

· 实验研究 ·

超声联合微泡照射对大鼠视网膜的安全性及阈值分析

范森¹ 唐永红¹ 兰津² 秦明敏¹ 邹欢¹ 陈小璠¹ 刘政² 李佩惊² 袁容娣¹¹陆军军医大学第二附属医院眼科, 重庆 400037; ²陆军军医大学第二附属医院超声科, 重庆 400037

通信作者: 李佩惊, Email: peijingli220@hotmail.com; 袁容娣, Email: yuanrongdi@tmmu.edu.cn

【摘要】 目的 探索超声联合微泡(USMB)照射对大鼠视网膜的安全性,分析造成视网膜不可逆损伤的USMB参数阈值。**方法** 采用随机数字表法将84只Sprague-Dawley大鼠随机分为机械指数(MI)=0.2、0.4、0.8共3个组,并对各组大鼠的右眼进行相应MI超声照射。在USMB照射前,USMB照射后不同时间点分别采用超声造影(CEUS)、荧光素眼底血管造影(FFA)、光学相干断层扫描(OCT)、视网膜电图(ERG)和苏木精-伊红染色检测视网膜结构和功能变化,采用实时荧光定量PCR检测大鼠视网膜中白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6和肿瘤坏死因子(TNF)- α 的mRNA相对表达量。另取6只Sprague-Dawley正常大鼠作为基线对照,分别进行ERG、苏木精-伊红染色和实时荧光定量PCR检测。**结果** MI=0.2时,USMB照射后即刻的时间-强度曲线中峰值强度(PI)值、曲线下面积(AUC)值分别为83.500 $\pm$ 1.310和4560.41 $\pm$ 143.10,明显高于USMB照射前的71.600 $\pm$ 0.778和4209.20 $\pm$ 93.08,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$),其他各项研究指标在USMB照射后各时间点与USMB照射前相比,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。MI=0.4时,USMB照射后即刻PI值和AUC值较USMB照射前明显降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);FFA提示在USMB照射后即刻眼底血管有少量渗漏,并且在USMB照射后1d渗漏消失;OCT和苏木精-伊红染色显示视网膜在USMB照射后1d有轻度水肿,内层和全层视网膜厚度较USMB照射前升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);ERG显示在USMB照射后1d暗适应3.0a波、b波和振荡电位(OPs)振幅较USMB照射前明显降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);USMB照射后1d视网膜中IL-1 β 、IL-6和TNF- α mRNA相对表达量较USMB照射前明显升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。MI=0.8时,USMB照射后即刻、1d、3d、7d的PI值和AUC值均较USMB照射前明显降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);FFA提示在USMB照射后即刻可见大血管荧光素渗漏,并且渗漏持续到USMB照射后1d;OCT和苏木精-伊红染色显示在USMB照射后1、3d有严重视网膜水肿,内层和全层视网膜厚度较USMB照射前明显升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$),USMB照射后7d视网膜萎缩,内层和全层视网膜厚度较USMB照射前明显变薄,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);ERG显示USMB照射后1、3、7d的暗适应3.0a波、b波和OPs振幅均较USMB照射前明显降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);USMB照射后1、3d视网膜中IL-1 β 、TNF- α mRNA相对表达量明显高于USMB照射前,USMB照射后1d视网膜IL-6 mRNA相对表达量明显高于USMB照射前,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。**结论** MI在0.4以下时,USMB照射对大鼠视网膜结构和功能无明显影响或影响可逆;MI=0.8时,USMB照射对大鼠视网膜结构和功能造成了不可逆缺血性损伤。

【关键词】 视网膜; 安全性; 超声联合微泡; 对比增强超声; 机械指数**基金项目:** 国家自然科学基金(82127804)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20250221-00047

Safety of ultrasound combined with microbubbles irradiation on rat retina and its threshold

Fan Sen¹, Tang Yonghong¹, Lan Jin², Qin Mingmin¹, Zou Huan¹, Chen Xiaofan¹, Liu Zheng², Li Peijing², Yuan Rongdi¹¹Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China;²Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China

Corresponding authors: Li Peijing, Email: peijingli220@hotmail.com; Yuan Rongdi, Email: yuanrongdi@tmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the safety of ultrasound combined with microbubbles (USMB) irradiation中华医学杂志
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究

on the rat retina, and to preliminarily identify the USMB parameter threshold that causes irreversible damage to the retina. **Methods** Eighty-four Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups according to the mechanical index (MI) of contrast-enhanced ultrasound (CEUS): MI = 0.2, 0.4, and 0.8. CEUS, fundus fluorescein angiography (FFA), optical coherence tomography (OCT), electroretinogram (ERG), and hematoxylin-eosin (HE) staining were used to detect changes in retinal structure and function before USMB irradiation and at different time points after irradiation. Real time fluorescence quantitative PCR was used to detect the relative mRNA expression levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α in the rat retina. Another six normal Sprague-Dawley rats were selected as baseline controls and underwent ERG, HE staining, and real-time fluorescence quantitative PCR. All animal procedures in this study strictly followed the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement. All animal experimental protocols have been approved by the Laboratory Animal Welfare and Ethics Committee of the Army Medical University (No. AMUWEC20245237). **Results** When MI = 0.2, the peak intensity (PI) and area under the curve (AUC) values in the time-intensity curve immediately after USMB irradiation were 83.500 ± 1.310 and $4\,560.41 \pm 143.10$, respectively, which were significantly higher than 71.600 ± 0.778 and $4\,209.20 \pm 93.08$ before USMB irradiation (all $P < 0.01$). No statistically significant differences in other research indicators were observed at every time point after USMB irradiation compared to before USMB irradiation (all $P > 0.05$). When MI = 0.4, the PI and AUC values immediately after USMB irradiation significantly decreased compared to before USMB irradiation (both $P < 0.05$). FFA results showed a slight leakage immediately after USMB and disappeared 1 day after USMB irradiation. OCT and HE staining showed mild edema of the retina on day 1 after USMB irradiation, with an increase in inner and full retinal thickness compared to before USMB irradiation, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). The ERG results showed that the amplitudes of a wave, b wave, and oscillatory potential (OPs) of dark adaptation 3.0 at 1 day after USMB irradiation was significantly reduced compared to before USMB irradiation (all $P < 0.05$). The relative expression levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α mRNA in the retina 1 day after USMB irradiation were significantly increased compared to before USMB irradiation (all $P < 0.05$). When MI = 0.8, the PI and AUC values immediately, 1 day, 3 days, and 7 days after USMB irradiation were significantly reduced compared to before USMB (all $P < 0.01$). FFA showed immediate large vessel leakage after USMB irradiation, which persisted until 1 day after USMB irradiation. OCT and HE staining showed severe retinal edema at 1 and 3 days after USMB irradiation, with significant increases in inner and full layer retinal thickness compared to before USMB irradiation, and the differences were statistically significant (all $P < 0.01$). At 7 days after USMB irradiation, the retina atrophied, and the inner and full layer retinal thickness decreased significantly compared to before USMB irradiation, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). The ERG results showed that at 1, 3, and 7 days after USMB irradiation, the amplitudes of a wave, b wave, and OPs of dark adaptation 3.0 were significantly reduced compared to before USMB irradiation (all $P < 0.05$). The relative expression levels of IL-1 β and TNF- α mRNA in the retina at 1 and 3 days after USMB irradiation were significantly higher than before USMB irradiation, and the relative expression level of IL-6 mRNA in the retina at 1 day after USMB irradiation was significantly higher than before USMB irradiation (all $P < 0.01$). **Conclusions** When MI is below 0.4, USMB irradiation has no effect on the structure and function of rat retina or the effect is reversible. When MI = 0.8, USMB irradiation causes irreversible ischemic damage to the structure and function of rat retinas.

[Key words] Retina; Safety; Ultrasound combined with microbubbles; Contrast-enhanced ultrasound; Mechanical index

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82127804)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20250221-00047

针对眼前节疾病,局部药物治疗通常被视为首选方案。对于眼后节疾病的治疗,优选眼周和球内注射,以确保治疗药物能够有效抵达视网膜和脉络膜;玻璃体腔注射已被广泛应用于糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑变性、眼部炎症性疾病及恶性肿瘤等多种疾病的治疗中^[1-2]。然而,玻璃体腔注射也伴随着一系列

潜在的并发症,如一过性眼压升高、眼内感染及视网膜脱离等,且往往需要患者在数月至数年间接受重复注射,这对患者及医生均构成严峻的挑战。此外,全身性治疗在某些眼部疾病中同样具有应用价值,例如在严重或双侧眼部炎症以及视网膜母细胞瘤等恶性肿瘤的治疗中,而药物向眼内扩散常受血-视网膜屏障

(blood-retinal barrier, BRB) 的限制^[3]。因此,为了达到有效视网膜药物浓度,常需采用高剂量给药方式,但其可能引发全身性不良反应。为提升全身给药的有效性并降低其医源性风险,一种可行的解决方案是暂时性地打开 BRB,以促进药物向眼内扩散。

微泡是直径为 0.5~10.0 μm 的充气微球,广泛用作超声造影剂^[4-5];通过静脉给药后,微泡溶解于血液中,最终通过呼气排泄或细胞吞噬作用消除^[6]。微泡也可用于治疗性超声领域,暴露于超声波的微泡会发生振荡,从而对周围结构产生各种生物效应,其中包括空化效应和声孔效应等^[7-8]。空化效应在血管壁上产生额外的机械力,可增强药物渗透性,引发血管收缩或舒张。超声联合微泡 (ultrasound and microbubble, USMB) 产生的空化效应已应用于多个学科领域的临床前研究,可通过声机械血管舒张 (又称声灌注) 预防和治疗心肌梗死、缺血性卒中和外周动脉疾病中的缺血-再灌注损伤,具有很好的溶栓、扩血管和改善微循环作用^[9-10]。在眼科领域已经进行了 USMB 治疗用途的临床前研究,包括 BRB 的破坏、眼部基因转染和药物的递送等^[11-14]。然而,目前关于 USMB 对眼部安全性的探究仍不全面^[15]。本研究拟从形态学、组织学和功能学等多角度综合性探究不同机械指数 (mechanical index, MI) USMB 对大鼠眼球的安全性,同时确定造成大鼠视网膜不可逆损伤的超声参数阈值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取成年 Sprague-Dawley 大鼠 90 只,雌雄不限,6~8 周龄,体质量 180~200 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司 [许可证号:SCXK (京) 2024-0003],饲养于陆军军医大学第二附属医院动物房 [许可证号:SYXK (渝) 2022-00188],按照啮齿动物喂养标准进行饲养,并保持 12 h/12 h 的光照/黑暗周期。本研究所有动物程序均严格遵循美国视觉与眼科学研究协会关于在眼科和视力研究中使用动物的声明。所有动物实验方案均已获得陆军军医大学实验动物福利与伦理委员会批准 (批文号:AMUWE C 20245237)。

1.1.2 主要试剂及仪器 全氟丙烷气体、4%多聚甲醛溶液、磷酸盐缓冲液、生理盐水、逆转录试剂盒 (武汉赛维尔生物科技有限公司);二棕榈酰磷脂酰甘油 (250 mg,北京百灵威科技有限公司);二硬脂酰磷脂酰胆碱 (25 mg,北京迈瑞达科技有限公司);聚乙二醇 4000 (500 g,上海阿拉丁生化股份有限公司);超纯水

(陆军军医大学自制);复方托吡卡胺滴眼液、0.4% 奥布卡因滴眼液 (日本参天制药株式会社);加替沙星眼用凝胶 (沈阳兴齐眼药股份有限公司);10% 荧光素钠造影剂 (5 ml,美国 Alcon 公司);Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司)。正置光学显微镜 (日本尼康公司);光学相干断层扫描 (optical coherence tomography, OCT) 仪、眼底荧光素钠造影仪 (德国 Heidelberg 公司);视觉电生理仪 (重庆国特医疗设备有限公司);VINNO 70 超声诊疗一体机 (苏州飞依诺科技有限公司);实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-rad 公司);冷冻干燥机 (北京建强伟业科技有限公司);机械振荡器 (安泰科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 微泡制备与使用 参照文献 [16] 的方法制备微泡。使用实验室制备的脂氟显微泡作为对比增强超声 (contrast-enhanced ultrasound, CEUS) 的造影剂,并使用空化核进行 USMB 照射。它是一种具有全氟丙烷气核的脂质涂层微泡混悬液,浓度为 $2 \times 10^9 \sim 9 \times 10^9$ 个/ml,平均微泡直径为 $(1.92 \pm 0.52) \mu\text{m}$ 。使用 26 G 针通过大鼠尾静脉注射微泡。对于 CEUS,注射 0.01 ml 原始微泡混悬液。USMB 照射时,用 0.5 ml 生理盐水溶液稀释 0.01 ml 原始微泡溶液,缓慢注射 90 s。主要制备步骤如下:将二棕榈酰磷脂酰甘油、二硬脂酰磷脂酰胆碱和聚乙二醇 4000 按质量比为 30:30:3 000 混合,与超纯水按体积比 10:3 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中充分混合。将得到的悬浮液分装至 2 ml 规格小瓶中,每瓶 1 ml,置于冷冻干燥机中冻干。取冻干后的粉末,分散于 1 ml 体积比为 8:1:1 的 50% 葡萄糖、丙二醇和甘油混合液中,随后向瓶内通入全氟丙烷以置换瓶中空气。将小瓶密封并用机械振荡器以 4 000~5 500 次/min 的频率振荡 90 s,最终获得脂氟显微泡。

1.2.2 实验分组与干预 采用随机数字表法将 30 只大鼠随机分成 MI=0.2 组、MI=0.4 组和 MI=0.8 组,每组 10 只,对各组大鼠右眼进行相应 MI 超声照射,分别于照射前,照射后 1、3、7 d 进行 CEUS、荧光素眼底血管造影 (fundus fluorescein angiography, FFA)、OCT 检测。另选取 54 只同周龄的正常大鼠,采用随机数字表法随机分为 MI=0.2 组、MI=0.4 组和 MI=0.8 组,每组 18 只,对各组大鼠双眼均进行相应 MI 超声照射,分别在照射后 1、3、7 d,每组任意选取 6 只大鼠进行视网膜电图 (electroretinogram, ERG) 检测;实验完成后立即通过腹腔内注射过量戊巴比妥钠溶液 (200 mg/kg) 处死大鼠,立即摘除大鼠一侧眼球,用 4% 多聚甲醛固定 24 h,常规脱水、透明、石蜡包埋,取另一侧眼球于

解剖显微镜下完整剥离视网膜组织,置于 -80°C 冰箱冷冻保存备用,随机选取 3 个视网膜组织用于实时荧光定量 PCR 检测。取 6 只正常大鼠参照以上方法分别进行 ERG、苏木精-伊红染色和实时荧光定量 PCR 检测。

1.2.3 CEUS 及定量分析 参照文献[17]的方法,使用配备 X4-12L 线阵换能器的商用诊断超声系统 VINNO 70 进行治疗性超声照射和超声成像(图 1B)。在 USMB 处理之前,用 B 模式对眼部进行成像(图 1C)。选用 CEUS 模式对眼球进行超声成像(图 1D),采用 VINNO 70 改良的闪光模式(Vflash 模式)进行 USMB 照射。Vflash 模式可以通过以下参数来调节微泡空化:中心频率、MI、脉冲长度、脉冲重复频率和破坏(开)/补充(关)时间。该模式可实现诊断超声和超声照射的交替发射,以确保有足够的空化核来破坏微泡,同时保证治疗在同一平面内进行,从而提高治疗精度。此外,可将超声弱聚焦于感兴趣区域,以减少其对周围组织的影响(图 1D)。USMB 照射参数设定如下:中心频率为 3 MHz,脉冲重复频率为 100 Hz,脉冲长度为 5 cycles,破坏(开)/补充(关)时间为 0.20/1 s,照射总时间为 90 s。CEUS 定量分析:采用 VINNO 70 超声诊疗一体机自带的超声造影分析软件,参考二维图像勾画眼球血流灌注区域(5 mm×10 mm,图 1D),分析 60 s 动态造影图像,通过时间-强度曲线(图 1E)获得峰值强度(peak intensity, PI)及曲线下面积(area under the curve, AUC)(图 1F)。计算两者相对 USMB 照射前的变化率。变化率(%)=(各时间点测量值-USMB 照射前值)/USMB 照射前值×100%。

1.2.4 FFA 检测 各组大鼠视网膜血管 大鼠腹腔注射氯胺酮(100 mg/kg)和甲苯噻嗪(5 mg/kg)行全身麻醉,复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳。腹膜内注射 5 μg 荧光素钠后观察红外图像并连续拍照,于注射后 2 min 拍摄晚期图像。对同一只大鼠分别于 USMB 照射前,照射后即刻及照射后 1、3、7 d 获取 FFA 图像。

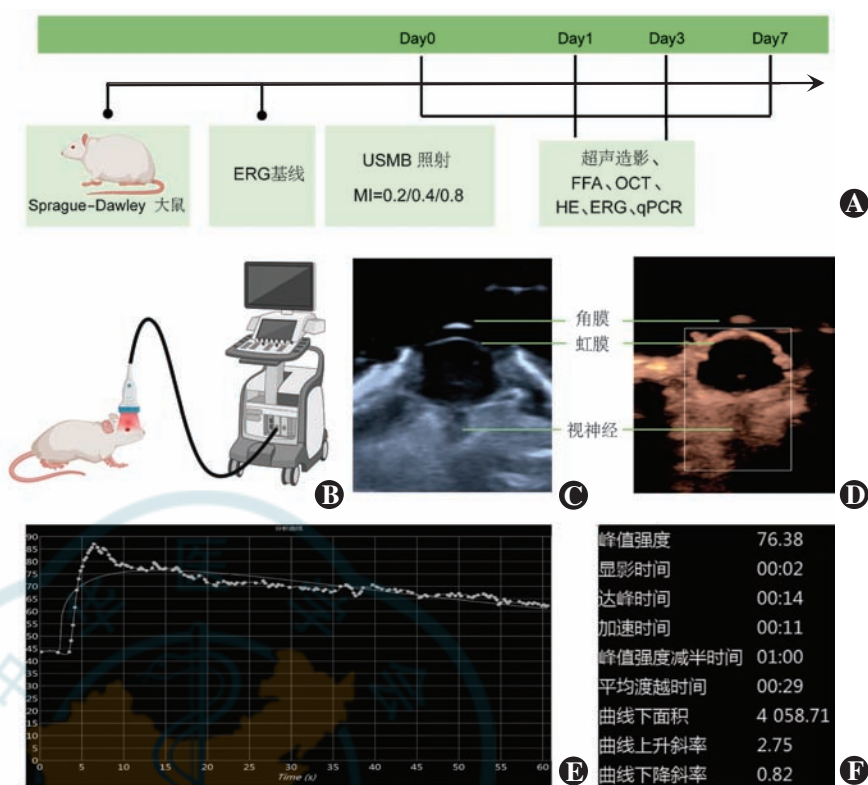


图 1 实验操作流程及 USMB A: 实验操作流程 B: 大鼠眼球示意图 C: 大鼠眼球 B 模式成像 D: 大鼠眼球对比增强超声成像 E: 对比增强超声成像后时间-强度曲线图 F: 对比增强超声成像后自动生成的峰值强度值和曲线下面积 ERG: 视网膜电图; USMB: 超声联合微泡; MI: 机械指数; FFA: 荧光素眼底血管造影; OCT: 光学相干断层扫描; HE: 苏木精-伊红染色

Figure 1 Flow chart of experimental operation and USMB A: Flow chart of experimental operation B: Schematic diagram of ultrasound and microbubble irradiation on rat eyeball C: B-mode imaging of rat eyeball D: Contrast-enhanced ultrasound imaging of rat eyeball E: Time-intensity curve after contrast-enhanced ultrasound F: The peak intensity and area under the curve values automatically generated after contrast-enhanced ultrasound ERG: electroretinogram; USMB: ultrasound combined with microbubbles; MI: mechanical index; FFA: fundus fluorescein angiography; OCT: optical coherence tomography; HE: hematoxylin-eosin

1.2.5 OCT 仪检测 各组大鼠视网膜结构及厚度 对同一只大鼠,分别在 USMB 照射前,照射后即刻以及照射后 1、3、7 d 依据上述方法进行全身麻醉,复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳。将大鼠仰卧置于检测台上,采用 OCT 仪对视网膜进行扫描,扫描区域为视盘周边视网膜,扫描深度为 2 mm,扫描面积为 3 mm×3 mm。所有操作均由同一名经验丰富的医师完成。检测过程中使用加替沙星眼用凝胶点眼以防角膜干燥。将大鼠视网膜分为内层视网膜(范围从内界膜到内核层)、外层视网膜(范围从内核层到外核层)和视网膜全层(范围从内界膜到外核层),采用 OCT 仪自带的自动检测系统测量各层视网膜厚度。

1.2.6 苏木精-伊红染色法 观察各组大鼠视网膜组织形态 取各组不同时间点石蜡包埋的眼球,随机选取 3 个通过视神经的不连续视网膜切片,经二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水,行苏木素染色 5 min,酸性乙醇分

化液处理 3 s,水洗 2 min,伊红染色 30 s,脱水后封片;光学显微镜下观察大鼠视网膜组织形态学改变。参照文献[18],采用 ImageJ 软件测量距离视神经约 500 μm (中央区)、1 100 μm (中间区)和 1 700 μm (周边区)的视网膜厚度。在测量区域垂直视网膜层放置参考线,以确保测量准确性;以 3 个切片的视网膜厚度平均值作为每个眼球的视网膜厚度最终值。

1.2.7 ERG 检测各组大鼠视网膜功能 参照文献[19]的方法,由同一位设盲操作者对正常大鼠和 USMB 照射后的大鼠行 ERG 检测。实验操作期间,采用加热毯维持所有大鼠体温稳定。大鼠暗适应 12 h 以上,于暗室暗红光下经腹腔注射麻醉,用托吡卡胺滴眼液点双眼扩瞳。定制的银/氯化银电极由 0.01 英寸(0.254 mm)特氟龙涂层银丝制成。取长度约 10 mm 电极制成小环,形成角膜正电极;同时将皮下参考电极和接地电极分别连接到外眶缘皮下和尾部颞侧皮下。在暗红光下,采用 $3.0\text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ 的光强刺激,记录大鼠暗视觉 ERG 反应。a 波振幅计算方法为从基线至 a 波最低点的电位差,b 波振幅为从 a 波最低点至 b 波峰值的电位差。振荡电位(oscillatory potentials, OPs)反映视网膜内层血管功能变化^[20]。

1.2.8 实时荧光定量 PCR 检测各组大鼠视网膜炎因子 mRNA 表达水平 各组大鼠于 ERG 检测完成后,腹腔注射过量戊巴比妥钠处死,取一侧眼球的视网膜组织,置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。采用 Trizol 试剂提取总 RNA,使用逆转录试剂盒逆转录为 cDNA。各基因引物序列见表 1,引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成。PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火及延伸 30 s,循环 40 次。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α mRNA 相对表达量。实验重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计学软件进行统计分析。计量

资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组不同时间点各参数比较采用重复测量两因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验。采用双侧检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 各基因 PCR 引物序列 Table 1 PCR primer sequence of each gene	
基因	引物序列(5'-3')
IL-1 β	正向:ACTTGGGCTGTCCAGATGAGAG
	反向:CGAGTCACAGAGGACGGGCT
IL-6	正向:AAGAGACTCCAGCCAGTTGCC
	反向:TGTGGGTGGTATCTCTGTGAAG
TNF- α	正向:CCAGGTTCTCTTCAAGGGACAA
	反向:GGTATGAAATGGCAAATCGGCT
GAPDH	正向:CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG
	反向:GGTGAAGAATGGGAGTTGCT
注:IL:白细胞介素;TNF:肿瘤坏死因子;GAPDH:3-磷酸甘油醛脱氢酶 Note: IL: interleukin; TNF: tumor necrosis factor; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	

2 结果

2.1 不同处理组 USMB 照射前后 CEUS 定量参数比较 各组不同时间点 PI 和 AUC 总体比较,差异均有统计学意义($F_{\text{时间}}=10.735、7.181$,均 $P<0.001$)。MI=0.2 组中,USMB 照射后即刻 PI 和 AUC 较 USMB 照射前明显增加,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);与 USMB 照射前比较,USMB 照射后 1、3 和 7 d PI 和 AUC 差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。MI=0.4 组中,USMB 照射后即刻 PI 和 AUC 较 USMB 照射前明显降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与 USMB 照射前比较,USMB 照射后 1、3 和 7 d PI 和 AUC 差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。MI=0.8 组中,USMB 照射后即刻及照射后 1、3 和 7 d,PI 和 AUC 明显低于 USMB 照射前,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$) (表 2、3)。MI=0.8 组 USMB 照射后各时间点超声显影均较 USMB 照射前明显减弱(图 2)。

表 2 各组 USMB 照射前及照射后不同时间点 PI 值比较($\bar{x}\pm s$) Table 2 Comparison of PI values before and at different time points after USMB irradiation within each group ($\bar{x}\pm s$)						
组别	眼数	不同时间点 PI 值				
		照射前	照射即刻	照射后 1 d	照射后 3 d	照射后 7 d
MI=0.2 组	10	71.600 $\pm$ 0.778	83.500 $\pm$ 1.310 ^a	72.900 $\pm$ 0.657	71.700 $\pm$ 0.830	72.400 $\pm$ 0.980
MI=0.4 组	10	73.300 $\pm$ 1.012	65.500 $\pm$ 0.619 ^a	73.500 $\pm$ 1.046	72.200 $\pm$ 0.752	73.500 $\pm$ 0.764
MI=0.8 组	10	75.700 $\pm$ 0.967	60.500 $\pm$ 1.384 ^a	60.900 $\pm$ 1.215 ^a	67.400 $\pm$ 0.980 ^a	68.200 $\pm$ 1.020 ^a
注: $F_{\text{分组}}=37.372, P<0.001; F_{\text{时间}}=10.735, P<0.001$ 。与各自 USMB 照射前值比较, ^a $P<0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD- t 检验) USMB: 超声联合微泡; PI: 峰值强度; MI: 机械指数 Note: $F_{\text{group}}=37.372, P<0.001; F_{\text{time}}=10.735, P<0.001$ 。Compared with respective value before USMB irradiation, ^a $P<0.05$ (Repeated measures two-way ANOVA, LSD- t test) USMB: ultrasound and microbubbles; PI: peak intensity; MI: mechanical index						

表 3 各组 USMB 照射前及照射后不同时间点 AUC 值比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of AUC values before and at different time points after USMB irradiation within each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	眼数	不同时间点的 AUC 值				
		照射前	照射即刻	照射后 1 d	照射后 3 d	照射后 7 d
MI=0.2 组	10	4 209.20±93.08	4 560.41±143.10 ^a	4 261.20±96.80	4 220.80±55.67	4 191.20±76.85
MI=0.4 组	10	4 165.90±93.36	3 843.90±96.10 ^a	4 162.90±73.23	4 160.70±80.00	4 217.70±81.56
MI=0.8 组	10	4 298.20±110.30	3 516.70±78.52 ^a	3 893.20±92.63 ^a	3 884.10±86.77 ^a	3 860.00±86.78 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 23.069, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 7.181, P < 0.001$. 与各自 USMB 照射前值比较, ^a $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验) USMB: 超声联合微泡; AUC: 曲线下面积; MI: 机械指数

Note: $F_{\text{group}} = 23.069, P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 7.181, P < 0.001$. Compared with respective value before USMB irradiation, ^a $P < 0.05$ (Repeated measures two-way ANOVA, LSD-*t* test) USMB: ultrasound and microbubbles; AUC: area under the curve; MI: mechanical index

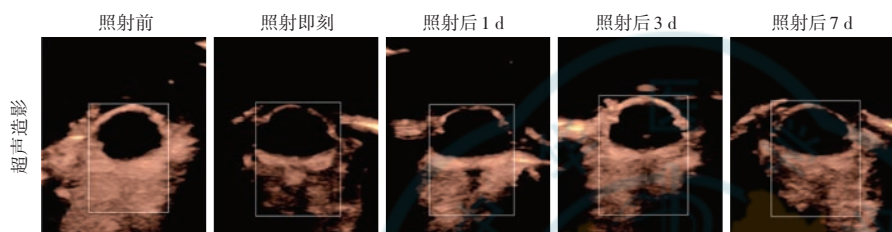


图 2 MI=0.8 组 USMB 照射前及照射后不同时间点对比增强超声图像 USMB 照射后各时间点超声显影均较 USMB 照射前明显减弱 MI: 机械指数; USMB: 超声联合微泡

Figure 2 Contrast-enhanced ultrasound images before and at different time points after USMB irradiation in MI=0.8 group Ultrasound imaging at each time point after USMB irradiation was significantly weaker than that before USMB irradiation MI: mechanical index; USMB: ultrasound and microbubbles

2.2 不同处理组大鼠 FFA 情况比较

MI=0.2 组 USMB 照射后各个时间点 FFA 晚期图像

均未发现明显荧光素渗漏; MI=0.4 组 USMB 照射后即刻 FFA 晚期图像可观察到视网膜血管有少量荧光素渗漏,但这种渗漏在 USMB 照射后 1 d 消失; MI=0.8 组 USMB 照射后即刻 FFA 晚期图像出现了严重的荧光素渗漏,并且这种渗漏持续到 USMB 照射后 1 d (图 3)。

2.3 不同处理组 USMB 照射前后大鼠视网膜形态和厚度比较

OCT 扫描结果显示, MI=0.2 组 USMB 照射后各时间点大鼠视网膜结构和厚度未出现明显变化; MI=0.4 组 USMB 照射后 1 d 视网膜有轻度水肿,且在照射后 3 d 恢复到正常视网膜厚度水平; MI=0.8 组 USMB 照射后 1 d 视网膜水肿,并有内层高反射灶 (high reflex foci, HRF),水肿持续到照射后 3 d,照射后 7 d 视网膜

出现萎缩 (图 4)。各组 USMB 照射前后不同时间点内层和全层视网膜厚度总体比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{时间}} = 221.369, 102.673$, 均 $P < 0.001$), 其中 MI=0.4 组 USMB 照射后 1 d 内层和全层视网膜厚度较照射前明显增厚,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); MI=0.8 组 USMB 照射后 1、3 d 内层和全层视网膜厚度较照射前明显增厚, USMB 照射后 7 d 内层和全层视网膜厚度较照射前明显变薄,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$) (表 4、5)。

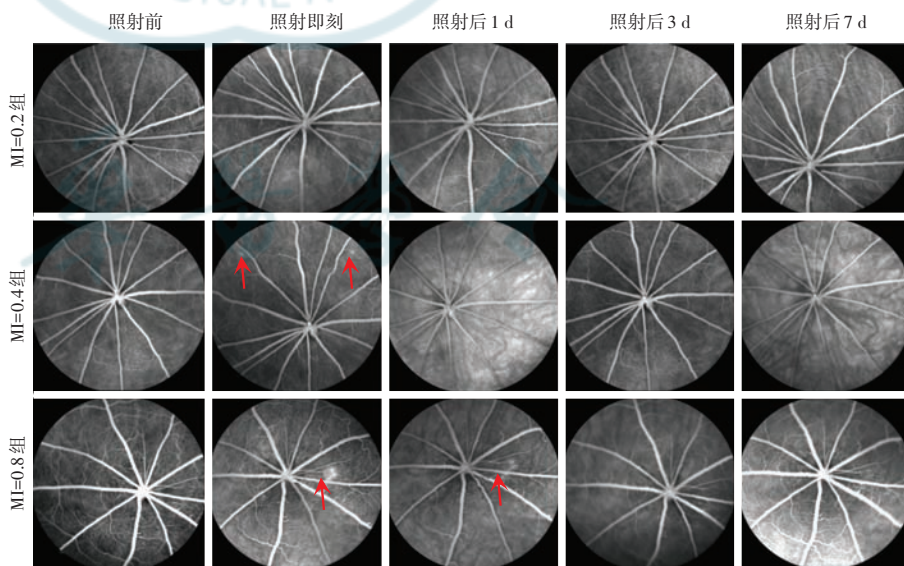


图 3 各组 USMB 照射前及照射后不同时间点荧光素眼底血管造影图像 荧光素钠注射后 2 min 拍摄的晚期图像, 视野 50°; MI=0.4 组 USMB 照射后即刻, MI=0.8 组 USMB 照射后即刻和 1 d 时可观察到荧光素渗漏点 (箭头) MI: 机械指数; USMB: 超声联合微泡

Figure 3 Fundus fluorescein angiography images before and at different time points after USMB irradiation in each group Late-stage images were taken two minutes after the injection of fluorescein sodium, with a field of view of 50°. Fluorescence leakage points (red arrows) were observed immediately after USMB irradiation in the MI=0.4 group and at one day and immediately after USMB irradiation in the MI=0.8 group MI: mechanical index; USMB: ultrasound and microbubbles

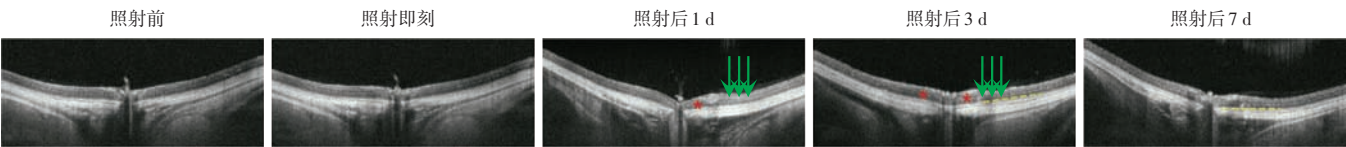


图 4 MI=0.8 组 USMB 照射前及照射后不同时间点光学相干断层扫描成像图像 红色星号示视网膜水肿,黄色虚线示视网膜的分层紊乱,绿色箭头示视网膜内层高反射灶 MI:机械指数;USMB:超声联合微泡
Figure 4 Optical coherence tomography images of retina before and at different time points after USMB irradiation in each group Red asterisk indicated retinal edema, the yellow dashed line indicated retinal layering disorder, and the green arrow indicated high reflex foci in the inner layer of the retina MI: mechanical index; USMB: ultrasound and microbubbles

2.4 不同处理组 USMB 照射前后大鼠视网膜组织形态学比较

苏木精-伊红染色结果显示,MI=0.2 组大鼠视网膜组织形态在各时间点均无明显变化;MI=0.4 组在 USMB 照射后 1 d 视网膜有部分水肿;MI=0.8 组 USMB 照射后 1、3 d 视网膜持续水肿,照射后 7 d 可观察到空泡化改变、视网膜结构紊乱和萎缩等不可逆损伤(图 5)。各组 USMB 照射前后不同时间点内层和全层视网膜厚度总体比较差异均有统计学意义($F_{\text{时间}}=42.970、215.500$,均 $P<0.001$),其中 MI=0.4 组 USMB 照射后 1 d 内层和全层视网膜厚度较照射前明显增厚,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);MI=0.8 组 USMB 照射后 1、3 d 内层和全层视网膜厚度较照射前明显增厚,照射后 7 d 内层和全层视网膜厚度较照射前明显变薄,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(表 6、7)。

2.5 不同处理组 USMB 照射前后大鼠视网膜功能比较

ERG 检测结果显示,MI=0.2 组 USMB 照射前后不同时间点暗适应 3.0 a 波、b 波和 OPs 波振幅无明显变化;MI=0.4 组 USMB 照射后 1 d a 波、b 波和 OPs 波振幅较照射前均有小幅度降低,并在照射后 3 d 恢复至照射前水平;MI=0.8 组 USMB 照射后 1 d a 波、b 波和 OPs 波振幅较照射前大幅度降低,照射后 3、7 d 各波振幅逐渐回升,但仍低于照射前。各组 USMB 照射前后不同时间点暗适应 3.0 a 波、b 波和 OPs 波总

体比较差异均有统计学意义($F_{\text{时间}}=31.850、205.600、65.500$,均 $P<0.001$),其中 MI=0.4 组 USMB 照射后 1 d 的 a 波、b 波和 OPs 波振幅较照射前均明显降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);MI=0.8 组 USMB 照射后 1、3、7 d 的 a 波、b 波和 OPs 波振幅较照射前明显降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(图 6,表 8~10)。

表 4 各组 USMB 照射前及照射后不同时间点内层视网膜厚度的 OCT 测量值比较($\bar{x}\pm s, \mu\text{m}$)
Table 4 Comparison of OCT measurements of inner retinal thickness before and at different time points after USMB irradiation within each group ($\bar{x}\pm s, \mu\text{m}$)

组别	眼数	不同时间点内层视网膜厚度				
		照射前	照射即刻	照射后 1 d	照射后 3 d	照射后 7 d
MI=0.2 组	6	102.610±0.967	101.492±1.124	104.773±1.513	105.593±1.348	103.918±0.496
MI=0.4 组	6	101.778±2.628	101.775±2.460	121.000±1.363 ^a	106.145±1.087	102.140±1.808
MI=0.8 组	6	102.805±0.938	103.648±1.439	137.112±1.285 ^a	110.250±0.580 ^a	92.502±1.740 ^a

注: $F_{\text{分组}}=67.575, P<0.001; F_{\text{时间}}=221.369, P<0.001$ 。与各自 USMB 照射前值比较,^a $P<0.01$ (重复测量两因素方差分析,LSD- t 检验) USMB:超声联合微泡;OCT:光学相干断层扫描;MI:机械指数
Note: $F_{\text{group}}=67.575, P<0.001; F_{\text{time}}=221.369, P<0.001$. Compared with respective value before USMB irradiation within group, ^a $P<0.01$ (Repeated measures two-way ANOVA, LSD- t test) USMB: ultrasound and microbubbles; OCT: optical coherence tomography; MI: mechanical index

表 5 各组 USMB 照射前及照射后不同时间点全层视网膜厚度的 OCT 测量值($\bar{x}\pm s, \mu\text{m}$)
Table 5 Comparison of OCT measurements of whole layer retinal thickness before and at different time points after USMB irradiation within each group ($\bar{x}\pm s, \mu\text{m}$)

组别	眼数	不同时间点全层视网膜厚度				
		照射前	照射即刻	照射后 1 d	照射后 3 d	照射后 7 d
MI=0.2 组	6	194.723±3.298	195.497±2.132	194.798±2.674	193.450±1.851	196.477±3.084
MI=0.4 组	6	197.445±1.763	198.668±2.511	217.430±1.678 ^a	199.598±1.852	195.000±1.848
MI=0.8 组	6	194.272±1.983	194.633±1.540	229.462±3.218 ^a	204.587±1.774 ^a	183.610±1.306 ^a

注: $F_{\text{分组}}=38.065, P<0.001; F_{\text{时间}}=102.673, P<0.001$ 。与各自 USMB 照射前值比较,^a $P<0.001$ (重复测量两因素方差分析,LSD- t 检验) USMB:超声联合微泡;OCT:光学相干断层扫描;MI:机械指数
Note: $F_{\text{group}}=38.065, P<0.001; F_{\text{time}}=102.673, P<0.001$. Compared with respective value before USMB irradiation within group, ^a $P<0.001$ (Repeated measures two-way ANOVA, LSD- t test) USMB: ultrasound and microbubbles; OCT: optical coherence tomography; MI: mechanical index

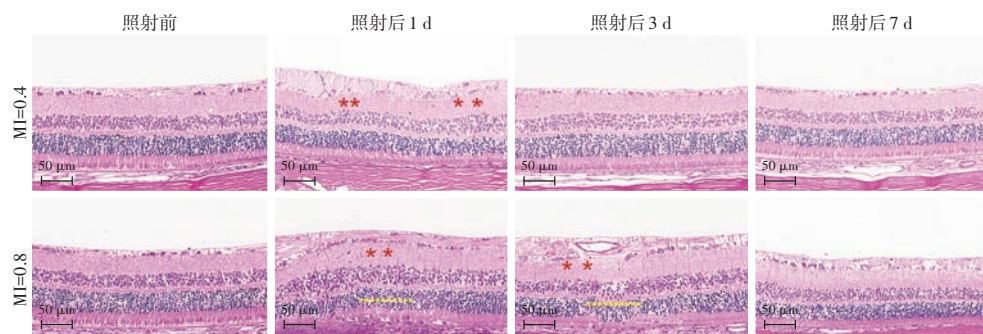


图 5 各组 USMB 照射前及照射后视网膜苏木精-伊红染色图像 ($\times 200$, 标尺 = $50 \mu\text{m}$) 红色星号示视网膜水肿, 黄色虚线示视网膜的分层紊乱 USMB: 超声联合微泡

Figure 5 Hematoxylin-eosin staining images of retina before and at different time points after USMB irradiation in each group ($\times 200$, scale bar = $50 \mu\text{m}$) The red asterisk indicated retinal edema and the yellow dashed line indicated retinal layering disorder USMB: ultrasound and microbubbles

表 6 各组 USMB 照射前及照射后不同时间点苏木精-伊红染色切片中
内层视网膜厚度比较 ($\bar{x} \pm s$, μm)

Table 6 Comparison of inner retinal thickness by hematoxylin-eosin sections before
at different time points and after USMB within each group ($\bar{x} \pm s$, μm)

组别	样本量	不同时间点内层视网膜厚度			
		照射前	照射即刻	照射后 1 d	照射后 3 d
MI=0.2 组	6	105.000 $\pm$ 1.203	101.300 $\pm$ 1.459	102.400 $\pm$ 1.662	103.800 $\pm$ 1.942
MI=0.4 组	6	105.000 $\pm$ 1.203	122.600 $\pm$ 1.762 ^a	102.300 $\pm$ 1.483	103.500 $\pm$ 1.956
MI=0.8 组	6	105.000 $\pm$ 1.203	135.700 $\pm$ 2.393 ^a	117.300 $\pm$ 0.683 ^a	91.710 $\pm$ 1.644 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 59.470, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 42.970, P < 0.001$. 与各自 USMB 照射前值比较, ^a $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验) USMB: 超声联合微泡; MI: 机械指数

Note: $F_{\text{group}} = 59.470, P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 42.970, P < 0.001$. Compared with respective value before USMB irradiation within group, ^a $P < 0.05$ (Repeated measures two-way ANOVA, LSD-*t* test) USMB: ultrasound and microbubbles; MI: mechanical index

表 7 各组 USMB 照射前及照射后不同时间点苏木精-伊红染色
切片中全层视网膜厚度比较 ($\bar{x} \pm s$, μm)

Table 7 Comparison of whole layer retinal thickness by hematoxylin-eosin sections before
at different time points and after USMB irradiation within each group ($\bar{x} \pm s$, μm)

组别	样本量	不同时间点全层视网膜厚度			
		照射前	照射即刻	照射后 1 d	照射后 3 d
MI=0.2 组	6	149.700 $\pm$ 0.655	150.600 $\pm$ 1.207	150.100 $\pm$ 1.296	151.200 $\pm$ 0.959
MI=0.4 组	6	149.700 $\pm$ 0.655	165.100 $\pm$ 1.186 ^a	154.700 $\pm$ 1.104	150.700 $\pm$ 1.038
MI=0.8 组	6	149.700 $\pm$ 0.655	191.200 $\pm$ 1.629 ^a	162.400 $\pm$ 1.489 ^a	141.900 $\pm$ 1.173 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 92.380, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 215.500, P < 0.001$. 与各自 USMB 照射前值比较, ^a $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验) USMB: 超声联合微泡; MI: 机械指数

Note: $F_{\text{group}} = 92.380, P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 215.500, P < 0.001$. Compared with respective value before USMB irradiation within group, ^a $P < 0.05$ (Repeated measures two-way ANOVA, LSD-*t* test) USMB: ultrasound and microbubbles; MI: mechanical index

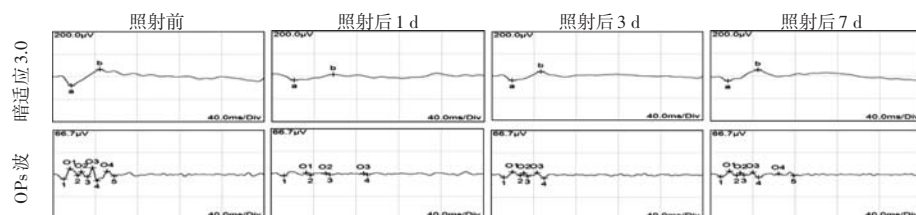


图 6 MI=0.8 组 USMB 照射前及照射后视网膜暗适应 3.0 和 OPs 的 ERG 结果 MI: 机械指数; OPs: 振荡电位; ERG: 视网膜电图; USMB: 超声联合微泡

Figure 6 ERG of retinal dark adaptation 3.0 and OPs before and after USMB irradiation in MI=0.8 group MI: mechanical index; OPs: oscillatory potentials; ERG: electroretinogram; USMB: ultrasound and microbubbles

2.6 不同处理组 USMB 照射前后大鼠视网膜 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 相对表达量比较

各组 USMB 照射前后不同时间点大鼠视网膜 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{时间}} = 158.200, 21.400, 154.000$, 均 $P < 0.001$), 其中 MI = 0.4 组 USMB 照射后 1 d IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 相对表达量较照射前均明显增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); MI = 0.8 组 USMB 照射后 1 d IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 相对表达量较照射前均明显增加, 照射后 3 d IL-1 β 和 TNF- α mRNA 相对表达量较照射前均明显增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (表 11~13)。

3 讨论

近年来, USMB 在眼科领域的研究重点主要集中在基因转染、药物递送和 BRB 的开放等方面^[11-14]。USMB 对眼部特定疾病的治疗展现出很好的发展前景。然而, 一个关键性问题的在于, 需首先明确 USMB 技术对眼球组织的安全性, 这是后续研究的重要前提。USMB 本身可能对组织产生一定损害, 如诱发炎症反应, 甚至导致血管损伤和细胞凋亡^[21]。因此, 本研究旨在确定导致大鼠视网膜不可逆损害的超声参数临界值, 同时探索合适的治疗参数范围。

表 8 各组 USMB 照射前及照射后不同时间点 a 波振幅比较 ($\bar{x}\pm s, \mu V$)
Table 8 Comparison of amplitude of a wave before and at different time points after USMB irradiation within each group ($\bar{x}\pm s, \mu V$)

组别	眼数	不同时间点 a 波振幅			
		照射前	照射后 1 d	照射后 3 d	照射后 7 d
MI=0.2 组	6	53.420±1.480	55.270±1.755	54.080±1.519	55.220±1.423
MI=0.4 组	6	53.420±1.480	50.850±1.086 ^a	53.270±1.074	54.680±1.057
MI=0.8 组	6	53.420±1.480	29.550±1.021 ^a	35.970±0.640 ^a	40.170±1.281 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 76.980, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 31.850, P < 0.001$. 与各自 USMB 照射前值比较, ^a $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验) USMB: 超声联合微泡; MI: 机械指数
Note: $F_{\text{group}} = 76.980, P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 31.850, P < 0.001$. Compared with respective value before USMB irradiation within group, ^a $P < 0.05$ (Repeated measures two-way ANOVA, LSD-*t* test) USMB: ultrasound and microbubbles; MI: mechanical index

表 9 各组 USMB 照射前及照射后不同时间点 b 波振幅比较 ($\bar{x}\pm s, \mu V$)
Table 9 Comparison of amplitude of b wave before and at different time points after USMB irradiation within each group ($\bar{x}\pm s, \mu V$)

组别	眼数	不同时间点 b 波振幅			
		照射前	照射后 1 d	照射后 3 d	照射后 7 d
MI=0.2 组	6	127.100±1.928	126.500±1.141	127.300±1.602	127.300±1.044
MI=0.4 组	6	127.100±1.928	119.100±0.670 ^a	129.200±1.189	128.800±1.113
MI=0.8 组	6	127.100±1.928	52.200±1.055 ^a	75.400±2.336 ^a	88.720±2.243 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 492.600, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 205.600, P < 0.001$. 与各自 USMB 照射前值比较, ^a $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验) USMB: 超声联合微泡; MI: 机械指数
Note: $F_{\text{group}} = 492.600, P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 205.600, P < 0.001$. Compared with respective value before USMB irradiation within group, ^a $P < 0.05$ (Repeated measures two-way ANOVA, LSD-*t* test) USMB: ultrasound and microbubbles; MI: mechanical index

表 10 各组 USMB 照射前及照射后不同时间点 OPs 波振幅比较 ($\bar{x}\pm s, \mu V$)
Table 10 Comparison of amplitude of OPs wave before and at different time points after USMB irradiation within each group ($\bar{x}\pm s, \mu V$)

组别	眼数	不同时间点 OPs 波振幅			
		照射前	照射后 1 d	照射后 3 d	照射后 7 d
MI=0.2 组	6	66.780±0.957	67.200±0.870	66.620±1.044	65.070±0.937
MI=0.4 组	6	66.780±0.957	56.350±1.243 ^a	66.120±0.877	65.120±1.013
MI=0.8 组	6	66.780±0.957	34.400±1.109 ^a	44.720±2.331 ^a	53.070±1.314 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 298.100, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 65.500, P < 0.001$. 与各自 USMB 照射前值比较, ^a $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验) USMB: 超声联合微泡; OPs: 振荡电位; MI: 机械指数
Note: $F_{\text{group}} = 298.100, P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 65.500, P < 0.001$. Compared with respective value before USMB irradiation within group, ^a $P < 0.05$ (Repeated measures two-way ANOVA, LSD-*t* test) USMB: ultrasound and microbubbles; OPs: oscillatory potentials; MI: mechanical index

USMB 用于其他领域的疾病治疗主要依赖微泡的稳态空化效应,而稳态空化与超声参数密切相关^[21-22]。微泡产生稳态空化的效率与峰值负压 (peak

negative pressure, PNP) 和脉冲重复频率等参数呈正相关^[22]。这些参数中,稳态空化对 PNP 的依赖性最大,而 PNP 又与 MI 呈正相关。本研究中使用的 VINNO70 超声诊疗一体机可在超声处理过程中对多项参数进行调节,包括中心频率、MI、脉冲长度、PRF、脉冲持续时间和治疗持续时间。本研究在保持其他参数不变的情况下,重点调整 MI 参数。

Lin 等^[22]研究发现,PNP 大于 0.25 MPa 时才能产生稳定的空化效果;El Kadi 等^[9]也指出在 MI 为 0.1~0.5 范围内可以观察到稳定的空化。因此,本研究设置 MI 梯度时设置了 0.2、0.4、0.8 共 3 个组,换算为 PNP 分别为 0.35、0.69、1.39 MPa。

本研究通过设置不同 MI 梯度,从 CEUS、形态学、组织学和功能学等多维度系统评估大鼠视网膜变化,确定引起视网膜损伤的 MI 阈值范围。本研究结果显示,MI 低于 0.4 时,USMB 照射对大鼠眼球未产生明显影响或引起可逆性改变,该结论在 CEUS、FFA、OCT、组织学和 ERG 等实验中均得到很好的印证。当 MI=0.2 时,USMB 照射后各时间点大鼠眼球均未见明显变化,仅在 MI=0.4 时出现部分轻微且可逆改变。

CEUS 是目前眼科临床诊疗的重要影像学检查手段,主要用于视网膜脱离、脉络膜脱离和眼部肿瘤疾病的诊断^[24]。基础实验研究也证实,CEUS 可提供肿瘤

表 11 各组 USMB 照射前及照射后不同时间点 IL-1 β mRNA 相对表达量比较
($\bar{x} \pm s$)

Table 11 Comparison of relative expression level of IL-1 β mRNA before and at different time points after USMB irradiation within each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同时间点 IL-1 β 相对表达量			
		照射前	照射后 1 d	照射后 3 d	照射后 7 d
MI=0.2 组	3	1.059 $\pm$ 0.040	1.062 $\pm$ 0.057	1.041 $\pm$ 0.041	1.057 $\pm$ 0.039
MI=0.4 组	3	1.059 $\pm$ 0.040	1.501 $\pm$ 0.030 ^a	1.067 $\pm$ 0.034	1.087 $\pm$ 0.043
MI=0.8 组	3	1.059 $\pm$ 0.040	5.705 $\pm$ 0.327 ^a	2.488 $\pm$ 0.202 ^a	1.079 $\pm$ 0.055

注: $F_{\text{分组}} = 150.200, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 158.200, P < 0.001$. 与各自 USMB 照射前值比较, ^a $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD- t 检验) USMB: 超声联合微泡; IL: 白细胞介素; MI: 机械指数

Note: $F_{\text{group}} = 150.200, P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 158.200, P < 0.001$. Compared with respective value before USMB irradiation within group, ^a $P < 0.05$ (Repeated measures two-way ANOVA, LSD- t test) USMB: ultrasound and microbubbles; IL: interleukin; MI: mechanical index

表 12 各组 USMB 照射前及照射后不同时间点 IL-6 mRNA 相对表达量比较
($\bar{x} \pm s$)

Table 12 Comparison of relative expression level of IL-6 mRNA before and at different time points after USMB irradiation within each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同时间点 IL-6 相对表达量			
		照射前	照射后 1 d	照射后 3 d	照射后 7 d
MI=0.2	3	1.000 $\pm$ 0.033	1.007 $\pm$ 0.006	1.008 $\pm$ 0.309	1.004 $\pm$ 0.012
MI=0.4	3	1.000 $\pm$ 0.033	1.213 $\pm$ 0.019 ^a	0.977 $\pm$ 0.043	1.087 $\pm$ 0.043
MI=0.8	3	1.000 $\pm$ 0.033	1.489 $\pm$ 0.104 ^a	1.121 $\pm$ 0.023	1.032 $\pm$ 0.039

注: $F_{\text{分组}} = 10.490, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 21.400, P < 0.001$. 与各自 USMB 照射前值比较, ^a $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD- t 检验) USMB: 超声联合微泡; IL: 白细胞介素; MI: 机械指数

Note: $F_{\text{group}} = 10.490, P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 21.400, P < 0.001$. Compared with respective value before USMB irradiation within group, ^a $P < 0.05$ (Repeated measures two-way ANOVA, LSD- t test) USMB: ultrasound and microbubbles; IL: interleukin; MI: mechanical index

表 13 各组 USMB 照射前及照射后不同时间点 TNF- α mRNA 相对表达量比较
($\bar{x} \pm s$)

Table 13 Comparison of relative expression level of TNF- α mRNA before and at different time points after USMB irradiation within each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同时间点 TNF- α 相对表达量			
		照射前	照射后 1 d	照射后 3 d	照射后 7 d
MI=0.2 组	3	1.000 $\pm$ 0.019	1.012 $\pm$ 0.038	1.013 $\pm$ 0.026	1.027 $\pm$ 0.040
MI=0.4 组	3	1.000 $\pm$ 0.019	1.731 $\pm$ 0.107 ^a	1.030 $\pm$ 0.046	1.087 $\pm$ 0.043
MI=0.8 组	3	1.000 $\pm$ 0.019	2.355 $\pm$ 0.185 ^a	1.661 $\pm$ 0.049 ^a	1.079 $\pm$ 0.055

注: $F_{\text{分组}} = 30.770, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 154.000, P < 0.001$. 与各自 USMB 照射前值比较, ^a $P < 0.01$ (重复测量两因素方差分析, LSD- t 检验) USMB: 超声联合微泡; TNF: 肿瘤坏死因子; MI: 机械指数

Note: $F_{\text{group}} = 30.770, P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 154.000, P < 0.001$. Compared with respective value before USMB irradiation within group, ^a $P < 0.01$ (Repeated measures two-way ANOVA, LSD- t test) USMB: ultrasound and microbubbles; TNF: tumor necrosis factor; MI: mechanical index

形态学及血流动力学相关信息,通过定量分析 PI 及 AUC 可准确评估肿瘤内血流灌注情况^[17,25]。本研究

尝试将 CEUS 影的方法应用于眼部研究的动物实验中,并采用系统自带的矩形框设定感兴趣区域,覆盖眼球周围的血流灌注区,包括视网膜中央动脉、睫状动脉、虹膜血管和眼球周围的其他组织血供。本研究结果显示,当 MI=0.4 时,CEUS 出现了短暂性的灌注减少,然后恢复到正常水平;而 MI=0.8 时,大鼠眼部周围血供出现严重且持续性的灌注减少,提示高强度的 USMB 可对眼部血管造成不可逆损伤。OCT 和组织学检查结果也显示,在 MI=0.8 时,可观察到内层 HRF,这被认为是视网膜缺血的典型标志^[11],同时伴有视网膜大面积水肿。组织学观察可见退化性空泡化、视网膜分层紊乱和萎缩,其中细胞边界消失提示感光细胞死亡。ERG 检查结果提示,高 MI 超声照射后大鼠视网膜功能出现不可逆丧失,进一步证实了高 MI 的 USMB 可导致视网膜不可逆损伤。以上改变可能是由于高 MI 下 USMB 引发的血管收缩,甚至结构破坏,造成视网膜严重缺血^[7-8]。有研究证实,缺血损伤可使 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等炎症因子的表达上调^[25-26]。本研究通过实时荧光定量 PCR 实验,观察到高 MI 处理后大鼠视网膜组织中上述炎症因子表达显著升高,证实高 MI 的 USMB 照射造成了视网

膜不可逆的缺血损伤。

值得注意的是,当 MI=0.2 时,USMB 照射后即刻



出现 PI 和 AUC 的短暂升高,提示低强度的 USMB 可能促进了眼部血管的血流灌注。这一结果与 Qiu 等^[28]的实验结果相似,该研究发现 USMB 可以促进缺血后肢的微血管血容量和血流量显著提高。这一现象可能与 USMB 的空化作用密切相关,USMB 产生的空化作用对血管内皮具有生物学效应,通过激活内皮一氧化氮合酶促进一氧化氮生成。大量研究证据表明,一氧化氮可通过调节血管张力、诱导血管扩张等机制增加血流灌注^[28-29]。Liang 等^[29]研究发现,US 靶向微泡破坏组和一氧化氮+US 靶向微泡破坏组可显著减小大鼠后肢血栓面积,提高再通率和血流速度,其机制与内皮一氧化氮合酶介导的一氧化氮生成有关。Qiu 等^[28]在急性后肢缺血模型中发现了类似的结果。本研究推测 USMB 作用于正常大鼠眼球后,可能通过刺激血管内皮细胞激活了内皮一氧化氮合酶通路,诱导一氧化氮生成,造成血管舒张,达到血流灌注增加的作用。

此外,在 MI=0.4 时,本研究通过 FFA 观察到少量视网膜渗漏,并且该现象是可逆的,这表明 USMB 可短暂性地开放 BRB。这与 Park 等^[30]的研究结果相似,但与 Bourdin 等^[11]研究发现当 PNP 在 0.15 MPa 时就可以打开 BRB 的结果不一致,这个差异可能是由于两者选用的超声中心频率不同;同时该研究选用的小鼠和本研究采用的大鼠存在生理结构差异。USMB 可逆性地开放 BRB 有望用于递送常规条件下难以进入视网膜的治疗药物或成像探针。BRB 在几小时内恢复,这为眼部药物递送提供良好的时间窗,同时避免因长期 BRB 破坏引起的不良效果。

本研究首次从形态学、组织学、功能学、分子生物学等多角度探究了 USMB 对大鼠眼球的安全性,并明确了造成视网膜不可逆损伤的超声参数和临界阈值,为下一步 USMB 治疗相关眼部疾病的研究提供了实验基础。鉴于 USMB 已通过空化效应在心肌梗死、缺血性卒中以及外周动脉血栓等血栓性疾病中展现出防治潜力,而目前尚缺乏 USMB 对具体眼部疾病的治疗性研究,本课题组下一步将围绕 USMB 对视网膜血栓性疾病,包括视网膜动脉阻塞、视网膜静脉阻塞的治疗作用开展实验研究,进一步探索其治疗效应背后的潜在机制。USMB 有望成为一种新型、安全、高效的治疗策略用于血栓性视网膜疾病的治疗。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 范森: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章;唐永红、兰津、秦明敏: 实施研究、采集数据、分析/解释数据;邹欢、陈小璠: 实施研究、分析/解释数据;刘政: 指导研究、实施研究、分析/解释数据;李佩倬: 酝酿和设计实验、分析/解释数据、

对文章的知识性内容作批评性审阅及定稿;袁容娣: 酝酿和设计实验、指导研究、分析/解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅及定稿

参考文献

- [1] Chong DD, Das N, Singh RP. Diabetic retinopathy: screening, prevention, and treatment [J]. *Cleve Clin J Med*, 2024, 91 (8) : 503-510. DOI: 10.3949/ccjm.91a.24028.
- [2] Thomas CJ, Mirza RG, Gill MK. Age-related macular degeneration [J]. *Med Clin North Am*, 2021, 105 (3) : 473-491. DOI: 10.1016/j.mcna.2021.01.003.
- [3] Kubo Y, Akanuma SI, Hosoya KI. Recent advances in drug and nutrient transport across the blood-retinal barrier [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2018, 14 (5) : 513-531. DOI: 10.1080/17425255.2018.1472764.
- [4] Frinking P, Segers T, Luan Y, et al. Three decades of ultrasound contrast agents: a review of the past, present and future improvements [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2020, 46 (4) : 892-908. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2019.12.008.
- [5] Averkiou MA, Bruce MF, Powers JE, et al. Imaging methods for ultrasound contrast agents [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2020, 46 (3) : 498-517. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2019.11.004.
- [6] Klibanov AL. Ultrasound contrast: gas microbubbles in the vasculature [J]. *Invest Radiol*, 2021, 56 (1) : 50-61. DOI: 10.1097/RLI.0000000000000733.
- [7] Yanye Y, Qunying L, Xiasheng G, et al. Mechanisms underlying sonoporation: interaction between microbubbles and cells [J]. *Ultrason Sonochem*, 2020, 67 : 105096. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2020.105096.
- [8] Deprez J, Lajoinie G, Engelen Y, et al. Opening doors with ultrasound and microbubbles: beating biological barriers to promote drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 172 : 9-36. DOI: 10.1016/j.addr.2021.02.015.
- [9] El Kadi S, Porter TR, Verouden N, et al. Contrast ultrasound, sonothrombolysis and sonoperfusion in cardiovascular disease: shifting to therapeutic clinical trials [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2022, 15 (2) : 345-360. DOI: 10.1016/j.jcmg.2021.07.028.
- [10] Chen J, Yang Y, Li Y, et al. Targeted microbubbles combined with low-power focused ultrasound promote the thrombolysis of acute deep vein thrombosis [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11 : 1163405. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1163405.
- [11] Bourdin A, Ortolini M, Karadayi R, et al. Efficacy and safety of low-intensity pulsed ultrasound-induced blood-retinal barrier opening in mice [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15 (7) : 1896. DOI: 10.3390/pharmaceutics15071896.
- [12] Li H, Qian J, Yao C, et al. Combined ultrasound-targeted microbubble destruction and polyethylenimine-mediated plasmid DNA delivery to the rat retina: enhanced efficiency and accelerated expression [J]. *J Gene Med*, 2016, 18 (4-6) : 47-56. DOI: 10.1002/jgm.2875.
- [13] Wan C, Qian J, Li F, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction enhances polyethylenimine-mediated gene transfection *in vitro* in human retinal pigment epithelial cells and *in vivo* in rat retina [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12 (2) : 2835-2841. DOI: 10.3892/mmr.2015.3703.
- [14] Touahri Y, Dixit R, Kofoed RH, et al. Focused ultrasound as a novel strategy for noninvasive gene delivery to retinal Müller glia [J]. *Theranostics*, 2020, 10 (7) : 2982-2999. DOI: 10.7150/thno.42611.
- [15] 申晓丽, 李强, 黄丽娜, 等. 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 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34 (11) : 983-988. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.11.005.
- [16] Shen XL, Li Q, Huang LN, et al. Screening of optimal ultrasound

- parameters after intravitreal injection of microbubble in normal rabbit eyes[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(11):983-988. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.11.005.
- [16] Xie F, Gao S, Wu J, et al. Diagnostic ultrasound induced inertial cavitation to non-invasively restore coronary and microvascular flow in acute myocardial infarction[J/OL]. PLoS One, 2013, 8(7): e69780 [2025-05-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23922797/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0069780.
- [17] Zhang Y, Zhang J, Luo T, et al. Sononeoperfusion effect by ultrasound and microbubble promotes nitric oxide release to alleviate hypoxia in a mouse MC38 tumor model[J]. Ultrason Sonochem, 2023, 100: 106619. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2023.106619.
- [18] Feng Y, Hu C, Cui K, et al. GSK840 alleviates retinal neuronal injury by inhibiting RIPK3/MLKL-mediated RGC necroptosis after ischemia/reperfusion[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2023, 64(14): 42. DOI: 10.1167/iov.64.14.42.
- [19] Wen X, Yuan M, Li C, et al. Effect of vitrectomy with intrasurgical regulation of intraocular pressure in a rabbit model of central retinal artery occlusion[J]. Exp Eye Res, 2019, 189: 107779. DOI: 10.1016/j.exer.2019.107779.
- [20] Xiao K, Ma XH, Zhong Z, et al. Low-dose trans-resveratrol ameliorates diabetes-induced retinal ganglion cell degeneration via TyrRS/c-Jun pathway[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2023, 64(7): 2. DOI: 10.1167/iov.64.7.2.
- [21] Ji R, Karakatsani ME, Burgess M, et al. Cavitation-modulated inflammatory response following focused ultrasound blood-brain barrier opening[J]. J Control Release, 2021, 337: 458-471. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.07.042.
- [22] Lin Y, Lin L, Cheng M, et al. Effect of acoustic parameters on the cavitation behavior of SonoVue microbubbles induced by pulsed ultrasound[J]. Ultrason Sonochem, 2017, 35(Pt A): 176-184. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2016.09.016.
- [23] Ward RE, Martinez-Correa S, Tierradentro-García LO, et al. Sonothrombolysis: state-of-the-art and potential applications in children [J]. Children (Basel), 2023, 11(1): 57. DOI: 10.3390/children11010057.
- [24] 高敏, 林秋蓉, 刘海芸. 超声微泡和超声造影在眼部疾病诊断和治疗研究进展[J]. 中国实用眼科杂志, 2017, 35(3): 230-233. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-4443.2017.03.002.
- [25] Tang N, Tang J, Tang J, et al. Sononeoperfusion: a new therapeutic effect to enhance tumour blood perfusion using diagnostic ultrasound and microbubbles[J]. Cancer Imaging, 2023, 23(1): 29. DOI: 10.1186/s40644-023-00545-y.
- [26] Kramer M, Dadon S, Hasanreisoglu M, et al. Proinflammatory cytokines in a mouse model of central retinal artery occlusion[J]. Mol Vis, 2009, 15: 885-894.
- [27] Lin S, Zhu P, Jiang L, et al. Neutrophil extracellular traps induced by IL-1 β promote endothelial dysfunction and aggravate limb ischemia[J]. Hypertens Res, 2024, 47(6): 1654-1667. DOI: 10.1038/s41440-024-01661-3.
- [28] Qiu S, Li D, Wang Y, et al. Ultrasound-mediated microbubble cavitation transiently reverses acute hindlimb tissue ischemia through augmentation of microcirculation perfusion via the eNOS/NO pathway[J]. Ultrasound Med Biol, 2021, 47(4): 1014-1023. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2020.12.028.
- [29] Liang Z, Chen H, Gong X, et al. Ultrasound-induced destruction of nitric oxide-loaded microbubbles in the treatment of thrombus and ischemia-reperfusion injury[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 745693. DOI: 10.3389/fphar.2021.745693.
- [30] Park J, Zhang Y, Vykhodtseva N, et al. Targeted and reversible blood-retinal barrier disruption via focused ultrasound and microbubbles[J/OL]. PLoS One, 2012, 7(8): e42754 [2025-05-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22912733/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0042754.
- (收稿日期: 2025-06-19 修回日期: 2025-12-09)
- (本文编辑: 张宇)

读者 · 作者 · 编者

本刊对中英文摘要的要求

论著或综述文稿正文请撰写中英文摘要。原创性论著文稿要求为结构式摘要,包括目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusions)4个要素,摘要应能够回答以下问题:(1)为什么进行这项研究。(2)主要用什么方法进行研究。(3)获得什么主要结果。(4)通过研究得出什么结论等。其中目的部分为本课题对上述提出问题设立的目标。方法部分应提供研究对象、样本量、分组情况、各组的干预情况、与研究相适应的观察或检测指标,获得结局指标的手段和设备等。临床研究请说明是前瞻性研究、回顾性研究还是观察性研究。结果部分请客观描述研究的主要发现,包括主要的形态学检查表现、相关的关键性或主要的量化资料以及相应的统计学比较结果,须写明统计学量值及其概率值。结论部分请提出与本研究论据直接相关的、必然的推论,避免得出过度推测性、评价性和扩大化的结论。摘要请用第三人称客观表述,不列图表,不引用文献,不加评论和解释。英文摘要应与中文摘要内容相对应,但为了对外交流的需要,可以略详细。英文摘要应包括论文文题(正体)及全部作者姓名(汉语拼音,姓在前,首字母大写,名在后,首字母大写,双字连写。如:Yin Xiaohui)、标准化的单位名称、城市名称(汉语拼音)、邮政编码及国家名称(全部为斜体)。并请另起一行提供通信作者姓名的汉语拼音和Email地址,如Corresponding author: Yin Xiaohui, Email: xiaohuih@126.com。专家述评或综述类文稿请撰写指示性中英文摘要,摘要内容应包含研究涉及的概念、研究的目的、综述资料的来源、复习的文献量、研究的新发现或应用领域、综合的结果和结论及其意义等必要的信息。

研究论文为前瞻性研究者应在中英文摘要结束处提供临床试验注册号,以“临床试验注册(Trial registration)”为标题,提供注册机构名称和注册号。前瞻性临床研究的论著摘要应注明遵循CONSORT声明(Consolidated Standards of Reporting Trials)(<http://www.consort-standard.org/home>)。

(本刊编辑部)