

· 实验研究 ·

正常兔眼玻璃体微泡注射联合超声辐照干预中最适超声参数的筛选

申晓丽 李强 黄丽娜 赵军 樊宁

518040 深圳,暨南大学附属深圳市眼科医院 深圳市眼病研究所 深圳市眼科学重点实验室 (申晓丽、黄丽娜、赵军、樊宁); 518000 深圳,暨南大学附属深圳市人民医院眼科(李强)

通信作者:黄丽娜,Email:sxljnu@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.11.005

【摘要】 背景 微泡可作为药物和基因的转染载体,经超声照射后转染效率提高,从而在多种眼科疾病的治疗方面发挥重要作用。然而,不同超声辐照强度发挥的生物学效应有所不同。目的 筛选适用于正常兔视网膜组织的超声辐照强度和照射时间,为超声联合微泡治疗眼底疾病的研究提供实验依据。方法 选取 18 只清洁级新西兰大白兔,按照随机数字表法分为空白对照组、单纯超声辐照组、单纯玻璃体腔注射组及玻璃体腔注射+低、中、高强超声辐照组。空白对照组未给予任何处理,单纯超声辐照组和单纯玻璃体腔注射组分别给予 2.0 W/cm^2 的超声强度照射实验眼 60 s 或单纯玻璃体腔注射 0.1 ml 微泡,玻璃体腔注射+低、中、高强超声辐照组兔眼在玻璃体腔注射 0.1 ml 微泡后分别用 0.5 、 1.0 和 2.0 W/cm^2 超声强度照射实验眼 60 s。各组于术前、术后即刻、术后第 1 天、第 7 天分别行眼前节照相、直接检眼镜检查和彩色眼底照相观察眼前节和眼底情况,于术后第 7 天处死实验兔并分离视网膜,行苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察实验兔视网膜形态学改变,透射电子显微镜观察兔视网膜超微结构变化。结果 空白对照组、单纯超声辐照组、单纯玻璃体腔注射组及玻璃体腔注射+低、中、高强超声辐照组兔手术前后不同时间点眼前后节均未见明显异常。术后 7 d,光学显微镜下可见空白对照组、单纯超声辐照组、单纯玻璃体腔注射组和玻璃体腔注射+低超声辐照组兔 10 层视网膜组织结构清晰,未见炎症、变性及细胞坏死等改变,而玻璃体腔注射+中强超声辐照组和玻璃体腔注射+高强超声辐照组兔视网膜各层组织结构疏松,视细胞层排列紊乱,内核层和外核层不同程度变薄,视网膜神经节细胞(RGCs)数量减少,可见细胞的空泡样变性。透射电子显微镜下可见空白对照组、单纯超声辐照组、单纯玻璃体腔注射组及玻璃体腔注射+低强超声辐照组兔视网膜超微结构未见明显异常改变,而玻璃体腔注射+中强超声辐照组和玻璃体腔注射+高强超声辐照组兔视网膜细胞排列紊乱,内核层和外核层细胞数目减少,细胞排列紊乱,细胞核染色质不均匀,RGCs 数目减少。结论 适用于正常兔视网膜组织的理想超声参数为超声强度 0.5 W/cm^2 辐照 60 s,这一结果为超声联合微泡治疗眼底疾病的研究提供了实验依据。

【关键词】 视网膜; 超声; 微泡; 超声处理; 玻璃体腔注射; 超声参数; 兔**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目(81170840); 广东省医学科学技术研究基金项目(A2015315); 深圳市创新委基础研究项目(JCYJ20120831154554508)

Screening of optimal ultrasound parameters after intravitreal injection of microbubble in normal rabbit eyes

Shen Xiaoli, Li Qiang, Huang Lina, Zhao Jun, Fan Ning

Shenzhen Key Laboratory, Shenzhen Eye Institute, Shenzhen Eye Hospital, Jinan University, Shenzhen 518040, China (Shen XL, Huang LN, Zhao J, Fan N); Department of Ophthalmology, Shenzhen People's Hospital, Jinan University, Shenzhen 518000, China (Li Q)

Corresponding author: Huang Lina, Email: sxljnu@163.com

[Abstract] **Background** Ultrasound microbubbles play important effects on delivery of drug or gene, which can significantly improve the transfection efficiency of drug or gene after ultrasonic irradiation. However, different ultrasonic irradiation parameters have different biological effects on different cells. **Objectives** This study was to investigate the effects of ultrasound microbubble on normal rabbit retina in different ultrasound intensities and irradiation time and provide the experimental basis for the treating study of fundus diseases with ultrasound

microbubble. **Methods** Eighteen clean New Zealand albino rabbits were randomized into blank control group, simple ultrasound radiation group, simple intraocular injection group and intraocular injection+low, moderate and high intensity ultrasound groups. No intervention was performed in the blank control group. Only 2.0 W/cm² ultrasound radiated for 60 seconds or 0.1 ml microbubbles were injected in vitreous cavity respectively in the simple ultrasound radiation group or simple intraocular injection group. The ultrasound with the intensity of 0.5, 1.0 and 2.0 W/cm² radiated the eyes with intraocular injection of microbubbles for 60 seconds in the intraocular injection+low, moderate and high intensity ultrasound groups, respectively. The photography of ocular anterior segment, direct ophthalmoscopy and color fundus photography were performed before operation, immediately after operation and 1 day, 7 days after operation. The retinas were isolated in the seventh day and hematoxylin & eosin staining was carried out for the evaluation of retinal morphology. The ultrastructure of the retinas was examined by transmission electron microscope. This study protocol was approved by Ethic Committee of Experimental Animals Use and Care in Shenzhen Eye Hospital. **Results** There were not abnormal findings by slit lamp microscope and ophthalmoscope in the eyes of various groups at different time points. In the intraocular injection+moderate and high intensity ultrasound groups, the loosening of retinal layers, disorder of photoreceptors, thinning of inner and outer nuclear layers as well as the decrease of retinal ganglion cells (RGCs) were exhibited under the optical microscope, and mitochondrial swelling of photoreceptors, noneven of chromatin in nucleus and losing of RGCs were found under the transmission electron microscope. However, the retinal morphology and ultrastructure were normal in the blank control group, simple ultrasound radiation group, simple intraocular injection group and intraocular injection+low intensity ultrasound group. **Conclusions** Ultrasound irradiation in the intensity 0.5 W/cm² for 60 seconds is safe and suitable for retina in the eyes with intraocular injection of microbubble. This result provides an experimental basis for the management of fundus diseases by ultrasound microbubble.

[Key words] Retina; Ultrasonics; Microbubbles; Sonication; Intravitreal injection; Ultrasound parameter; Rabbits

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81170840); Medical Science and Technology Research Fund Project of Guangdong Province (A2015315); Shenzhen Innovation Basic Research Project (JCYJ20120831154554508)

微泡是含有气体的微球,其最内层为惰性气体氟烷,中间层为油层,外壳由人体清蛋白、脂类、糖类和可降解的多聚物构成,主要用于溶栓、携带药物或基因治疗疾病^[1]。研究发现,微泡造影剂除具有增强显影的作用外,还具有药物或基因载体的作用,且经超声辐照后可大大提高药物或基因的转染效率^[2-3]。由于不同类型、不同剂量的超声微泡造影剂和超声辐照参数对不同组织细胞具有不同的生物学效应,因此,深入研究超声辐照参数对不同组织细胞的超声生物学效应非常重要,如何选择不同组织的最佳超声辐照条件是目前的研究方向。本研究旨在观察不同超声声强和超声辐照时间下微泡注射联合超声辐照对正常兔视网膜组织的影响,筛选出作用于正常兔视网膜组织的适宜超声声强和辐照时间,为超声微泡作为基因或药物载体用于治疗眼底疾病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 健康清洁级新西兰大白兔

18只,雌雄不限,体质量约1.5 kg(购自广东医学实验动物中心),由深圳大学医学院动物房饲养,饲养条件为清洁、通风、温度及湿度恒定,混合饲料单笼饲养。双眼眼前节及眼底检查均正常。采用随机数字表法将实验兔分为6个组,每组3只兔3只眼。空白对照组未给予任何处理;单纯超声辐照组用2.0 W/cm²超声强度照射实验眼60 s;单纯玻璃体腔注射组实验眼玻璃体腔注射0.1 ml微泡;玻璃体腔注射+低、中、高强超声辐照组在玻璃体注射0.1 ml微泡后分别以0.5、1.0和2.0 W/cm²的超声强度照射60 s。实验动物的使用和喂养符合动物伦理学标准,本研究通过深圳市眼科医院实验动物伦理委员会批准。

1.1.2 微泡混悬液的制备及主要仪器 用质量分数0.9%生理盐水5 ml缓慢注入SonoVue冻干粉(意大利Bracco公司)瓶内制备微泡混悬液,静置备用,使用前用力振荡以产生微泡。微泡浓度为 2×10^8 /ml,微泡平均直径为2.5 μm,90%的微泡直径<8 μm,其重量渗透克分子浓度为290 Osm/kg。超声基因转染治疗仪(重庆医科大学超声影像学研究所研制)的中心频率是

1 MHz, 探头直径为 1 cm, 可调超声强度为 0~3.0 W/cm², 具有连续和脉冲 2 种发射方式。裂隙灯显微镜彩色眼前节照相系统(北京高视远望科技有限公司); 直接检眼镜(苏州医疗器械设备厂); 免扩瞳彩色眼底照相系统(日本 Topcon 公司)。

1.2 方法

1.2.1 玻璃体腔微泡注射及超声辐照

各组兔用质量分数 0.5% 复方托吡卡胺滴眼液点双眼扩瞳。按照实验分组对兔眼实施干预, 用质量分数 3% 戊巴比妥钠(1 ml/kg) 行耳缘静脉注射, 盐酸爱尔卡因滴眼液表面麻醉, 开睑器开睑, 在动物手术显微镜下于兔实验眼上方角巩膜缘处透明角膜区呈隧道样穿刺抽出房水约 0.1 ml, 于上方距角巩膜缘后约 3 mm 处垂直巩膜刺入玻璃体腔, 缓慢注入 0.1 ml 微泡混悬液, 棉签按压进针处 30 s 后抽出针头, 给予氧氟沙星滴眼液点眼预防感染。超声照法是在玻璃体腔注射 0.1 ml 微泡后闭合兔眼, 在眼睑上涂耦合剂, 将超声探头置于眼球上方进行辐照。术后术眼每日给予氧氟沙星滴眼液及氧氟沙星眼膏。于术前、术后即刻、术后第 1 天及第 7 天分别行眼前节照相, 用直接检眼镜观察眼底和彩色眼底照相。

1.2.2 兔视网膜组织的形态学表现

于术后第 7 天空气栓塞法处死各组兔, 立即摘除眼球, 分离视网膜, 光学显微镜下观察视网膜各层组织的形态学变化; 采用透射电子显微镜观察视网膜超微结构的变化。

1.2.2.1 苏木精-伊红染色

摘除眼球后去除眼球多余筋膜和肌肉, 沿角膜巩膜缘处切口, 开窗; 用体积分数 10% 磷酸盐缓冲甲醛固定液固定; 冲洗后上机梯度脱水: 10% 磷酸盐缓冲甲醛固定液固定 2 h, 梯度乙醇脱水, 甲苯 40 min, 二甲苯 40 min, 石蜡固定; 浸蜡、包埋、切片: 浸蜡采用三步浸蜡法, 切片厚 5 μm; 染色后自来水洗 10~30 s, 苏木素染色 10~15 min, 冲洗 20 min 后分化切片, 冲洗 15 min, 质量分数 1% 伊红染色 3 min, 梯度乙醇脱水、透明、封片。

1.2.2.2 透射电子显微镜观察视网膜超微结构

固定、脱水、包埋; 取材和前固定: 剥离视盘周围约 1.0 mm × 0.5 mm 的视网膜, 放入质量分数 4% 戊二醛中 4℃ 保存, 采用常规组织块双重固定法; 采用梯度脱水法: 在 4℃ 下进行, 体积分数 50%、70%、90% 乙醇作用各 10 min; 90% 乙醇+体积分数 90% 丙酮混合液作用 10 min; 90% 丙酮作用 10 min; 100% 丙酮作用

15 min; 用 V_{EPO812 环氧树脂}:V_{丙酮} = 1:1 的溶液浸透 10 min, EPON812 环氧树脂包埋, 37℃ 过夜; 68℃ 聚合 48 h。用超薄切片机切厚度为 800 μm 的半薄切片; 干燥后滴加甲苯胺蓝染色液, 冷却后蒸馏水冲洗, 自然晾干, 中性树胶封片, 光学显微镜观察定位。使用超薄切片机制作 100 μm 厚超薄切片, 用铜网把切片沾起; 醋酸双氧铀染色 5 min, 蒸馏水洗 3 次, 滤纸吸干, 自然干燥; 铅染色液加入 5 min 后, 氢氧化钠和蒸馏水冲洗, 晾干; 透射电子显微镜下观察。

2 结果

2.1 各组兔实验眼前节检查

术后即刻、术后第 1 天及第 7 天空白对照组、单纯超声辐照组、单纯玻璃体腔注射组及玻璃体腔注射+低、中、高强超声辐照组兔实验眼角膜均透明, 前房深度正常, 房水清, 晶状体透明, 玻璃体清, 实验眼未见明显炎症反应及出血(图 1)。

2.2 各组兔实验眼眼底表现

术前、术后即刻、术后第 1 天及第 7 天各组兔视网膜均呈橘红色反光, 未见渗出、出血、水肿改变, 视网膜血管走行正常, 视盘色淡红, 边界清, 未见出血及水肿(图 2)。

2.3 各组兔视网膜组织形态学表现

空白对照组兔可观察到视网膜 10 层结构, 各层组织结构清晰, 排列规则, 视细胞层完整, 外核层细胞数量最多, 内核层细胞数量较少, 视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs) 为单层, 细胞呈类圆形。单纯超声辐照组兔视网膜组织结构清晰, 视网膜各层未见明显异常。玻璃体腔注射+低强超声辐照组兔视

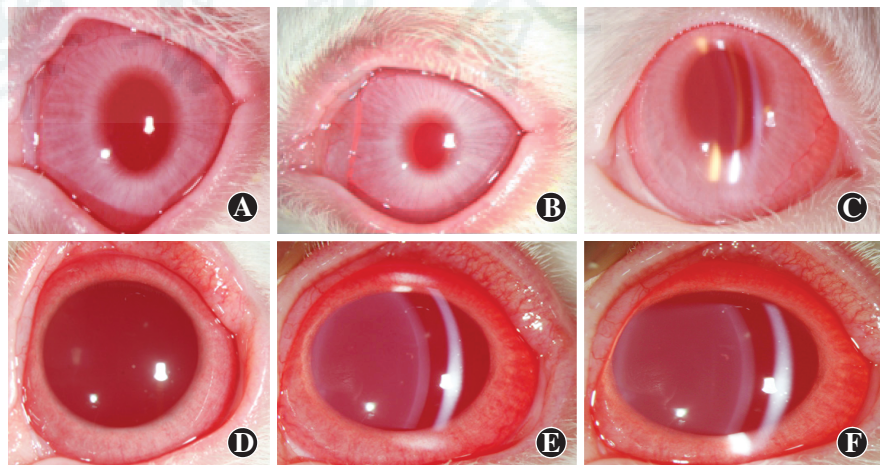


图 1 术后第 7 天各组兔实验眼前节表现 各组兔角膜透明, 前房深度正常, 房水清, 晶状体透明, 玻璃体透明 A: 空白对照组 B: 单纯超声辐照组 C: 单纯玻璃体腔注射组 D: 玻璃体腔注射+低强超声辐照组 E: 玻璃体腔注射+中强超声辐照组 F: 玻璃体腔注射+高强超声辐照组

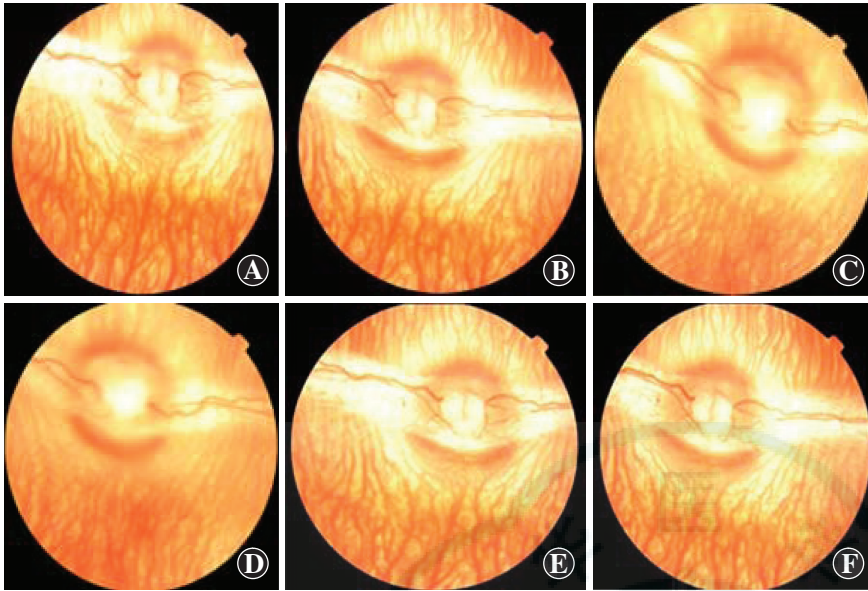


图 2 术后第 7 天各组兔眼底表现 术后各组兔实验视网膜均呈橘红色反光,血管走行正常,视盘形态未见异常 A:空白对照组 B:单纯超声辐照组 C:单纯玻璃体腔注射组 D:玻璃体腔注射+低强超声辐照组 E:玻璃体腔注射+中强超声辐照组 F:玻璃体腔注射+高强超声辐照组

视网膜组织形态结构未见明显异常。玻璃体腔注射+中强超声辐照组和玻璃体腔注射+高强超声辐照组兔实验视网膜各层组织结构疏松,排列不规则,视细胞层

变薄,排列不规则;内核层和内核层结构排列紊乱、疏松;RGCs 数量减少,可见细胞空泡样变性,以玻璃体腔注射+高强超声辐照组表现更为严重(图 3)。

2.4 各组兔视网膜超微结构变化

空白对照组、单纯超声辐照组及单纯玻璃体腔注射组兔视网膜组织超微结构未见明显异常改变,光感受器层视细胞排列整齐,细胞结构正常;外核层细胞排列整齐,细胞核染色质较深;内核层细胞排列规则,细胞核染色质均匀;RGCs 核膜清晰,染色质分布均匀,核仁明显。玻璃体腔注射+低强超声辐照组兔视网膜各层超微结构与空白对照组表现接近,未见明显异常改变。玻璃体腔注射+中强超声辐照组和玻璃体腔注射+高强

超声辐照组兔实验眼部分视杆细胞、视锥细胞断裂,可见膜盘内有裂隙;内核层和内核层细胞萎缩,数目减少,细胞排列紊乱;RGCs 数目减少(图 4)。

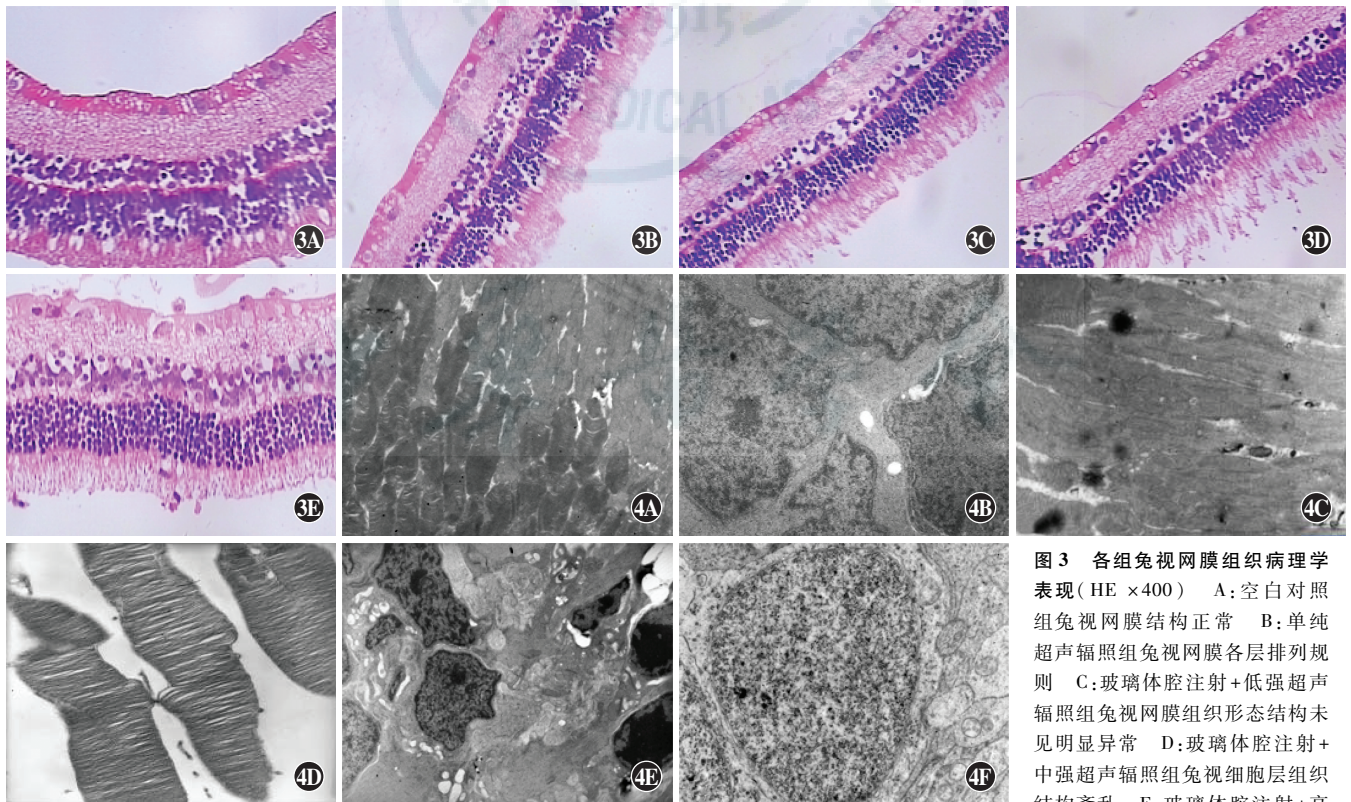


图 3 各组兔视网膜组织病理学表现(HE ×400) A:空白对照组兔视网膜结构正常 B:单纯超声辐照组兔视网膜各层排列规则 C:玻璃体腔注射+低强超声辐照组兔视网膜组织形态结构未见明显异常 D:玻璃体腔注射+中强超声辐照组兔视细胞层组织结构紊乱 E:玻璃体腔注射+高强

超声辐照组兔视网膜组织结构紊乱,组织疏松,视网膜内核层和 RGCs 层可见细胞空泡样变性 图 4 透射电子显微镜下兔视网膜超微结构表现 A:空白对照组视细胞排列整齐,细胞形态正常(×3 900) B:单纯超声辐照组内核层细胞排列整齐,核染色质均匀(×13 500) C:玻璃体腔注射+低强超声辐照组视细胞排列整齐(×12 500) D:玻璃体腔注射+中强超声辐照组视细胞断裂(×9 800) E:玻璃体腔注射+高强超声辐照组内核层和内核层细胞萎缩,细胞数目减少(×9 800) F:玻璃体腔注射+高强超声辐照组 RGCs 数目减少(×9 800)

3 讨论

超声爆破微泡瞬间产生的能量可使细胞膜表面产生许多可恢复性小孔,增加细胞膜的通透性,使进入组织细胞内的药物或基因增多^[4-5];另外,微泡在超声辐照的作用下经历扩大、收缩和崩溃的动力学变化过程,产生强烈的冲击波,引起周围组织细胞的结构和功能发生改变,使基因或药物易于跨越内膜屏障;高速微射流、冲击波和高温、高压等生物效应,也可增强细胞的通透性^[6-7]。

但超声爆破微泡实现基因或药物定向转移的同时,也一定程度上对机体组织产生了有害的生物效应,如组织结构的断裂、出血、血管内溶血、细胞死亡和微血管出血等。Liang 等^[8]研究发现,微泡在超声强度为 3 W/cm^2 、时间 1 min 的条件下可增强 DNA 质粒在 SD 大鼠骨骼肌的转染率,但该方法也会导致局部组织发生不伴炎症反应的小范围坏死,这可能与超声爆破微泡产生较强的空化效应有关。张群霞等^[9]探讨了不同超声强度破坏微泡对绿色荧光蛋白质粒和小鼠骨骼肌组织的作用,发现 $1.0 \sim 2.5 \text{ W/cm}^2$ 超声破坏微泡后可引起红细胞渗出和血管充血,甚至使部分骨骼肌变性。胡文静等^[10]采用不同声强(0.5 、 1.0 和 2.0 W/cm^2)和辐照时间(30、60 和 120 s)的超声作用于微泡干扰的兔眼角膜,并对角膜内皮细胞进行定量分析和组织病理学观察,发现与 0.5 W/cm^2 超声组相比, 1.0 W/cm^2 超声组和 2.0 W/cm^2 超声组角膜组织损害严重,角膜内皮细胞密度和六角形细胞的比例均降低;与超声辐照时间 30 s 和 60 s 比较,超声辐照时间 120 s 时角膜内皮细胞密度明显下降,六角形细胞的比例降低。本研究中发现,用 1.0 W/cm^2 和 2.0 W/cm^2 超声照射 60 s 的条件下,玻璃体腔注射 0.1 ml 微泡眼可发生视细胞断裂,膜盘内有裂隙,视网膜内核层和外核层细胞及 RGCs 数目减少且排列紊乱,与其他的研究结果一致^[11-12]。

进行超声介导微泡转染时随着超声强度的增强和辐照时间的延长,转染效率明显提高,但当超声强度、辐照时间和微泡浓度达到一定程度后,细胞成活率和转染效率均显著降低^[13-14]。因此,理想的结果应该是既能达到较高的基因或药物转染效率,又可将细胞的损伤减少到最低限度,因此寻找适宜的超声辐照条件非常必要。本研究中通过体内实验筛选出适宜的兔视网膜超声参数,为下一步超声微泡联合药物治疗眼底疾病奠定基础^[15-17]。本研究中采用探头频率为 1 MHz 的超声基因转染仪在兔眼进行活体转染,发现前房和

玻璃体腔内无明显炎症反应,眼底未发生渗出和出血。在兔视网膜组织病理形态学和超微结构观察中发现,空白对照组及单纯玻璃体腔注射组或单纯超声照射组兔视网膜各层组织结构未见明显异常,说明单纯给予兔视网膜一定强度的超声辐照和单纯兔玻璃体腔注射一定浓度的微泡对兔视网膜组织无明显损害,与既往研究结果相近^[18],SonoVue 联合超声辐照条件可增强绿色荧光蛋白报告基因质粒转染人脐血管内皮细胞的效率;在一定超声辐照条件下,单纯超声辐照组对人脐血管内皮细胞活性无明显影响。

本研究中用声强为 1.0 W/cm^2 和 2.0 W/cm^2 的超声辐照玻璃体腔注射 0.1 ml 微泡的兔眼 60 s 时,兔视网膜层间组织结构疏松,RGCs 数量明显减少,细胞核可见空泡样变性,内核层和外核层细胞数量减少,视细胞排列紊乱,同时视网膜内核层、外核层和 RGCs 层可见较多的凋亡细胞,说明强度为 1.0 W/cm^2 和 2.0 W/cm^2 的超声可对视网膜组织和细胞产生严重损害,对视网膜组织、细胞有产生变性或坏死等有害的生物效应,提示高强度超声在导致微泡破裂的同时也增加了空化效应,可对正常的组织细胞造成损伤。因此,本研究认为声强为 0.5 W/cm^2 的超声辐照 60 s 对视网膜组织是合适的,可为进一步超声联合微泡治疗眼底疾病提供实验依据。

参考文献

- [1] Huang SL. Liposomes in ultrasonic drug and gene delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60 (10) : 1167-1176. DOI: 10.1016/j.addr.2008.03.003.
- [2] Wan C, Li F, Li H. Gene therapy for ocular diseases mediated by ultrasound and microbubbles (Review) [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(4) : 4803-4844. DOI: 10.3892/mmr.2015.4054.
- [3] Li W, Liu S, Ren J, et al. Gene transfection to retinal ganglion cells mediated by ultrasound microbubbles *in vitro* [J]. Acad Radiol, 2009, 16(9) : 1086-1094. DOI: 10.1016/j.acra.2009.03.019.
- [4] Christiansen JP, French BA, Klivanov AL, et al. Targeted tissue transfection with ultrasound destruction of plasmid-bearing cationic microbubbles [J]. Ultrasound Med Biol, 2003, 29(12) : 1759-1767.
- [5] van Wamel A, Bouakaz A, Versluis M, et al. Micromanipulation of endothelial cells: ultrasound-microbubble-cell interaction [J]. Ultrasound Med Biol, 2004, 30(9) : 1255-1258.
- [6] Christiansen JP, French BA, Klivanov AL, et al. Targeted tissue transfection with ultrasound destruction of plasmid-bearing cationic microbubbles [J]. Ultrasound Med Biol, 2003, 29(12) : 1759-1767.
- [7] Lentacker I, De Cock I, Deckers R, et al. Understanding ultrasound induced sonoporation: definitions and underlying mechanisms [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2014, 72 : 49-64. DOI: 10.1016/j.addr.2013.11.008.
- [8] Liang HD, Lu QL, Xue SA, et al. Optimisation of ultrasound-mediated gene transfer (sonoporation) in skeletal muscle cells [J]. Ultrasound Med Biol, 2004, 30(11) : 1523-1529.
- [9] 张群霞,王志刚,冉海涛,等.不同超声强度及微泡对基因和组织作

- 用的实验研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2005, 14(4): 304-306.
- Zhang QX, Wang ZG, Ran HT, et al. Experimental study of effects of ultrasound and microbubble on gene and tissue[J]. Chin J Ultrasonography, 2005, 14(4): 304-306.
- [10] 胡文静, 张良珂, 李攀, 等. 超声联合微泡对正常兔角膜组织的生物学效应[J]. 中国医学影像技术, 2009, 25(1): 21-24.
- Hu WJ, Zhang LK, Li P, et al. Bioeffect of ultrasound combined with microbubble on normal rabbit cornea[J]. Chin J Med Imaging Tech, 2009, 25(1): 21-24.
- [11] Tabuchi Y, Ando H, Takasaki I, et al. Identification of genes responsive to low intensity pulsed ultrasound in a human leukemia cell line Molt-4 [J]. Cancer Lett, 2007, 246(1-2): 149-156.
- [12] Wang YU, Chen YN, Zhang W, et al. Upregulation of Beclin-1 expression in DU-145 cells following low-frequency ultrasound irradiation combined with microbubbles[J]. Oncol Lett, 2015, 10(4): 2487-2490. DOI: 10.3892/ol.2015.3509.
- [13] Yu MH, Lee JY, Kim HR, et al. Therapeutic effects of microbubbles added to combined high-intensity focused ultrasound and chemotherapy in a pancreatic cancer xenograft model [J]. 2016, 17(5): 779-788. DOI: 10.3348/kjr.2016.17.5.779.
- [14] Sonoda S, Tachibana K, Uchino E, et al. Gene transfer to corneal epithelium and keratocytes mediated by ultrasound with microbubbles [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(2): 558-564.
- [15] Cao WJ, Matkar PN, Chen HH, et al. Microbubbles and ultrasound: therapeutic applications in diabetic nephropathy [J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 880: 309-330. DOI: 10.1007/978-3-319-22536-4_17.
- [16] Zhang Y, Ye C, Xu Y, et al. Ultrasound-mediated microbubble destruction increases renal interstitial capillary permeability in early diabetic nephropathy rats [J]. Ultrasound Med Biol, 2014, 40(6): 1273-1281. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2013.12.006.
- [17] 杨静菲, 刘苏, 王志刚, 等. 超声微泡造影剂联合美金胺增强视神经损伤大鼠视网膜神经节细胞保护作用[J]. 中华眼底病杂志, 2011, 27(6): 567-572. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2011.06.016.
- Yang JF, Liu S, Wang ZG, et al. Ultrasonic microbubbles and memantine can protect rat retinal ganglion cells after optic nerve injury [J]. Chin J Ocul Fundus Dis, 2011, 27(6): 567-572. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2011.06.016.
- [18] Li T, Tachibana K, Kuroki M, et al. Gene transfer with echo-enhanced contrast agents: comparison between albumex, optison, and levovist in mice initial results [J]. Radiology, 2003, 229(2): 423-428.

(收稿日期: 2016-06-23)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)

· 病例报告 ·

原发性泪腺导管腺癌一例

李静 马建民

100730 北京, 首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心
北京市眼科研究所 北京市眼科学与视觉科学重点实验室

通信作者: 马建民, Email: jmama@sina.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.11.006

基金项目: 国家自然科学基金项目(81371052)

患者, 女, 76 岁, 因发现左眼眶内肿物 2 个月于 2012 年 8 月 10 日于北京同仁医院眼肿瘤科就诊。2 个月前患者在外院(医院名称不详)行头颅 CT 时偶然发现左眼眶内肿物, 无眼红、眼痛等不适, 至当地医院(医院名称不详)就诊, 未予治疗。为求进一步诊治, 遂于北京同仁医院就诊。眼部检查: 视力右眼 0.5, 左眼 0.5, 矫正视力右眼 0.9, 左眼 0.6; 眼压右眼 13 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa), 左眼 14 mmHg; 双眼眼位正, 眼球运动可。左眼外上眶缘处可触及大小约 1.0 cm×1.0 cm 肿物, 活动度差, 轻触痛。双眼眼前节和眼底检查未见明显异常。眼眶 CT 示左侧眼眶外上象限偏颞侧、肌锥内外间隙可见一不规则高密度影, 界清, CT 值为 33~82 HU, 体积约 10 mm×16 mm×23 mm, 周围各壁骨质连续性良好, 未见明确异常征象。眼球形态正常, 眼环完整; 晶状体存在, 形态规整; 玻璃体密度均匀。眼上下静脉及眼动脉未见明显扩张。各眼外肌及视神经未见明确异常改变。眼睑未见明确异常改变。右侧眼眶形态、密度未见异常。左侧泪腺区占位性病变, 建议行 MRI 检查。眼眶 MRI 示: 左侧眼球前突, 形态正常。左侧泪腺明显增大, 大小约 11 mm×17 mm×14 mm, 以眶部增大为主, 略呈分叶状, 病灶

信号不均, 主体呈等 T1 等 T2 信号, 内部点状短 T1 短 T2 信号影。病灶与外直肌起始部分界不清。与眼球分界不清。增强后病灶轻度不均匀强化。泪腺窝骨质表面光滑, 未见明显加深。左眼球内信号未见异常, 球后肌锥内外软组织未见异常。视神经信号未见异常, 考虑良性病变可能性大, 泪腺混合瘤伴局部出血。血常规、尿常规及生生化检查未见异常。患者以左眼眶内占位, 性质待查入院。

入院后完善相关检查, 经患者同意于 2012 年 10 月 25 日在全身麻醉下行左眼眶内肿物切除术。术后病理检查示左眼眶涎腺型肿瘤, 形态符合中度恶性导管癌, 部分肿瘤侵及神经, 管内可见癌栓(图 1)。免疫组织化学检查结果: GCDPF+, ER-, PR-, HER-2+, CK5/6±, CK8/18+, CK+, Vimentin-, CEA 弱+, CK20-, CK7+, CA125 弱+, TTF-1-和 VEGF+(图 2)。术后恢复良好, 7 d 后拆线出院。建议转肿瘤科继续治疗, 患者及家属拒绝, 嘱其定期复诊。密切随访至 2012 年 12 月 20 日未见复发, 全身情况良好。

讨论: 原发性泪腺导管腺癌不常见, 约占泪腺原发性上皮癌的 10%^[1]。Katz 等^[2]于 1996 年首次报道泪腺导管腺癌。国