

超声联合靶向微泡治疗急性脑血栓的动物实验研究

王崇宝, 胡会社, 刘亚民

陕西省中医医院 血管病介入科 (西安 710002)

【摘要】 目的 探讨超声联合靶向微泡治疗急性血栓的效果,以及对纤溶系统的影响。**方法** 采用脑血管造影后将大白兔自体血栓通过导管注入颈动脉制备脑血栓动物模型。6 h后造影确定血栓未自溶。49只大白兔分为4组。A组($n=13$):经导管注射新型结合血小板Ⅱb/Ⅲa受体的靶向微泡(TMB);B组($n=12$):经导管直接注射非靶向微泡(NTMB);C组($n=12$):注射艾通立(重组纤溶酶原激活物 r-TPA);D组($n=12$):经导管注射生理盐水。A、B、D组均在治疗时应用低频超声(1 MHz , 2.0 W/cm^2)30 min。分别在治疗后立刻、1 h和2 h造影观察血栓溶解、血流再通情况,并在栓塞前和治疗后2 h取静脉血,检测凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(Fib)和D-二聚体。**结果** A组6只(46.15%),B组1只(8.33%),C组4只(33.33%),D组1只(8.33%)血栓溶解,A、C组血栓溶解率高于B、D组($P<0.01$);A、B、D组治疗后PT、APTT、TT、Fib和D-二聚体差异无统计学意义($P>0.05$),组间差异也无统计学意义($P>0.05$),而C组中D-二聚体高于其他组($P<0.05$),Fib低于其他组($P<0.05$)。**结论** 超声联合靶向微泡可快速溶解血栓使血管再通,其作用与r-TPA相似而出血等副作用小。

【关键词】 靶向微泡 超声 血栓 缺血性脑卒中

Animal Study in Combining Targeted-microbubbles with Low-frequency Ultrasound for the Treatment of Ischemic Stroke
WANG Chong-bao, HU Hui-she, LIU Ya-min. Department of Vascular Disease Intervention Families, Traditional Chinese Hospital of Shanxi, Xi'an 710002, China

【Abstract】 Objective To study the treatment of ischemic stroke with combining targeted-microbubbles with low frequency ultrasound in animal model. **Methods** Cerebral thrombus animal model was established by the injection of autologous blood clots after cerebral angiogram through the carotid artery catheter in big white rabbit. With the confirm of thrombosis not being dissolved after angiography 6 h later, 49 big white rabbit were divided into four groups. Group A ($n=13$): direct injection of TMB through the vessel; group B ($n=12$): direct injection with nontargeted-microbubbles (NTMB) through the vessel; group C ($n=12$): direct injection with tissue plasminogen activator (r-TPA) through the auricular vein; group D ($n=12$): injection with saline through the vessel as control. Group A, B, D was given with transcutaneous temporal LFUS (1 MHz at 2.0 W/cm^2) for 30 minutes. At 0 h, 1 h and 2 h after the treatments, imaging observation of thrombolytic and blood flow recanalization were performed. The venous blood was collected before and at 2 h after the treatment in embolization for the detection of prothrombin time (PT), thrombin time (TT), fibrinogen (Fib) and the d-dimer. **Results** Group A rabbit had six of 13 (46.15%) success thrombolysis, group B 12 rabbit had 1 of (8.33%) success thrombolysis, group C had 4 of 12 (33.33%) success thrombolysis, group D had 1 of 12 (8.33%) success thrombolysis. The thrombolytic rates of group A, C were higher than those of group B and D ($P<0.01$). After the treatments, the differences of PT, APTT, TT, Fib and the d-dimer in A, B and D group were not statistically significant, and d-dimer in group C was higher than that in other groups ($P<0.05$). **Conclusion** The treatment of combining targeted-microbubbles with low frequency ultrasound can rapidly release acute intracranial thrombotic occlusions, which has the same effect as r-TPA with less side effects.

【Key words】 Targeted-microbubbles Ultrasound Thrombus Ischemic stroke

目前急性脑卒中的治疗以药物溶栓为主,但同时有严格的时间窗^[1]、溶栓效果不佳或有出血等副作用。近年研究发现,微泡联合经颅超声有溶解血栓的作用^[2]。Unger等^[3]报道在脂质微泡表面结合有特异性寡肽,与活化的血小板膜糖蛋白Ⅱb/Ⅲa(GPⅡb/Ⅲa)受体有较强的结合力,可特异性结合到血栓表面并可进入血栓内部以增强溶栓作用。本课题组为制作纳米脂质靶向微泡(TMB)已研制出一种纤维蛋白素原类似物-A链,可以特异性结合到

血小板GPⅡb/Ⅲa受体^[4],纳米脂质非靶向微泡(NTMB)不具有特异性结合血小板功能。本实验旨在观察超声联合TMB治疗急性脑血栓(6 h)的溶栓效果及副作用,评价其临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 49只家兔(由西安交通大学医学院动物实验中心提供),体质量2.3~3.0 kg,雌

雄不限,常规饲养。

1.1.2 主要试剂及仪器 纳米脂质微泡(包括TMB和NTMB);由西安交通大学医学院国家863实验室提供,微泡浓度为 2×10^8 个/mL $\sim 5 \times 10^8$ 个/mL,平均直径 $4.0 \mu\text{m}$ 。超声治疗仪(北京科技有限公司)、数字减影平板机(DSA,美国GE公司)。检测D-二聚体的酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒购买于美国ADL公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 49只家兔随机分为4组:A组($n=13$),经导管注射TMB;B组($n=12$),经导管直接注射NTMB;C组($n=12$),经耳缘静脉注射艾通立(重组纤溶酶原激活物 r-TPA);D组($n=12$),经导管注射生理盐水。A、B、D组均给予经颅超声治疗。

1.2.2 血栓栓塞模型制备及分组治疗 术前从兔耳缘静脉抽取自体静脉血5 mL,体外无菌 20°C 静置2~6 h,形成的血栓剪成 $0.5 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$ 备用。 20% 乌拉坦全身麻醉(5 mL/kg)后,耳缘静脉抽血4.5 mL加入内有0.5 mL枸橼酸钠的试管中,以 3000 r/min 离心,冷藏。外科分离股动脉。用改良Seldinger法穿刺右股动脉置入微(sp)导管鞘。经股动脉鞘引入sp导管导丝。在DSA透视引导下插管至颈总动脉,约平第二颈椎下缘水平侧位做路途,可见颈内动脉为颈外动脉向后上走行的一个分支,其起始部有一壶腹样膨大为其标志。将导管插至颈内动脉近端,行正侧位造影判断血管走行情况,手推造影剂确定无明显返流后,用1 mL注射器吸入3~4条血栓条注入颈内动脉,再次造影证实大脑中动脉栓塞后撤出导管。栓塞后兔尽量保温在 37°C 左右,分别在栓塞后1 h、2 h、6 h造影复查血管的再通情况。

在脑血管栓塞后6 h,将导管插至颈内动脉近端,DSA造影证实栓塞血管没有再通后,A、B组:经导管分别注入TMB和NTMB,起始为1.0 mL,后为每3 min给药0.5 mL,24 min,共5 mL。C组:耳缘静脉注射r-TPA 0.9 g/kg ,其中立即注射总剂量的 $1/3$,体积5 mL,紧接着恒速输注余 $2/3$ 量,滴速 0.5 mL/min ,总体积15 mL。D组:耳缘静脉注射生理盐水,每3 min给药2 mL,24 min,共16 mL。A、B、D组均应用低频超声(1 MHz , 2.0 W/cm^2)照射(从第一次注入微泡起开始至注完后6 min),共30 min。溶栓过程中注意观察血管穿刺点等部位有无出血表现。

1.3 观察指标

在栓塞前及溶栓治疗后分别于即刻、1 h及2 h再行脑血管造影复查以评价血管的通畅情况。

1.3.1 血栓清除评分 0分:血栓无清除;1分: $<30\%$ 清除;2分: $30\% \sim 70\%$ 清除;3分: $71\% \sim 90\%$ 清除;4分: $>90\%$ 清除。

1.3.2 血管再通评分 根据心肌梗塞溶栓治疗(thrombolysis in myocardial infarction, TIMI)在临床试验中,用冠状动脉造影方法评价冠状动脉再灌注的标准,分为TIMI 0级:完全闭塞,无血流;1级:阻塞区域有少量造影剂通过但末梢血管不能显影;2级:末梢血管显影但速度缓慢;3级:完全灌注并快速成像。

血栓清除评分 ≥ 3 分和TIMI评分 ≥ 2 分视为成功溶栓。

1.4 凝血指标检测

每只兔子分别在栓塞前和治疗后6 h抽取静脉血,在室温下以 3000 r/min 离心10 min提取血浆,储存在 -20°C 备用。所有血样按常规检测凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(Fib);并用ELISA法检测D-二聚体。

1.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较用单因素方差分析及SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物一般情况

4组动物在体质量、性别、体温、心率间差异无统计学意义。所有兔子完成了整个实验。

2.2 各组兔治疗后血栓清除、再通评分和成功溶栓比较

大脑中动脉栓塞和治疗后的脑血管造影见附图。本研究成功制备了49只兔大脑中动脉栓塞动物模型。6 h后血管均仍未发生再通。治疗后1 h和2 h A、C组血栓清除评分和TIMI评分无明显差异($P > 0.05$),与B组、D组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),B组与D组比较无明显差异($P > 0.05$),见表1。治疗后2 h, A组家兔中有6只(46.15%)、B组中1只(8.33%)、C组中4只(33.33%)、D组中1只(8.33%)成功溶栓,A、C组成功溶栓率高于B、D组($P < 0.01$),A、C组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 各组治疗后凝血指标检测的比较

附图 大脑中动脉造影
Fig Radiography of rabbit cerebrum distributing arteries

A: With an injection of autologous thrombosis cause brain artery embolization; B: The blood vessels is not recanalization six hours after embolization; C: The blood vessels is recanalization after the treatment of combining targeted-microbubbles with low frequency ultrasound, and remote vessels reappear; D: The blood vessels is recanalization partly after the treatment of combining nontargeted-microbubbles with low frequency ultrasound, and the blood stream is slow; E: The blood vessels is recanalization after the treatment of r-TPA through the auricular vein, and remote vessels reappear; F: The blood vessels is recanalization partly after the treatment of normal saline (NS) with low frequency ultrasound, and the blood stream is slow

各组在治疗前 D-二聚体无明显差异, A、B、D 组治疗后与治疗前差异无统计学意义 ($P>0.05$)。治疗后 C 组 D-二聚体高于治疗前和治疗后其它组 (P 均 <0.05), A、B、D 组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 2。

明显差异 ($P>0.05$), 但治疗后 Fib 值 C 组较其他组低 (P 均 <0.05), 与治疗前比较差异也有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 2。

2.4 治疗后副作用观察

C 组 12 只兔子中 2 只出现便血和脑出血, 另 1 只兔子出现便血, 在其他组未发现此类情况。

A、B、D 组在治疗前、后 PT、APTT、TT、Fib 无

表 1 各组家兔治疗后血栓清除和 TIMI 评分比较

Table 1 Comparison of each group in the treatment of thrombosis after elimination and TIMI score

Group	n	Elimination score			TIMI score		
		0 h	1 h	2 h	0 h	1 h	2 h
A	13	0	1.56±0.32*	2.39±0.37*	0	1.48±0.39*	2.05±0.40*
B	12	0	0.65±0.22	1.05±0.36	0	0.66±0.42	1.14±0.45
C	12	0	1.59±0.28*	2.50±0.24*	0	1.51±0.25*	2.01±0.23*
D	12	0	0	0.79±0.23	0	0	1.12±0.38

* $P<0.05$, vs. B and D groups

表 2 各组治疗后凝血指标比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 The blood coagulation index each group after treatment ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	D-dimer (mg/L)	PT (s)	APTT (s)	TT (s)	Fib (s)
A	13	2.25±0.12	11.98±0.65	124.75±21.53	31.60±7.32	1.81±0.88
B	12	2.13±0.30	10.43±1.70	121.56±31.56	34.30±8.38	1.84±0.61
C	12	2.35±0.31*	14.32±3.43	129.13±15.40	45.33±7.48	0.77±0.47*
D	12	2.24±0.21	13.66±2.28	98.6±22.16	34.00±9.61	1.86±0.62

* $P<0.05$, vs. A, B and D groups

3 讨论

目前急性缺血性脑卒中的治疗方法还需进一步提高,临床中需要更有效和更安全的治疗途径。静脉药物溶栓和介入治疗取得了一定效果,但由于治疗时间窗限制、出血等副作用使其不能应用在大多数患者,或者因为技术要求以及经济原因限制了它们的临床应用。应用 r-TPA 联合经颅超声治疗缺血性脑卒中已证明超声可以提高 r-TPA 的溶栓作用^[5],但Ⅱ期临床试验证实其增加脑出血的风险^[6]。微泡治疗急性缺血性脑卒中已经证明是安全的^[7]。肽序列精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp)是血小板 GPⅡb/Ⅲa 受体选择性结合位点^[8],本课题组前期研究制备了其类似物将其连接在脂质纳米微泡表面,制备了靶向脂质微泡,其可选择性作用于活化的血小板,促进其溶解,并在实验中取得理想的溶解血栓效果^[4]。

本研究结果显示,超声联合 TMB 治疗脑血栓未应用任何溶栓药,具有与 r-TPA 相同的治疗效果(血栓清除评分、血管再通率及成功溶栓率),可能是一种新的治疗急性缺血性脑卒中的有效、安全、经济的方法。

D-二聚体因子是凝血因子ⅩⅢ与纤维蛋白交联时的激活因子,是交联纤维蛋白经纤溶酶作用后的终末产物和纤溶酶被激活的结果,纤溶作用增加时血中才会大量出现,对血栓性疾病的诊断有重要意义。也可作为溶栓治疗的疗效判断。急性脑梗塞、脑出血的患者血浆 D-二聚体水平较正常人有明显增高,反映患者体内有血栓形成^[9]。Fib 升高是血栓性疾病的危险因素,它导致血栓性疾病的可能机制有:①通过高凝状态促进血栓形成;②加速动脉硬化的发生;③通过血压和血液黏稠度减慢血流速度^[10]。可见 Fib 在脑梗死血栓形成中起到重要作用。使用 r-TPA 溶栓治疗是因其是一种很强的组织激活物,能激活血栓及血浆中的纤溶酶原转化为纤溶酶,从而激活纤溶系统,使纤维蛋白原或纤维蛋白降解,变为可溶性物质,使血栓溶解,恢复梗死区血流灌注。本研究中 D-二聚体在 r-TPA 组较其他 3 组高,Fib 低于其他 3 组($P<0.05$),并且 r-TPA 组中有 3 只兔出现脑出血或(和)便血,说明虽然 r-TPA 组治疗脑血栓有明显效果,但增加了出血风险,而应用超声和 TMB 可明显减轻出血的风险,在动物实验中是相对比较安全的。

综上所述,本研究发现应用超声联合靶向微泡

治疗动物脑血栓,在治疗前、后 D-二聚体、PT、APTT、TT、Fib 水平没有发生明显的变化,即未激活纤溶系统,而相同的时间窗应用超声和微泡具有与 r-TPA 相似的溶解血栓能力,具有较高的临床应用价值,在人体内治疗效果尚需进一步研究。经导管给药仍然不是很方便,我们下一步将从静脉给药观察溶栓效果,寻找一种更方便的治疗途径;同时应用脑保护剂,不但要提高血管再通率,还要挽救濒死的脑组织,保护受损的脑细胞,改善临床症状。同时,超声联合 TMB 治疗四肢血管和冠状动脉急性血栓的实验研究也将进一步开展。

参 考 文 献

- 1 William CC, Thomas RP, John L, *et al.* Intracranial clot lysis with intravenous microbubbles transcranial ultrasound in swine. *Stroke*,2004;35(2):2047-2011.
- 2 William CC, Thomas RP, Feng X, *et al.* Microbubble potentiated ultrasound as a method of declotting thrombosed dialysis grafts: experimental study in dogs. *Cardiovasc Inter Rad*,2001;24(1):407-412.
- 3 Unger E, Metzger P, Krupinski E, *et al.* The use of a thrombus-specific ultrasound contrast agent to detect thrombus in arteriovenous fistulae. *Invest Radiol*,2000;35(1):86-89.
- 4 Wang B, Zang WJ, Wang M, *et al.* Prolonging the ultrasound signal enhancement from thrombi using targeted microbubbles based on sulfur-hexafluoride-filled gas. *Acad Radiol*,2006;13(4):428-433.
- 5 Alexandrov AV, Wojner AW, Grotta JC. CLOTBUST: design of a randomized trial of ultrasound-enhanced thrombolysis for acute ischemic stroke. *J Neuroimaging*,2004;14(6):108-112.
- 6 Michael D, Achim G, Peter R, *et al.* Transcranial low-frequency ultrasound-mediated thrombolysis in bBrain ischemia increased risk of hemorrhage with combined ultrasound and tissue plasminogen activator results of a phase Ⅱ clinical trial. *Stroke*,2005;36(5):1441-1446.
- 7 Carlos AM, Marc R, Marta R, *et al.* Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-MHz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke*,2006;37(3):425-429.
- 8 Calvete JJ, Man K, Schafer W, *et al.* Proteolytic degradation of the RGD-binding and non-RGD-binding conformer of human platelet integrin glycoprotein Ⅱb/Ⅲa: clues for identification of regions involved in the receptors activation. *Biochem J*,1994;298(Pt 1):1-7.
- 9 黄尉国. 血浆 D-二聚体检测及其临床意义. *中华医学检验杂志*,1995;18(2):71-72.
- 10 王晶莹, 谢 风. 纤维蛋白与血栓性疾病. *中国实验诊断学*,2006;10(5):566-567.

(2012-05-06 收稿,2012-07-31 修回)

编辑 沈 进