

文章编号:1000-582X(2007)01-0120-03

# 导管超声辐照犬心肌组织的生物效应\*

袁侨英<sup>1</sup>,黄晶<sup>1</sup>,朱正伟<sup>2</sup>,邓辉胜<sup>1</sup>,李进嵩<sup>1</sup>

(1. 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 心内科,重庆 400016;  
2. 重庆大学 土木工程学院,重庆 400030, 3. 四川压电与声光技术研究所,重庆,400060)

**摘要:**探索导管超声在活体犬心腔内辐照心肌的可行性,及辐照后对心肌组织、细胞的生物效应。研制超声辐照导管在X线影像引导下经介入法进入活体犬左心室腔,在心腔内以频率4.3 MHz、声能 $1\text{ W/cm}^2$ 的超声照射心肌1 min;即刻观察超声照射后血流动力学、心肌组织和细胞病理形态、超微结构的变化。导管超声辐照后光镜见心肌轻微充血,电镜发现线粒体普遍轻微肿胀,毛细血管内皮细胞间隙增宽,肌浆网扩张;血流动力学检测则显示有心肌收缩增强的趋势。超声辐照导管在心腔内辐照活体心肌安全可行,具有增加细胞膜及毛细血管通透性等生物效应、并且未产生毒副效应。

**关键词:**导管;超声辐照;生物效应

**中图分类号:**R542.22

**文献标识码:**A

超声辐照活体组织细胞可产生复杂的生物效应<sup>[1-3]</sup>,利用超声特有的生物物理效应治疗疾病在临床广泛运用。但传统的体外超声辐照心脏等深部脏器,超声通过含空气的肺、骨骼等介质后明显衰减,加之心脏本身结构的复杂性,最终到达需要辐照部位心肌的声能量、超声辐照效应难以准确控制,并且超声与组织的相互作用十分复杂,在体外用同等剂量的超声辐照,经过不同的超声辐照条件和方式,最终在细胞水平的生物效应会表现出较大的差异<sup>[4]</sup>,影响最终的治疗效果,当声能量大于超声治疗的安全阈值剂量时,甚至对组织产生不可逆的有害效应或损伤<sup>[5]</sup>。因此,将超声治疗与成熟的导管介入技术结合<sup>[6]</sup>,在导管顶端安装微型超声治疗换能器,利用导管超声进入心血管腔内直接近距离辐照心肌的治疗具有很大优势,避开了声窗等外界因素影响,较准确控制超声辐照环境和声波能量,为心血管疾患的超声治疗探索安全有效的新途径,也为建立以心腔内超声辐照治疗为主的新技术奠定基础。

## 1 材料及方法

### 1.1 超声设备

超声辐照导管由重庆医科大学与中国电子科技集

团公司二十六研究所共同研制:超声辐照导管为临床应用介入心导管改制而成,总体外观和操控性能类似于射频消融所用的可操控导管,顶端设置有微型环状超声辐照换能器,直径2.7 mm,工作频率为4.3 MHz,发射方式为连续波,经重庆市计量研究所用辐射声压法测定声能为 $1.0\text{ W/cm}^2$ 。

### 1.2 动物分组及实验方法

由重庆医科大学实验动物中心提供的健康杂种犬10只,体重15~20 kg,雌雄不限,随机分为2组( $n=5$ ),分别为:超声辐照组(A组)、对照组(B组)。

3%的戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉犬,在X线引导下将超声辐照导管经左颈总动脉鞘插入左心室腔,注射肝素1千单位,A组在心腔内行超声辐照1 min,B组仅插入超声辐照导管不进行超声辐照,测完血流动力学,即刻摘取心脏。

### 1.3 血流动力学测定

血流动力学测定共2次,第1次在麻醉犬后,经左颈总动脉插管,连接MPA-2000生物信号分析系统压力换能器,用多导记录仪记录2组犬的心腔内血流动力学参数;第2次A组在超声辐照导管插入心腔辐照心肌后测定,B组在插入超声辐照导管后测定。

\* 收稿日期:2006-08-06

基金项目:国家自然科学基金资助(10604068)

作者简介:袁侨英(1978-),女,重庆医科大学博士研究生,主要从事心脏介入超声的研究。黄晶,男,教授,电话(Tel.):63849075-3083;E-mail:huangqing-9901@yahoo.com.cn.

### 1.4 心肌病理形态观察

解剖心脏肉眼观察有无心肌撕裂、穿孔、水肿、烧灼等损伤,切取左室前壁厚约2~3 mm的心肌组织块,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,二甲苯脱蜡后梯度乙醇脱水,苏木素-伊红染色,中性树胶封片,普通光学显微镜观察心肌HE染色组织结构。

### 1.5 心肌组织超微结构观察

取左室前壁心肌1 mm<sup>3</sup>,置于冰2.5%戊二醛固定,四氧化锇后固定,梯度丙酮脱水,环氧树脂包埋,超薄切片后经醋酸双氧铀和枸橼酸醋酸双重电子染色,H-600型透射电镜观察心肌微细结构的改变,放大倍数1.2万~1.5万倍。

### 1.6 统计学处理

数值采用均数±平均差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用SAS6.12统计软件分析,2组间行t检验,多组间用方差分析作q检验。 $P < 0.05$ 为差异具统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 超声辐照导管系统工作状态

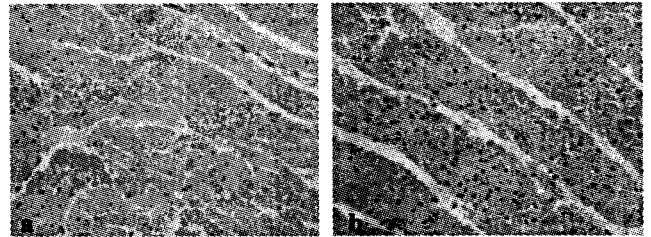
超声辐照导管工作时处于共振状态,工作频率稳定、微型超声辐照换能器在导管顶端均匀发射声能并激起水波(图1);超声辐照导管在心腔内辐照过程中犬的生命体征平稳无异常,心电监护无心律失常发生。导管进入活体犬的心腔内连续工作约1 min后,换能器表面有少许血液中的蛋白纤维黏附,但发射声能仍良好,与未进入心腔前发射一致。



图1 微型超声辐照换能器在导管顶端发射声能

### 2.2 心肌病理形态观察结果

肉眼观察大体组织效应:辐照后即刻处死动物发现心肌颜色、结构、形态无异常变化,无心肌烧灼损伤、穿孔、心壁内未见附壁血栓。HE染色后光镜显示:超声辐照组心肌组织轻微充血,但心肌纤维结构清楚,心肌细胞排列整齐,心肌间质内无炎症细胞浸润,无心肌细胞变性坏死(图2(a));对照组心肌组织正常(图2(b))。



(a) 超声辐照组 (b) 对照组

图2 心肌组织HE染色病理图片(放大倍数×40)

### 2.3 心肌超微结构变化

经1.0 W/cm<sup>2</sup>的超声辐照导管在心腔内辐照心肌1 min后,透射电镜发现:心肌细胞界限分明,肌原纤维排列整齐、肌丝排列规则、肌节明暗带清晰,心肌细胞内线粒体变大变圆、普遍轻微肿胀,但线粒体形状正常、嵴排列规则清楚、无线粒体破坏,肌浆网不同程度扩张(图3);毛细血管可见内皮细胞肿胀破坏、间隙增宽(图4),但细胞浆内未见空泡或灶性空化,细胞核形态结构正常,细胞内无髓鞘样结构破坏、轴突断裂等表现。



图3 超声辐照组心肌细胞(透射电镜×15 000)



图4 超声辐照组心肌细胞(透射电镜×12 000)

## 2.4 心腔内超声辐照心肌对血流动力学影响

在超声辐照导管插入前后,对照组血流动力学无明显改变(见表1),表明超声辐照导管本身对犬的血流动力学无影响( $P < 0.01$ );超声辐照导管在心腔内辐照心肌1 min后心率稍减慢,左室收缩压(LVSP)、

心室收缩期室内压上升速率( $+dp/dt_{max}$ )、心室舒张期室内压下降速率( $-dp/dt_{max}$ )较辐照前有升高趋势,但未达到统计学意义( $P > 0.05$ ),左室舒张末压(LV-EDP)无明显改变( $P < 0.05$ )。

表1 2组犬血流动力学参数

Group	A组插管前	A组插管辐照后	B组插管前	B组插管后
HR (次/min)	102 ± 10	99 ± 8	103 ± 10	103 ± 13
LVSP (mmHg)	120.2 ± 11.3	123.0 ± 10.4	120.8 ± 11.4	120.2 ± 11.7
LVDEP (mmHg)	7.80 ± 1.62	7.78 ± 1.60	7.68 ± 1.46	7.64 ± 1.48
+ $dp/dt_{max}$ (mmHg/s)	3 421 ± 253	3 509 ± 263	3 456 ± 186	3 441 ± 143
- $dp/dt_{max}$ (mmHg/s)	2 756 ± 244	2 861 ± 294	2 706 ± 194	2 753 ± 208

## 3 结论

在开展的活体犬介入实验中发现:研制的超声辐照导管经常规介入法顺利进入犬左心室腔,在心腔内发射超声均匀稳定,在辐照心肌的过程中无心律失常等严重并发症发生;术后解剖心脏肉眼观察未见心肌烧灼损伤、穿孔、血栓形成,在光镜下未发现心肌病理改变,初步表明了1.0 W/cm<sup>2</sup>的导管超声在心腔内辐照活体心肌1 min安全可行。

检测心脏的血流动力学发现超声导管辐照后心肌收缩力有增强趋势,而电镜发现心肌细胞内肌质网扩张,推测导管超声辐照后可促进心肌钙离子的释放或转运,进而增强心肌收缩。透射电镜发现心肌细胞内线粒体变大变圆、普遍轻微肿胀,提示心肌细胞及线粒体膜的通透性增加,但细胞膜及细胞核形态结构正常,无其他细胞器的破坏,表明细胞膜通透性增加为功能性的和可逆的;毛细血管出现内皮细胞间隙增大,提示血管壁通透性也增加,这为导管超声辐照促进药物或基因进入心肌细胞,促进离子交换等治疗运用奠定了基础。

该实验从生物整体水平,研究导管超声在心腔内近距离辐照心肌组织后产生的生物效应,为心脏疾患的介入超声治疗提供试验依据,也为介入超声治疗其他深部脏器疾患提供思路和方法。在进一步的试验中

笔者将继续观察导管超声辐照心肌后产生的长期效应,探索最佳超声辐照治疗参数。

## 参考文献:

- [1] WEI W, ZHENG-ZHONG B, YONG-JIE W, et al. Bioeffects of ilow-frequency ultrasonic gene delivery and safety on cell membrane permeability control [J]. *Ultrasound Med*, 2004, 23 (12): 1569-1582.
- [2] HARLE J, VEHD S, MAYIA F, et al. Effects of ultrasound on the growth and function of bone and periodontal ligament cells in vitro [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2001, 27: 579-586.
- [3] RYABY T, BACHNER E J, BENDO J A, et al. Low intensity pulsed ultrasound increases calcium incorporation in both differentiation cartilage and bone cell cultures [J]. *Trans Orthop Res Soc*, 1989, 14: 15-20.
- [4] DOAN N, REHER P, MEGJLJ S, et al. In Vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts and monocytes [J]. *Oral Maxillofac Surg*, 1999, 57: 409-420.
- [5] 冯若. 超声空化与超声治疗 [J]. *自然杂志*, 2003, 25(6): 311-314.
- [6] 黄晶, 王志刚, 李增高. 导管超声对兔肝组织细胞的生物学效应 [J]. *中华肝脏病杂志*, 1997, 5(1): 55-56.

(下转第128页)

致谢: 本文的研究工作得到了王志刚教授、刘光聪高级工程师及黄晶教授“心脏介入超声课题组”成员的帮助, 在此一并致谢。

- [6] THOMSON D, HENRY R. Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR[J]. *Biotechniques*, 2003, 19:394-400.
- [7] 汪秀峰, 杨剑波, 向太和, 等. 一种叶片直接用作 PCR 扩增的新方法及其应用[J]. *中国水稻科学*, 2002, 16(1): 67-70.
- [8] KLIMYUN VL, CARROLL BJ, THOMAS CM, et al. Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis[J]. *Plant J*, 1993(3):493-494.
- [9] 楼巧君, 陈亮, 罗利军. 三种水稻基因组 DNA 快速提取方法的比较[J]. *分子植物育种*, 2005, 3(5):749-752.
- [10] 王凭青. 杂交狼尾草新品种的生物学特性与营养价值[J]. *重庆大学学报:自然科学版*, 2001, 24(5):96-97.
- [11] 吴秀峰, 陈平, 祁桂林, 等. 杂交狼尾草新品系 1 号的特性及牧草品质[J]. *广东农业科学*, 2005(5):60-61.

## Rapid DNA Extraction method for Molecular Marker Analysis of Pennisetum Hybrid

WANG Ping-qing, WU Ming-sheng, LIU Bo, TANG Fang, LI Zhi-zhong  
(College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** A rapid method for DNA extraction from Pennisetum hybrid was developed. Using the method, leaves of the Pennisetum hybrid was treated by the 0.05 mol NaOH solution and heated in the boiling water for 10 min, followed by the neutralization with TE solution ( $pH=3.0$ ), and the DNA extraction was used for RAPD-PCR and SSR-PCR analysis. The result indicates. The quality of the DNA by the simplified method is amount to DNA extracted by the CTAB method, and the DNA extracted by this method an meet the requirement of molecular marker analysis based on PCR technology. Combined with the 96-well plate, it can realize the high-throughput DNA extraction.

**Key words:** Pennisetum; DNA extraction; molecular marker.

(编辑 陈移峰)

(上接第 122 页)

## Biological Effect of Catheter-based Ultrasound Irradiating dog's Myocardium

YUAN Qiao-ying<sup>1</sup>, HUANG Jing<sup>1</sup>, ZHU Zhng-wei<sup>2</sup>, DENG Hui-sheng<sup>1</sup>, LI Jing-song<sup>1</sup>

(1. Cardiological Department, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of  
Medical Science, Chongqing 400016, China;

2. College of Civil Engineering of Chongqing University, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** This paper investigates the biological effect of intracardiac ultrasound irradiating myocardium in dogs. A ultrasound catheter was inserted into the dog's left ventricular chamber and the therapeutic ultrasound energy ( $1w/cm^2$ , one minute) was delivered. The immediate change of myocardial pathobiology and microstructure were observed, meanwhile hemodynamics was measured. Compared with controls, mitochondria generally little swell, capillary endothelium cell also swell after the dogs were irradiated by ultrasound. In general, intracardiac ultrasound irradiating myocardium can enhance the permeability of capillary and myocardial cell membrane, which may be a new, safe and effective method for interventional ultrasound therapy of cardiovascular disease.

**Key words:** catheter; ultrasound irradiation; biological effect

(编辑 侯湘)