 \pm 2.50$ ) 及给药第 16 周末 ( $6.83 \pm 0.95$ ) 差异均无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ )。给药前、后光镜和电镜下观察颈动脉壁结构未见明显变化。

## 3 讨论

超声是临床评价左心室结构和功能的首选影像学检查方法, 主要通过左心室 EF 评价左心室收缩功能。但有研究<sup>[8-12]</sup>认为 EF 有时不能准确反映左心室收缩功能的实际状况, 因为 EF 值的计算公式未考虑到射血时间的影响, 且在左心室收缩功能下降早期, EF 值较难反映射血时间的改变; 此外, EF 还受心脏前、后负荷等因素的影响。目前超声评估左心室功能直接以心脏作为观察对象, 当观察声窗受影响时, 会影响左心室测量的准确性, 导致左心功能评估不准确。WI 技术可通过外周动脉的参数检测评价心脏收缩功能变化。

多柔比星能使左心室收缩功能进行性下降, 导致慢性心力衰竭<sup>[13]</sup>; 早期心肌损伤属可逆性, 如能早期发现并采取有效干预措施, 可能阻止心肌损伤的不可逆性发展<sup>[14]</sup>。颈动脉超声 WI 曲线中的第一个正向峰称为  $WI_1$  峰, 反映左心室收缩功能。以往研究<sup>[15]</sup>认为左心室收缩功能增强时  $WI_1$  峰增高, 左心室收缩功能减低时  $WI_1$  峰减低。本研究结果显示, EF 值从给药第 7 周末开始才出现明显下降, 晚于颈动脉 WI 及

表 2 给药前、后血液黏滞度检测 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

时间点	低切全血黏度 (mPa/s)	中切全血黏度 (mPa/s)	高切全血黏度 (mPa/s)	血浆黏度 (mPa/s)	红细胞压积 (%)
给药前	4.26±0.48	2.90±0.13	2.59±0.16	1.33±0.10	34.00±2.54
给药后					
第 8 周末	4.05±0.33	3.03±0.18	2.77±0.14	1.32±0.08	36.25±3.30
第 16 周末	4.03±0.10	2.93±0.40	2.70±0.10	1.28±0.06	33.33±2.08
P 值	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

心肌细胞 AI,可能与以下机制有关:心肌细胞损害较轻时,心肌收缩能力尚未出现明显减弱,心排量未出现减少;当心肌细胞损害进一步加重时,心肌收缩能力开始减弱,此时可以通过增加心率代偿心搏量减少,心排量还可以维持,心脏形态改变不明显;当大量心肌细胞受损、心肌收缩能力进一步下降时,为保持正常心排出量,机体通过 Frank-Starling 机制进行代偿,即增加心脏的前负荷,使回心血量增多,心室舒张末期容积增加,从而增加心排出量,直至储备耗尽。心力衰竭时,即使左心室舒张末期容积增高,心排出量仍然低下。随着心肌细胞数量减少,残存心肌所承受的负荷更重,形成恶性循环,促使心力衰竭进一步向不可逆方向发展。停药后,心肌内药物蓄积不再增加,心肌结构得到部分修复,细胞病变有所减轻,纤维组织增生,左心室收缩功能得到一定程度的恢复。研究<sup>[16]</sup>发现,心肌受损后,部分固有心肌细胞能够重返细胞分裂周期,通过低强度分化复制发挥修复代偿作用。本研究中停药后心肌细胞 AI 下降,而 WI<sub>1</sub> 值出现上升趋势,但 EF 值不能反映这种变化,提示 EF 值不仅难以敏感反映心功能早期损害情况,而且不能较好地反映心功能变化的过程,难以作为动态监测病情发展的良好指标。

本研究显示颈动脉 WI 较常规超声心功能检测在反映兔心功能损害变化方面具有优势,可能与下列因素有关:①WI 计算公式增加了 EF 计算中所未包含的时间因素;②颈动脉位置较表浅,透声条件较好;图像分辨力也比较高;其取样容积与声束调节更加方便,较易获得较为精确的结果;③WI 检查不是以心脏为直接观察对象,故不易受心脏几何形态变化的影响。

颈动脉 WI 检查反映的是心脏和动脉系统的综合功能,即除反映心脏本身功能状态以外,还反映颈动脉本身弹性;如果颈动脉本身存在病变或血液性状有改变,则检测结果可能受到影响。本研究通过检查兔颈动脉僵硬指数、颈动脉组织学和血液流变学,排除了多柔比星可能造成的颈动脉弹性和血液性状的影响。

综上,与常规心脏超声心功能检查比较,颈动脉超声 WI 检查能更好地反映兔心功能损害程度。

### [参考文献]

- [1] Geisberg CA, Sawyer DB. Mechanisms of anthracycline cardiotoxicity and strategies to decrease cardiac damage. *Curr Hypertens Rep*, 2010, 12(6):404-410.
- [2] Jones CJ, Sugawara M, Kondoh Y, et al. Compression and expansion wavefront travel in canine ascending aortic flow: Wave intensity analysis. *Heart Vessels*, 2002, 16(3):91-98.
- [3] Nobuoka S, Aono J, Nagashima J, et al. Assessment of reflection pulse wave in patients with cardiomyopathy: Evaluation of noninvasive measurement of wave intensity. *Acta Cardiol*, 2001, 56(5):283-287.
- [4] Palombo C, Malshi E, Morizzo C, et al. Arterial wave reflection during antihypertensive therapy with barnidipine: A 6-month, open-label study using an integrated cardiovascular ultrasound approach in patients with newly diagnosed hypertension. *Clin Ther*, 2009, 31(12):2873-2885.
- [5] Ohte N, Narita H, Sugawara M, et al. Clinical usefulness of carotid arterial wave intensity in assessing left ventricular systolic and early diastolic performance. *Heart Vessels*, 2003, 18(3):107-111.
- [6] Breed JG, Zimmerman AN, Dormans JA, et al. Failure of the antioxidant vitamin E to protect against adriamycin induced cardiotoxicity in the rabbit. *Cancer Res*, 1980, 40(6):2033-2038.
- [7] Arnolda L, McGrath B, Cocks M, et al. Adriamycin cardiomyopathy in the rabbit: An animal model of low output cardiac failure with activation of vasoconstrictor mechanisms. *Cardiovasc Res*, 1985, 19(6):378-382.
- [8] Bian Y, Sun M, Silver M, et al. Neuregulin-1 attenuated doxorubicin-induced decrease in cardiac troponins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297(6):H1974-H1983.
- [9] Urbanova D, Urban L, Danova K, et al. Natriuretic peptides: Biochemical markers of anthracycline cardiac toxicity? *Oncol Res*, 2008, 17(2):51-58.
- [10] Cardinale D, Sandri MT, Colombo A, et al. Prognostic value of troponin I in cardiac risks stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation*, 2004, 109(22):2749-2754.
- [11] Lenihan DJ, Massey MR, Baysinger KB. Superior detection of cardiotoxicity during chemotherapy using biomarkers. *J Card Fail*, 2007, 13(3):S151.
- [12] Gottdiener JS, McClelland RL, Marshall R, et al. Outcome of congestive heart failure in elderly persons: Influence of left ventricular systolic function. The cardiovascular health study. *Ann Intern Med*, 2002, 137(8):631-639.
- [13] Smith LA, Cornelius VR, Plummer CJ, et al. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Cancer*, 2010, 10:337-351.
- [14] Jannazzo A, Hoffman J, Lutz M. Monitoring of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Pharmacother*, 2008, 42(1):99-104.
- [15] Hughes AD, Parker KH, Davies JE. Waves in arteries: Are view of wave intensity analysis in the systemic and coronary circulations. *Artery Research*, 2008, 2(1):51-59.
- [16] Libby P, Bonow RO, Mann DL, et al. Braunwald's heart disease: A textbook of cardiovascular medicine. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Inc, 2008:534-535.