

高强度聚焦超声对SD大鼠感染耻垢分枝杆菌病灶损伤效应的实验研究

李健虎 傅敏 谢霜 杜永洪

摘要 **目的** 探究高强度聚焦超声(HIFU)对SD大鼠感染耻垢分枝杆菌(MS)结核动物模型的损伤效应。**方法** 20只SD大鼠臀部皮下分别注射MS悬液1 ml建立感染MS结核动物模型。选取10只成功建立模型的SD大鼠分为HIFU组和对照组,每组5只。HIFU组行HIFU辐照15 s(频率1 MHz,声强6369 W/cm²);对照组行假照15 s(频率1 MHz,声强0 W/cm²)。观察两组辐照前后结节B超灰度变化。对结节组织分别进行HE染色和抗酸染色,光学显微镜下观察结节组织病理变化;激光共聚焦显微镜及扫描电镜下观察HIFU辐照对结节的损伤效应。**结果** HIFU组HIFU辐照前后SD大鼠结核结节的B超灰度值比较差异有统计学意义($P=0.004$);对照组辐照前后结节的B超灰度值无明显变化。HE染色:对照组光学显微镜下见皮肤组织结构完整,皮肤附件结构正常,未发现明显的炎症浸润;HIFU组光学显微镜下见皮肤组织结构完整,真皮层组织未见损伤,皮肤附件正常,炎性细胞浸润加重,呈急性损伤表现。抗酸染色:对照组中MS聚集成团,HIFU组中MS较分散,呈短棒状。对照组和HIFU组MS存活率分别为93.61%和48.60%。经HIFU辐照后,MS菌体表面变得粗糙,菌体细胞壁破裂。**结论** 一定剂量的HIFU辐照能有效抑制SD大鼠感染MS的结核结节,有望成为治疗结核病的新方法。

关键词 高强度聚焦超声;耻垢分枝杆菌;损伤效应;结核病;鼠

[中图分类号]R445.1;R-332

[文献标识码]A

Injury effect of high intensity focused ultrasound on mycobacterium smegmatis infection in SD rats

LI Jianhu, FU Min, XIE Shuang, DU Yonghong

College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

ABSTRACT **Objective** To investigate the injury effect of high intensity focused ultrasound(HIFU) on mycobacterium smegmatis (MS) in tuberculous rat models. **Methods** By subcutaneous injection of 1 ml of MS suspension into the hip of SD rats, 10 SD rats were successfully established MS tuberculous infection model and divided into HIFU group and control group, 5 rats in each group. HIFU group was irradiated with HIFU for 15 s (frequency of 1 MHz, sound intensity of 6369 W/cm²), while control group was sham for 15 s (frequency of 1 MHz, sound intensity of 0 W/cm²). The changes of B-mode ultrasonic grayscale of nodules before and after irradiation were observed in the two groups. HE staining and acid-fast staining were used to observe the pathological changes of nodule tissues under optical microscope. The effects of HIFU irradiation damage were observed by confocal laser and scanning electron microscope. **Results** There was statistically significant difference in the B - ultrasound grayscale of the tuberculous nodules before and after irradiation in the HIFU group ($P=0.004$). There was no significant change in B-ultrasound grayscale of nodules before and after irradiation in the control group. HE staining: under the optical microscope, the skin tissue structure was intact and the skin attachment structure was normal in the control group, no obvious inflammatory infiltration was found. The structure of the skin tissue was intact under the optical microscope of the HIFU group, no damage was observed to the dermal tissue, and the skin appendages were normal, inflammatory cells infiltrated and presented acute injury. Acid-fast staining: MS in the control group was clustered, while MS in the HIFU group was dispersed and appeared as a short

基金项目:国家自然科学基金项目(11604034);重庆市基础科学与前沿技术研究专项(csc2016jcyjA0098)

作者单位:400016 重庆市,重庆医科大学生物医学工程学院 省部共建国家重点实验室培育基地——重庆市超声医学工程重点实验室(李健虎、谢霜、杜永洪);重庆市中医院肿瘤科(傅敏)

通讯作者:杜永洪,Email:duyonghong@yeah.net

rod. Compared with the control group, the survival rate of MS bacteria in HIFU group decreased significantly (93.61% vs. 48.60%). After HIFU irradiation, the surface of MS became rough and the cell wall was broken. **Conclusion** HIFU at a certain dose can effectively inhibit the infected MS tuberculous nodules in SD rats, which is expected to be a new method for the treatment of tuberculosis.

KEY WORDS High intensity focused ultrasound; Mycobacterium smegmatis; Injury effect; Tuberculosis; Rats

结核病是由结核分枝杆菌引起、具有高度传染性的慢性疾病^[1]。由于结核分枝杆菌生长非常缓慢,具有高致病性,故对实验条件的要求高。目前,相关实验常选用具有类似细胞壁的结核分枝杆菌生物模式菌——卡介苗和耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*, MS)开展研究^[2-4]。研究^[5]报道高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)对卡介苗具有急性损伤效应,但HIFU对MS的损伤研究未见报道。本实验通过建立SD大鼠感染MS结核动物模型,并对其HIFU辐照,旨在探讨HIFU对活体MS结核结节的损伤效应。

材料与方法

一、实验动物

健康SD雌鼠20只,5~6周龄,体质量180~210 g,由重庆医科大学动物实验中心提供,无菌条件下饲养,环境温度和湿度相同。

二、主要实验仪器及试剂

JC-200型HIFU肿瘤治疗系统(重庆海扶医疗科技股份有限公司),由组合治疗探头、功率源、诊断B超、多维数控运动装置、真空脱气水装置、治疗床及计算机组成。换能器频率1 MHz,焦距145 mm,辐照声强6369 W/cm²; TCS-SP2激光共聚焦显微镜(德国Leica公司); S-3400N扫描电镜(日本日立公司) Middlebrook 7H9肉汤和OADC增菌液(美国BD公司,批号分别为4099145、211886);甘油[重庆川东化工(集团)有限公司];吐温。

三、培养耻垢分枝杆菌

MS标准株购于中国药品生物制品检定所。取0.47 g Middlebrook 7H9肉汤加入装有90 ml双蒸水的锥形瓶中,再加入200 μ l甘油和50 μ l吐温,配置好细菌生长所需的培养基^[6]。然后将锥形瓶放置于高温灭菌箱中灭菌30 min,取出后待温度降至室温时加入2 ml MS和10 ml OADC增菌液。于恒温水平摇床中培养24 h使MS菌达到对数期。

四、建立SD大鼠感染MS结核动物模型

20只健康SD大鼠在接种MS前3 d时喂食免疫抑制剂(地塞米松1 mg/kg),接种当天用37 $^{\circ}$ C、4%硫化钠溶液对SD大鼠右侧臀部进行脱毛,然后注射1 ml浓度为 2×10^7 cfu/ml的MS悬液。每只SD大鼠的左侧臀部不做处理。随后每天正常饲养大鼠,分别记录其体质量变化和结节形成情况。注射MS菌第14天随机取3只SD大鼠处死,并对其结核结节进行病理切片,以光学显微镜下显示有MS菌存在为SD大鼠感染MS结核动物模型建立成功。

五、实验分组及操作方法

选取建模成功的SD大鼠10只,随机分为对照组和HIFU组,每组5只。辐照前分别对SD大鼠右侧臀部进行脱毛处理,将SD大鼠仰卧位固定于HIFU肿瘤治疗系统下端带有圆孔的治疗架上,于HIFU肿瘤治疗系统监控B超下找到SD大鼠结核结节的边界,将HIFU的焦点定位在结节中心,辐照前测量结节的B超灰度值。HIFU组进行HIFU辐照15 s(辐照5 s、停5 s),辐照参数为频率1 MHz,声强6369 W/cm²;对照组进行HIFU假照15 s(辐照5 s、停5 s),辐照参数为频率1 MHz,声强0 W/cm²。分别检测两组辐照前后结节B超图像的灰度值,并将大鼠继续饲养3 d后处死,进一步行病理学相关分析。

六、病理学检查

取SD大鼠右侧臀部大小为8.0 mm \times 6.0 mm的结节组织,用4%多聚甲醛溶液固定并进行HE染色和抗酸染色,光镜下分别观察两组结节组织损伤情况和菌体结构形态。将剩余的结节组织剪碎行组织匀浆染色,应用激光共聚焦显微镜和扫描电镜分别观察HIFU对MS结核结节的损伤情况。SYTO9-PI染色后应用激光共聚焦显微镜观察HIFU辐照前后MS的活性,绿色荧光说明有MS活菌存在,红色荧光为死细胞。应用Image J软件对荧光强度进行分析,比较两组细菌存活率。扫描电镜观察MS的外部形态。

七、统计学处理

应用SPSS 22.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、SD大鼠感染MS结核动物模型建立

20只SD大鼠在注射MS后1~3d精神状态欠佳,4d后精神状态逐步好转,其活跃程度与注射前比较稍有下降,体质量较注射前轻微下降,但差异均无统计学意义。注射MS后14d,SD大鼠臀部结节大小为8.0mm×6.0mm~12.0mm×7.5mm,质地较硬,活动性差(图1)。选取结节大小相似,平均大小为(74.2±7.4)mm²的10只SD大鼠进行后续实验。

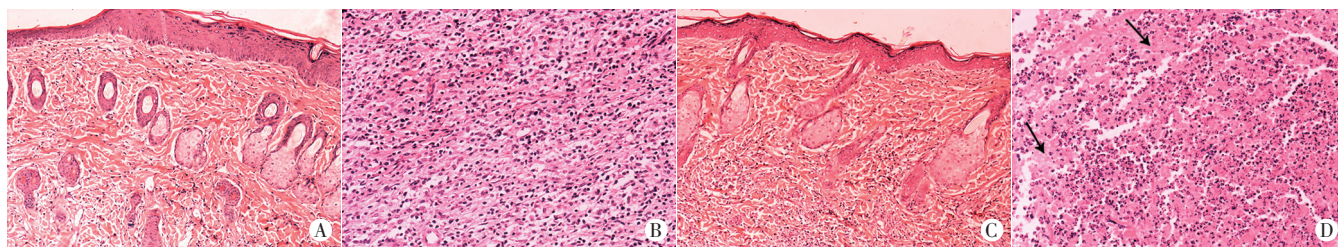


图1 SD大鼠感染MS结核结节大体图

二、两组辐照前后结节B超灰度值比较

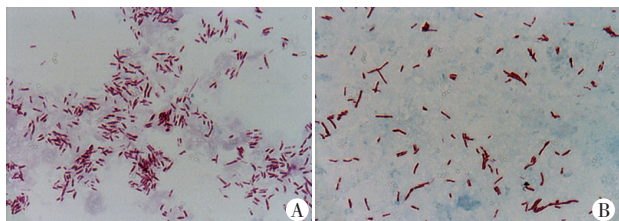
对照组SD大鼠皮下结核结节辐照前后结节回声强度无明显变化(图2A、B),HIFU组辐照前后结节回声强度明显增强(图2C、D)。对照组和HIFU组辐照前后B超灰度值分别为:72.40±7.33、74.40±8.50和74.60±6.95、115.2±5.31,HIFU组辐照前后B超灰度值比较,差异有统计学意义($P=0.004$),见图3。

三、两组HE染色和抗酸染色结果比较



A、B:对照组;C、D:HIFU组,箭头示HIFU辐照后出现大量炎性细胞浸润

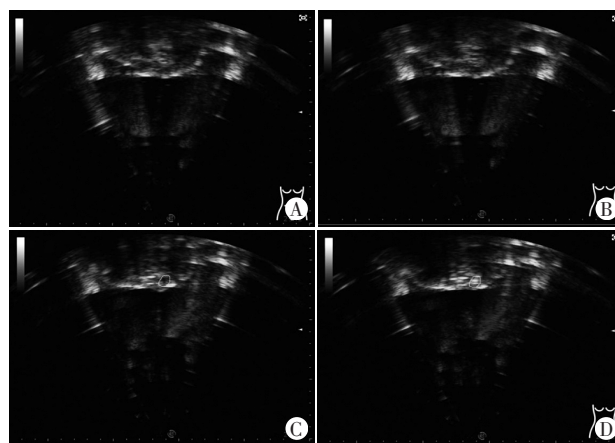
图4 两组结节组织HE染色病理图(图A、C×100;图B、D×200)



A:对照组;B:HIFU组

图5 两组结节组织抗酸染色病理图(×100)

HE染色:对照组光学显微镜下见皮肤组织结构完整,皮肤附件结构正常(图4A),未见明显的炎症浸润(图4B);HIFU组光学显微镜下见皮肤组织结构完整,真皮层组织未见损伤,皮肤附件正常(图4C),炎性细胞浸润加重,呈急性损伤表现(图4D)。抗酸染色:对照组MS聚集在一起,成团块状;HIFU组MS较分散,有断裂现象,菌体较对照组明显变短(图5)。



A、B:分别为对照组辐照前和辐照后;C、D:分别为HIFU组辐照前和辐照后

图2 两组辐照前后B超图

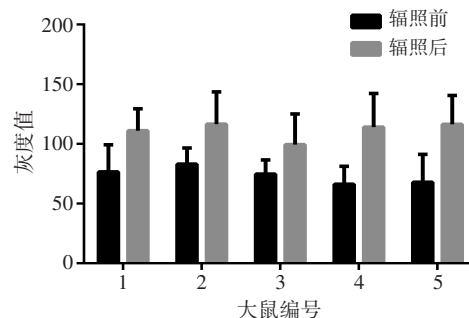
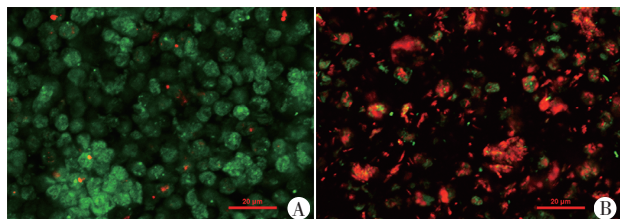


图3 HIFU组辐照前后B超灰度值变化柱状图

四、两组镜下结果比较

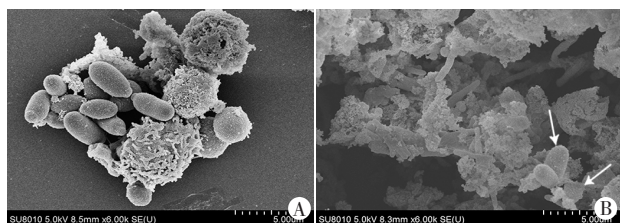
对照组激光共聚焦显微镜下主要以绿色荧光为主,MS聚集成团;HIFU组激光共聚焦显微镜下可观察到红色和少量绿色荧光。与对照组比较,HIFU组MS存活率显著降低,活菌数量明显减少。Image J软件分析显示对照组和HIFU组细菌存活率分别为93.61%和48.60%。见图6。

HIFU 辐照后,扫描电镜下见 MS 菌体明显变得粗糙,菌体细胞壁破裂。与对照组比较,HIFU 组 MS 的形态发生了明显变化,细胞壁的完整性及通透性均发生改变。见图 7。



A: 对照组; B: HIFU 组

图 6 两组结节组织匀浆激光共聚焦显微镜图(标尺大小 20 μm)



A: 对照组; B: HIFU 组, 箭头示为 MS 的菌体明显变得粗糙

图 7 两组结节组织匀浆扫描电镜图(×6.0 K)

讨 论

结核病是由结核分枝杆菌引起的世界第二大传染病,是全球十大死亡原因之一^[7]。近年来,随着人口迁移、社会老龄化和结核分枝杆菌^[8]耐药菌株的出现,全球结核病流行呈上升趋势。全球 2016 年约 1040 万人感染结核病,180 万人死于结核病^[9]。结核分枝杆菌可以侵犯人体各个器官,感染至肺部引起肺结核,临床最为常见;侵犯肺部以外部位为肺外结核。本实验通过对 SD 大鼠感染 MS 结核动物模型进行 HIFU 辐照,探讨 HIFU 对活体 MS 结核结节的损伤效应,旨在为 HIFU 治疗结核病提供参考依据。

本实验结果显示,HIFU 对结核结节的损伤效果显著,HIFU 组结核结节 HIFU 辐照后 B 超灰度较辐照前明显增强;MS 的细胞膜变得粗糙,细菌存活率显著降低。以往研究^[10]表明结核病的难治性根源在于结核分枝杆菌生物被膜的产生,细胞外基质阻止药物进入细胞,从而使治疗困难。HIFU 的主要作用原理是机械效应、热效应和空化效应。本实验结果表明了 HIFU 的热效应和机械效应对 MS 有显著的杀灭作用。分析其原因,HIFU 的热效应使组织的温度瞬间升高到 60℃,从而对细菌产生致死效应^[11];而通过 HIFU 的机械效应使得细菌的细胞膜通透性发生变化^[12]。基于

以上的特点,HIFU 在结核病的治疗上有巨大的潜力。本课题组今后将进一步研究 HIFU 对 MS 的作用机制,为临床结核病的治疗提供一种新方法。

本实验结果显示 HIFU 对杀灭 MS 具有良好的效果,且未见其对 SD 大鼠产生其他不良反应。这可能与 HIFU 能够使得细胞膜的通透性发生变化有关^[12],且 HIFU 产生的热效应和空化效应对 MS 具有一定的杀灭作用。

综上所述,HIFU 对结核分枝杆菌的模式菌——MS 显示出良好的损伤效应。一定剂量的 HIFU 能够有效消除 SD 大鼠感染 MS 的结核病灶,有望成为治疗结核病的新方法。

参考文献

- [1] Santha T, Renu G, Frieden TR, et al. Are community surveys to detect tuberculosis in high prevalence areas useful? Results of a comparative study from Tiruvallur District, South India [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2003, 7(3): 258-265.
- [2] Reyat JM, Kahn D. *Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis? [J]. *Trends Microbiol*, 2001, 9(10): 472-474.
- [3] Bohsali A, Abdalla H, Velmurugan K, et al. The non-pathogenic mycobacteria *M. smegmatis* and *M. fortuitum* induce rapid host cell apoptosis via a caspase-3 and TNF dependent pathway [J]. *BMC Microbiol*, 2010, 10(10): 237.
- [4] 董源,李哲,唐筱潇,等.低频超声对 BCG 急性损伤效应的实验研究[J]. *中国超声医学杂志*, 2014, 30(2): 175-178.
- [5] 杜永洪,王陈美依,彭从峰,等.聚焦超声对卡介苗急性损伤效应的实验研究[J]. *中国超声医学杂志*, 2012, 28(10): 880-883.
- [6] 谢霜,杨敏,杜永洪,等.低频低强度超声对巨噬细胞内耻垢分枝杆菌的损伤效应[J]. *第三军医大学学报*, 2018, 40(16): 1476-1482.
- [7] Zumla A, George A, Sharma V, et al. The WHO 2014 global tuberculosis report—further to go [J]. *Lancet Glob Health*, 2015, 3(1): 10-12.
- [8] Donald PR, van Helden PD. The global burden of tuberculosis—combating drug resistance in difficult times [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(23): 2393-2395.
- [9] Sotgiu G, Dara M, Centis R, et al. Breaking the barriers: migrants and tuberculosis [J]. *Presse Med*, 2017, 46(2 Pt 2): 5-11.
- [10] 石廷玉,王园媛,向宇波,等.结核分枝杆菌生物被膜基质及潜在的药物靶点和治疗策略 [J]. *中国科学:生命科学*, 2018, 48(7): 760-771.
- [11] 杜永洪,陈畅,陈飞,等.聚焦超声致早孕小鼠子宫平滑肌及胚胎损伤效应的观察 [J]. *临床超声医学杂志*, 2013, 15(1): 1-4.
- [12] 向洋,李帅,叶合敏,等.低频低强度超声对白色念珠菌急性损伤效应的实验研究 [J]. *临床超声医学杂志*, 2016, 18(9): 577-579.

(收稿日期:2019-03-28)