

血管内超声导管联合微泡增强尿激酶溶栓的实验研究

董睿 朱琼 冯爽 朱贤胜 高顺记 刘政

摘要 **目的** 探讨EKOS[®]超声导管联合血栓内注射微泡增强尿激酶体外溶栓治疗效果。**方法** 采用水听器法测量EKOS[®]超声导管峰值负压。将90份体外牛血血栓样本根据其实验方法随机分为6组,分别为:超声+微泡+尿激酶联合组(联合组)、超声+尿激酶组(US+UK组)、超声+微泡组(US+MB组)、超声组(US组)、尿激酶组(UK组)和对照组,每组15份,称取各组溶栓前后的血栓质量,计算并比较其溶栓率。对溶栓处理后各组血栓行HE染色并于光镜下观察红细胞和纤维蛋白的分布情况。**结果** EKOS[®]超声导管的峰值负压在0.4~6.4 MPa,呈无规律动态变化。联合组溶栓率为(41.9±4.5)%,与US+UK组(42.0±3.3)%接近,均显著高于其余各组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);US+MB组溶栓率为(28.4±3.3)%,UK组为(27.8±3.1)%,两组比较差异无统计学意义,但均高于US组(23.9±3.0)%和对照组(17.5±3.7)%,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。光镜下见联合组和US+UK组与EKOS[®]超声导管接触处的血栓较多崩解,红细胞分布较其余各组更稀疏。**结论** EKOS[®]超声导管可明显提高尿激酶对体外牛血血栓的溶栓率,在此基础上增加微泡对溶栓率无明显提高。

关键词 EKOS[®]超声导管;微泡;尿激酶;溶栓

[中图分类号]R445.1

[文献标识码]A

Enhanced urokinase thrombolysis by endovascular ultrasound catheter and microbubbles: a experimental study

DONG Rui, ZHU Qiong, FENG Shuang, ZHU Xiansheng, GAO Shunji, LIU Zheng

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

ABSTRACT **Objective** To investigate the thrombolytic effect of EKOS[®] ultrasound catheter combined with intrathrombotic microbubbles (MB) on urokinase (UK) thrombolysis. **Methods** The peak negative pressure (PNP) of the EKOS[®] catheter was measured by hydrophone method. Ninety bovine thrombus samples in vitro were randomly divided into six groups: ultrasound (US)+MB+UK (combined group), US+UK group, US+MB group, US group, UK group and control group, each group has 15 samples. The thrombus quality of each group was weighed before and after thrombolysis, and thrombolysis rate was calculated and compared. After treatment, the thrombus in each group was stained with HE, and the distribution of erythrocyte and fibrin was observed under a light microscope. **Results** The PNP of EKOS[®] catheter varied irregularly within the range of 0.4~6.4 MPa. The thrombolysis rate of combined group (41.9±4.5)% was close to that of US+UK group (42.0±3.3)%, which were significantly higher than that of the other groups (all $P<0.05$). The thrombolysis rate of US+MB group was (28.4±3.3)%, compared with (27.8±3.1)% in UK group, there was no significant difference between the two groups, which were significantly higher than that of US group (23.9±3.0)% and control group (17.5±3.7)%, there were significant difference (both $P<0.05$). Histological examination of the thrombus in combined group and US+UK group showed that the thrombus contacting with EKOS[®] catheter was more disintegrated, and the distribution of red blood cells was more sparse than other groups. **Conclusion** EKOS[®] catheter can obviously improve the thrombolysis rate of UK to bovine thrombus in vitro, however, MB has no significant effect on thrombolysis rate.

KEY WORDS EKOS[®] catheter; Microbubbles; Urokinase; Thrombolysis

基金项目:广州市科技计划项目(201707010083);湖北省卫计委科研基金面上项目(WJ2018H0078);武汉市中青年医学骨干人才基金
作者单位:400037 重庆市,中国人民解放军陆军军医大学第二附属医院超声科(董睿、朱琼、刘政);中国人民解放军南部战区总医院超声影像科(冯爽、朱贤胜);中国人民解放军中部战区总医院超声科(高顺记)
通讯作者:刘政, Email: liuzheng@163.com

深静脉血栓形成是一种常见的外周血管血栓性疾病,血栓脱落可引起肺动脉栓塞、脑梗死等严重并发症。下肢深静脉血栓即使接受规范的抗凝治疗,仍有 30%~50% 患者发展为血栓后综合征,出现患肢肿胀、静脉性跛行等^[1]。超声溶栓是超声空化治疗技术的应用之一,其通过超声发射产生的空化效应增强药物溶栓的疗效^[2-4]。研究^[5-6]显示微泡作为一种有效的空化核,可增强诱导超声空化效应,提高超声溶栓效果。EKOS[®]超声导管是一种经血管腔内的新型超声溶栓方法,在不联合微泡的情况下,该超声导管应用于临床治疗肺动脉栓塞和静脉血栓等已取得肯定的效果^[7-8]。本实验通过经 EKOS[®]超声导管血栓内注射微泡和尿激酶进行体外溶栓,旨在探讨 EKOS[®]超声导管联合血栓内注射微泡增强尿激酶体外溶栓治疗效果。

材料与方 法

一、主要实验试剂与仪器

1. 实验试剂: 无菌抗凝新生牛血、无水氯化钙、4% 组织细胞固定液(北京索莱宝科技有限公司); 牛血浆(郑州九龙生物制品有限公司); 注射用尿激酶(丽珠集团丽珠制药厂); 注射用全氟丁烷微球($1.2 \times 10^9/\text{ml}$, Sonazoid[®], GE 医疗, 挪威); PBS 缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司)。

2. 仪器: EKOS[®] 超声导管系统(MACH4, 美国 EKOS 公司), 配备多侧孔给药鞘管、多阵元超声发射轴芯和 EkoSonic 控制单元, 其轴芯在治疗区有 12 个微型超声换能器, 发射频率 2.2 MHz。针式水听器(HNC-0400, 美国 ONDA 公司); 微量蠕动泵(BT-100E, 重庆杰恒蠕动泵有限公司); 恒温水浴箱(德国 HUBER 公司); 双通道微量输液泵(上海蓝德医疗器械有限公司); 电子天平(UTP-313, 上海花潮电器有限公司); 荧光显微镜(BX3-CBH, 日本 OLYMPUS 公司)。

3. 体外循环装置: 由微量蠕动泵和自制模拟体循环的管道组成, 在管道的入口处以三通管连接另一管道入口用于插入 EKOS[®] 超声导管, 血栓样品池两端设有管道以模拟人体血栓形成时开放的侧支循环, 置整个循环管道于 37℃ 恒温水浴箱中。见图 1。循环液为含 10% 牛血浆的 PBS 液, 蠕动泵以 60 r/min 工作。

二、实验方法

1. EKOS[®] 超声导管声学参数测量: 应用 HNC-0400 针式水听器(灵敏度为 1.228×10^{-7}), 分别于换能器晶片距水听器 1、2、3、4、5 mm 处, 测量峰值负压并记录。

2. 血栓制备: 取无菌抗凝新生牛血制备血栓 90 份,

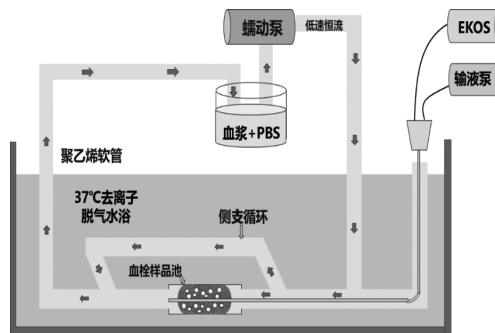


图 1 体外溶栓实验循环装置示意图

每份 8 ml, 置于预先加入 5% 氯化钙溶液 ($33 \mu\text{l}/\text{ml}$) 的圆底 EP 管中, 于 37℃ 恒温水浴箱中温育 3 h 后取出, 去除血清, PBS 液冲洗 3 次, 滤纸吸干血栓表面液体后应用电子天平称量血栓的初始质量 (W_0)。

3. 实验分组及步骤: 采用 Excel 随机数字表法将前期制备的 90 份同质血栓样本随机分为 6 组, 每组 15 份, 分别为: 超声+微泡+尿激酶联合组(联合组)、超声+尿激酶组(US+UK 组)、超声+微泡组(US+MB 组)、超声组(US 组)、尿激酶组(UK 组)和对照组。各实验组血栓栓龄相同, 具有可比性。

将 10 万 U 尿激酶和/或 0.02 ml Sonazoid[®] 造影剂以 0.9% 无菌生理盐水稀释至 5.0 ml (微泡浓度为 $4.8 \times 10^6/\text{ml}$), 并全部吸入微量输液泵 I 通道的注射器中, 然后与 EKOS[®] 超声导管的 Drug 端口连接; 输液泵 II 通道放置充满 50.0 ml 0.9% 无菌生理盐水的注射器, 并以 100 ml/h 的速度向 EKOS[®] 超声导管的 Coolant 端口注入, 以扩散超声传感器产生的热能。联合组采用经 EKOS[®] 超声导管匀速 (10 ml/h) 向血栓内注入 10 万 U 尿激酶和 0.02 ml Sonazoid[®] 造影剂稀释液; US+UK 组和 UK 组以同样方法注入 10 万 U 尿激酶稀释液; US+MB 组注入 0.02 ml Sonazoid[®] 造影剂稀释液; US 组和对照组注入 5.0 ml 无菌生理盐水。同时根据分组情况, 对联合组、US+UK 组、US+MB 组和 US 组采用经 EKOS[®] 超声导管进行超声辐照, UK 组和对照组不予超声辐照, 各组处理时间均为 30 min。然后取出血栓, 以 PBS 液冲洗 3 次, 用滤纸吸干血栓表面液体, 再次应用电子天平称量血栓质量 (W_1)。

三、评价和观测指标

计算各组血栓溶栓率, 公式为: 溶栓率 = $(W_0 - W_1) / W_0 \times 100\%$ 。将溶栓处理后血栓置于 4% 组织细胞固定液中固定, 制成石蜡切片, 并进行 HE 染色。于荧光显微镜下观察各组血栓中红细胞和纤维蛋白的分布情况。

四、统计学处理

应用 SPSS 25.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,

各组处理前血栓 W_0 的比较采用非参数检验中的 Kruskal-Wallis H 检验;计数资料以百分比表示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、EKOS[®]超声导管声学参数测量结果

导管换能器占空比为 24.86%,峰值负压范围为 0.4~6.4 MPa,呈无规律动态变化。

二、各组血栓样本 W_0 和溶栓率比较

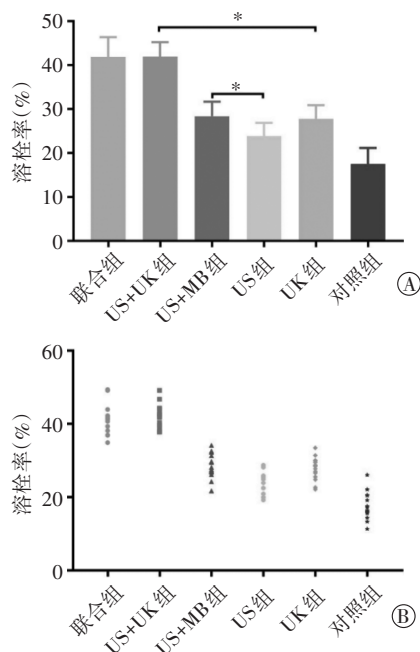
各组血栓样本 W_0 、溶栓率比较情况见表 1 和图 2。

各组血栓样本 W_0 比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 10.033, P = 0.074$)。联合组溶栓率与 US+UK 组溶栓率相近,均显著高于其余各组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。US+MB 组溶栓率与 UK 组溶栓率相近,均高于 US 组和对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

表 1 各组溶栓前后血栓质量和溶栓率比较

组别	W_0 (g)	W_1 (g)	溶栓率(%)	
			$\bar{x} \pm s$	95% 可信区间
联合组	6.2±0.3	3.6±0.4	41.9±4.5*	39.4~44.4
US+UK 组	6.3±0.1	3.6±0.2	42.0±3.3*	40.1~43.8
US+MB 组	6.3±0.2	4.5±0.3	28.4±3.3	26.6~30.2
US 组	6.2±0.1	4.7±0.2	23.9±3.0*	22.3~25.6
UK 组	6.3±0.2	4.5±0.3	27.8±3.1	26.1~29.5
对照组	6.4±0.2	5.2±0.3	17.5±3.7*	15.4~19.5

与 UK 组比较,* $P < 0.05$ 。 W_0 :初始质量; W_1 :溶栓后质量



A:柱状图,* $P < 0.05$;B:散点图
图 2 各组溶栓率比较柱状图和散点图

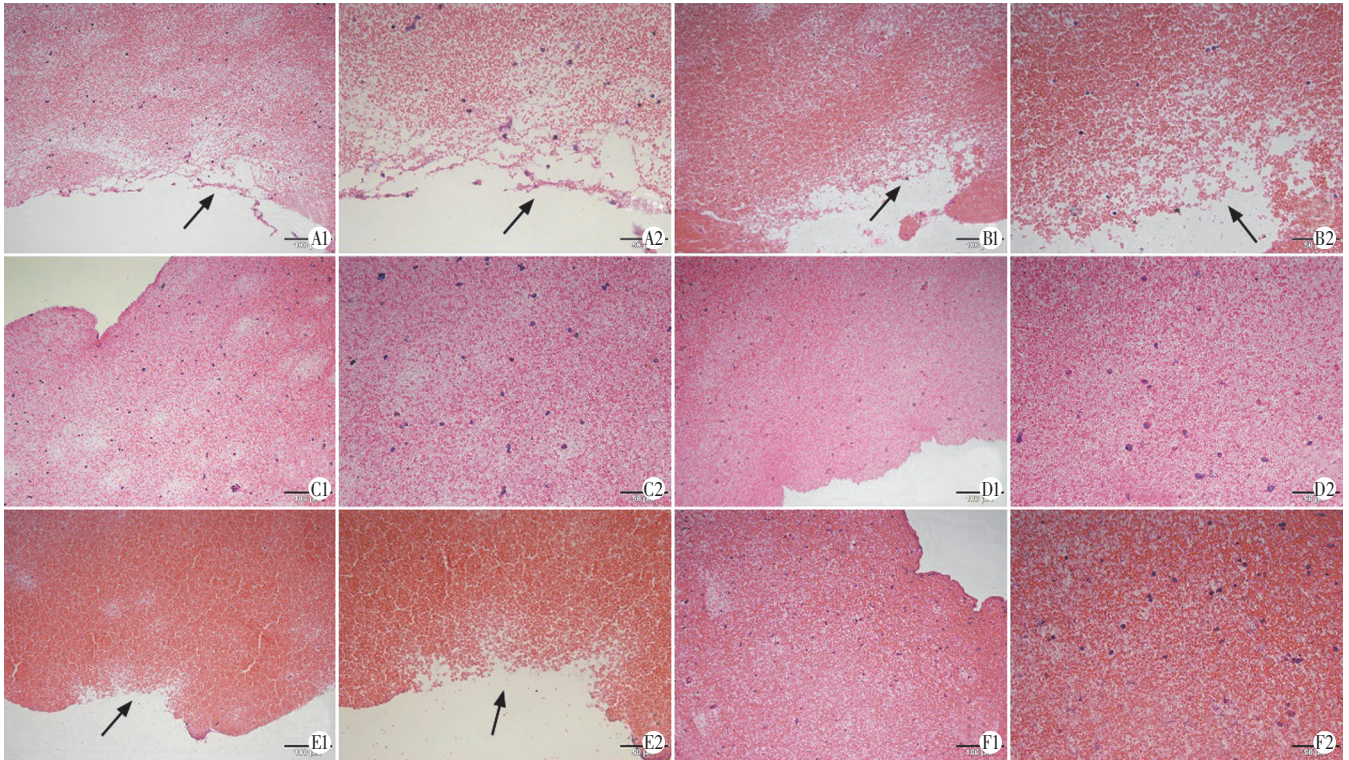
三、组织学表现

光镜观察结果显示,联合组和 US+UK 组与 EKOS[®] 超声导管接触处的血栓可见较多崩解,红细胞分布较其余各组更稀疏;UK 组血栓可见少量溶解灶,红细胞分布较稀疏;余各组血栓仍较致密,未见明显血栓溶解区。见图 3。

讨 论

近年来,超声溶栓已成为治疗深静脉血栓的一种新方法。超声波作为一种机械波,一方面可以机械性地破坏血栓,同时也可以激励空化核产生空化效应,其释放的声辐射、微射流、冲击波等机械能量进一步使血栓裂解,产生更多的孔隙,利于溶栓药物的渗透,进而提高溶栓效率^[2,9]。微泡作为一种有效的空化核,是诱导超声空化效应的关键,可显著降低发生空化效应的声压阈值^[10]。研究^[11-13]结果表明在适合微泡空化的条件下,超声联合微泡可显著提高溶栓效果。EKOS[®] 超声导管结合了导管介入溶栓和高频超声,可通过超声能量使纤维蛋白链可逆性分解,允许更多地暴露血栓内纤溶酶原受体位点,同时经多侧孔超声导管使溶栓药物直接作用于血栓内部,使血栓局部药物浓度增高,作用增强,从而减少了溶栓药物的用量和治疗时间^[14-15]。该导管系统的换能器发射频率为 2.2 MHz。研究^[16]表明 2.2 MHz 的超声频率与载尿激酶的微泡联合使用可产生最优的再通率,部分原因可能是超声频率与微泡的振动频率相似,可引起微泡谐振产生最佳的溶栓效果。本实验应用 EKOS[®] 超声导管联合血栓内注射微泡和尿激酶的方法,对体外牛血血栓进行溶栓实验,旨在探讨 EKOS[®] 超声导管联合微泡增强尿激酶溶栓效果。

本实验结果显示,US+UK 组的溶栓率为(42.0±3.3)%,高于 UK 组的溶栓率(27.8±3.1)%,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 EKOS[®] 超声导管产生的空化效应和机械效应有助于血栓溶解,并与 HE 染色光镜观察结果相符。US+MB 组的溶栓率为(28.4±3.3)%,高于 US 组的溶栓率(23.9±3.0)%,差异有统计学意义($P < 0.05$),但联合组的溶栓率(41.9±4.5)%与 US+UK 组的溶栓率相近,表明在超声和尿激酶两者作用的基础上,微泡的加入并未进一步提高溶栓率。分析其原因,一方面可能是由于 EKOS[®] 超声导管的频率为 2.2 MHz,声压在 0.4~6.4 MPa,呈无规律动态变化,高声压的超声能量瞬间击破微泡,产生粒径更小的空化核,而 2.2 MHz 的频率不能与该小粒径的微泡产生较



A1、A2:联合组,箭头示镜下可见血栓较多崩解(A1:×200,A2:×400);B1、B2:US+UK组,箭头示镜下可见血栓较多崩解(B1:×200,B2:×400);C1、C2:US+MB组,镜下见血栓结构较致密(C1:×200,C2:×400);D1、D2:US组,镜下见血栓结构较致密(D1:×200,D2:×400);E1、E2:UK组,箭头示镜下血栓内可见少量溶解灶(E1:×200,E2:×400);F1、F2:对照组,镜下未见明显溶解,血栓结构致密(F1:×200,F2:×400)

图3 各组治疗后血栓病理图(HE染色)

好的谐振,从而削弱了超声空化效应;加之血栓较致密,微泡在导管侧孔两侧不能及时弥散,导致微泡大量堆积形成微泡层,阻挡了超声能量的穿透,从而导致溶栓效率有限。另一方面,在未应用尿激酶时,微泡介导的超声溶栓率较单纯的超声溶栓率有所提高,应用尿激酶后,超声和尿激酶两合作用产生的溶栓效果已经很显著,EKOS[®]超声导管激励微泡增加的有限的溶栓效果可能被超声联合尿激酶产生的溶栓效果掩盖,故联合组的溶栓率较US+UK组无明显变化。此外,有研究^[17]发现,在微泡介入的情况下,由于微射流、自由基生成、声流和剪切应力的增加,致使酶失活、变性或断裂,最终导致溶栓药物的活性降低。本实验采用的EKOS[®]超声导管其声压最大可达6.4 MPa,诱导产生剧烈的瞬态空化,也有可能使尿激酶活性下降。本实验US+MB组的溶栓率与UK组比较差异无统计学意义,表明超声联合微泡溶栓与单纯使用尿激酶溶栓具有相似的溶栓效果。

本实验的局限:作为EKOS[®]超声导管联合微泡和尿激酶进行溶栓实验的初步研究,本实验在体外采用抗凝牛血人工诱导形成的新鲜血栓上进行,未能在动物实验中进一步验证其有效性。此外,本实验未说明

因延长血栓形成时间及延长或缩短治疗时间而导致的血栓质量减少的差异,有待后续进一步完善。

综上所述,EKOS[®]超声导管可明显增强尿激酶的体外溶栓效果,但在此基础上,增加微泡对溶栓率的提高并不明显。结合对EKOS[®]超声导管的声学参数测量可发现该导管的设计制作并不利于微泡发生空化效应,但EKOS[®]超声导管联合尿激酶是治疗深静脉血栓形成的一种很有前途的方法。

参考文献

- [1] Sista AK, Suresh V, Kaufman JA, et al. Endovascular interventions for acute and chronic lower extremity deep venous disease: state of the art[J]. Radiology, 2015, 276(1):31-53.
- [2] Francis CW, Blinc A, Lee S, et al. Ultrasound accelerates transport of recombinant tissue plasminogen activator into clots [J]. Ultrasound Med Biol, 1995, 21(3):419-424.
- [3] Schellinger PD, Molina CA. Sonothrombolysis: current status [J]. Perspect Med, 2012, 1(1):11-13.
- [4] Alexandrov AV, Molina C, Grotta JC, et al. Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke [J]. N Engl J Med, 2004, 351(21):2170-2178.
- [5] Datta S, Coussios CC, Ammi AY, et al. Ultrasound-enhanced thrombolysis using definity as a cavitation nucleation agent [J].

- Ultrasound Med Biol, 2008, 34(9):1421-1433.
- [6] Brown AT, Flores R, Hamilton E, et al. Microbubbles improve sonothrombolysis in vitro and decrease hemorrhage in vivo in a rabbit stroke model[J]. Invest Radiol, 2011, 46(3):202-207.
- [7] Piazza G, Hohlfelder B, Jaff MR, et al. A prospective, single-arm, multicenter trial of ultrasound-facilitated, catheter-directed, low-dose fibrinolysis for acute massive and submassive pulmonary embolism: the seattle II study[J]. JACC Cardiovasc Interv, 2015, 8(10):1382-1392.
- [8] Zaghlool D, Franz R, Jenkins J. EkoSonic thrombolysis as a therapeutic adjunct in venous occlusive disease [J]. Int J Angiol, 2016, 25(4):203-209.
- [9] Rosenschein U, Furman V, Kerner E, et al. Ultrasound imaging-guided noninvasive ultrasound thrombolysis [J]. Circulation, 2000, 102(2):238-245.
- [10] Hwang JH, Brayman AA, Reidy MA, et al. Vascular effects induced by combined 1-MHz ultrasound and microbubble contrast agent treatments in vivo[J]. Ultrasound Med Biol, 2005, 31(4):553-564.
- [11] Tachibana K, Tachibana S. Albumin microbubble echo-contrast material as an enhancer for ultrasound accelerated thrombolysis [J]. Circulation, 1995, 92(5):1148-1150.
- [12] Molina CA, Ribo M, Rubiera M, et al. Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-MHz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator[J]. Stroke, 2006, 37(2):425-429.
- [13] 朱琼, 高顺记, 郭梦娇, 等. 血栓内微泡联合尿激酶介导的超声溶栓体外实验[J]. 中国介入影像与治疗学, 2017, 14(4):242-246.
- [14] Sekulic I, Dzudovic B, Matijasevic J, et al. Ultrasound assisted thrombolysis in intermediate-risk patients with pulmonary thromboembolism[J]. Acta Cardiol, 2019, 8(1):1-8.
- [15] Dumantepe M, Tarhan I, Ozler A. Treatment of chronic deep vein thrombosis using ultrasound accelerated catheter-directed thrombolysis[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2013, 46(3):366-371.
- [16] Zhu Y, Guan L, Mu Y. Combined low-frequency ultrasound and urokinase-containing microbubbles in treatment of femoral artery thrombosis in a rabbit model [J]. PLoS One, 2016, 11(12):e0168909.
- [17] Soltani A, Prokop AF, Vaezy S. Stability of alteplase in presence of cavitation[J]. Ultrasonics, 2008, 48(2):109-116.

(收稿日期:2019-11-11)

· 病例报道 ·

Three-dimensional transvaginal ultrasound in diagnosis of single horn uterus combined with residual uterine horn pregnancy: 2 cases report

经阴道三维超声诊断单角子宫合并残角子宫妊娠2例

余春艳 黄文霞 曾可为 彭格红

[中图法分类号]R445.1

[文献标识码]B

病例1,患者女,27岁,因外院超声检查示宫内双胎妊娠并胎儿死亡,引产失败转入我院。体格检查:生命体征平稳,子宫增大如孕4个月。超声检查:宫腔未见妊娠囊。双侧卵巢正常,腹、盆腔无积液。子宫右后方与右卵巢间见10.6 cm×9.7 cm×10.0 cm混合性团块(图1),边界清,内见两个变形胎儿及胎盘,均无胎心,头臀径分别为7.3 cm、6.8 cm,团块周边见子宫肌层回声,最薄处厚0.3 cm;CDFI可探及丰富血流信号。二维超声矢状切面示子宫似呈长梭形,横切面示子宫底部较窄,扫查包块与宫颈不相通。三维多平面成像:宫腔呈柳叶状偏向宫底左侧(图2)。超声诊断:单角子宫合并残角子宫双胎妊娠,双胎均停止发育。行经腹右侧残角子宫及右侧输卵管切除术,术中于子宫右后方见10 cm包块,其基底与子宫右侧相连,右侧卵巢

固有韧带及输卵管位于其上,内见两个孕14周变形胎儿。

病例2,患者女,18岁,因停经3个月,外院超声检查发现腹腔妊娠入院。体格检查:左附件区扪及大小约6 cm×5 cm包块。超声检查:宫腔内见3.5 cm×1.1 cm无回声区;双侧卵巢正常,腹、盆腔无积液,紧贴子宫左前方见7.7 cm×7.5 cm×7.0 cm混合性团块(图3),边界清,内见一胎儿及胎盘,胎心可见,头臀径6.4 cm,团块周边见子宫肌层回声,最薄处厚约0.2 cm;CDFI可探及丰富血流信号。二维超声矢状切面示子宫似呈长梭形,横切面示子宫底部较窄,包块与宫颈不相通。三维自由解剖成像:宫腔呈单一管状略偏向宫底右侧(图4)。超声诊断:单角子宫合并残角子宫妊娠,宫腔少量积液。行经腹左侧残角子宫及左侧输卵管切除术,术中于子宫左侧见8 cm包块,其基底与

(下转第94页)