

Bioeffect of ultrasound combined with microbubble on normal rabbit cornea

HU Wen-jing¹, ZHANG Liang-ke², LI Pan³, WANG Zhi-gang³,
ZHOU Xi-yuan⁴, XU Chuan-shan³, ZHOU Shan-bi^{1*}

(1. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Institute of Ultrasonic Image, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 4. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the bioeffect of ultrasound (US) microbubble on rabbit normal cornea in different US intensity and exposure time. **Methods** The cornea were exposed to US under different parameters (US intensities: 0.5, 1.0, 2.0 W/cm²; US exposure time: 30, 60, 120 seconds), and then observed by corneal quantitative analysis and histopathological examination. **Results** There were significant differences among 0.5, 1.0 and 2.0 W/cm² in endothelial cell density and percentage of hexagonal ($P < 0.05$). US exposure time of 120 s caused more severe injury than the other two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Ultrasound microbubble can lower the threshold for cavitation by ultrasound energy. Limited ultrasound energy has great influence on corneal epithelium.

[Key words] Ultrasound microbubble; Cornea; Bioeffect

超声联合微泡对正常兔角膜组织的生物学效应

胡文静¹, 张良珂², 李攀³, 王志刚³, 周希媛⁴, 许川山³, 周善璧^{1*}

(1. 重庆医科大学附属第一医院眼科, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学药学院, 重庆 400016;
3. 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010; 4. 重庆医科大学附属第二医院眼科, 重庆 400010)

[摘要] **目的** 观察不同声强和辐照时间的超声破坏微泡对兔正常角膜组织的生物学效应。 **方法** 采用不同声强 (0.5 W/cm²、1.0 W/cm²、2.0 W/cm²) 和辐照时间 (30 s、60 s、120 s) 的超声作用于微泡干预的兔眼角膜, 并对角膜进行定量分析和病理组织观察。 **结果** 超声声强 1.0 W/cm²、2.0 W/cm² 与 0.5 W/cm² 组比较, 角膜组织损害严重, 内皮细胞密度和六角形细胞比例差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 超声辐照时间 120 s 与 30 s、60 s 比较, 内皮细胞密度和六角形细胞比例有差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** 超声联合微泡能明显增强角膜组织的空化效应, 且超声能量越大, 角膜组织损害越严重。

[关键词] 超声微泡; 角膜; 生物学效应

[中图分类号] R339.14; R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2009)01-0021-04

众多角膜疾病如角膜新生血管 (corneal neovascular, CNV) 可引起角膜混浊, 导致严重的视力障碍, 是角膜病致盲性眼病的主要原因之一, 且治疗效果不理想, 基因治疗成为目前的研究热点。超声微泡 (ultrasound microbubble) 可作为一种新型的体内基因转染载体, 达到基因高效、定向的转染目

的^[1]。本研究旨在观察不同超声声强及超声辐照时间下超声联合微泡与单纯超声对正常角膜组织的影响, 以探寻作用于角膜的适宜超声声强和辐照时间, 为超声微泡作为基因载体用于治疗角膜新生血管性疾病提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 正常新西兰大白兔 (雌雄不分) 42 只 (84 眼), 体重 2.0 ~ 2.5 kg, 由重庆医科大学动物中心提供。脂质体超声微泡由重庆医科大学超声影像学研究所提供, 其外壳为磷脂成分, 内充全氟丙烷气体 (C₃F₈), 微泡浓度为 4.5 ~ 5.6 × 10⁸ 个/ml, 大小均匀, 直径 (2.7 ± 0.8) μm, 储存于 -20℃ 冰箱内。采用由该研究所自行研制的 GCZZ 型超声基因转染治疗仪。超声波发射频率为 1 MHz, 声强范围 0.5 ~ 2.5 W/cm²,

[基金项目] 国家自然科学基金 (30430230), 科技部“863”计划 (2006AA02Z4F0)。

[作者简介] 胡文静 (1982 -), 女, 山东菏泽人, 在读硕士。研究方向: 角膜及眼表疾病。E-mail: hwj200820082008@163.com

[通讯作者] 周善璧, 重庆医科大学附属第一医院眼科, 400016。

E-mail: zhoushanbi@yahoo.com.cn

[收稿日期] 2008-05-09 **[修回日期]** 2008-09-24

发射时间可控,精确度为秒。

1.2 实验分组 第 1 部分 15 只实验动物,按不同干预措施分空白组、实验对照组和实验组,空白组(3 只)未施加超声,实验对照组(6 只)单纯给予超声辐照(声强 0.5 W/cm^2 ,辐照时间 30 s、60 s 各 3 只),实验组(6 只)结膜下注射微泡并给予超声辐照(参数同上)。第 2 部分 27 只实验动物,按超声声强 (0.5 、 1.0 和 2.0 W/cm^2) 和超声辐照时间 (30、60 和 120 s) 共分 9 组,每组 3 只。超声辐照间隔时间为 5 s。通过非接触角膜内皮显微镜和病理组织切片观察超声微泡对角膜上皮、基质、内皮细胞的影响。

1.3 动物模型制备 以速眠新 II $0.1 \sim 0.2 \text{ ml}$ 肌肉麻醉动物,联合盐酸奥布卡因滴眼液表面麻醉后,结膜下注射 0.2 ml 超声微泡,上睑局部涂抹足量超声耦合剂,使探头与上睑皮肤紧密结合,按上述方法进行超声照射。

1.4 观察指标

1.4.1 活体角膜内皮细胞形态学定量分析 超声辐照后 25 ~ 30 min 内,运用单盲法,以角膜中央作为统一测量区,通过 TOPCON SP2000P 非接触式角膜内皮显微镜观察角膜内皮细胞形态学变化。分别对角膜内皮细胞密度 (endothelial cell density, ECD) 和六角形细胞比例 (percentage of hexagonal, 6A) 进行定量分析。

1.4.2 角膜病理组织观察 超声辐照后 30 min 处死动物,角膜环钻钻取角膜片,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋,HE 染色,光学显微镜下观察。

1.5 统计学分析 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计学软件进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 42 只新西兰大白兔,实验过程中无脱失,全部进入结果分析。

2.2 超声微泡对角膜内皮细胞的活体形态影响

2.2.1 不同干预措施对 ECD 和 6A 的影响 超声声强为 0.5 W/cm^2 、辐照时间为 30 s 时,实验组与空白组、实验对照组比较,6A 差异有统计学意义 ($P < 0.05$),ECD 差异无统计学意义;超声声强为 0.5 W/cm^2 、辐照时间为 60 s 时,实验组与空白组、实验对照组比较,6A 和 ECD 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$,图 1)。

2.2.2 不同声强和不同辐照时间下对 ECD 和 6A 的影响 随声强增大,ECD 和 6A 均减小。 0.5 W/cm^2 组分别与 1.0 、

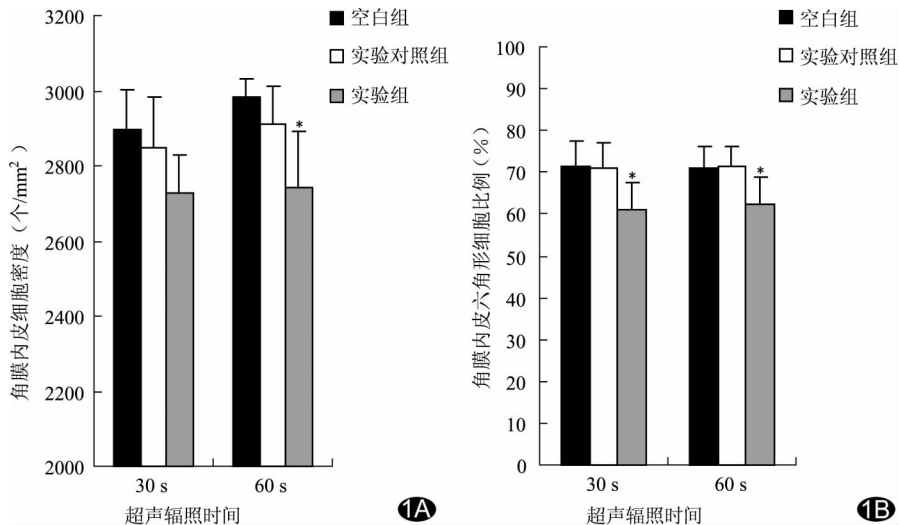


图 1 超声联合微泡不同干预措施对角膜 ECD 和 6A 的影响 A. 对 ECD 的影响; B. 对 6A 的影响(注: *:实验组分别与空白组和实验对照组比较, $P < 0.05$)

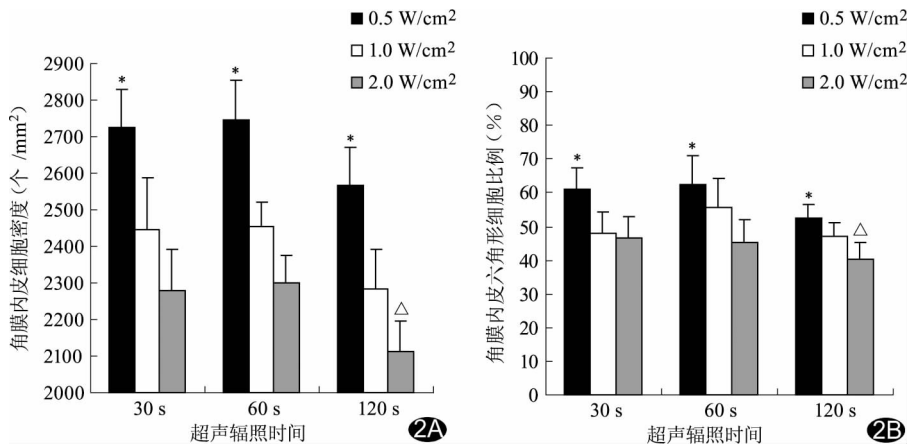


图 2 不同声强不同辐照时间下超声联合微泡对角膜 ECD 和 6A 的影响 A. 对 ECD 的影响; B. 对 6A 的影响 (* : 0.5 W/cm^2 、 1.0 W/cm^2 、 2.0 W/cm^2 三组两两比较, $P < 0.05$; Δ : 120 s 组分别与 30 s 组和 60 s 组比较, $P < 0.05$)

2.0 W/cm^2 组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。随辐照时间增加,30 s 组和 60 s 组 ECD 及 6A 差异无统计学意义 ($P > 0.05$),120 s 组分别与 30 s 组、60 s 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 2)。

2.3 超声微泡对角膜组织结构的影响

2.3.1 不同干预措施下角膜组织病理观察 实验对照组角膜上皮细胞层完整,排列较紧密;基质层,纤维细胞间无间隙;内皮细胞层,细胞呈扁平状,单层排列,紧密附着于后弹力层,与空白组比较组织损伤小。实验组上皮细胞层完整,基底细胞高柱状,未见基底细胞空泡化;基质层纤维细胞排列较紧密,纤维组织间隙无或微小;内皮细胞层细胞呈单层排列,扁平状,附着于后弹力层,细胞核清晰可见。

2.3.2 不同声强和不同辐照时间超声联合微泡对角膜组织病理观察 ①对角膜上皮细胞的影响: 0.5 W/cm^2 组和 1.0 W/cm^2 组上皮细胞层完整,细胞排列较紧密, 0.5 W/cm^2 组的 30 s 组未见基底细胞空泡化,而 1.0 W/cm^2 和

2.0 W/cm²组在不同的超声辐照时间均出现不同程度的空泡化(图3); 2.0 W/cm²组的上皮细胞层的表皮呈毛刷状,基底细胞高柱状,空泡化严重,尤其是120 s组(图3C)。②对基质层细胞的影响:随超声声强的增大,角膜基质层纤维出现不同程度的水肿,板层纤维间出现明显裂隙。0.5 W/cm²组基质层纤维细胞排列较紧密,纤维组织间隙无或小; 1.0 W/cm²组基质层纤维细胞排列疏松,裂隙明显增宽; 2.0 W/cm²组基质层细胞排列显著疏松,纤维细胞间存在明显间隙,120 s组损害尤其严重(图3C)。③对内皮细胞的影响: 0.5 W/cm²组角膜内皮细胞层细胞排列完整,扁平状,紧密附着于后弹力层,细胞核清晰可见(图3A); 1.0 W/cm²组内皮细胞层和后弹力层阶段性分离,细胞变形、肿胀,细胞核呈亚清晰状态(图3B); 2.0 W/cm²组内皮细胞层和后弹力层完全脱离,细胞肿胀增大,核增大,染色质不清晰,120 s组损害尤其严重(图3C)。

3 讨论

角膜内皮细胞是紧贴于角膜后弹力层的单层细胞,其正常的生理功能为保持角膜恒定的含水量,从而保持角膜透明性。角膜组织本身无血管,角膜上皮细胞和内皮细胞规则排列,实质纤维层亦规则排列,但角膜缘含丰富的血管网,角膜70%的营养供应和代谢所需能量,由角膜缘血管网供给。近来的研究显示,对角膜内皮细胞的密度、大小和形状进行形态学分析能反映内皮细胞的功能状态及损害程度,即角膜ECD和6A测定。

近年来超声对所作用组织生物学效应的研究颇多^[2-6]。超声破坏微泡破裂的瞬间,压力在单细胞水平能导致细胞死亡或产生可修复性声致孔隙效应,可导致微血管出血和组织结构断裂,因此空化效应可能产生有害的非治疗性的生物效应^[7]。Lu等^[8]的研究显示超声微泡介导基因转导方法会导致局部组织小范围坏死,可能是较强的空化效应使局部细胞坏死,但这种坏死不伴有炎症反应。彭小琼等^[9]报告超声破坏微泡对人乳腺癌细胞的杀伤程度与超声辐照时间、声强以及微泡浓度有关。Sonoda等^[10]发现体外培养的兔上皮细胞在不同超声辐照时间下没有显著性差异,不同的超声声强下,1.5和2.0 W/cm²组损害较大。

本实验发现,声强为0.5 W/cm²,超声联合微泡组与单纯超声组比较,6A逐建减小;单纯超声组与未施加超声组比较,角膜ECD和6A差异无显著统计学意义,说明超声联合微泡比单纯超声对角膜内皮细胞影响大。值得注意的是,辐照时间为30 s时,超声联合微泡组与未施加超声组和单纯超声组比较,6A降低的差异有显著统计学意义。细胞形态的评价描述比细胞密度测量对角膜内皮细胞早期病变更加敏感,定量

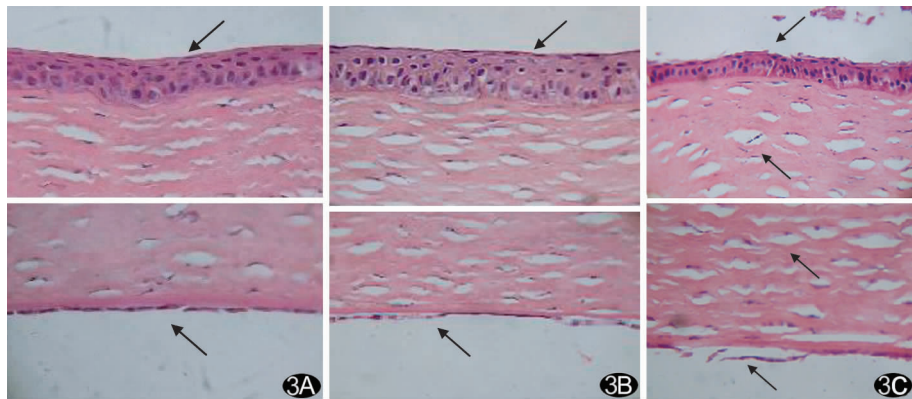


图3 不同超声声强辐照60 s角膜的显微变化 A. 超声声强为0.5 W/cm² 上皮细胞排列紧密,表层呈扁平状,基底细胞呈立方状(箭头);内皮细胞与后弹力层连接紧密(HE, ×400); B. 超声声强为1.0 W/cm² 上皮细胞层的基底细胞呈高柱状,细胞空泡化严重;内皮细胞与后弹力层阶段性脱离(箭头),内皮细胞肿胀,核疏松(HE, ×400); C. 超声声强为2.0 W/cm² 上皮细胞层的表皮细胞呈毛刷状,基底细胞高柱状,空泡化严重;基质层纤维组织间隙增大(箭头);内皮细胞与后弹力层脱离范围扩大,细胞肿胀,染色质不清晰(HE, ×400)

分析细胞图像所提供的内皮细胞的形态资料可以更准确地描述内皮细胞的群体状态,即可用6A的变化来反映内皮细胞的多形性。

由于兔眼角膜内皮细胞损伤后具有再生能力,而成人角膜内皮细胞是不可再生的,只能通过细胞变长、面积增大并向损伤区移行来修复损伤,因此选择适宜的超声参数是非常重要的。本实验结果表明,超声辐照120 s与30 s、60 s比较,ECD和6A减小明显;同期角膜病理组织检查发现内皮细胞肿胀,体积增大,说明120 s的辐照时间比30 s和60 s对角膜造成的损害更为严重。2.0 W/cm²、1.0 W/cm²与0.5 W/cm²比较,ECD和6A显著性下降,提示角膜内皮细胞功能受损;同期角膜病理组织学检查发现角膜上皮细胞层失去正常结构,基底细胞空泡化严重;内皮细胞肿胀、增大,细胞核染色质疏松,说明超声声强为2.0 W/cm²、1.0 W/cm²时比声强为0.5 W/cm²时角膜损害重。

本实验通过对角膜内皮细胞活体形态学和组织病理学研究,初步发现选择超声声强为0.5 W/cm²,辐照时间为30 s或60 s可能对角膜组织是合适的,为超声联合微泡治疗角膜新生血管性疾病提供了参考依据。

[参考文献]

- [1] Shohel RV, Chen S, Zhou YT, et al. Echocardiographic destruction of albumin microbubble directs gene delivery to the myocardium. *Circulation*, 2000, 101(22): 2554-2556.
- [2] Xu YQ, Chen XL, Xie MX, et al. Preliminary study of placental angioarchitecture of the rat and its biological effects with contrast-enhanced ultrasonography. *Chin J Med Imaging Technol*, 2008, 24(1): 5-8.
- [3] 许杨青, 陈欣林, 谢明星, 等. 大鼠胎盘超声造影灌注特征和生物效应的初步研究. *中国医学影像技术*, 2008, 24(1): 5-8.
- [3] Wang ZG, Ling ZY, Ran HT, et al. Experimental study on ultrasound-

mediated microbubble destruction deliver VEGF gene to myocardium of rats and its biological effects. Chin J Med Imaging Technol, 2003, 19(6): 656-658.

王志刚, 凌智瑜, 冉海涛, 等. 超声微泡造影剂对心肌组织的生物学效应及介导 VEGF 基因转染大鼠心肌的实验研究. 中国医学影像技术, 2003, 19(6): 656-658.

[4] Liu YF, Ren WD, Tang L, et al. High-efficiency gene transfection of HUVEC via ultrasound-mediated destruction of microbubbles in vitro. Chin J Med Imaging Technol, 2006, 22(2): 177-179.

刘玉凤, 任卫东, 唐力, 等. 超声介导声诺维提高人血管内皮细胞基因转染效率的体外实验研究. 中国医学影像技术, 2006, 22(2): 177-179.

[5] Wang JH, Liu LM, Wei J, et al. Comparative study of mouse embryos cells apoptosis induced by variant diagnostic dose of ultrasound. Chin J Med Imaging Technol, 2003, 19(10): 1270-1271.

王锦惠, 刘立民, 魏潜, 等. 不同频率诊断超声对小鼠早孕胚胎组织细胞凋亡影响的对比研究. 中国医学影像技术, 2003, 19(10): 1270-1271.

[6] Du LF, Ja YD. Influence of diagnostic ultrasound on corneal cell apop-

tosis in rats. Chinese Remedies & Clinics, 2002, 2(5): 293-295.

杜联芳, 贾亚丁. 诊断超声对大鼠角膜细胞凋亡的影响. 中国药物与临床, 2002, 2(5): 293-295.

[7] Wang ZX, Wang ZG. Treatment of ultrasound contrast agents for gene or drug delivery. Chin J Interv Imaging Ther, 2006, 3(4): 306-308.

汪朝霞, 王志刚. 超声微泡造影剂携基因或药物治疗研究. 中国介入影像与治疗学, 2006, 3(4): 306-308.

[8] Lu QL, Liang HD, Partridge T, et al. Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage. Gene Ther, 2003, 10(5): 396-405.

[9] Peng XQ, Wang ZG, Ran HT, et al. Bioeffect of echo-contrast agent on human mammary cancer cell during ultrasound exposure. China J Ultrasound Med, 2005, 21(11): 807-809.

彭晓琼, 王志刚, 冉海涛, 等. 低频超声辐照微泡造影剂对人乳腺癌细胞的生物学效应研究. 中国超声医学杂志, 2005, 21(11): 807-809.

[10] Sonoda S, Tachiban K, Uchino E, et al. Gene transfer to corneal epithelium and keratocytes mediated by ultrasound with microbubbles. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(2): 558-564.

Brodie's abscess: case report

慢性局限性骨脓肿 1 例

张富军

(解放军第 251 医院放射线科, 河北 张家口 075000)

[Key words] Bone abscess; X-rays [关键词] 骨脓肿; X 线

[中图分类号] R681.2; R814 [文献标识码] B [文章编号] 1003-3289(2009)01-0024-01

患者,男,16 岁。左足跟部反复疼痛 1 年加重 1 周入院。体检:局部稍肿,皮温正常,疼痛性质为酸胀样并不剧烈。X 线:左跟骨松质骨内见椭圆形骨密度减低区,边缘整齐,周围骨密度增高,骨密度增高区与正常骨之间无明确分界(图 1)。术中见病灶为肉芽组织,彻底刮除病灶,送病理报告为炎性肉芽组织。随访 2 个月未复发。

讨论 慢性局限性骨脓肿,由英国医生 Brodie 于 1930 年首先报告,故又称 Brodie 骨脓肿。多见于儿童及青少年,好发于胫骨上下端、股骨、肱骨和桡骨下端。发生于跟骨者报道较少。一般认为系低毒力细菌感染所致,或因身体抵抗力强使化脓性骨髓炎局限于骨髓的一部分。脓液培养常为阴性。在脓腔内,脓液逐渐被肉芽组织代替,肉芽组织周围因胶原化而形成纤维囊壁。X 线表现可见松质骨内圆形或椭圆形低密度骨质破坏区,边缘较整齐,周围骨密度增高为骨质硬化反应,硬化带与正常骨质间无明确分界。治疗须凿开脓肿腔,清除脓液,彻底刮除腔壁肉芽组织缝合伤口,滴注引流。

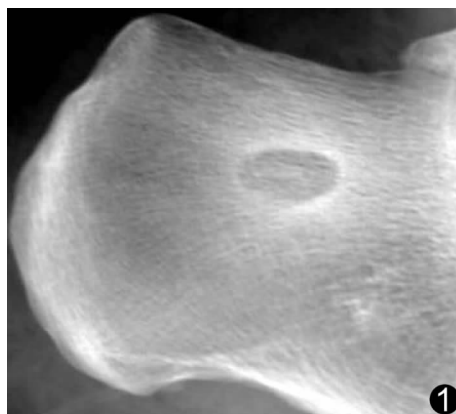


图 1 X 线平片 左跟骨松质骨内见椭圆形骨密度减低区

[作者简介] 张富军(1973 -),男,河北张家口人,学士,主治医师。

E-mail: zhangfujun1973@qq.com

[收稿日期] 2008-10-06 [修回日期] 2008-10-16