

# Diagnostic ultrasound and contrast microbubbles on new capillaries

ZHENG Yuan-yi, WANG Zhi-gang, RAN Hai-tao, ZHANG Qun-xia,

LI Xiao-dong, LING Zhi-yu, LU Min, REN Hong

(The Second Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effects of diagnostic ultrasound and contrast microbubbles on the new capillaries of hepatic VX2 tumors in rabbits. **Methods** Tumor growth rates of six rabbits were observed by B-mode sonography. When the tumors reached 0.6 cm to 1.0 cm in diameter, all the rabbits were used in research. The rabbits were divided into two groups-treatment group and control group. The rabbits in treatment group were injected with contrast microbubbles, while the rabbits in control group were injected with the same dose of physiological salt solution. First we found the place of the tumor by ultrasound imaging, then contrast microbubbles (Optison) at the dose of 0.10 ml/kg were injected into the vascular system of rabbits through the ear veins. At the same time, the tumors were observed by B-mode sonography at a mechanical index (MI) of 1.4. The whole process of imaging lasted about six to seven minutes. After that, the tumors were quickly cut off for electronic microscope and light microscope (HE stain) observations. **Results** Contrast microbubbles can significantly enhance tumors sonography, and they also have bioeffects on the new capillaries of tumors. There were no significantly changes in light microscope images, but significantly ultrastructure changes in the endocells of the capillaries were found in electronic microscope images, such as: swollen mitochondria, myelin figure, and cavilization of cytoplasm etc. **Conclusion** Diagnostic ultrasound at high mechanical index plus contrast microbubbles can cause capillaries' ultrastructure changes in tumors.

**[Key words]** Ultrasonography; Microbubbles; Neoplasm; New capillary

## 诊断超声加微泡造影剂对新生血管的作用

郑元义,王志刚,冉海涛,张群霞,李晓东,凌智瑜,卢岷,任红

(重庆医科大学超声影像学研究所 重庆医科大学附属第二医院超声科, 重庆 400010)

**[摘要]** 目的 评价诊断超声加微泡造影剂对兔 VX2 肝肿瘤新生血管的作用。方法 用二维灰阶超声监测 6 只大白兔肿瘤生长情况,待肿瘤长至长径约 0.6~1.0 cm 时进行实验。实验分为两组,处理组注射微泡造影剂(全氟显),对照组注射相同剂量的生理盐水。先用二维超声定位肿瘤,然后对处理组大白兔通过兔耳缘静脉缓慢注射微泡造影剂,剂量为 0.10 ml/kg,注射时间约 5 s。注射的同时行持续性二维超声显像(将 MI 调至 1.4)。整个显像过程持续 6~7 min。然后两组肝肿瘤取材后送做透射电镜及切片 HE 染色检查。结果 超声微泡造影剂能够显著增强肿瘤显像,同时也存在对肿瘤血管明显的生物学效应。在光镜下未见明显的肿瘤血管损坏,未见红细胞渗出等改变,但在电镜下可见肿瘤新生毛细血管明显的超微结构破坏,包括线粒体肿胀、髓样变及胞质空化等改变。结论 高机械指数诊断超声加超声微泡造影剂能够破坏肿瘤新生血管的超微结构。

**[关键词]** 超声检查;微泡;肿瘤;新生血管

**[中图分类号]** R981; R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2004)03-0349-03

随着超声微泡造影剂在临床上的广泛应用,必将大大提高对各种疾病的诊断准确性,特别是有利于对直径小于 1 cm 肿瘤的诊断。冯若等<sup>[1]</sup>还发现经低频超声辐照后的微泡造影

剂能够引起肿瘤血管栓塞,具有潜在的抗肿瘤作用。目前已有厂家成功研制出低频多功能超声加微泡造影剂的手术装置用于肿瘤的治疗。但是随之而来的关于微泡造影剂生物学效应的问题也逐渐引起人们的重视。本实验通过超声微泡造影剂对实验兔肝脏 VX2 肿瘤的研究发现,超声微泡造影剂不仅有利于超声对肝肿瘤的诊断,而且能在常规剂量下破坏肿瘤新生血管,这将有利于促进超声微泡造影剂在临床肝脏肿瘤的诊断与治疗上的应用,同时也应引起我们对微泡造影剂副作用的重视。

**[基本项目]** 国家自然科学基金项目(30370402)、重庆市科技攻关项目渝科发计字[2002]28 号。

**[作者简介]** 郑元义(1975—),男,四川人,博士,住院医师。

E-mail:zhengyuanyi@163.com

**[收稿日期]** 2004-01-09

## 1 资料与方法

1.1 动物准备 6只健康新西兰雄性白兔(重庆医科大学实验动物中心提供),体重2.5~4.0 kg,平均3.0 kg。经剖腹后将VX2肿瘤块(重庆医科大学医学超声工程研究所提供)植入兔肝脏中叶20天左右,待肿瘤长至直径0.6~0.8 cm大小时,全部用于实验。

1.2 声学造影剂 全氟显(第一军医大学南方医院提供),每瓶造影剂约含 $4.5 \times 10^9$ 个微气泡,微泡直径约3.0~3.5  $\mu\text{m}$ 。实验时以3 ml生理盐水溶解并摇匀后使用。

1.3 超声仪器及显像方法 应用HP-5500型彩色超声仪,S<sub>4</sub>探头,二维灰阶超声显像探头频率为2.5 MHz。实验前将仪器的所有条件根据预实验情况设置:机械指数(MI)分别为0.1(定位肿瘤用)与1.4(持续显像用),显像深度60 mm,增益、TGC等参数均在实验中保持不变。整个检查过程均用视频捕获软件摄相。

1.4 研究方案 用二维超声监测肿瘤生长情况,待肿瘤长至直径约0.6~1.0 cm时进行实验。实验分为两组,处理组注射微泡造影剂(全氟显),对照组注射相同剂量的生理盐水。先用二维超声定位肿瘤,然后将实验用微泡造影剂(全氟显)通过兔耳缘静脉缓慢注射,剂量为0.10 ml/kg,注射时间约5 s。注射的同时行持续性二维超声显像(将MI调至1.4)。整个显像过程持续6~7 min。然后迅速打开腹腔,按电镜取材的严格标准对两组肝肿瘤分别进行取材,固定后送相关科室做透射电镜及切片HE染色光镜观察肿瘤新生毛细血管改变。

## 2 结果

2.1 二维超声定位 全部6只大白兔均造模成功,肿瘤结节全部显示,呈低回声,圆形或椭圆形,与周围肝脏组织界限较清晰,周边有一圈极低的回声晕(图1)。

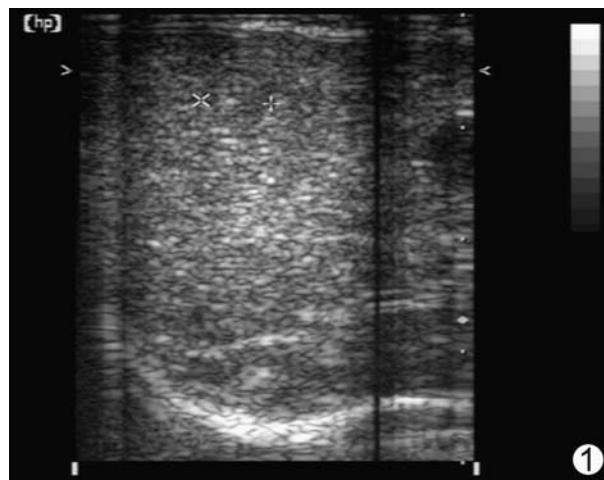


图1 肝肿瘤的二维超声图像,可见肿瘤呈圆形稍低回声,直径约0.6 cm,周边有一圈极低回声晕

2.2 诊断超声(MI 1.4)持续照射6 min时,肝脏显影减弱、消失。在照射第4 min时仍可见对肝肿瘤明显的迟发显影效应。肿瘤周边明显显影呈圆形高回声区,而肿瘤内部为低回

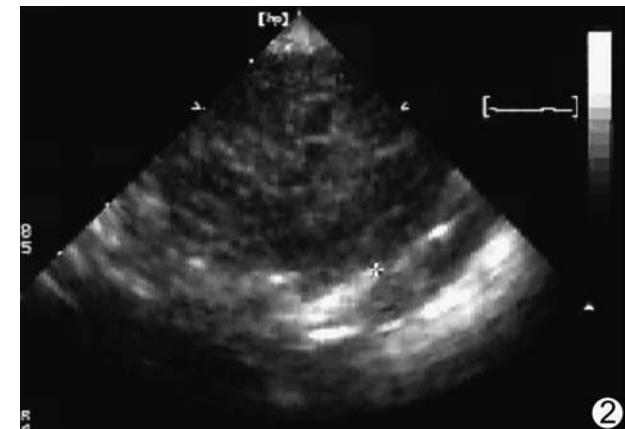


图2 微泡造影剂注射后4 min所见肝肿瘤的迟发显影效应,肿瘤周边为圆形高回声区,内部为低回声暗区

声暗区(图2)。

2.3 肿瘤组织切片 HE染色后油镜观测结果 肿瘤毛细血管形态正常,未见明显破损,未见红细胞渗出、溶血等改变。毛细血管中可见形态正常的红细胞(图3)。

图3 毛细血管未见明显破坏,内皮细胞形态良好,无红细胞渗出血管外(HE,  $\times 1000$ )

2.4 透射电镜观察结果 肝肿瘤对照组(未注射微泡造影剂),可见肿瘤毛细血管形态及各种细胞器的超微结构均正常(图4)。而肝肿瘤处理组(注射微泡造影剂组)可见肿瘤新生毛细血管明显的超微结构破坏,包括线粒体肿胀、髓样变及胞质空化等改变(图5)。

## 3 讨论

随着影像学逐渐向分子影像学发展,超声分子影像学这一概念也应当明确提出,它就是将分子生物学、物理、化学、材料学(包括纳米技术)等与超声相结合的一门学科。携基因、药物的超声微泡研究就属于此范畴。随着超声微泡造影剂的广泛应用,超声微泡造影剂的生物学效应问题逐渐显现出来。目前国内外在这方面的资料较少,需要引起人们的重视。

体外实验研究表明,超声微泡造影剂在超声的作用下能引起显著的生物学效应。诊断用超声加微泡造影剂可引起血液发生溶血反应<sup>[2]</sup>。在单层细胞培养基中加入微泡造影剂后

在诊断用超声的作用下可引起细胞膜的破坏,然后发生坏死脱落<sup>[3]</sup>。

体内实验研究表明,微泡造影剂在超声作用下所产生的“声孔效应”可使毛细血管破坏,引起出血,形成瘀点<sup>[4]</sup>。这种效应在微泡注射完成后持续发生作用时间达数小时。在低剂量超声组,这种效应与微泡量呈正相关<sup>[5]</sup>。而随着新型超声微泡造影剂的研制,微泡在体内存留时间的延长,这种效应持续时间也随之延长。

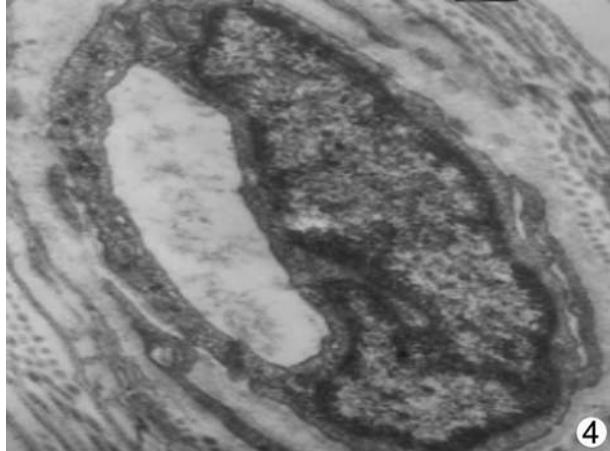


图4 肝肿瘤对照组(未注射微泡)毛细血管未见明显超微结构破坏(TEM,×8000)

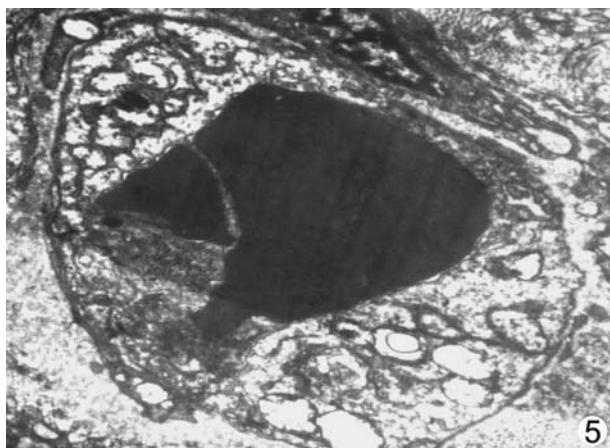


图5 肝肿瘤处理组(注射微泡造影剂组)毛细血管可见明显超微结构破坏,如:线粒体肿胀、髓样变,细胞质局部空化等(TEM,×8000)

对于这种生物学效应的研究出现了不同的结果。活体实验研究表明,脉冲超声波加微泡造影剂可在接近正常诊断用超声剂量的情况下引起出血,而正常非脉冲超声波加微泡造影剂却未引起出血<sup>[6]</sup>。但Miller等人用共聚焦显微镜观察诊断用超声加微泡造影剂对大鼠斜方肌血管的研究却发现能够引起微血管的破坏<sup>[7]</sup>。

这种效应可能与超声机械指数(MI)有显著关系<sup>[8]</sup>。在体外细胞实验中,诊断用超声(2.3 MHz)加微泡造影剂,当MI最低至0.4时即可引起细胞损坏,损坏程度与微泡剂量呈

正相关。而在体内实验中,Miller等人发现,MI达1.4这一阈值时,方可引起大鼠小肠出现明显的生物学效应。

本实验研究与Miller等人的发现基本吻合,我们从另一个角度,即毛细血管超微结构方面观测了诊断用超声加微泡造影剂对血管的生物学效应,发现其能够引起肿瘤新生毛细血管超微结构的损害,引起肿瘤毛细血管发生线粒体肿胀、髓样变及胞质空化等改变。但也有人认为这种生物学效应将有利于毛细血管的重构以及刺激其增生。总之,这一现象提示我们:超声微泡造影剂一方面有潜在抗肿瘤的应用价值;另一方面也提醒我们有必要加强对微泡造影剂生物学效应安全性问题的研究。

## 〔参考文献〕

- [1] Feng R. Rise of high-intensity focused ultrasound (HIFU) noninvasive surgery [J]. Journal of Clinical Ultrasound in Medicine, 1999, 1(2): 65-67.
- [2]冯若.高强聚焦超声无创性外科的兴起[J].临床超声医学杂志,1999,1(2):65-67.
- [3] Guzman HR, McNamara AJ, Nguyen DX, et al. Bioeffects caused by changes in acoustic cavitation bubble density and cell concentration: a unified explanation based on cell-to-bubble ratio and blast radius[J]. Ultrasound Med Biol, 2003, 29(8):1211-1222.
- [4] Guzman HR, Nguyen DX, Khan S, et al. Ultrasound-mediated disruption of cell membranes. II. Heterogeneous effects on cells [J]. J Acoust Soc Am, 2001, 110(1):597-606.
- [5] Miller DL, Pislaru SV, Greenleaf JE. Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation[J]. Somat Cell Mol Genet, 2002, 27(1-6):115-134.
- [6] Miller DL, Gies RA. The influence of ultrasound frequency and gas-body composition on the contrast agent-mediated enhancement of vascular bioeffects in mouse intestine[J]. Ultrasound Med Biol, 2000, 26(2):307-313.
- [7] Chen S, Kroll MH, Shohet RV, et al. Bioeffects of myocardial contrast microbubble destruction by echocardiography[J]. Echocardiography, 2002, 19(6):495-500.
- [8] Miller DL, Gies RA. The influence of ultrasound frequency and gas-body composition on the contrast agent-mediated enhancement of vascular bioeffects in mouse intestine[J]. Ultrasound Med Biol, 2000, 26(2):307-313.
- [9] 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[J]. Chin J Med Imaging Technol, 2003, 19(6):656-658.
- [10] 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[J].中国医学影像技术,2003,19(6):656-658.
- [11] Miller DL, Gies RA. The influence of ultrasound frequency and gas-body composition on the contrast agent-mediated enhancement of vascular bioeffects in mouse intestine[J]. Ultrasound Med Biol, 2000, 26(2):307-313.
- [12] Miller DL, Song J. Lithotripter shock waves with cavitation nucleation agents produce tumor growth reduction and gene transfer in vivo[J]. Ultrasound Med Biol, 2002, 28(10):1343-1348.