❖实验研究

Targeted contrast enhanced ultrasound for in vivo quantitative evaluation on angiogenesis in transplanted ovarian of rats

WANG Guodong[1], ZHANG Shan[1], DI Na[2], MU Yuming[1*]

(1. Department of Echocardiography, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China; 2. Department of Ultrasound, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the value of targeted contrast enhanced ultrasound (CEUS) using anti-Mullerian canal hormone (AMH) targeted nanobubbles (AMH-NB) for in vivo quantitative evaluation on ovarian neovascular density after ovarian auto-transplantation in SD rats. **Methods** The nanobubbles carrying anti-AMH antibody were prepared, and their basic physical properties were examined. Then ovarian auto-transplantation rat models were established. The targeted (AMH-NB), non-targeted (N-NB) contrast agents and SonoVue were administered on the 7th day after transplantation to obtain peak intensity (PI) and time to peak (TTP). The microvascular density (MVD) was measured using immunohistochemistry, and the correlation of PI, TTP and MVD were analyzed. **Results** The particle size of AMH-NB uniformly distributed, ranged (622.67±33.65)nm, and the concentration of AMH-NB was (2.90±0.26)×10^8/ml. PI of ovarian angiography with AMH-NB was (7.93±0.65)dB and TTP was (42.53±1.74)s, with N-NB was (6.14±0.44) dB and (54.35±1.73)s, with Sonovue was (4.15±0.83)dB and (28.71±1.18)s, respectively (all $P<0.05$). Immunohistochemical analysis showed that the microvascular density was (61.20±6.84)/HP, histological analysis indicated that AMH-NB were able to penetrate blood vessels to the interstitial space and combine with AMH. PI, TTP of AMH-NB were highly both correlated with MVD ($r=0.84$, $r=-0.84$, both $P<0.05$). **Conclusion** AMH-NB can be used to qualitatively and quantitatively evaluate the angiogenesis in transplanted ovarian of rats in vivo with CEUS.

[**Keywords**] ultrasonography, interventional; microbubbles; neovascularization, physiologic; rats

DOI: 10.13929/j.issn.1003-3289.2020.08.007

靶向超声造影在体定量评价大鼠移植后卵巢新生血管

王国栋[1], 张 姗[1], 狄 娜[2], 穆玉明[1*]

(1. 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 830000;
2. 中山大学孙逸仙纪念医院超声科, 广东 广州 510120)

[**摘 要**] **目的** 观察以抗苗勒管(AMH)激素靶向纳米泡(AMH-NB)为超声造影剂在体定量评价大鼠自体卵巢移植后新生血管密度的价值。**方法** 制备 AMH-NB 并检测其基本物理特性。建立大鼠自体卵巢移植模型,于术后第 7 天行靶向(AMH-NB)、非靶向(N-NB)及声诺维(SonoVue)超声造影,获得峰值强度(PI)和达峰时间(TTP)。以免疫组织化学法检测微血管密度(MVD),并对 PI、TTP 与 MVD 进行相关性分析。**结果** 所制备的 AMH-NB 粒径(622.67±33.65)nm,分布均匀,浓度(2.90±0.26)×10^8/ml。AMH-NB 超声造影显示卵巢 PI 为(7.93±0.65)dB,TTP 为(42.53±1.74)s;N-

[**基金项目**] 自治区科技支疆项目计划(2018E02062)、中国博士后科学基金(2019M653903XB)。

[**第一作者**] 王国栋(1995—),男,新疆可克达拉人,在读硕士。研究方向:心血管超声。E-mail: 1498217112@qq.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,830000。E-mail: mym1234@126.com

[**收稿日期**] 2020-02-08 [**修回日期**] 2020-04-22

NB 造影 PI 为(6.14±0.44)dB,TTP 为(54.35±1.73)s;声诺维造影 PI 为(4.15±0.83)dB,TTP 为(28.71±1.18)s(*P* 均<0.05)。免疫组织化学分析显示移植后卵巢微血管密度为(61.20±6.84)/HP,组织学分析 AMH-NB 可穿过血管内皮细胞间隙进入组织间隙并与 AMH 结合。AMH-NB 造影所示 PI、TTP 与 MVD 呈高度相关(*r*=0.84、−0.84,*P* 均<0.05)。**结论**　利用 AMH-NB 进行超声造影可实现定性、定量评价大鼠移植后卵巢新生血管。

[**关键词**]　超声检查,介入性;微泡;新生血管形成,生理学;大鼠
[**中图分类号**]　R-332;R445.1　[**文献标识码**]　A　　[**文章编号**]　1003-3289(2020)08-1147-06

卵巢移植技术为卵巢功能衰退患者提供了一种保存生育能力的有效方法[1-2]。移植后卵巢部位血管生成速度和密度直接影响卵巢存活和功能恢复[3],但长期以来缺乏在体评价移植后卵巢新生血管状态的无创方法[4]。LI 等[5]发现,通过连接肿瘤血管特异性配体,以靶向造影剂进行超声造影,可检测肿瘤新生血管。抗苗勒管激素(anti-Mullerian canal hormone, AMH)仅由卵巢颗粒细胞特异性分泌,其他组织少有表达[6-7]。本研究尝试通过制备具有卵巢组织靶向性的 AMH-靶向纳米泡(AMH-targeting nanobubble, AMH-NB),实现在体无创评价大鼠移植后卵巢新生血管。

1　材料与方法

1.1　实验动物及模型制备　选取 SD 雌性大鼠 10 只,鼠龄 7～8 周,体质量 200～220 g,由新疆医科大学动物实验中心提供,伦理审查批准编号(SYSU-LACUC-2019-B463)。以 3% 戊巴比妥钠腹腔注射(45 mg/kg体质量)麻醉动物,摘除两侧卵巢后,立即将一侧卵巢皮质移植到右侧腹股沟区皮下,之后荷包缝合皮肤,建立大鼠自体卵巢移植模型[8]。将手术次日记为移植后第 1 天。

1.2　材料与设备　造影剂声诺维(SonoVue,Bracco 公司),AMH 抗体(北京 Bioss 公司),免疫组织化学一抗 CD34(Abcom 公司),二抗即用型山羊抗兔二步法试剂盒,荧光二抗为 AF-488,红细胞计数板。纳米泡粒径检测仪 ZETASIZER Nano-ZS90,GE-vivid 7 超声诊断仪,高频探头 i13L,频率 14 MHz。

1.3　制备非靶向微泡(non-targeting nanobubble, N-NB)和 AMH-NB　采用“薄膜水化法”制备 N-NB[9],以“亲和素-生物素”桥接法构建 AMH-NB[10]。采用共聚焦显微镜检测 AMH 是否与纳米泡连接。

1.4　超声造影　术后第 7 天麻醉并保定动物,选取造影模式,机械指数 0.06,记录时间为 10 min,经尾静脉团注 6×10^6/ml 造影剂 0.1 ml,对全部大鼠分别随机采用 3 种造影剂(SonoVue、N-NB 和 AMH-NB)进行 3 次检查,每次间隔 30 min。由 2 名分别具有工作 7、8 年工作经验的超声医师采用双盲法分析数据,通过造影时间-强度曲线获取峰值强度(peak intensity, PI)和达峰时间(time to peak, TTP)。

1.5　病理和免疫荧光分析　完成造影后,取 9 只大鼠,分为 3 组(每组 3 只),每组分别注入 1 种造影剂,之后处死动物,留取移植后卵巢组织。参照刘艳丽等[11]方法以 4% 甲醛固定标本,石蜡包埋切片,行 HE 染色,并以 SP 法行 CD34 免疫组织化学染色。于光学显微镜下随机选取 5 个高倍镜视野(HP)计数呈棕黄色的阳性血管,取平均值作为卵巢微血管密度[4](microvascular density, MVD)。制备冰冻切片,厚度为 5 μm,经甲醇固定,加入一抗 AMH 抗体(1∶100 稀释),放入湿盒内 4℃过夜;之后加入荧光二抗 AF-488(1∶100 稀释),显色,脱水,封片,观察携带 DiL 的红色微泡在血管内外及其在组织间隙的微泡是否与 AMH 抗体结合。

1.6　统计学分析　采用 SPSS 25.0 统计分析软件。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,行两独立样本 *t* 检验;用单因素方差分析进行多组比较,两两比较采用 *LSD* 法。采用 *Pearson* 相关性分析或线性回归分析观察 PI、TTP 与 MVD 的相关性:$|r|\geq0.8$ 高度相关性,$0.5\leq|r|<0.8$ 中度相关性,$0.3\leq|r|<0.5$ 低度相关性,$0<|r|<0.3$ 弱相关。$P<0.05$ 差异有统计学意义。

2　结果

2.1　N-NB 和 AMH-NB 表征　纳米泡肉眼观为乳白色,光学显微镜下呈圆形结构。表面连接 AMH 抗体后的 AMH-NB 在激光共聚焦显微镜下呈绿色环状,分布均匀(图 1)。ZETASIZER Nano-ZS90 及红细胞计数板检测的 N-NB、AMH-NB 直径、浓度差异均有统计学意义(*P* 均<0.05,表 1)。

表 1　N-NB 与 AMH-NB 微泡直径及浓度比较($\bar{x}\pm s$)

微泡	直径(nm)	浓度($\times10^8$/ml)
N-NB	473.33±28.02	3.50±0.20
AMH-NB	622.67±33.65	2.90±0.26
t 值	5.91	3.17
P 值	<0.01	0.04

2.2　二维超声及超声造影　二维超声观察，移植后卵巢均见包膜形成。图 2 为 SonoVue、N-NB 及 AMH-NB 超声造影图像，单因素方差分析 3 组间造影参数 PI、TTP 差异均有统计学意义（F=83.04、666.17，P 均<0.05，表 2），两两比较差异均有统计学意义（P 均<0.05）。

2.3　病理　肉眼观察移植物表面呈粉红色具有光泽，可见丰富血管爬行其上，卵巢移植成功率为 100%。光镜下移植后卵巢中可见未凋亡的卵泡，其形态正常。免疫组织化学 CD34 结果显示移植后卵巢组织的 MVD 平均值为（61.20±6.84）/HP（图 3）。激光共聚焦观察，组织免疫荧光 AMH-NB 进入组织间隙与 AMH 结合，呈黄色（图 4）。

2.4　相关性分析与线性回归分析　移植后卵巢 MVD 与 AMH-NB 造影所见 PI、TTP 呈高度相关（r=0.84、−0.84，P 均<0.05），SonoVue（r=0.67、−0.71，P 均<0.05）、N-NB（r=0.65、−0.68，P 均<0.05）造影所见 PI、TTP 分别与 MVD 呈中度相关（图 5）。

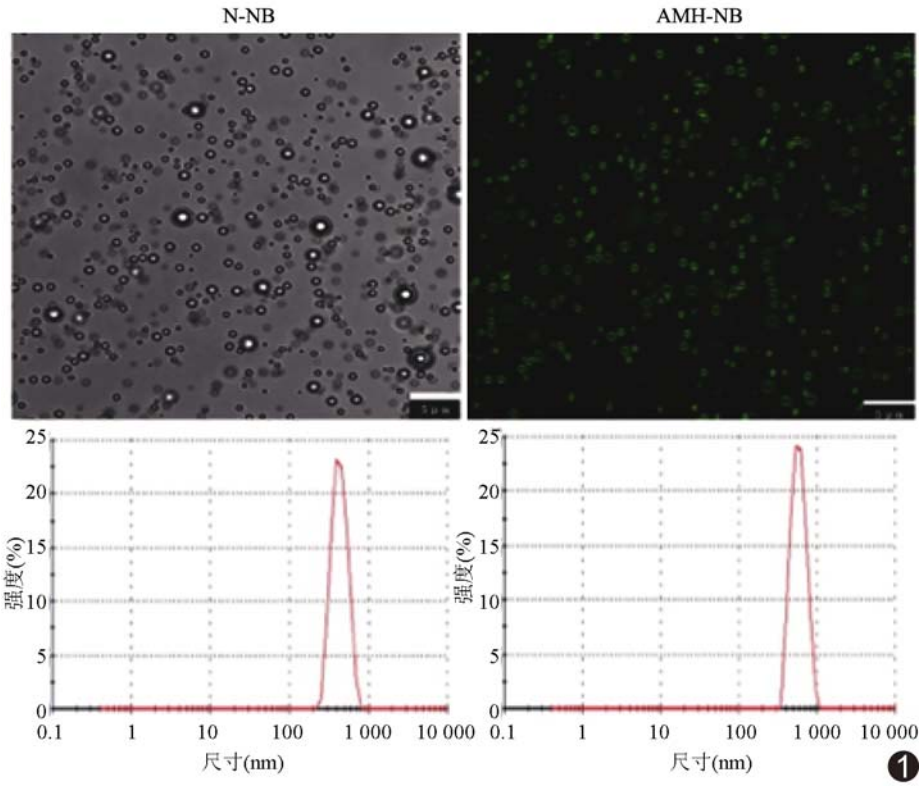

图 1　N-NB 和 AMH-NB 形态和粒径分布曲线图　显微镜下观察，微泡分布均匀，NB 表面成功携带 AMH 抗体表达绿色（×400）

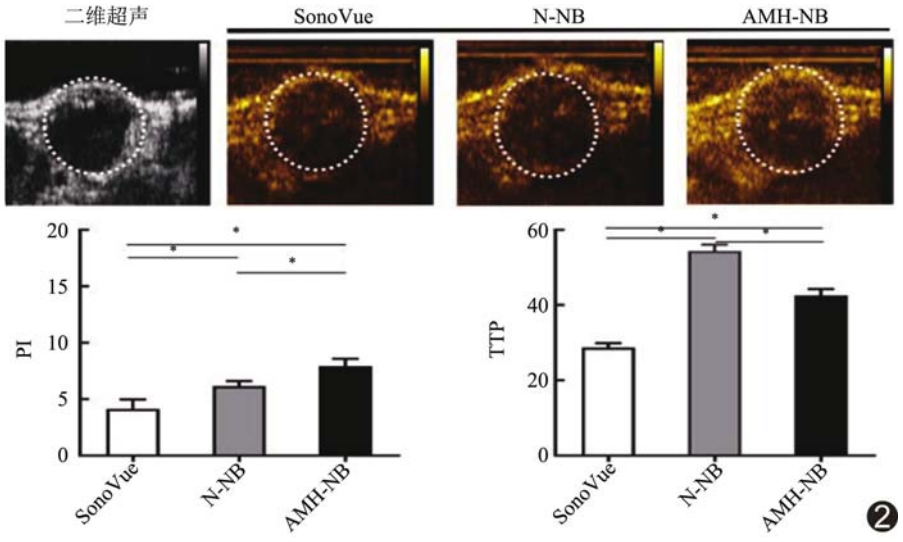

图 2　超声造影图像及参数分析 白圈示 ROI，AMH-NB 超声造影增强幅度高于 SonoVue 及 N-NB（*：P<0.05）

3　讨论

AMH 与卵巢移植物的存活及卵泡功能密切相关。研究[12]显示，通过检测 AMH 水平，可评价移植卵巢是否成活。血管相关抗体如 CD31 和血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）被广泛用于血管靶点，但并无特异性，且卵巢移植物属乏血供器官，常规血管相关靶点并不能敏感识别其内新生血管，故本研究以 AMH 作为靶向超声造影的靶点。

制备靶向超声造影剂是实现靶向显影的前提。本研究所制备的造影剂 N-NB 及 AMH-NB 粒径均达到纳米级；NB 携带抗体后粒径明显大于非靶向纳米泡，浓度也明显低于非靶向纳米泡，可能是携带抗体过程中需要反复离心和洗涤纳米泡所致，但 AMH-NB 的粒径仍为纳米级且浓度仍维持在 2.9×10^8/ml，而体

表 2　采用 3 种造影剂进行超声造影所见大鼠移植卵巢组织参数 PI、TTP 比较($\bar{x}\pm s$)

造影剂种类	PI(dB)	TTP(s)
SonoVue	4.15±0.83	28.71±1.18
N-NB	6.16±0.44	54.35±1.73
AMH-NB	7.93±0.65	42.53±1.74
F 值	83.04	666.17
P 值	<0.01	<0.01

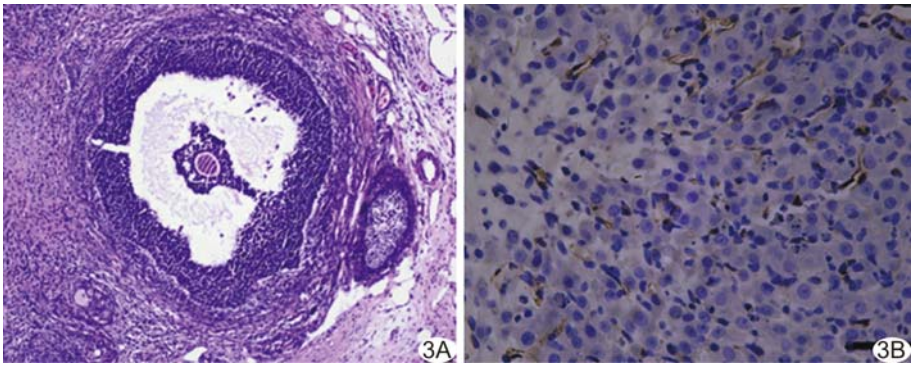

图 3　病理组织学分析　A. 光镜下观察 HE 染色片(×200)可见卵泡形态正常；B. CD34 免疫组织化学染色(×400)见移植后卵巢新生血管表达，呈棕黄色

内实验所用微泡浓度为 6×10^6/ml，对后续实验并无影响。

研究[13]表明，纳米泡的血管外渗能力优于普通微泡，其 PI 更高。本研究显示 N-NB 的 PI 较 SonoVue 增强 1.5 倍(6.16±0.44 vs 4.15±0.83)，可能因为纳米泡粒径较小，能克服普通微泡的局限性，通过血管内皮间隙进入卵巢组织间隙，增强渗透效应，利于保留，实现被动靶向作用[14]，集聚的纳米泡表现出较持续的超声增强显影效果，这一特性也为纳米泡靶向探测卵巢特异性表达分子奠定了基础。GAO 等[15]报道，与非靶向纳米泡相比，靶组织对靶向纳米泡的摄取增强。本研究 AMH-NB 造影所示 PI 较 N-NB 增高 1.3 倍(7.93±0.65 vs 6.16±0.44)，组织免疫荧光成像显示 NB 在移植后卵巢组织间隙中呈现高度聚集状态，提示 AMH-NB 与 AMH 成功结合，进一步证实了 AMH-NB 的靶向性，与 LI 等[16]的研究

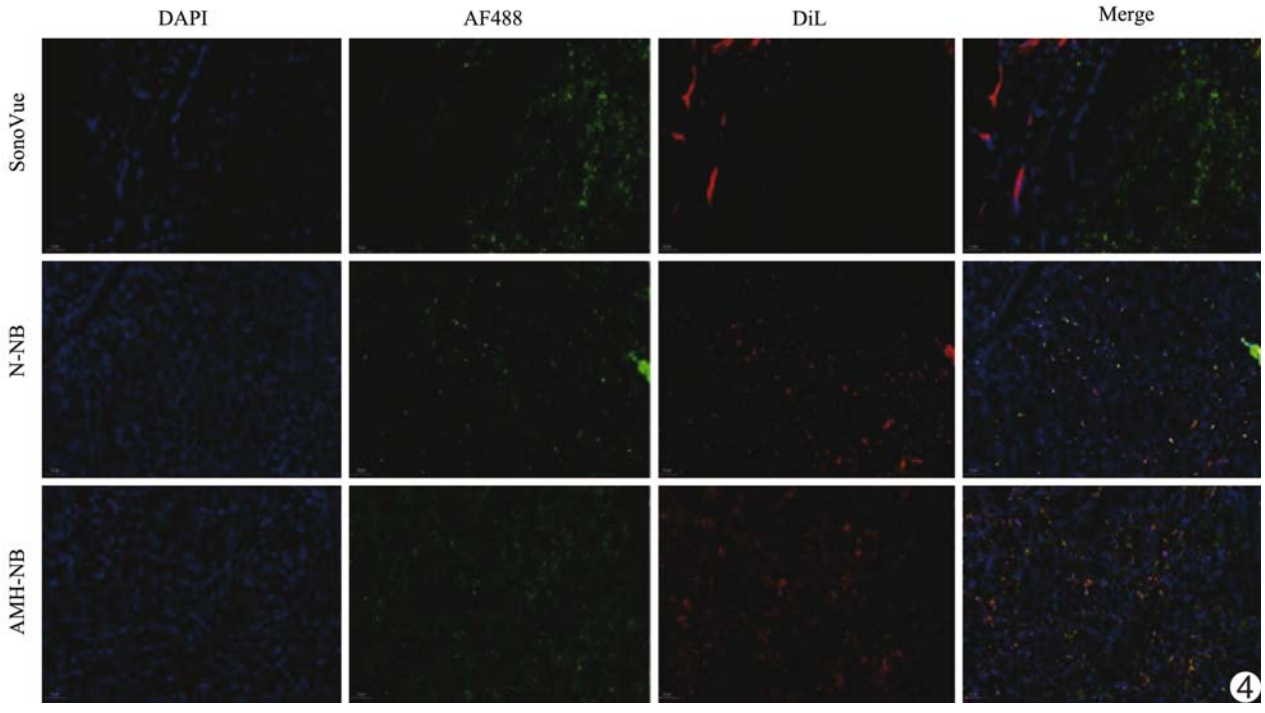

图 4　病理组织免疫荧光(×400)细胞核 DAPI 染色表达蓝色荧光，AMH 抗体染色表达绿色荧光，携带 Dil 的微泡表达红色荧光。SonoVue 红色微泡不进入组织；N-NB 红色微泡可在卵巢组织间隙表达，不与 AMH 结合；AMH-NB 的组织间隙有大量红色微泡表达，在 Merge 中可与 AMH 结合，呈棕黄色

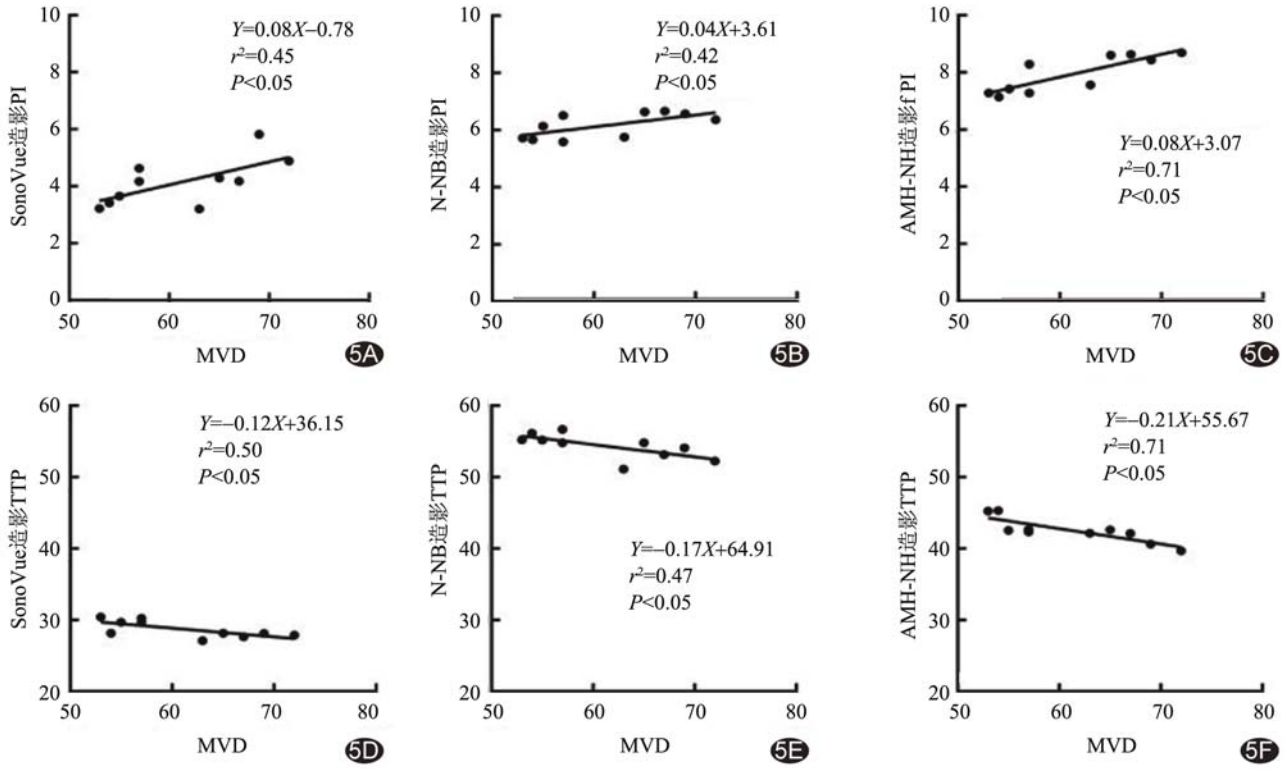

图 5　相关性分析 SonoVue、N-NB、AMH-NB 造影所示 PI 与 MVD 的线性回归方程（A～C）及 SonoVue、N-NB、AMH-NB 造影所示 TTP 与 MVD 的线性回归方程（D～F）

结果一致，提示 AMH 是良好的分子影像学靶点。本研究针对大鼠自体移植卵巢，理论上亦适用于同样分泌 AMH 的异体移植卵巢[17]，通过 AMH-NB 可实现对移植后卵巢组织的靶向显影，并增强靶组织摄取解决了以往微泡不能进入组织间隙实现全面显影的难题。

本研究 SonoVue 造影所示 TTP 明显早于 NB，其原因如下：①SonoVue 是血池显像剂，通过血管内皮间隙进入组织需要一定时间[18]；②血管管径越小，其阻力越大[19-20]，NB 较 SonoVue 灌注的血管更细小、阻力更大，导致 TTP 延迟。AMH-NB 的 TTP 较 N-NB 提前，可能是进入组织间隙的 AMH-NB 微泡能够快速与 AMH 结合，故 TTP 较快。通过比较 TTP 进一步验证了 AMH-NB 可增强移植后卵巢组织的靶向显影。

既往研究[21]于大鼠卵巢移植后第 3 天观察到毛细血管芽，5～10 天可见完整的微血管网。MVD 是评价新生血管的金标准[4]。本研究通过 CD34 染色证实卵巢移植物存在新生血管表达，相关性分析结果显示 AMH-NB 造影所示 PI、TTP 值与 MVD 呈高度相关，而 SonoVue 和 N-NB 造影所示 PI、TTP 值与 MVD 呈中度相关，表明以 AMH-NB 进行超声造影能有效量化评价大鼠移植卵巢的微血管密度。

本研究的不足之处：未能确定 AMH-NB 超声造影最佳造影参数；仅观察了移植后 7 天卵巢早期新生血管，AMH-NB 超声造影对移植后卵巢的长期检测效果有待验证。

[参考文献]

[1] 陈峪，宋晓婕，聂华，等. 卵巢移植技术的研究进展[J]. 武汉大学学报(医学版)，2018，39(1)：26-29.

[2] 丁岩，王翔，华克勤. 完整卵巢移植的研究进展[J]. 上海医学，2016，39(7)：441-446.

[3] XIA X，YIN T，YAN J，et al. Mesenchymal stem cells enhance angiogenesis and follicle survival in human cryopreserved ovarian cortex transplantation [J]. Cell Transplant，2015，24(10)：1999-2010.

[4] WEIDNER N. Tumour vascularity and proliferation：Clear evidence of a close relationship[J]. J Pathol，1999，189(3)：297-299.

[5] LI X，STAUB D，RAFAILIDIS V，et al. Contrast-enhanced ultrasound of the abdominal aorta-current status and future perspectives[J]. Vasa，2019，48(2)：115-125.

[6] DEWAILLY D，ANDERSEN C Y，BALEN A，et al. The

physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women [J]. Hum Reprod Update, 2014,20(3):370-385.

[7] BROER S L, BROEKMANS F J, LAVEN J S, et al. Anti-Mullerian hormone: Ovarian reserve testing and its potential clinical implications [J]. Hum Reprod Update, 2014, 20(5): 688-701.

[8] 李明,吕厚辰,尹鹏滨,等.两种卵巢切除术式建立大鼠骨质疏松模型的优势比较[J].解放军医学院学报,2015(4):383-387.

[9] YANG H, CAI W, XU L, et al. Nanobubble-Affibody: Novel ultrasound contrast agents for targeted molecular ultrasound imaging of tumor[J]. Biomaterials, 2015,37:279-288.

[10] YAN F, SUN Y, MAO Y, et al. Ultrasound molecular imaging of atherosclerosis for early diagnosis and therapeutic evaluation through leucocyte-like multiple targeted microbubbles [J]. Theranostics, 2018,8(7):1879-1891.

[11] 刘艳丽,赵晓徽,随笑琳.肉芽组织内自体移植大鼠卵巢组织卵泡存活的研究[J].天津医科大学学报,2010,16(4):580-582.

[12] 高旭婷,王波.抗缪勒氏管激素的临床研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(A0),134-134,138.

[13] WU H, ABENOJAR E C, PERERA R, et al. Time-intensity-curve analysis and tumor extravasation of nanobubble ultrasound contrast agents [J]. Ultrasound Med Biol, 2019, 45(9): 2502-2514.

[14] STENDAHL J C, SINUSAS A J. Nanoparticles for cardiovascular imaging and therapeutic delivery, Part 1: Compositions and features[J]. J Nucl Med, 2015,56(10):1469-1475.

[15] GAO Y, HERNANDEZ C, YUAN H X, et al. Ultrasound molecular imaging of ovarian cancer with CA-125 targeted nanobubble contrast agents[J]. Nanomedicine, 2017, 13(7): 2159-2168.

[16] LI W, ZHANG L, ZHU Y, et al. Improving ovarian cancer imaging with LHRH-NBs: An experimental study [J]. Arch Gynecol Obstet, 2016,294(3):631-638.

[17] 杨旭,黑长春,张晓光,等.小鼠卵巢玻璃化冻存后异体移植对卵巢衰竭模型鼠卵巢功能的影响[J].宁夏医学杂志,2012,34(9):830-832,820.

[18] YIN T, WANG P, ZHENG R, et al. Nanobubbles for enhanced ultrasound imaging of tumors[J]. Int J Nanomedicine, 2012,7: 895-904.

[19] 江虹虹,李安华,周建华,等.肝细胞癌造影增强模式与微血管相关性系列研究(二)[J].中国超声医学杂志,2008,24(2):158-161.

[20] 林庆光,邹如海,王建伟,等.超声造影对肝细胞癌微血管形态术前分型的可行性[J].中华医学超声杂志(电子版),2015(6):453-458.

[21] LADANYI C, MOR A, CHRISTIANSON M S, et al. Recent advances in the field of ovarian tissue cryopreservation and opportunities for research[J]. J Assist Reprod Genet, 2017,34(6):709-722.

2019 年中国学术期刊影响因子年报
——《中国医学影像技术》

“2019 年中国学术期刊影响因子年报”于 2019 年 10 月 28 日由中国科学文献计量评价研究中心在北京会议中心发布。《中国医学影像技术》杂志在期刊综合类的相关数据为：

1 影响力指数 CI 值:418.509;

2 总被引:3817;

3 影响因子:0.962;

4 他引影响因子:0.730;

5 5 年影响因子:0.723;

6 即年指标:0.148。