·实验研究·

不同占空比低强度诊断超声联合微泡对大鼠乏血供肿瘤血流灌注影响的实验研究

姚 雷 杨国良 殷佳蓓 张 毅 罗婷婷 唐家伟 唐君辉 刘 政

摘 要 **目的** 探讨不同占空比低强度诊断超声联合微泡对大鼠乏血供肿瘤血流灌注的影响。**方法** 选取Wistar大鼠45只，于右侧背部皮下建立大鼠C6胶质细胞瘤模型，根据不同脉冲时间及间隔时间随机分为5组，每组各9只：A组，脉冲时间5 s，间隔时间1 s；B组，脉冲时间1 s，间隔时间1 s；C组，脉冲时间1 s，间隔时间5 s；D组，脉冲时间5 s，间隔时间5 s；E组，超声假照；各组对应的治疗脉冲占空比分别为0.167%、0.100%、0.033%、0.100%和0。每组荷瘤大鼠经超声联合微泡治疗10 min，于治疗前和治疗后即刻分别应用超声造影检查获取时间-强度曲线，比较各组治疗前后峰值强度(PI)、曲线下面积(AUC)；分析各组超声造影图像进行超声造影视觉评分，并对其进行比较。各组随机选取3只大鼠取肿瘤组织行HE染色，观察治疗后病理学改变。**结果** A、B组治疗后AUC增加，与治疗前比较差异均有统计学意义(均$P<0.05$)；各组治疗后PI及C、D、E组AUC与治疗前比较差异均无统计学意义。A、B组治疗后超声造影视觉评分均较高，与C、D、E组比较差异均有统计学意义(均$P<0.05$)，余组间比较差异均无统计学意义。病理图示：A、B组可见较明显的血管扩张，A组部分血管周围组织内可见少量红细胞渗出，C、D、E组血管扩张均不明显。**结论** 脉冲时间5 s、间隔时间1 s、占空比0.167%及脉冲时间1 s、间隔时间1 s、占空比0.100%的低强度诊断超声联合微泡可增强大鼠乏血供肿瘤血流灌注，后者为相对安全的超声治疗声学参数。

关键词 超声辐照；微泡；空化效应；占空比；肿瘤；血流灌注；大鼠

[中图法分类号]R445.1 [文献标识码]A

Effect of low intensity diagnostic ultrasound with different duty cycle combined with microbubbles on blood perfusion of tumor with lack of blood supply in rats: a experimental study

YAO Lei, YANG Guoliang, YIN Jiabei, ZHANG Yi, LUO Tingting, TANG Jiawei, TANG Junhui, LIU Zheng

Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect of low intensity diagnostic ultrasound with different duty cycle combined with microbubbles on blood perfusion of tumor with lack of blood supply in rats. **Methods** Forty-five Wistar rats were selected to establish a rat C6 glioma model subcutaneously on the right back. According to different pulse time and interval time, they were randomly divided into 5 groups with 9 rats in each group: Group A, pulse time 5 s, interval time 1 s, Group B, pulse time 1 s, interval time 1 s, Group C, pulse time 1 s, interval time 5 s, Group D, pulse time 5 s, interval time 5 s, Group E, sham exposure with ultrasound. The corresponding treatment pulse duty cycles of each group were 0.167%, 0.100%, 0.033%, 0.100% and 0, respectively. Tumor bearing rats in each group were treated by ultrasound combined with microbubbles for 10 min. Contrast-enhanced ultrasound was performed before and after treatment immediately to obtain the time-intensity curve. The peak intensity (PI) and area under the curve (AUC) of each group were compared. The contrast-enhanced ultrasound images of each group were compared, and the contrast-enhanced ultrasound visual scores were analyzed. Three rats in each group were randomly selected, and the tumor tissues were stained with HE to observe the pathological changes after treatment. **Results** Compared with the pre-treatment, the AUC of Group A and Group B increased after treatment, and the differences

基金项目：国家重大科研仪器研制项目(82127804)

作者单位：400037 重庆市，陆军军医大学第二附属医院超声科

通讯作者：刘政，Email：liuzheng@tmmu.edu.cn

were statistically significant(all $P<0.05$). There were no statistically significant changes in PI of each group and in AUC of Group C, Group D and Group E after treatment compared with pre-treatment. Compared with Group C, Group D and Group E, the contrast-enhanced ultrasound visual scores in Group A and Group B were higher, the differences were statistically significant(all $P<0.05$), while there were no significant differences among the other groups. The pathological graphic showed that obvious vasodilation was observed in Group A and Group B, a small amount of red blood cell exudation was observed in some perivascular tissues in Group A, and there were no obvious vasodilation in Group C, Group D and Group E. **Conclusion** Low intensity diagnostic ultrasound combined with microbubbles with pulse time of 5 s, interval time of 1 s, and duty cycle of 0.167% and pulse time of 1 s, interval time of 1 s and duty cycle of 0.100% can enhance the blood perfusion of tumor with lack of blood supply in rats. The latter is a relatively safe acoustic parameter for ultrasonic treatment.

KEY WORDS Ultrasonic irradiation; Microbubbles; Cavitation; Duty cycle; Tumor; Blood perfusion; Rat

研究[1-2]证实，超声联合微泡空化可以改善微循环，增加局部血流灌注，在急性组织缺血性疾病的诊治中发挥重要作用。另有研究[3]表明，低强度超声激励微泡发生空化，可以在细胞膜形成“声孔效应”，通过增强微血管通透性提高肿瘤组织药物递送。利用诊断超声激励微泡发生空化，可改善乏血供肿瘤血流灌注，进一步增强肿瘤化疗及免疫治疗效果[4-5]，具有靶向定位、可实时影像监测、简便易行、安全性高等优点，临床应用前景广泛。超声空化效应的强度与多个声学参数密切相关，包括频率、声压、机械指数、脉冲长度、脉冲重复频率、占空比等。本课题组前期研究[4-6]表明，通过调控机械指数或脉冲重复频率产生特定的超声治疗参数，可以激励微泡空化，增强血流灌注效应。但超声不同声学参数及微泡理化性质的组合产生的增强效应并不甚稳定，某些声学参数下可能还会出现血流灌注降低的效果[7-8]。不同脉冲时间及间隔时间的组合可形成不同占空比，其是否会影响空化效应，造成肿瘤血流灌注差异，仍亟待研究。本实验通过建立大鼠皮下C6胶质细胞瘤模型，使用低强度诊断超声激励微泡空化，在相同频率、机械指数、脉冲长度及脉冲重复频率条件下，通过调控脉冲时间及间隔时间产生不同占空比，分析其对乏血供肿瘤血流灌注的影响。

材料与方法

一、实验动物

选取5周龄雌性Wistar大鼠45只，体质量96~110 g，均由陆军军医大学第二附属医院实验动物中心提供[许可证号：SYXK(渝)20170002]；实验过程中动物操作和处理方案通过陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会批准(AMUWEC20224334)。

二、主要实验仪器与试剂

1. 主要仪器：使用VINNO 70超声诊疗一体机(苏州飞依诺科技有限公司)，X4-12L线阵探头，频率4~12 MHz；具有Vflash空化调控功能，可通过调控机械指数、探头中心频率、脉冲长度、脉冲重复频率、脉冲时间及间隔时间等参数产生不同的超声空化效应。该仪器配备自适应可变焦域技术，通过电子相控阵聚焦，在超声发射平面形成1~5 cm的感兴趣区(region of interest, ROI)，使治疗超声在ROI内形成弱聚焦，治疗中ROI内微泡可发生靶向空化。

2. 主要试剂：“脂氟显”微泡造影剂，由陆军军医大学第二附属医院超声科自行研发，外层为磷脂外膜，核心气体为全氟丙烷，使用前经机械振荡器振荡90 s，所得微泡平均粒径约2.0 μm，浓度为(2~9)×10^9/ml。

三、实验方法

1. 模型建立及分组：将大鼠C6胶质瘤细胞(陆军军医大学第一附属医院病理科提供)于37℃、5%CO_2恒温培养箱中培养传代，显微镜下观察肿瘤细胞占据视野约90%时行胰酶消化处理，以1000 r/min离心5 min，磷酸盐缓冲液重悬，调整细胞浓度为1×10^5/μl。选择大鼠右侧背部皮肤备皮、消毒，使用1.0 ml无菌注射器抽取0.2 ml肿瘤细胞悬液注入皮下，注射后轻压注射点30 s防止细胞悬液漏出。待肿瘤生长至直径约1 cm时可以入组，将荷瘤大鼠随机分为A、B、C、D、E 5组，每组各9只。

2. 肿瘤治疗方法：使用2%戊巴比妥钠(2 ml/kg)腹腔注射麻醉大鼠，将大鼠俯卧位固定于治疗台上，建立尾静脉通道，充分暴露肿瘤生长处皮肤，均匀涂抹医用耦合剂后覆盖3 cm厚超声耦合垫。应用二维超声观察肿瘤形态，测量肿瘤大小；然后切换至超声造影模式，固定超声探头于肿瘤最大切面，经大鼠尾静脉通道团注0.04 ml“脂氟显”，随后立即注入0.2 ml无菌生理盐水冲管，存储60 s动态造影图像。待造影剂基本廓清后，切换至Vflash治疗模式，取0.04 ml“脂氟显”，用无菌生理盐水稀释至0.40 ml，治疗时长10 min

内缓慢匀速推注。治疗时超声探头以肿瘤最大切面为中心，向两侧扇形倾斜扫查至肿瘤边缘。调整仪器确保治疗ROI覆盖肿瘤及周边0.5 cm范围组织。本研究5组荷瘤大鼠相同的超声治疗声学参数设置：机械指数0.3，探头中心频率3 MHz，脉冲长度3个周期，脉冲重复频率2 kHz；需调控的参数为脉冲时间及间隔时间，A组：脉冲时间5 s，间隔时间1 s；B组：脉冲时间1 s，间隔时间1 s；C组：脉冲时间1 s，间隔时间5 s；D组：脉冲时间5 s，间隔时间5 s；E组：超声假照；各组对应的治疗脉冲占空比分别为0.167%、0.100%、0.033%、0.100%和0。治疗后即刻再次行超声造影检查，方法同前。

3.超声造影定量分析：使用VINNO 70超声诊疗一体机自带的超声造影分析软件，参考二维图像勾画肿瘤区域，分析60 s动态造影图像，通过时间-强度曲线获得峰值强度（peak intensity，PI）及曲线下面积（area under curve，AUC），比较各组治疗前后PI及AUC变化情况。

4.超声造影视觉评分：由两名超声科医师对超声造影图像进行视觉评分，不一致时以工作经验较长者的评分为最终评分。具体评分标准：0分，与每个样本的治疗前造影图像对比，治疗后造影肿瘤区域内微泡灌注面积、整体亮度及循环内微泡持续时间无明显变化或减少；1分，微泡灌注面积、整体亮度及循环内微泡持续时间轻度增加；2分，微泡灌注面积、整体亮度及循环内微泡持续时间明显增加。

5.组织病理检查：治疗结束后，每组随机选取3只荷瘤大鼠，在充分麻醉的情况下完整剥离皮下肿瘤组织，经磷酸盐缓冲液冲洗后用4%多聚甲醛固定，脱水，石蜡包埋，切片，进行HE染色，光学显微镜下观察肿瘤组织微结构。

四、统计学处理

应用SPSS 26.0统计软件，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，各组治疗前后PI、AUC比较采用配对t检验；计数资料以频数表示，各组肿瘤超声造影视觉评分比较采用Kruskal-Wallis H检验，组间两两比较采用Bonferroni法矫正P值。P<0.05为差异有统计学意义。

结　果

一、各组治疗前后超声造影定量参数比较

A、B组治疗后AUC增加，与治疗前比较差异均有统计学意义（均P<0.05）；各组治疗后PI及C、D、E组治疗后AUC与治疗前比较差异均无统计学意义。见表1和图1，2。

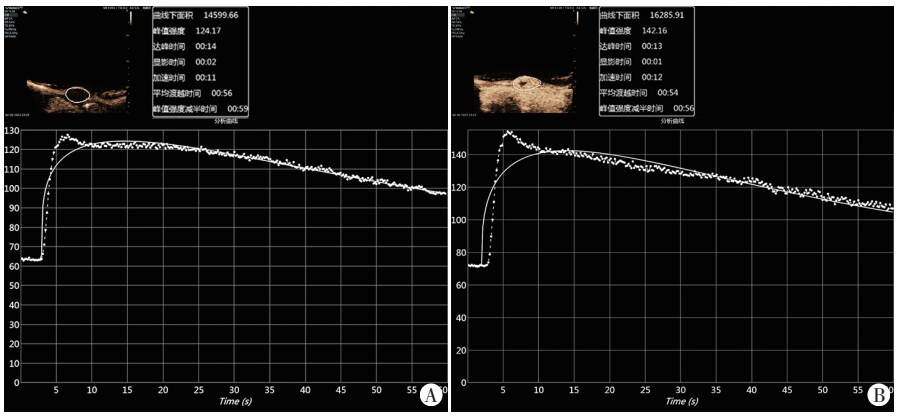
二、各组超声造影视觉评分比较

各组超声造影视觉评分比较差异有统计学意义（P<0.001）。A、B组超声造影视觉评分均增高，与C、D、E组比较差异均有统计学意义（均P<0.05）；余组间

表1　各组治疗前后超声造影定量参数比较（$\bar{x}\pm s$）

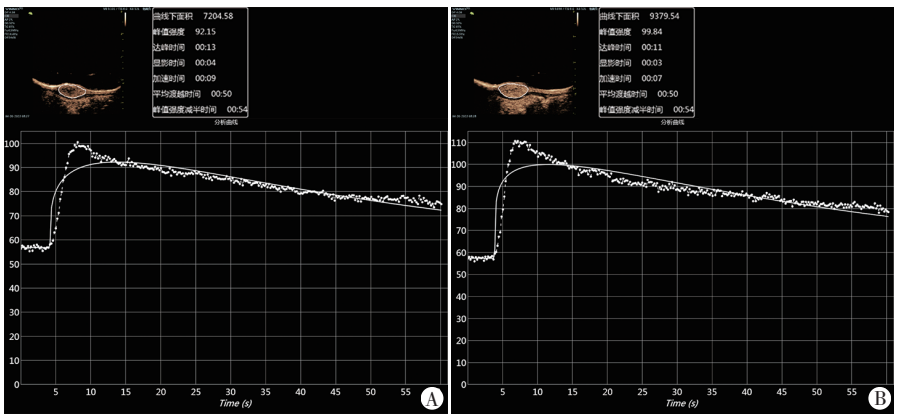
组别	PI(dB)		AUC(dB·s)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
A组	107.37±13.05	115.72±16.96	8743.00±3790.47	10 413.96±2935.66*
B组	108.93±20.33	114.53±16.17	8118.20±2893.35	9642.06±3222.97*
C组	118.55±17.52	122.65±9.03	9095.03±3018.66	10 145.10±2325.99
D组	113.08±11.05	120.74±13.13	8603.39±2139.50	9828.32±3433.83
E组	124.80±14.17	120.91±13.99	11 244.94±4172.35	10 562.88±3160.83

与治疗前比较，*P<0.05。PI：峰值强度；AUC：曲线下面积



A：治疗前；B：治疗后

图1　A组治疗前后超声造影时间-强度曲线图



A：治疗前；B：治疗后

图2　B组治疗前后超声造影时间-强度曲线图

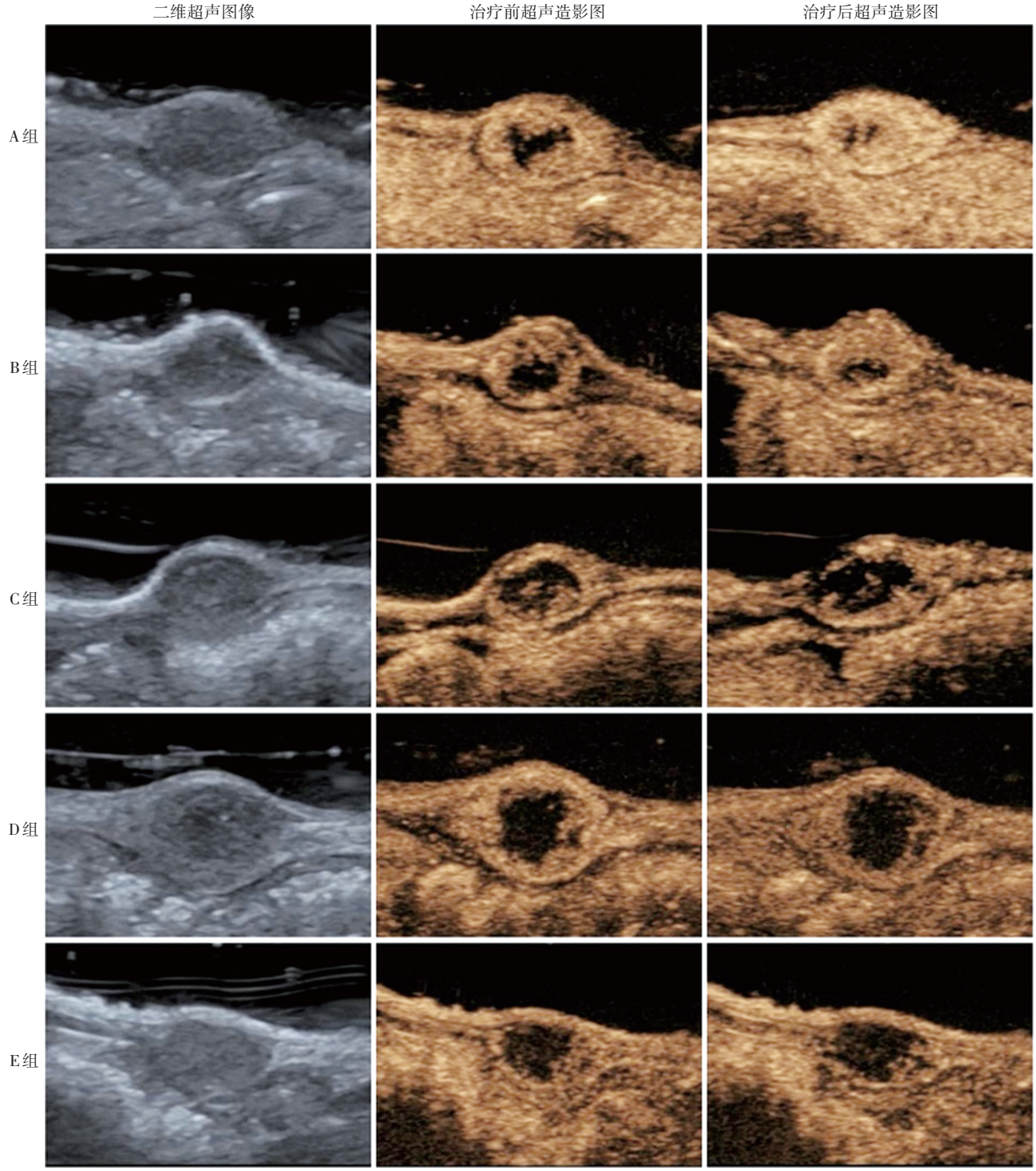
比较差异均无统计学意义。见表2和图3。

三、肿瘤组织病理表现

镜下观察见肿瘤组织主要由胶质瘤细胞和结缔组织构成，胶质瘤细胞呈条索状排列，核大、深染，异型性明显，内可见血管穿行。其中，A、B组可见较明显的血管扩张，A组部分血管周围组织内可见少量红细胞渗出，C、D、E组血管扩张均不明显。见图4。

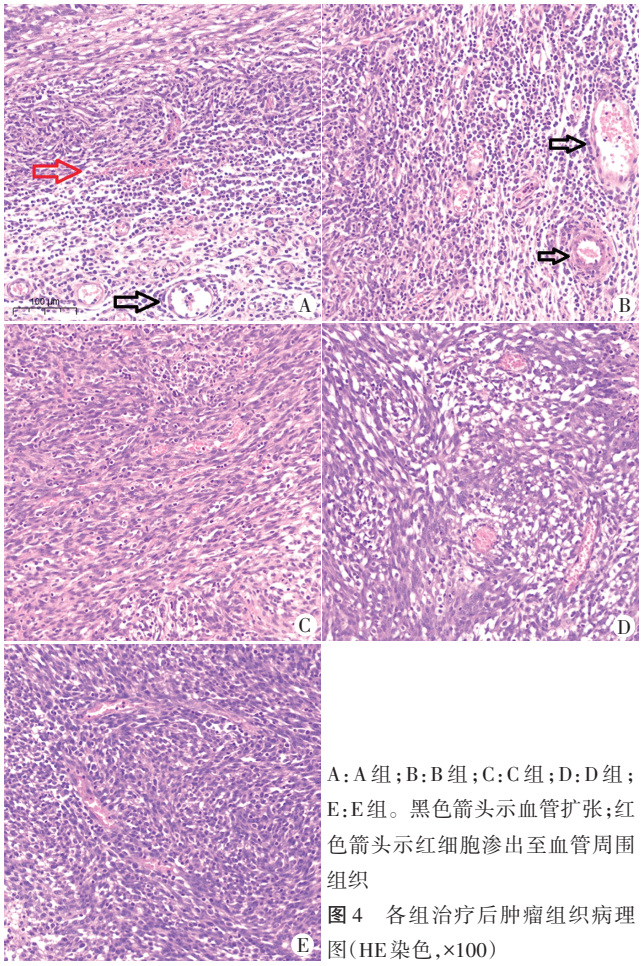
表2　各组超声造影视觉评分情况　　个

组别	0分	1分	2分
A组	0	4	5
B组	0	2	7
C组	5	4	0
D组	5	4	0
E组	6	3	0



A组2分；B组2分；C、D、E组均为0分

图3　各组超声造影视觉评分



A：A组；B：B组；C：C组；D：D组；E：E组。黑色箭头示血管扩张；红色箭头示红细胞渗出至血管周围组织

图4　各组治疗后肿瘤组织病理图（HE染色，×100）

讨　论

恶性肿瘤是对人类健康威胁最大的疾病之一，其活跃的代谢和快速的细胞增殖导致血管生成滞后，形成不成熟和畸形的血管，这种血管不具有正常供血功能，将逐步导致肿瘤组织血流灌注不足。同时，实体瘤伴随肿瘤生长造成局部空间受限，不断增加的占位效应导致空间挤压，压迫周围血管及淋巴管，引起血流灌注下降及淋巴回流障碍，造成局部组织静水压升高，进一步形成肿瘤内缺血缺氧微环境[9]。本实验建立的大鼠皮下胶质细胞瘤模型可以观察到肿瘤中心明显的缺血区域，较好地还原了恶性肿瘤内乏血供状态。超声造影剂微泡是纯血池造影剂，经静脉注射后随血液循环流动而不会弥散至血管外，是研究组织血流灌注的理想示踪剂。超声造影是目前肿瘤临床诊疗的重要影像学检查方法之一[10]。基础实验[11]也证实，超声造影可提供肿瘤形态学及血流动力学相关信息，利用超声造影定量分析获取的PI及AUC可以准确评估肿瘤内血流灌注量。本实验利用超声造影定量分析评估肿瘤组织内血流灌注状态，具有较高的准确性。

本实验结果显示，各组治疗后PI与治疗前比较差异均无统计学意义，表明各组不同声学参数下超声造影峰值强度变化不明显。A、B组治疗后AUC均较治疗前增加（均$P<0.05$），说明肿瘤组织在A、B组超声治疗作用下血流灌注面积及微循环开放时间明显提升。进一步分析发现，B组脉冲时间1 s、间隔时间1 s、治疗脉冲占空比0.100%的条件，可以增加肿瘤组织血流灌注；A组调整脉冲时间为5 s，间隔时间为1 s，占空比提升至0.167%，同样具有改善肿瘤组织血供的效果。当治疗参数调整为C组，即脉冲时间1 s、间隔时间5 s、占空比下降至0.033%时，肿瘤血流灌注改变不明显。D组脉冲时间及间隔时间均为5 s，与B组占空比相同，均为0.100%，但D组治疗前后肿瘤组织血流灌注并无差异性改变。E组为超声假照组，假照后肿瘤血供变化不明显。另外，A、B组超声造影视觉评分均高于其他各组（均$P<0.05$），说明A、B组肿瘤组织血流灌注得到明显改善，与超声造影定量分析结果一致。

有研究[12-13]报道，微泡作为空化核可降低声压阈值，在特定强度的超声辐照下发生周期性收缩、扩张甚至内爆等动力学改变，产生瞬态高温、高压、微射流和冲击波等机械效应及剪切力改变，作用于血管内皮细胞，激活一氧化氮合酶，促进内皮一氧化氮、前列腺素的产生和释放，增加剪切依赖性ATP产生，激活下游多种嘌呤能信号通路，发挥扩张血管、增加血流灌注的作用。基于上述机制，本实验推测A组占空比0.167%和B组占空比0.100%的条件可以对血管内皮细胞产生足够的机械效应和生物学效应，引发血管扩张，增加肿瘤组织血流灌注；肿瘤组织病理检查也发现A、B组血管扩张较其他各组更明显。由于A组占空比相对B组升高，微泡空化的机械效应加大，造成局部血管壁损伤，导致红细胞渗出，故B组超声治疗声学参数相对A组更为安全。C组占空比下降至0.033%，其微泡空化的机械效应较弱，尚不足以引发扩血管效应。D组虽然占空比与B组相同，且脉冲时间长于B组，但其间隔时间较长，可能导致微泡空化对血管壁的机械作用和剪切力改变“累积效应”不足，不能产生足够引起生物学效应的扩血管因子，故未能明显增强肿瘤血流灌注。E组作为空白对照，未施加微泡空化处理，超声假照后无明显血管扩张。

本课题组预实验发现，给予一定的间隔时间，有利于微泡在肿瘤血管中再灌注，在间隔时间使肿瘤血管中储存一定数量的微泡，再发射治疗脉冲引发微泡空化，血流增强效应比较稳定。超声连续辐照虽然占空比相对较大，但微泡再灌注数量不足，导致空化效应减弱，不利于改善肿瘤血流灌注。故本实验未设置超声连续辐照组，而是重点比较了不同脉冲时间和间隔时间组合的差异。另外，本课题组前期研究[8]发现脉冲长度3个周期、脉冲重复频率2 kHz的超声治疗声学参数可增加肿瘤血流灌注面积，推测在该参数下微泡可发生稳态空化，有利于增强肿瘤血供；当脉冲长度增加至34.5个周期、脉冲重复频率下降至200 Hz时肿瘤血流灌注面积减少，推测较高的脉冲长度和相对较低的脉冲重复频率条件可能激励微泡发生惯性空化，阻断了肿瘤血供。本实验沿用了增强肿瘤血供的超声治疗声学参数。

本实验的局限性：①所选超声治疗声学参数目前仅限于大鼠皮下C6胶质细胞瘤，更换实验动物、肿瘤细胞或移植瘤部位，相关参数可能会有差异；②影响占空比的声学参数除脉冲时间和间隔时间外，频率、脉冲长度、脉冲重复频率的不同组合，也会产生不同占空比，且可能发生参数间交互作用，本实验未进一步探究其他参数对肿瘤组织血流灌注的影响；③仅对超声治疗后即刻肿瘤组织血供改变进行观察分析，未进行长时间、不同时间点重复测量，在后期研究中可进一步探索血流增强效应的持续时间及变化趋势。

综上所述，脉冲时间5 s、间隔时间1 s、占空比0.167%及脉冲时间1 s、间隔时间1 s、占空比0.100%的低强度诊断超声联合微泡可增强乏血供肿瘤血流灌注，后者为相对安全的超声治疗声学参数。

参考文献

[1] Qiu S, Li D, Wang Y, et al. Ultrasound-mediated microbubble cavitation transiently reverses acute hindlimb tissue ischemia through augmentation of microcirculation perfusion via the eNOS/NO pathway[J].Ultrasound Med Biol, 2021, 47(4): 1014-1023.

[2] Moccetti F, Belcik T, Latifi Y, et al. Flow augmentation in the myocardium by ultrasound cavitation of microbubbles: role of shear-mediated purinergic signaling[J]. J Am Soc Echocardiogr, 2020, 33(8): 1023-1031.e2.

[3] Chowdhury SM, Abou-Elkacem L, Lee T, et al. Ultrasound and microbubble mediated therapeutic delivery: underlying mechanisms and future outlook[J].J Control Release, 2020, 326(1): 75-90.

[4] Li N, Tang J, Yang J, et al. Tumor perfusion enhancement by ultrasound stimulated microbubbles potentiates PD-L1 blockade of MC38 colon cancer in mice[J].Cancer Lett, 2021, 498(1): 121-129.

[5] 冯爽，乔伟，益磋，等. 不同机械指数诊断超声联合微泡对裸鼠胰腺癌移植瘤化疗的影响[J]. 中国介入影像与治疗学，2019，16(2)：107-111.

[6] 唐娜娇，唐家伟，张毅，等. 微泡超声空化增强乏血供肿瘤血流灌注的实验研究[J]. 中华超声影像学杂志，2021，30(2)：167-172.

[7] Li N, Liao Y, Tang J. Characteristic blood-perfusion reduction of walker 256 tumor induced by diagnostic ultrasound and microbubbles[J]. Ultrasound Med Biol, 2020, 46(11): 3069-3079.

[8] 白露华，罗婷婷，唐家伟，等. 不同超声脉冲宽度和脉冲重复频率组合激励微泡空化对肿瘤血流灌注及释药的影响[J]. 陆军军医大学学报，2022，44(9)：935-942.

[9] Liu Z, Zhao Q, Zheng Z, et al. Vascular normalization in immunotherapy: a promising mechanisms combined with radiotherapy[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 139(1): 111607.

[10] 潘茜，王斯达. 超声造影联合剪切波弹性成像对肝硬化背景下肝实质内良恶性结节的鉴别诊断价值[J]. 临床超声医学杂志，2022，24(2)：119-122.

[11] 范义. 超声造影评估裸鼠胰腺癌微血管分布的实验研究[J]. 临床超声医学杂志，2020，22(5)：321-325.

[12] Belcik JT, Davidson BP, Xie A, et al. Augmentation of muscle blood flow by ultrasound cavitation is mediated by ATP and purinergic signaling[J].Circulation, 2017, 135(13): 1240-1252.

[13] Yu GZ, Istvanic F, Chen X, et al. Ultrasound-targeted microbubble cavitation with sodium nitrite synergistically enhances nitric oxide production and microvascular perfusion[J]. Ultrasound Med Biol, 2020, 46(3): 667-678.

（收稿日期：2022-05-16）