

❖ 实验研究

Manifestations of electron microscopy of targeted and non-targeted microbubble combined with urokinase in thrombolysis with ultrasound in vivo

GUAN Lina, WANG Chunmei, MU Yuming*

(Department of Echocardiography, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

[Abstract] **Objective** To explore the electron microscopy changes of thrombolysis using targeted and non-targeted microbubble combined with urokinase with diagnostic ultrasound in vivo. **Methods** Targeted microbubble with urokinase (UK) were prepared by Arg-Gly-Asp-Ser segments (RGDS), UK and microbubble through acoustic vibration. Thrombi were prepared in 30 New Zealand white rabbits with unilateral femoral artery, and all rabbits were divided into ultrasound (US) group, ultrasound+non-targeted microbubble+UK (US+M+UK) group and ultrasound+targeted microbubble+UK (US+RGDS+UK) group. The effect of thrombolysis was observed by ultrasound and Doppler flowmetry. The femoral artery was stained with HE and observed by electron microscopy. **Results** The blood flow of US+RGDS+UK group were significantly restored (all $P<0.05$) after 20 min compared with that of US group and US+M+UK group, and there were no significant differences between US group and US+M+UK group (all $P>0.05$). In US+M+UK group, HE staining shown that thrombi were filled in the lumens and platelet beams were grainy and not dense in HE staining. Scanning electron microscopy showed that a small amount of fine loose fibrin strands were attached while most of them were broken. Transmission electron microscopy revealed most of the thrombi were dissolved, and white blood cells or platelets degradation fragments were visible. In US+RGDS+UK group, HE staining shown that thrombi were completely dissolved, and destruction of fibrin and complete dissolution of fibrous network were observed by scanning electron microscopy. Transmission electron microscopy revealed that thrombi were degraded into particles of high electron density. **Conclusion** The major electron microscope changes of targeted microbubble and UK combined with diagnostic ultrasound are vacuolation of thrombus structure, complete disintegration of fibrin network structure and complete dissolution of fibrin.

[Key words] Microbubble; Thrombolytic therapy; Ultrasonography

DOI:10.13929/j.1003-3289.201606016

靶向和非靶向微泡联合尿激酶超声溶栓的电镜表现

关丽娜,王春梅,穆玉明*

(新疆医科大学第一附属医院心脏超声诊断科,新疆 乌鲁木齐 830054)

[摘要] **目的** 比较靶向和非靶向微泡联合尿激酶超声溶栓的电镜表现。**方法** 将精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸片段(RGDS)与尿激酶(UK)以及超声微泡(SonoVue)通过机械振荡法,制备成靶向微泡。于30只新西兰大白兔单侧股动脉制备在体混合性血栓,并分为单纯超声辐照组(US组)、超声辐照+非靶向微泡造影剂+UK组(US+M+UK组)、超声辐照+靶向微泡造影剂+UK组(US+RGDS+UK组)。通过超声及多普勒血流仪观察溶栓效果,然后对股动脉离体

[基金项目] 国家自然科学基金(30860267)。

[第一作者] 关丽娜(1977—),女(锡伯族),新疆伊犁人,博士,副主任医师。研究方向:心血管超声诊断与治疗。E-mail: sanjin_lsx@163.com

[通信作者] 穆玉明,新疆医科大学第一附属医院心脏超声诊断科,830054。E-mail: mym1234@126.com

[收稿日期] 2016-06-03 **[修回日期]** 2016-11-01

标本行 HE 染色,并观察电镜表现。**结果** 溶栓 20 min 后,与 US 组和 US+M+UK 组比较,US+RGDS+UK 组血流量明显恢复(P 均 <0.05),US 组与 US+M+UK 组比较差异无统计学意义(P 均 >0.05)。US+M+UK 组 HE 染色显示管腔内充满血栓,血小板呈颗粒状、不致密,扫描电镜示粗大束状的胶原纤维上疏松附着少量细小纤维蛋白丝,大部分断裂;透射电镜示血栓大部分溶解为空泡状,可见白细胞或血小板降解的碎片。US+RGDS+UK 组 HE 染色显示血栓完全溶解;扫描电镜示血栓的纤维网状结构被破坏,纤维蛋白完全的溶解;透射电镜示血栓降解为高电子密度的颗粒。**结论** 血栓结构的空泡化、纤维蛋白网架结构完全崩解和纤维蛋白的完全溶解是靶向微泡和 UK 联合溶栓的主要电镜改变。

[关键词] 微泡;溶栓治疗;超声检查

[中图分类号] R-332; R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2017)01-0001-05

由于血栓缺乏正常的胶原纤维和弹性纤维,质地坚硬易碎,弹性小,易被超声能量分裂和崩解^[1]。超声联合微泡技术可使聚集于血栓局部的微泡产生共振,微泡破裂可软化血栓;此外超声与微泡的共振效应可以拉长、切断或损坏血栓中的纤维,导致血栓崩解,从而增加纤溶酶与血栓的结合位点,加快其结合速度,进而加速纤溶^[2]。研究^[3-5]表明低频超声联合微泡及药物可溶解在体血栓,但其溶栓机制尚不明确。既往研究^[6]发现低频超声联合靶向微泡+药物和非靶向微泡+药物对血栓的溶解效果不同。本研究通过建立股动脉内混合性血栓动物模型,比较非靶向和靶向微泡联合尿激酶(urokinase, UK)超声溶栓的电镜表现,探讨低频超声联合靶向微泡和药物溶栓的可能机制。

1 材料与方法

1.1 制备微泡造影剂^[7] 靶向微泡造影剂的制备:按 UK(样品批号 20071011,注射级原料,南京南大药业生物化学有限公司)/精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸片段(Arg-Gly-Asp-Ser segments, RGDS)/造影剂微泡最优比例 1:1:1^[8] 配置,即 UK 3 mg (240 000 U/kg)、RGDS [含荧光标记的上述 UK (FITC-UK,杭州中肽生化有限公司特约合成)、荧光标记的 RGDS(5-TAMRA-RGDS,吉尔生化上海有限公司特约合成)] 3 mg、微泡造影剂(SonoVue) 3 ml,将 UK、RGDS、SonoVue 微泡混合振荡 30 s,制备成白色、乳状的微泡混悬液 6 ml。采用漩涡混合器(杭州 IKA MS)以 400 转/分振荡 60 s 后,室温下静置 30 min。

非靶向微泡造影剂的制备:将未标记 RGDS 的 SonoVue 微泡造影剂 3 ml 和 UK 3 mg 溶解于 3 ml 生理盐水中振荡,制备 6 ml 混悬液。采用漩涡混合器以 400 rot/min 振荡 60 s 后,室温下静置 30 min。

1.2 靶向微泡形态分析 将 1 ml 靶向微泡造影剂置于离心管中,加入等量的生理盐水,在超速离心机中离心 1 min(转速 400 rot/min),使微泡聚集于液相的顶部,去除下清液,加入生理盐水 1 ml,再放入超速离心机中离心 1 min(转速 400 rot/min)。重复洗涤 2 次,

进行提纯。分析靶向微泡的粒径;采用流式细胞仪(Beckman, CYTOMETER)分析洗涤前、后 UK 和 RGDS 的携带率,应用洗涤后的靶向微泡进行溶栓实验。

1.3 建立动物模型 选取新西兰大白兔 30 只,体重 1.8~2.8 kg。采用戊巴比妥钠(30~40 mg/kg 体重)麻醉,于耳缘静脉留置静脉套管针,建立静脉通道。将实验兔仰卧位保定,腹股沟区备皮,钝性分离股动脉,结扎其相应的侧支,游离股动脉长约 3~5 cm,于其后壁放置一大一小 2.5 cm×2.5 cm 的橡胶薄膜,以保护动脉周围组织。于股动脉的近心端放置 PWD 流量计(Transonic, TS420)监测血流量,监测数据由 PowerLab system (AD Instruments Pty Ltd)处理。采用一大一小 0.5 cm×0.5 cm 的浸有 10%三氯化铁(沈阳市新西试剂厂)溶液的滤纸片将股动脉环绕包裹,使接触面约为股动脉表面积的 3/4。待血流稳定后,将股动脉的远端夹闭,7~8 min 后取出动脉夹,约 20 min 后取出滤纸片,采用生理盐水冲洗局部组织。以流量计显示血流量 <0.05 ml/min,同时二维超声和 CDFI 均显示闭塞性血栓为血栓成功形成的标志。所有动物的处置均经新疆医科大学伦理委员会批准(批件号:20090317001),并按照相关规定处理。

1.4 实验分组 将 30 只新西兰大白兔随机分为单超声辐照组 (US 组)、超声辐照+非靶向微泡造影剂+UK 组 (US+M+UK 组)、超声辐照+靶向微泡造影剂+UK 组 (US+RGDS+UK 组),每组 10 只。US+M+UK 组和 US+RGDS+UK 组均于 5 min 内经耳缘静脉注射 3 ml 对应混悬液,于 20 min 内静脉缓慢推注剩余 3 ml 混悬液,后以生理盐水冲管。在完全闭塞性血栓形成后溶栓按 1 000 U/kg 体质量开始前注射。

1.5 超声检查 采用 GE Vivid 7 型超声诊断仪,高频探头 i13L,频率 5.7~11.4 MHz,输出功率-15 dB,机械指数 0.13,深度 3 cm;低频探头 M3S,频率 1.5~3.1 MHz,机械指数为 0.08。于血栓形成后,采用高频

探头采集二维及彩色多普勒图像,观察血栓的形成情况、血流变化。注射造影剂后,采用低频探头,启动二次谐波模式,将探头置于股动脉血栓处,照射 30 min,使造影剂微泡完全爆破,监测血栓变化,共观察 120 min^[8],帧频 27.5 帧/秒;并分别于超声辐照后 10、20、30、60、90、120 min 时记录血流量。

1.6 病理检查 实验结束后即刻结扎股动脉远、近端血管,取出股动脉。予过量麻醉处死动物。采用 4% 甲醛溶液固定标本,常规脱水、石蜡包埋、切片和 HE 染色。采用 4% 戊二醛固定股动脉标本,进行扫描电镜和透射电镜(JEOL JSM-1230, Nihon Denshi, Tokyo, Japan)检查。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计分析软件,所有数据均经正态分布和方差齐性检验,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,3 组血流量的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验;洗涤前、后尿激酶和 RGDS 携带率的比较采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

靶向微泡平均粒径大小约(1 095.4 ± 260.1)nm;洗涤前、后 UK 的携带率为(73.4 ± 11.0)%、(72.3 ± 9.4)%,RGDS 的携带率分别为(67.1 ± 10.9)%、(64.6 ± 10.2)%,差异均无统计学意义($\chi^2 = 5.8、6.3$, $P = 0.12、0.09$)。

溶栓后,二维声像图示 US 组和 US+M+UK 组股动脉壁均增厚、粗糙,腔内充满低回声实性团块,回声不均匀,CDFI 未探及明显血流信号,PWD 未见高幅脉冲血流信号,造影显示血栓内无强回声(图 1)。二维声像图示 US+RGDS+UK 组股动脉壁增厚、粗

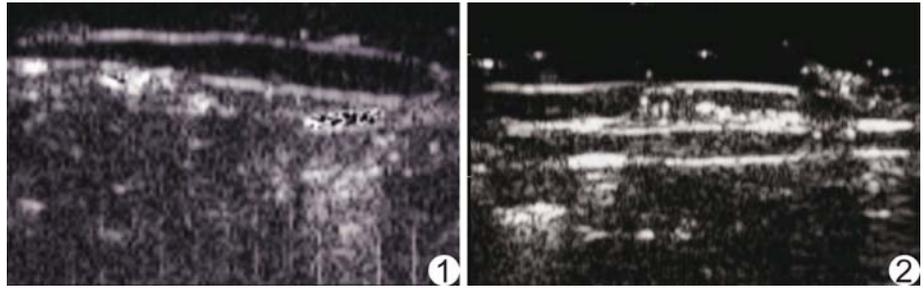


图 1 US+M+UK 组 造影显示股动脉内充满血栓,仅见散在的造影剂回声 图 2 US+RGDS+UK 组 血栓被完全溶解,管腔内充满强回声

糙,管腔通畅,CDFI 探及动脉血流信号,PWD 见高幅脉冲血流信号,造影显示血栓处呈强回声(图 2)。

溶栓前后血流量的变化见表 1。溶栓前 3 组血流量的比较差异无统计学($F = 2.981, P = 0.068$),溶栓 20 min 后,3 组血流量差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),且与 US 组和 US+M+UK 组比较,US+RGDS+UK 组血流量明显恢复,差异有统计学意义(P 均 < 0.05),US 组与 US+M+UK 组比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。

光镜下 HE 染色,US 组和 US+M+UK 组管腔内均充满血栓,血小板呈颗粒状、不致密;US+RGDS+UK 组未见血栓结构(图 3)。透射电镜见 US 组血小板排列较分散,局部聚集,部分碎裂,内部颗粒减少,空泡化(图 4A);US+M+UK 组血栓成分大部分溶解为空泡状,可见白细胞或血小板降解的碎片(图 4B);US+RGDS+UK 组可见大量降解碎片及降解颗粒,碎片内空泡化,未见完整细胞和血小板(图 4C)。扫描电镜见 US 组纤维蛋白丝较细,排列较稀疏,可见少量血小板,血管内膜表面区域性血栓脱落(图 5A);US+M+UK 组粗大束状的胶原纤维上疏松附着少量细小纤维蛋白丝,大部分断裂(图 5B);US+RGDS+UK 组纤维蛋白网架结构崩解,大部分溶解为细沙样,并见多处血细胞脱落后的空洞(图 5C)。

表 1 溶栓前后血流量的变化(ml/min, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	溶栓前	溶栓后					
		10 min	20 min	30 min	60 min	90 min	120 min
US 组	16.92 ± 2.34	3.06 ± 1.91	3.73 ± 5.66*	1.44 ± 1.32*	4.29 ± 6.71*	4.07 ± 6.74*	2.01 ± 3.02*
US+M+UK 组	20.11 ± 4.13	3.84 ± 5.22	2.08 ± 2.65*	4.92 ± 7.95*	4.53 ± 7.42*	1.13 ± 1.38*	2.55 ± 5.83*
US+RGDS+UK 组	19.43 ± 5.54	3.17 ± 2.41	7.43 ± 6.43	9.09 ± 6.14	13.09 ± 4.29	17.29 ± 4.42	17.09 ± 4.69
F 值	2.981	2.072	4.211	70.048	64.333	319.738	436.708
P 值	0.068	0.145	0.04	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: * :与 US+RGDS+UK 组比较, $P < 0.05$

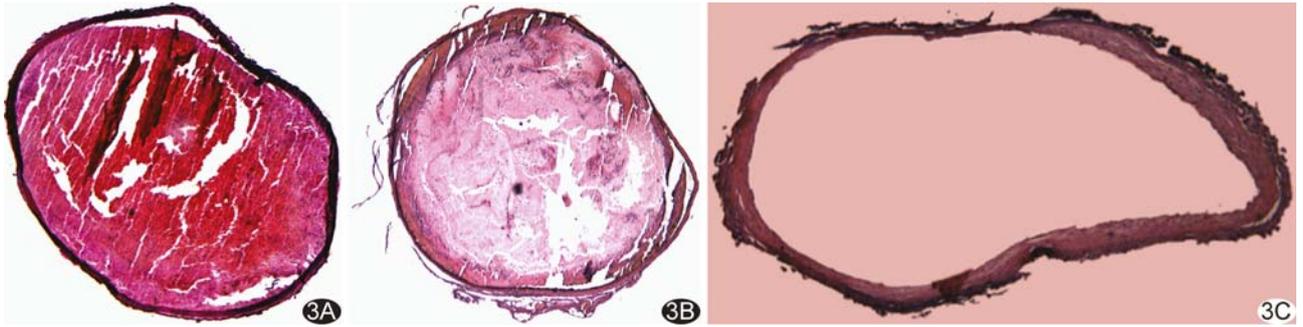


图 3 光镜下病理图(HE, ×4) A. US 组; B. US+M+UK 组; C. US+RGDS+UK 组

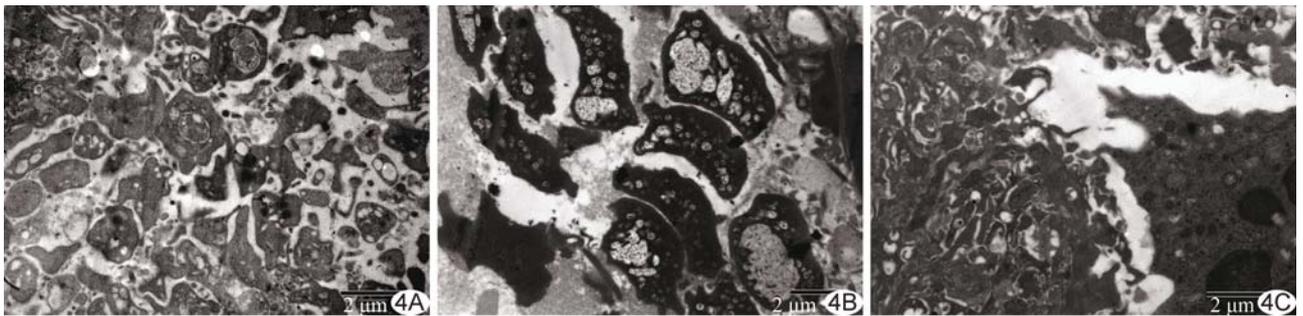


图 4 透射电镜下病理图(×600) A. US 组; B. US+M+UK 组; C. US+RGDS+UK 组

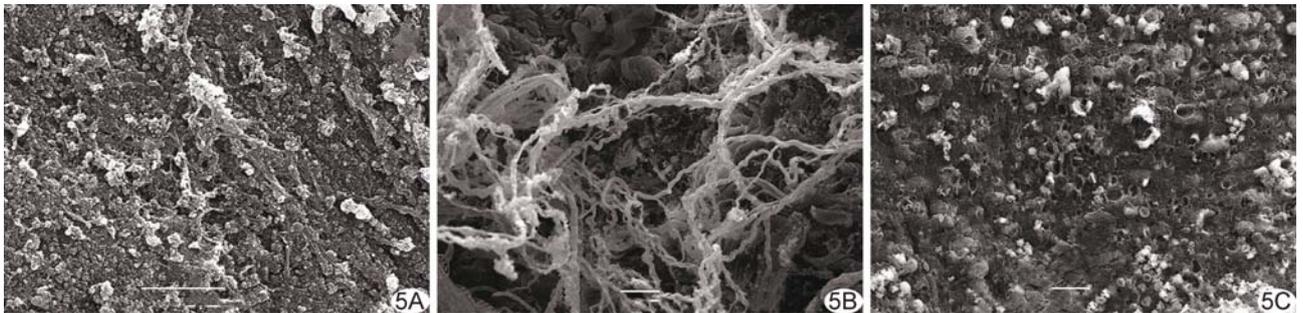


图 5 扫描电镜下病理图(×600) A. US 组; B. US+M+UK 组; C. US+RGDS+UK 组

3 讨论

本研究结果显示,US 组和 US+M+UK 组均未实现血管的再通,仅 US+RGDS+UK 组实现血管再通,且溶栓 20 min 后该组的血流量较另两组增加;但对其病理结果进行分析发现,3 组实验动物溶栓后无论是否实现血管完全再通,其溶栓表现具有一定的相似性,即血栓结构出现一定程度的空泡化,以及血栓空泡化的降解、血栓网状结构的破坏和纤维蛋白被溶解。既往研究^[9-11]表明,超声微泡产生的空穴效应和微流效应等是导致血栓溶解的主要机制。因此,本研究提示低频超声、靶向微泡、非靶向微泡在溶栓中通过发挥空穴效应和微流效应对血栓进行了不同程度的溶解,但对血栓的溶解程度不同,与既往的研究^[9-10]结果

相似。

本研究 US+M+UK 组为部分血栓溶解,未实现血管再通,电镜示血栓内粗大束状的胶原纤维上疏松附着少量细小纤维蛋白丝,大部分纤维网状结构断裂、纤维蛋白丝变细和血栓结构内发生空泡化;US+RGDS+UK 组纤维蛋白网架结构崩解,大部分溶解为细沙样,并见多处血细胞脱落后形成的空洞。两组溶栓后电镜表现有一定的相似性,但 US+M+UK 组由于 UK 及微泡无靶向性,故聚集在血栓局部的微泡数量和 UK 的剂量均较低,导致产生的空穴效应和微流效应均较弱,UK 对纤维蛋白的溶解作用未能有效发挥,因而未能实现血管的再通。

由于 RGDS 可与血栓内血小板表面糖蛋白 II b/

III a(GP II b/III a)受体特异性结合,故将微泡与 RGDS 连接制备具有靶向性的微泡。本研究中 US+RGDS+UK 组由于微泡具有靶向性,使得微泡大量聚集于血栓处,导致产生的空穴效应和微流效应较强;同时这些物理作用促进 UK 进入血栓内部,故溶栓效果达到最大化。此外,UK 在具有靶向性后会在血栓局部大量聚集,有助于血栓内部纤维蛋白的溶解,进而达到有效溶解血栓的目的。总之,低频超声、靶向微泡和 UK 可导致血小板和纤维素结构完全破坏,纤维网完全崩解,血栓被完全溶解,实现血管再通。

综上所述,低频超声联合靶向微泡和 UK 是通过超声、超声与微泡产生的空穴效应和微流效应、UK 对纤维蛋白的溶解等联合作用对血栓产生不同程度的破坏,最终导致血栓的完全溶解。其中,微泡和 UK 的靶向性可使这种联合溶栓作用获得最大程度的发挥。

[参考文献]

- [1] Chuang YH, Cheng PW, Li PC. Combining radiation force with cavitation for enhanced sonothrombolysis. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 2013, 60(1):97-104.
- [2] Meairs S, Alonso A, Hennerici MG. Progress in sonothrombolysis for the treatment of stroke. *Stroke*, 2012, 43(6):1706-1710.
- [3] Bader KB, Gruber MJ, Holland CK. Shaken and stirred: Mechanisms of ultrasound-enhanced thrombolysis. *Ultrasound Med Biol*, 2015, 41(1):187-196.
- [4] Sutton JT, Raymond JL, Verleye MC, et al. Pulsed ultrasound enhances the delivery of nitric oxide from bubble liposomes to ex vivo porcine carotid tissue. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9: 4671-4683.
- [5] Kandadai MA, Meunier JM, Hart K, et al. Plasmin-loaded echogenic liposomes for ultrasound-mediated thrombolysis. *Transl Stroke Res*, 2015, 6(1):78-87.
- [6] 美丽娜,穆玉明,王春梅,等.尿激酶 RGDS 微泡在体溶栓的血流频谱特点与可能机制的实验研究. *中华超声影像学杂志*, 2010, 19(11):997-1000.
- [7] Mu Y, Li L, Ayoufu G. Experimental study of the preparation of targeted microbubble contrast agents carrying urokinase and RGDS. *Ultrasonics*, 2009, 49(8):676-681.
- [8] Culp WC, Porter TR, Xie F, et al. Microbubble potentiated ultrasound as a method of declotting thrombosed dialysis grafts: Experimental study in dogs. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2001, 24(6):407-412.
- [9] Everbach EC, Francis CW. Cavitation mechanism in ultrasound-accelerated thrombolysis at 1 MHz. *Ultrasound Med Biol*, 2000, 26(7):1153-1160.
- [10] 夏红梅,高云华.超声与微泡在血栓性疾病诊断与治疗中的作用. *中国医学影像技术*, 2007, 23(2):307-309.
- [11] 钟渝,陈重,陈礼波,等.诊断超声联合微泡对肿瘤微循环的作用. *中国医学影像技术*, 2013, 29(5):688-692.

欢迎订阅 2017 年《介入放射学杂志》

《介入放射学杂志》是我国第一本有关介入放射学基础研究、临床应用等方面的学术性期刊,是中国科技核心期刊、《中国科技论文统计源期刊》、《中文核心期刊要目总览》临床医学/特种医学类核心期刊、中国科学引文数据库来源期刊、《中国生物医学文献数据库》(CBM)收录期刊、《中国学术期刊文摘》(CSAD-C)源期刊,并已进入俄罗斯《文摘杂志》(AJ OF VINITI)、荷兰《医学文摘》(EMBASE)等六个国际检索系统。据 2016 年版中国期刊引证研究报告,本刊 2015 年度核心影响因子为 1.093,在中国科技核心期刊综合评价核心影响因子排名第 195。本刊的宗旨是介绍介入放射学方面最新的学术成果和临床经验,内容涵盖神经介入、心脏介入、血管介入、肿瘤介入、非血管介入等方面,具有内容丰富、资料新颖、学术性强、编辑规范等特色,创刊以来受到国内外介入放射学界的重视与欢迎,对我国介入放射学事业起到了积极的推动和促进作用。2002 年曾被评为第三届华东地区优秀期刊。杂志为大 16 开铜版纸印刷。国内外公开发行。中国标准连续出版物号:ISSN 1008-794X, CN31-1796/R,可在全国各地邮局订购,邮发代号:4-634;也可直接向编辑部订购。为满足广大作者与读者的需要,本刊 2017 年为月刊,92 页,每月下旬出版,每期定价 15 元,全年 180 元。编辑部地址:上海市长宁区华山路 1328 号,邮政编码:200052,联系电话:021-62409496。