

❖ 实验研究

Bioeffects on canine myocardium under microbubbles destruction using multifunctional intracardiac echocardiography catheter

QIAN Jun^{1,2}, HUANG Jing^{1,2*}, GUO Rui^{1,2}, YANG Ya^{1,2}, LIU Di-chuan^{1,2},
DENG Chang-ming^{1,2}, WANG Zhi-gang^{1,3}

(1. Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Department of Cardiology, 3. Department of Ultrasonography, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To explore the bioeffects on canine myocardium under microbubbles destruction using multifunctional intracardiac echocardiography (ICE) catheter, in order to investigate a new way for gene treatment of ischemic heart disease. **Methods** Fifteen canines were randomly allocated to ultrasound+microbubble group, ultrasound group and control group, each group had 5 animals. The catheter was delivered into the left ventricle using interventional method. Ultrasound irradiation (1 W/cm²) was applied to expose canine myocardium for 1 min after intramyocardial injection of 0.5 ml microbubbles in ultrasound+microbubble group. Animals in ultrasound group only received ultrasound irradiation, and the other 5 animals in control group accepted catheterization only. All the animals were killed 3 days after operation. The myocardium was harvested for HE staining and observed with microscope. **Results** The depth of the injection needle, the procedure of microbubbles injection and irradiation could be monitored by ICE imaging. All animals survived during follow-up period. The myocardium of hyperemia, myocardial cell gaps widen, pale cytoplasm dyed and microvascular wall burst could be seen in ultrasound+microbubble group. The myocardium of hyperemia was relative slight in ultrasound group and without any exception appearance in control group. **Conclusion** Ultrasound mediated microbubbles destruction using this multifunction catheter can induce corresponding bioeffects. ICE imaging can achieve monitoring of intramyocardial injection of microbubbles and provide information of ultrasound irradiation. This multifunctional intracardiac echocardiography catheter may provide a new, safe and more effective strategy for gene treatment of ischemic heart disease.

[Key words] Echocardiography; Heart catheterization; Microbubbles; Ultrasound irradiation

经多功能心腔内超声导管超声辐照破坏微泡对犬心肌组织的生物学效应

钱俊^{1,2}, 黄晶^{1,2*}, 郭睿^{1,2}, 杨亚^{1,2}, 刘地川^{1,2}, 邓昌明^{1,2}, 王志刚^{1,3}

(1. 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学附属第二医院心血管内科, 3. 超声科, 重庆 400010)

[摘要] **目的** 观察经多功能心腔内超声(ICE)导管超声辐照破坏微泡对动物心肌产生的生物学效应, 探索基因治疗缺血性心脏病的新方法。 **方法** 15只犬随机分为US+MB组、US组、对照组3组, 每组5只。以介入法将多功能ICE导管送入犬心室。对US+MB在ICE监控下向左心室游离壁注射0.5 ml微泡, 并以1 W/cm²的声能对注射部位辐照

[基金项目] 国家自然科学基金科学仪器基础专项(30527001)、重庆市科技攻关计划项目(CSTS2009AB5003)。

[作者简介] 钱俊(1985—), 男, 江苏南京人, 在读硕士, 医师。研究方向: 心血管疾病的介入诊断和治疗。E-mail: qj5711@sina.com

[通讯作者] 黄晶, 重庆医科大学超声影像学研究所, 400010; 重庆医科大学附属第二医院心血管内科, 400010。

E-mail: huangjing_9901@yahoo.com.cn

[收稿日期] 2012-02-21 **[修回日期]** 2012-04-08

1 min;对 US 组以相同条件行左心室壁辐照,但不注射微泡;对照组在插入导管后不进行任何处理。术后 3 天处死动物,观察心肌组织大体改变,并行 HE 染色观察细微结构变化。**结果** ICE 能对注射针的进针深度、微泡注射及辐照过程进行实时监控。观察期内所有动物均正常存活。US+MB 组心肌辐照部位出现充血、心肌细胞间隙增宽、少量炎性细胞浸润等改变,US 组心肌组织仅出现轻微充血;对照组动物心肌无异常变化。**结论** 经 ICE 导管超声辐照破坏微泡能在靶区域产生相应生物学效应,内置 ICE 可对心肌内微泡注射、超声辐照过程进行实时监控。此款新型多功能导管可能为基因治疗缺血性心脏病提供新的、更加安全有效的途径。

[关键词] 超声心动描记术;心脏导管插入术;微泡;超声辐照

[中图分类号] R540.45; R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2012)08-1436-04

基因治疗缺血性心脏病已逐步用于临床,但经静脉输注基因的转染效率低下,影响治疗效果^[1]。采用心肌内注射方式可在一定程度上提高目的基因的表达,但疗效仍不能令人满意^[2-3]。建立安全、高效的基因投递系统是心脏基因治疗的研究重点之一^[4]。既往研究^[5-7]证明,超声破坏微泡能在局部组织产生一系列生物学效应,如细胞膜通透性增加、毛细血管内皮间隙增宽、局部组织微血管破裂等,促进靶区域目的基因的表达,提高基因治疗缺血性心脏病的效果。本研究采用自行研制的一款多功能心腔内超声(intracardiac echocardiography, ICE)导管,在 ICE 监控下经心内膜途径注射微泡,联合导管内置的超声辐照片对注射区域心肌进行辐照,观察超声破坏微泡对活体犬心肌的效应,为基因治疗缺血性心脏病探索新的治疗手段。

1 材料与方 法

1.1 多功能心腔内超声导管系统 包括 32 晶阵微型心腔内超声成像换能器(6.5~10.0 MHz),通过同轴电缆与 CTS-5000B 型超声主机(汕头超声仪器研究所)相连,提供心腔内的二维 B 型及 M 型超声图像;超声辐照换能器(7.2 MHz),通过导线与超声辐照主机(重庆医科大学与电子工业部第二十六所研制)相连,声强 1~30 W/cm²,连续可调;镍钛合金注射针(29G)等部件^[8]。

1.2 微泡制备 超声微泡由重庆医科大学超声影像学研究所提供。微泡造影剂的浓度为 1×10⁹~3×10⁹/ml、平均直径为 2 μm。

1.3 实验方法 15 只健康杂种犬,雌雄不限,体质量平均(15.3±2.0)kg,购于重庆医科大学实验动物中心,随机分为超声+微泡组(US+MB 组)、单纯超声辐

照组(US 组)、对照组,每组 5 只。以 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 体质量腹腔注射麻醉后,颈部脱毛,保定于手术台上。于呼吸机(Vni-Venttm Model 754, IMPACT Instrumentation)及心电监护(RM6240B 多道生理信号采集处理系统,成都仪器厂)下暴露颈动脉,置入鞘管并注入 1000 U 肝素溶液,送入多功能导管直至左心室腔。观察腔室结构,将探头面朝向左心室前壁,US+MB 组在 ICE 图像监控下注射 0.5 ml 微泡,开启辐照主机,参数设定为 1 W/cm²,1 min;US 组不注射微泡,仅以 1 W/cm² 声能辐照 1 min;对照组仅插入导管,不进行其他处理。实验结束 3 天后处死动物,将左心室前壁心肌组织置于 10% 甲醛溶液固定,石蜡切片包埋,行 HE 染色,观察心肌组织显微结构的改变。

2 结果

2.1 ICE 对微泡注射及超声辐照过程的监控效果 左心室腔内的解剖结构清晰可见(图 1A);与正常心

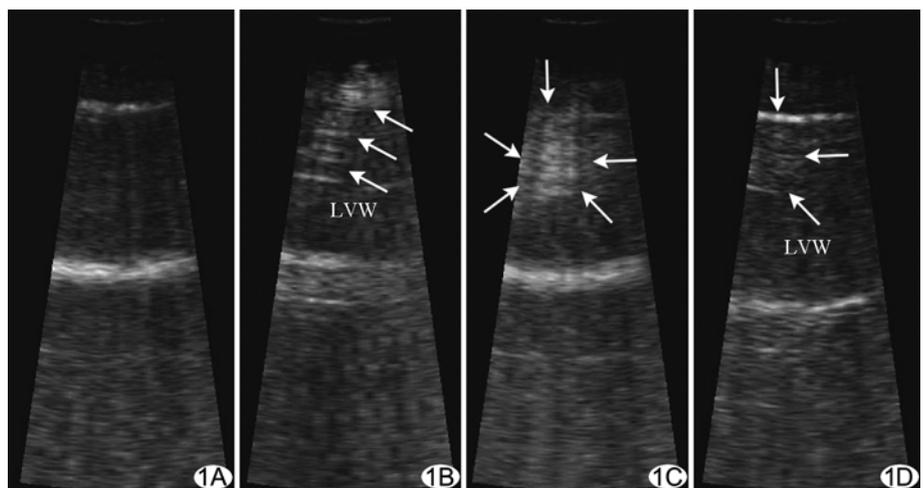


图 1 ICE 监控微泡注射及超声辐照过程 A. ICE 识别犬左心室组织结构,左心室壁及心内膜、心外膜清晰可见; B. ICE 对进针过程进行监控,与正常心肌组织相比,插入心肌的注射针(箭)显示为强回声; C. ICE 监控微泡注射过程,向心肌内注射 0.5 ml 微泡后,局部心肌的灰度值显著升高,呈斑片状强回声(箭); D 辐照结束后,ICE 观察心肌组织,可见辐照后心肌内的灰度值较辐照前下降,斑片状强回声范围缩小并出现破裂(箭) (LVW:左心室壁)

肌组织相比,插入心肌内的注射针显示为强回声(图 1B);注射 0.5 ml 微泡后,前壁心肌组织内注射区域超声灰度值显著增强,可见斑片状强回声(图 1C);开启辐照主机后,受辐照声能影响,ICE 图像暂时变模糊,关闭辐照主机后即刻恢复正常;辐照 1 min 后,心肌内灰度值较辐照前降低,斑片状强回声影部分碎裂(图 1D)。

2.2 肉眼观察 US+MB 组左心室前壁微泡注射及辐照部位可见充血(图 2);US 组心肌仅轻微充血;对照组动物心肌正常。未发生心肌烧灼损伤、穿孔、心脏破裂、附壁血栓形成等并发症。

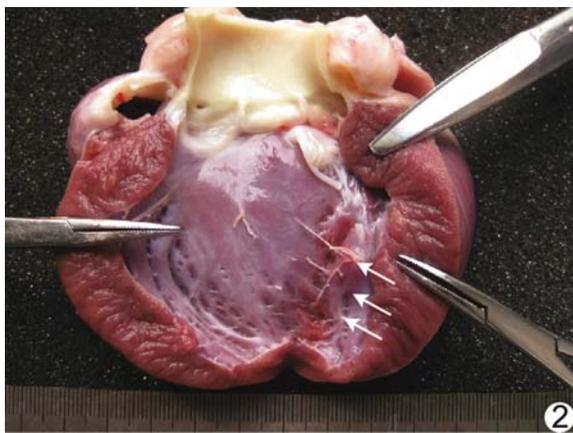


图 2 US+MB 组犬心脏大体观察 心内膜面完整,在微泡注射及超声辐照区域可见心内膜面充血样改变(箭)

2.3 HE 染色结果 光学显微镜下可见 US+MB 组靶区域心肌充血,心肌细胞间隙增宽、胞浆淡染水肿、细胞内出现空泡、部分微血管(以微静脉为主)壁破裂、

红细胞少量溢出并进入细胞间隙、少量炎性细胞浸润等,无心肌细胞变性坏死(图 3A);US 组超声辐照部位心肌仅轻微充血,无炎性细胞浸润(图 3B);对照组心肌组织未见异常(图 3C)。

3 讨论

基因治疗缺血性心脏病的关键在于提高基因转染效率以及基因投递的靶向性^[9]。研究^[2-3]表明通过心肌内注射的方式进行投递,可避免基因在肝、肾等心外组织扩散所带来的不良反应及基因浪费,提高基因治疗的效率和靶向性,但以脂质体等非病毒作为基因载体时,其转染效率依然较低,治疗效果不甚理想。

在超声作用下,微泡造影剂产生非对称收缩和膨胀,在体内可对其周围组织产生剪切力,引起毛细血管破裂、内皮细胞间隙增宽以及细胞膜通透性增加等生物学效应,使外源基因易于穿过血管屏障,进入组织内;同时由于邻近组织细胞膜的通透性也明显增高,外源基因更易被细胞摄取,进而提高基因的转染和表达^[5-7]。前期研究结果^[10-12]显示,心肌注射携基因微泡并联合一定声强的超声辐照后,目的基因的表达较对照组显著提高;与经静脉途径相比,心肌内注射能最大程度地避免基因浪费以及基因在心外组织扩散带来的不良反应。但是,上述研究多为开胸后经心外膜行基因注射,创伤较大。

本课题组前期通过介入方式^[13]利用超声导管经心内膜注射基因并实施辐照,不仅较心外膜注射损伤小,更能避免外界因素对声能的影响,从而准确控制超声辐照的环境和声波能量^[14];但须以 X 线作为引导手段,存在一些不足,如无法提供心腔内的详细解剖信

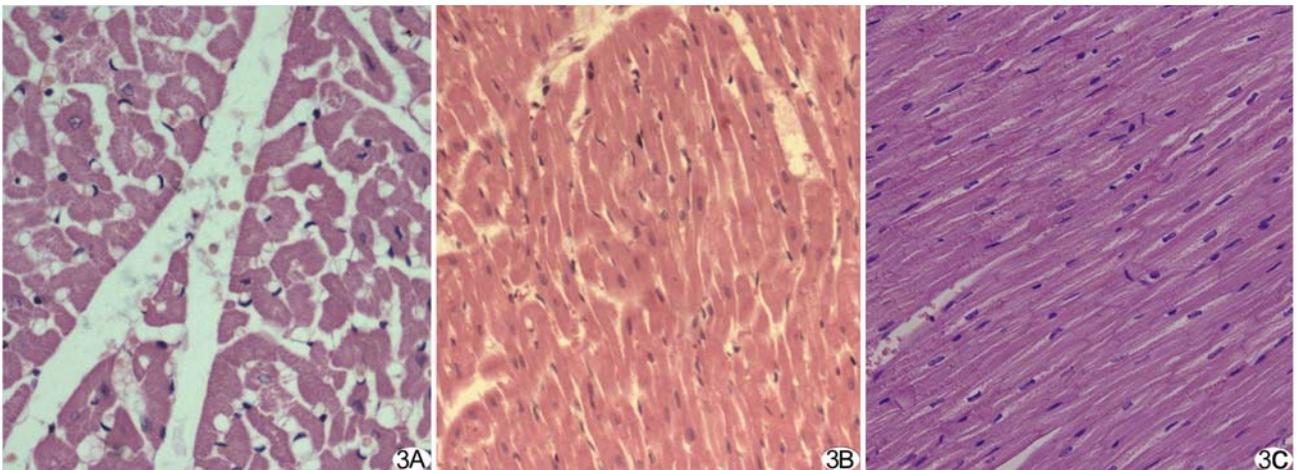


图 3 心肌组织病理图片(HE,×400) A. US+MB 组,心肌细胞间隙增宽、细胞内出现空泡、红细胞溢出并进入增宽的细胞间隙; B. US 组,心肌细胞间隙稍增宽伴有轻微充血; C. 对照组,心肌细胞排列整齐、细胞间隙紧密、组织结构正常

息,对微泡的注射部位判断较困难,在连续超声辐照时对辐照部位的精确定位及辐照过程的监控尚存在一定问题;此外,心肌内注射时,也不能有效控制注射针的进针深度,在较薄的梗死周边区域行心肌内注射时,存在进针过深导致心肌穿孔的可能^[15]。

为此,本课题组委托汕头超声仪器研究所研制了一款 32 晶阵微型 ICE 成像换能器^[16],并与超声辐照片及注射针整合成一款多功能心腔内超声导管,力图实现影像学监控、药物投递及超声辐照等功能一体化。本实验结果表明,导管内置的 ICE 能提供心腔内的详细解剖信息,当缺血、梗死部位心肌出现形态学变化时(如心肌变薄、室壁运动减弱等),通过 ICE 对这些部位的识别,能够提高基因注射的靶向性^[8];如图 1C 所示,在微泡注入心肌内后,ICE 图像上可清晰显示心肌内的强回声影,由于辐照换能器与 ICE 保持良好的同轴性,从而可以明确心肌内的微泡处于声能的作用范围内,避免由于导管位移而影响辐照的准确性,实施辐照时,可根据心肌内微泡的部位,指导连续辐照时对导管头方向进行实时调整,达到辐照过程与影像监控同步化的效果,可进一步增加心腔内超声辐照的效率;此外,ICE 能对心肌内注射的进针过程提供实时地监控,最大程度上降低因进针过深导致心肌穿孔、心包压塞的可能;利用超声图像作为引导手段,避免了 X 线辐射的风险。

本研究中全部动物在观察期内均正常存活。处死动物后,大体解剖未见心肌烧灼穿孔、血栓形成等并发症,提示采用 1 W/cm^2 声能进行辐照是安全的。病理学观察显示,US+MB 组心肌靶区域出现心肌细胞间隙增宽、毛细血管壁破裂、少量中性粒细胞浸润现象,这些生物学效应可促使目的基因进入心肌组织并增加其转染效率,提高治疗效果;与前期研究结果^[5,14]类似,US 组心肌内出现较为轻微的细胞间隙增宽等生物学效应,但与 US+MB 组相比较弱,对提升基因的治疗效果可能不如 US+MB 组显著。

综上所述,在活体条件下能够利用 ICE 导管内置的成像功能识别微泡注射的犬心肌靶区域,监控心肌内注射过程,提供微泡扩散及超声辐照实时信息;导管内置的超声辐照片工作情况良好,破坏心肌内的微泡后产生相应的生物学效应,可能提高外源性基因对缺血性心脏病的治疗效果。这款将超声诊断、监控、治疗等功能集合为一体的新型多功能导管可能为基因治疗缺血性心脏病提供新的、更加安全有效的途径。

[参考文献]

- [1] Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, et al. Vascular endothelial growth factors: Biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(10):1015-1026.
- [2] Muller OJ, Katus HA, Bekerredjian R. Targeting the heart with gene therapy-optimized gene delivery methods. *Cardiovasc Res*, 2007, 73(3):453-462.
- [3] Zeng R, Chen YC, Zeng Z, et al. Different angiogenesis effect of mini-tyrrs/mini-trprs by systemic administration of modified sirnas in rats with acute myocardial infarction. *Heart Vessels*, 2010, 25(4):324-332.
- [4] Taniyama Y, Morishita R. Development of plasmid DNA-based gene transfer. *Yakugaku Zasshi*, 2006, 126(11):1039-1045.
- [5] 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.
- [6] Gupta R, Tongers J, Losordo DW. Human studies of angiogenic gene therapy. *Circ Res*, 2009, 105(8):724-736.
- [7] Chen XH, Minatoguchi S, Kosai K, et al. In vivo hepatocyte growth factor gene transfer reduces myocardial ischemia-reperfusion injury through its multiple actions. *J Card Fail*, 2007, 13(10):874-883.
- [8] 郭睿,黄晶,邓辉胜,等.国产多晶阵心腔内超声成像换能器性能的初步测试. *中国医学影像技术*, 2009, 25(8):1500-1503.
- [9] Ran X, Wang H, Chen Y, et al. Aquaporin-1 expression and angiogenesis in rabbit chronic myocardial ischemia is decreased by acetazolamide. *Heart Vessels*, 2010, 25(3):237-247.
- [10] 盛妮妮,黄晶,周大燕,等.超声激活携基因微泡对碱性成纤维细胞生长因子在梗死心肌中表达的影响. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(9):1613-1616.
- [11] Yuan QY, Zhu ZW, Wang Z, et al. A novel method of augmenting gene expression and angiogenesis in the normal and ischemic canine myocardium. *Heart Vessels*, 2011, Jun 18. [Epub ahead of print]
- [12] Yuan QY, Huang J, Chu BC, et al. A visible, targeted high-efficiency gene delivery and transfection strategy. *BMC Biotechnol*, 2011, 11:56.
- [13] Huang J, Yuan QY, Zhu ZW, et al. Catheter-based transcatheter microbubble and pEGFP delivery combination of intracardiac ultrasonic exposure enhances EGFP gene expression. *Int J Cardiol*, 2010, 145(3):583-584.
- [14] 袁侨英,黄晶,朱正伟,等.导管超声辐照犬心肌组织的生物学效应. *重庆大学学报:自然科学版*, 2007, 30(1):120-122.
- [15] Kastrup J, Jørgensen E, Ruck, A, et al. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris a randomized double-blind placebo-controlled study: The euroinject onetrial. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45(7):982-988.
- [16] 郭睿,黄晶,钱俊,等.多功能心腔内超声导管性能的初步测试. *中国医学影像技术*, 2010, 26(12):2379-2381.