DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240269



# 连续低强度脉冲式超声联合微泡空化治疗促进小鼠缺血骨骼肌微循环 灌注效果的初步评价

刘奕佳<sup>1,2</sup>,汤晓轶<sup>1,2</sup>,李尚泽<sup>3</sup>,赵佳琦<sup>1,2\*</sup> 1.海军军医大学(第二军医大学)第二附属医院超声诊断科,上海 200003 2.同济大学附属上海市第四人民医院超声医学科,上海 200434 3.中国人民解放军联勤保障部队第九〇四医院常州医疗区骨科,常州 213000

[摘要] 印的 评价连续低强度脉冲式超声(LIPUS)联合微泡(MB)的空化治疗(以下简称超声空化治疗) 促进小鼠缺血后肢微循环灌注的效果,初步探讨该治疗方式对肢体动脉缺血性损伤的无创治疗潜力。方法 构建 小鼠左后肢缺血模型,按照不同治疗方法将小鼠随机分为4组(每组16只):模型组、MB组、LIPUS组和 超声空化治疗组(LIPUS+MB组)。模型组小鼠经尾静脉注射 0.1 mL生理盐水, MB组小鼠经尾静脉注射 0.1 mL MB, LIPUS 组小鼠在经尾静脉注射 0.1 mL 生理盐水的同时采用 LIPUS 对缺血后肢进行治疗, LIPUS+MB 组 小鼠在经尾静脉注射 0.1 mL MB 的同时采用 LIPUS 对缺血后肢进行治疗;各组均每天注射 1 次,共 7 d。在治疗的第 1、4、7天,通过超声造影评价小鼠缺血后肢的微循环灌注情况,并结合小鼠后肢腓肠肌组织H-E染色和CD31免疫 组织化学染色,评估不同治疗对小鼠缺血后肢微循环灌注的促进效果。结果 小鼠左后肢缺血模型构建成功,所有 的模型小鼠均表现出明显的缺血微循环灌注障碍,模型稳定性良好。治疗第7天结束后,LIPUS+MB组小鼠缺血后 肢微循环灌注水平升高,其缺血侧与非缺血侧微血管流量比值高于 LIPUS 组 [(94.33±4.51)% vs(70.33±2.09)%, P<0.05];H-E染色结果显示,LIPUS+MB组腓肠肌组织新生毛细血管和肌成纤维细胞数量增加,肌肉结构修复优 于 LIPUS 组, 而模型组和 MB 组则表现为肌细胞坏死、肌束排列紊乱及毛细血管稀疏; CD31 免疫组织化学分析进一 步证实,超声空化治疗在促进缺血骨骼肌微循环灌注、微血管新生和组织修复方面显著优于单纯LIPUS治疗(CD31 相对表达水平 5.03±0.33 vs 3.57±0.21, P<0.01)。结论 与单纯 LIPUS 治疗相比,连续超声空化治疗在促进小鼠 缺血后肢的微循环灌注方面表现出更加显著的效果,为外周动脉缺血性疾病所致肢体骨骼肌微循环灌注障碍提供了 新的治疗策略。

[关键词] 微泡空化治疗;低强度脉冲式超声波治疗;超声造影;微循环灌注;外周动脉疾病

[引用本文] 刘奕佳,汤晓轶,李尚泽,等.连续低强度脉冲式超声联合微泡空化治疗促进小鼠缺血骨骼肌微循环 灌注效果的初步评价[J].海军军医大学学报,2025,46(3):336-343.DOI:10.16781/j.CN31-2187/R.20240269.

# Continuous low-intensity pulsed ultrasound combined with microbubble cavitation therapy promoting microcirculatory perfusion in ischemic skeletal muscle of mice: a preliminary result

LIU Yijia<sup>1,2</sup>, TANG Xiaoyi<sup>1,2</sup>, LI Shangze<sup>3</sup>, ZHAO Jiaqi<sup>1,2\*</sup>

1. Department of Ultrasound, The Second Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200003, China

2. Department of Ultrasound, Shanghai Fourth People's Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200434, China

3. Department of Orthopedics, Changzhou Medical Branch, No. 904 Hospital of Joint Logistics Support Force of PLA, Changzhou 213000, Jiangsu, China

<sup>[</sup>收稿日期] 2024-04-25 [接受日期] 2024-12-03

<sup>[</sup>基金项目] 国家自然科学基金(81501492),上海市自然科学基金(20ZR1457900),上海市虹口区卫生健康委员会医学科研课题面上项目(虹卫2302-26),上海市虹口区卫生健康委员会临床重点扶持专科建设项目(HKLCFC202404),海军军医大学(第二军医大学)第二附属医院人才建设三年行动计划 "金字塔人才工程"军事医学人才项目(1009),同济大学附属上海市第四人民医院科研启动专项(SYKYQD06101). Supported by National Natural Science Foundation of China (81501492), Natural Science Foundation of Shanghai (20ZR1457900), General Program of Medical Research Project of Health Commission of Shanghai Hongkou District (HW2302-26), Clinical Key Supporting Project of Health Commission of Shanghai Hongkou District (HW2302-26), Clinical Key Supporting Project of Health Commission of Shanghai Hongkou District (HW2302-26), Clinical Key Supporting Project of Health Construction of The Second Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University) (1009), and Science and Technology Initiation Project of Shanghai Fourth People's Hospital Affiliated to Tongji University (SYKYQD06101).

<sup>[</sup>作者简介] 刘奕佳,硕士生. E-mail: ultrasoundlyj@smmu.edu.cn

<sup>\*</sup>通信作者(Corresponding author). Tel: 021-55603999, E-mail: qiqiblue67@163.com

[Abstract] Objective To evaluate the promoting effect of continuous low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) combined with microbubble (MB) cavitation therapy (hereinafter referred to as ultrasound cavitation therapy) on microcirculatory perfusion in the ischemic hindlimbs of mice, and to explore the non-invasive therapeutic potential of this treatment for limb arterial ischemic injury. Methods A mouse model of left hindlimb ischemia was established, and the mice were randomly assigned to 4 groups (16 mice per group) according to different treatment methods: model group, ultrasound contrast microbubble group (MB group), LIPUS treatment group (LIPUS group), and ultrasound cavitation therapy group (LIPUS+MB group). Mice in the model group were injected with 0.1 mL of normal saline via the tail vein, those in the MB group were injected with 0.1 mL of MB via the tail vein, those in the LIPUS group were treated with LIPUS on the ischemic hindlimb after injection of 0.1 mL of normal saline via the tail vein, and those in the LIPUS+ MB group were treated with LIPUS on the ischemic hindlimb after injection of 0.1 mL of MB via the tail vein; each group was injected once a day for a total of 7 d. On the 1<sup>st</sup>, 4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> days after treatment, the microcirculatory perfusion in the ischemic hindlimbs of mice was evaluated using contrast-enhanced ultrasound. The effects of different treatments on promoting microcirculatory perfusion in the ischemic hindlimbs of mice were assessed by combining hematoxylineosin (H-E) staining and CD31 immunohistochemical staining of the gastrocnemius muscle tissue in the hindlimbs. Results The left hindlimb ischemia model was successfully constructed, and all model mice showed obvious ischemic microcirculation perfusion disorders with good model stability. After the 7<sup>th</sup> day of treatment, the LIPUS+MB group showed a increase in microcirculation perfusion in the ischemic hindlimb, with the ratio of microvascular flow on the ischemic to non-ischemic sides higher than that of the LIPUS group ( $[94.33\pm4.51]$  % vs  $[70.33\pm2.09]$  %,  $P \le 0.05$ ). H-E staining results showed that the LIPUS+MB group had more newly formed capillaries and myofibroblasts in the gastrocnemius muscle, with better muscle structure repair compared to the LIPUS group, while the model group and MB group showed muscle cell necrosis, disorganized arrangement of muscle bundles, and sparse capillaries. CD31 immunohistochemical analysis further confirmed that ultrasonic cavitation therapy significantly outperformed traditional LIPUS treatment in promoting microcirculation perfusion, microvascular neogenesis, and tissue repair in ischemic skeletal muscles (CD31 relative expression level  $5.03 \pm 0.33$  vs  $3.57 \pm 0.21$ , P < 0.01). Conclusion Compared with single LIPUS treatment, continuous ultrasound cavitation therapy has a more significant effect on promoting microcirculation perfusion in the ischemic hindlimb of mice, which provides a new strategy for microcirculatory perfusion disorders in skeletal muscles of limbs caused by peripheral arterial ischemic diseases.

[Key words] microbubble cavitation therapy; low-intensity pulsed ultrasound shockwave therapy; contrast-enhanced ultrasound; microcirculatory perfusion; peripheral arterial disease

[ **Citation** ] LIU Y, TANG X, LI S, et al. Continuous low-intensity pulsed ultrasound combined with microbubble cavitation therapy promoting microcirculatory perfusion in ischemic skeletal muscle of mice: a preliminary result[J]. Acad J Naval Med Univ, 2025, 46(3): 336-343. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240269.

外周动脉疾病 (peripheral arterial disease, PAD) 主要是指除冠状动脉和颅内动脉以外的动脉系统发 生狭窄、闭塞或功能障碍,导致远端肢体微循环灌 注异常,进而引发一系列临床症状的疾病<sup>[1]</sup>。PAD 临床上多表现为间歇性跛行、静息痛和肢体溃疡 等,严重时可能致残,影响患者的生活质量<sup>[1]</sup>。尽 管药物疗法和外科手术能在一定程度上缓解症状, 但治疗过程中的潜在风险及手术并发症等问题仍不 容忽视<sup>[2]</sup>。因此,探索一种更高效、安全、无创的 治疗方法,解决由肢体缺血引发的微循环灌注障碍 问题,对于促进病患的康复具有至关重要的意义。

低强度脉冲式超声(low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS)是一种新兴的非侵入性治疗技术,其通过

将脉冲式的超声能量作用于目标区域,有效促进了局部组织的修复与再生,同时还避免了对周围正常组织的损伤,展现出独特的治疗优势<sup>[3-5]</sup>。然而,在处理区域广泛、病程较长的微循环障碍类疾病时,LIPUS的治疗往往难以达到预期效果<sup>[6]</sup>。研究表明,在LIPUS作用下,微泡(microbubble,MB)会发生空化现象<sup>[7]</sup>。基于这一机制,LIPUS通过激发 MB 在血液循环中的惯性空化,激活嘌呤能信号通路,促进一氧化氮和前列腺素的合成,增强内皮依赖性血管扩张,从而有效改善缺血组织的血流灌注<sup>[8-9]</sup>。与单纯使用 LIPUS 治疗相比,LIPUS 联合 MB 的空化治疗(以下简称超声空化治疗)在促进缺血组织微循环灌注方面具有显著优

势<sup>[10-11]</sup>。此外,与外科手术等治疗手段相比,超声 空化治疗不仅能有效促进微循环灌注,还能更好地 确保能量控制的安全性<sup>[12]</sup>。因此,超声空化治疗 为PAD类疾病提供了新的非侵入性治疗选择,为 临床治疗开辟了新思路。

在超声空化治疗领域,苏州飞依诺科技股份有限 公司独创了专为空化治疗而设计的 V-flash 超声治疗 模式<sup>[13]</sup>,该模式可通过调节与空化治疗相关的探头 中心频率(frequency, F)、脉冲长度(pulse length, PL)、脉冲重复频率(pulse repetition frequency, PRF)等参数,精确调整占空比,从而调控空化治 疗过程中的能量密度,优化治疗效果<sup>[7]</sup>。基于此, 本研究针对临床常见 PAD 所致微循环灌注障碍的 病理生理特点,拟建立小鼠左后肢缺血模型,利用 苏州飞依诺科技股份有限公司生产的数字化彩色超 声诊断仪的 V-flash 空化治疗模式,对连续超声空 化治疗促进小鼠缺血后肢的微循环灌注障碍效果进 行初步评价,以期为 PAD 所致肢体缺血骨骼肌微 循环灌注障碍提供新的治疗策略,并为实现该类疾 病的无创诊疗一体化提供新的解决方案。

#### 1 材料和方法

1.1 动物模型建立与分组 SPF级雄性ICR小鼠64只,6~8周龄,体重35~45g,购自上海雷根生物科技有限公司,实验动物生产许可证号: SCXK(浙)2024-0004,使用许可证号:SYXK (沪)2022-0011。实验过程中对动物的处置符 合国家科学技术委员会发布的《实验动物管理条 例》,所有动物实验均经海军军医大学(第二军 医大学)第二附属医院动物伦理委员会审查批准 (20ZR1457900)。

ICR小鼠经适应性饲养1周后,建立左后肢缺 血模型(0d)。小鼠用0.375%戊巴比妥钠溶液腹 腔注射(40 mg/kg)麻醉,对小鼠左侧腹股沟及双 后肢进行脱毛处理并消毒。在左腹股沟做一斜行切 口,分离股动脉、股静脉,在股动脉皮支和肌动脉 肌支的分支发出点远端1~2 mm处以5-0缝线结 扎股动脉,然后缝合切口。随后使用小鼠尾静脉注 射显像仪(WL-DXQ型,天津北瑞未来科技有限公 司)经尾静脉注射超声造影剂0.1 mL(Sonazoid<sup>®</sup>, 美国GE公司;约2×10<sup>8</sup>个MB悬浮于0.1 mL生 理盐水中),采集超声造影(contrast-enhanced ultrasound, CEUS)图像数据,评估造模小鼠双侧 后肢血供状态。

按照不同的治疗方式将小鼠随机分为4组,每 组 16 只: 模型组、MB 组、LIPUS 治疗组(LIPUS 组)、超声空化治疗组(LIPUS+MB组)。模型 组小鼠经尾静脉注射 0.1 mL 生理盐水, MB 组小鼠 经尾静脉注射 0.1 mL MB, LIPUS 组小鼠在经尾静 脉注射 0.1 mL 生理盐水的同时采用 LIPUS 对缺血 左后肢进行治疗, LIPUS+MB 组小鼠在经尾静脉 注射 0.1 mL MB 的同时采用 LIPUS 对缺血左后肢 进行治疗;各组均每天注射1次,共7d。以上各 组分别于治疗的第1、4、7天,随机选取4只小鼠 在治疗后2h对双侧后肢腓肠肌对称部位进行二维 超声及 CEUS 扫查,并定量评估,随后颈椎脱臼处 死小鼠,取双侧后肢腓肠肌进行组织病理学观察。 1.2 超声空化治疗与CEUS数据采集 使用苏州 飞依诺科技股份有限公司生产的G86 型数字化彩 色超声诊断仪。将超声诊断仪调整至 V-flash 空化 治疗模式, S1-8C 探头通过固定装置纵向固定于 小鼠左后肢上方, 在注射 MB 的同时, 开始空化治 疗。治疗参数: F=1.7 MHz, PRF=3 000 Hz, 机 械指数 (machine index, MI) =0.6, PL为 17.5个 周期,每个周期后间歇3s,以开/关模式进行治 疗,持续20min(对应占空比为3%)。之后使用 X4-12L 探头进行二维超声和 CEUS 扫描并采集数 据, CEUS 成像参数: F=4.0 MHz, MI=0.12。将 探头横向固定于小鼠双后肢上方,以胫骨为骨性标 志选取对称部位横断面, 经尾静脉注射 MB 的同时 进行 30 s 数据采集。为避免 CEUS 成像评估时出现 数据差异,在同一只小鼠进行空化治疗和数据采集 之间设置2h间隔,确保CEUS成像时微循环中的 MB代谢完全。

1.3 CEUS 定量评估 以1Hz 速率采集所有 CEUS 视频的时间-强度曲线数据,使用 OriginPro 2022 软件将其拟合至函数 $y=A(1-e^{-\beta t})$ ,式中y是时间 t处的强度,A 表示相对微血管血容量的平台强度,速率常数 $\beta$ 是微血管通量(microvascular blood flow, MBF)率<sup>[15]</sup>。MBF 通过 $A = \beta$ 的乘积来量化<sup>[14]</sup>。为了避免小鼠间的个体差异,实验中利用分析程序对同一只小鼠双侧后肢对称部位腓肠肌的 CEUS 视频进行感兴趣区(region of interest, ROI)对照分析,通过计算缺血侧(左)与非缺血

侧(右)的 MBF 比值(MBF<sub>LR</sub>)对不同治疗方式的疗效进行初步评估。

1.4 小鼠后肢腓肠肌 H-E 染色 各组小鼠治疗结 束后通过颈椎脱臼处死,取腓肠肌组织,用4%多 聚甲醛溶液冲洗并固定。固定后的样本经二甲苯透 明化(20 min 共 2 次)、梯度乙醇脱水(100%、 95%、80%、75%,各5 min)后,进行石蜡包埋。 最后,将样本切成连续5 μm 厚切片,贴于载玻片 上以备后续染色。将石蜡切片脱蜡水洗后使用 H-E 染色试剂盒(北京索莱宝医疗科技有限公司)染色 后,脱水、封片并镜下观察。

1.5 小鼠后肢腓肠肌 CD31 免疫组织化学染色 将 小鼠腓肠肌石蜡切片脱蜡水洗后,用 5% 牛血清白 蛋白溶液(北京碧云天生物技术股份有限公司)封 闭非特异性结合位点。加入兔抗 CD31 抗体(英国 Abcam 公司,稀释比例1:2000)4℃孵育过夜。

次日,加入山羊抗兔二抗(英国 Abcam 公司,稀释 比例1:1000)室温孵育 50 min。使用 DAB 显 色试剂盒(北京碧云天生物技术股份有限公司)显 色后,苏木精复染细胞核,随后进行脱水、透明化 和封片处理,最后使用 ECLIPSE Ci-L 光学显微镜 (日本 Nikon 公司)进行观察、拍照。采用 ImageJ 1.53t 软件对免疫组织化学染色切片进行 CD31 相 对表达水平分析,评估微血管密度。

1.6 统计学处理 应用 GraphPad Prism 9.0.0 软件 进行统计学分析。呈正态分布的计量资料以 x±s

表示。对于满足方差齐性的数据,采用单因素方差 分析,通过 Bonferroni 校正评估组间差异。检验水 准(α)为 0.05。

## 2 结 果

2.1 基于 CEUS 数据评估小鼠左后肢缺血模型的 稳定性 通过对各组小鼠双侧后肢腓肠肌的 CEUS 数据进行定量分析,评估小鼠左后肢缺血模型的稳 定性。结果显示,左后肢缺血小鼠造模完成后,模 型组小鼠的 MBF<sub>LR</sub>为(28.33±7.02)%, MB组 为(28.00±6.56)%,LIPUS 组为(26.00±7.21)%, LIPUS+MB 组为(30.00±5.29)%,各组间两两 比较差异均无统计学意义(均*P*>0.05),表明 手术造模后各组的 MBF<sub>LR</sub> 值在治疗前保持了一 致性,说明建立的小鼠左后肢缺血模型的稳定性 良好。

2.2 CEUS 动态评估小鼠缺血左后肢治疗后的微循环变化 第1天治疗结束后,对各组小鼠进行 CEUS 扫查评估微循环灌注情况。如图1所示, 模型组和MB组小鼠缺血左后肢在约6s时观察到 MB开始进入,且两组小鼠缺血左后肢的ROI时间-强度曲线的峰值强度相似。相比之下,LIPUS组小 鼠缺血左后肢在约4s时即能观察到少量MB进入; 而LIPUS+MB组小鼠则在约4s时即出现了明显 的MB进入现象,且ROI时间-强度曲线的峰值强 度高于其他组。

 CEUS

 2D US
 1 s
 4 s
 6 s
 10 s

 Model
 Image: Colspan="4">Image: Colspan="4" Image: Colspa="4" Image: Colspa=""4" Image: Colspan="4" Image: Colspan="4" Ima





On the 1<sup>st</sup> day after treatment, the CEUS imaging of the left hindlimb of ischemic mice showed that the contrast MBs in the model group and MB group entered at about 6 s, and the LIPUS group and LIPUS+MB group entered at about 4 s. Compared with the other groups of mice, the LIPUS+MB group had the highest peak intensity of contrast. The CEUS imaging of the right hindlimb of ischemic mice showed that the contrast MBs in each group entered at about 4 s. CEUS: Contrast-enhanced ultrasound; MB: Microbubble; LIPUS: Low-intensity pulsed ultrasound; 2D US: 2-dimensional ultrasound; L: Left; R: Right.

2.3 MBF<sub>LR</sub>定量分析治疗后小鼠缺血左后肢微循环灌注的变化 如表1所示,在治疗第1天, LIPUS组和LIPUS+MB组小鼠缺血左后肢的 MBF<sub>LR</sub>高于模型组(均P<0.05),而MB组与模 型组相比差异无统计学意义(P>0.05)。随着治 疗次数的增加,在治疗第4天、第7天,LIPUS组 和 LIPUS+MB 组小鼠的 MBF<sub>LR</sub> 均高于模型组(均 P < 0.01),且 LIPUS+MB 组的 MBF<sub>LR</sub> 增幅高于 LIPUS 组(均P < 0.05),说明 LIPUS+MB 组、 LIPUS 组的治疗方式均可有效促进小鼠缺血左后肢 的微循环灌注,且超声空化治疗促进缺血骨骼肌微 循环灌注的疗效优于单独使用 LIPUS。

表 1	治疗期间各组小鼠缺血左后肢 MBF <sub>L/R</sub> 对比	

Tab 1	MBF <sub>L/R</sub> value	of ischemic lef	t hindlimb	of mice in	each group	during treatment
-------	--------------------------	-----------------	------------	------------	------------	------------------

			%, $n=4, \overline{x}\pm s$
Group	Treatment for 1 d	Treatment for 4 d	Treatment for 7 d
Model	$29.00 \pm 11.79$	$37.00 \pm 4.00$	32.67±12.42
MB	$26.67 \pm 15.31$	$37.00 \pm 6.25$	$38.33 \pm 8.02$
LIPUS	$49.67 \pm 4.50^{*}$	$57.33 \pm 7.02^{**}$	$70.33 \pm 2.09^{**}$
LIPUS+MB	$63.00 \pm 6.56^{*}$	$75.67 \pm 3.06^{** \triangle}$	$94.33 \pm 4.51^{** \triangle}$

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs model group;  $^{\triangle}P < 0.05$  vs LIPUS group. MBF<sub>L/R</sub>: Ratio of microvascular blood flow on the ischemic side (left) to that on the non-ischemic side (right); MB: Microbubble; LIPUS: Low-intensity pulsed ultrasound.

如图 2 所示, 在整个治疗过程中, MB 组和模型组小鼠的缺血左后肢 MBF<sub>LR</sub>差异均无统计学意义(均 *P*>0.05)。与造模后(0 d)相比, 治疗第1天时, LIPUS 组和 LIPUS+MB 组小鼠的缺血左后肢 MBF<sub>LR</sub> 均增加(均*P*<0.01)。LIPUS 组的MBF<sub>LR</sub>在治疗第1天、第4天和第7天均有不

同程度的增加,但不同时间点间的差异无统计学 意义(均P>0.05)。LIPUS+MB组小鼠的缺血 左后肢MBF<sub>LR</sub>持续增高,治疗第7天的MBF<sub>LR</sub>与 第4天相比差异有统计学意义(P<0.05)。结果 表明,超声空化治疗促进小鼠缺血骨骼肌微循环灌 注的疗效随治疗次数的增加逐步加强。







A: Model group; B: MB group; C: LIPUS group; D: LIPUS+MB group.  ${}^{*}P < 0.05$ ,  ${}^{**}P < 0.01$ . n=16,  $\bar{x} \pm s$ . MBF<sub>L/R</sub>: Ratio of microvascular blood flow on the ischemic side (left) to that on the non-ischemic side (right); MB: Microbubble; LIPUS: Low-intensity pulsed ultrasound.

2.4 病理学评估小鼠缺血左后肢腓肠肌的微观结 构变化

2.4.1 H-E染色结果 如图 3 所示,在治疗的第 7 天, 与小鼠健侧右后肢腓肠肌相比,模型组和 MB 组小 鼠的缺血左后肢腓肠肌表现出明显的肌细胞数量减 少、肌细胞裂解坏死,肌束排列紊乱、间距变宽, 毛细血管稀疏。而在LIPUS+MB组的切片中,可观 察到大量新生毛细血管和肌成纤维细胞,表明该组 具有较为明显的组织修复反应。LIPUS组亦可见新 生毛细血管及肌成纤维细胞,但其数量和分布相较 于LIPUS+MB组较少。结果表明超声空化治疗在促 进血管生成和组织修复方面具有更为显著的效果。



图 3 治疗后各组小鼠双侧后肢腓肠肌 H-E 染色结果

#### Fig 3 H-E staining results of bilateral hindlimb gastrocnemius muscles of mice in each group after treatment

A: Ischemic left posterior gastrocnemius muscle in the model group; B: Ischemic left posterior gastrocnemius muscle in the MB group; C: Ischemic left posterior gastrocnemius muscle in the LIPUS group; D: Ischemic left posterior gastrocnemius muscle in the LIPUS+MB group; E: Healthy right posterior gastrocnemius muscle of mice. H-E: Hematoxylin-eosin; MB: Microbubble; LIPUS: Low-intensity pulsed ultrasound.

2.4.2 CD31免疫组织化学染色结果 如图4所示, 在治疗的第7天,LIPUS+MB组小鼠的缺血左后 肢腓肠肌组织中CD31阳性表达(棕黄色染色颗粒) 显著增加,高于模型组(5.03±0.33 vs 1.61±0.05, P<0.01)和MB组(5.03±0.33 vs 1.63±0.06, P<</li>
0.01)。LIPUS组虽然也有一定的CD31阳性表 达,但分布区域及相对密度不及LIPUS+MB组(3.57±0.21 vs 5.03±0.33, P<0.01)。结果表明,超声空化治疗显著促进了小鼠左后肢缺血区域血管新生,表现出更高的CD31表达,而LIPUS单独治疗虽然也有一定的促进作用,但效果不及LIPUS+MB组。



# 图 4 治疗后各组小鼠双侧后肢腓肠肌 CD31 免疫组织化学染色结果 Fig 4 Immunohistochemical staining results of CD31 in bilateral hindlimb gastrocnemius muscles of mice in each group after treatment

A: Ischemic left posterior gastrocnemius muscle in the model group; B: Ischemic left posterior gastrocnemius muscle in the MB group; C: Ischemic left posterior gastrocnemius muscle in the LIPUS group; D: Ischemic left posterior gastrocnemius muscle in the LIPUS +MB group; E: Healthy right posterior gastrocnemius muscle of mice. MB: Microbubble; LIPUS: Low-intensity pulsed ultrasound.

## 3 讨 论

PAD 是导致肢体缺血的常见原因,通常伴随

着血流不畅、组织缺氧及代谢异常等微循环灌注 障碍导致的病理变化<sup>[15]</sup>。这些病理改变不仅会引 发一系列严重的临床症状,还会对患者的预后和生 活质量造成严重影响。促进血管新生并改善缺血 骨骼肌微循环灌注已成为 PAD 治疗的重要研究方 向<sup>[16-17]</sup>。促进缺血区域的微循环灌注,不仅可以有 效缓解 PAD 患者的症状,提高生活质量,还能降低 心血管事件的发生风险<sup>[1]</sup>。

自 2006 年 lida 等<sup>[6]</sup>首次报道了经皮低频超声 波在人体肱动脉中会产生显著扩张效应以来,低频 超声波在灌注障碍类疾病治疗领域的研究中逐渐崭 露头角。这一发现不仅为缺血性疾病的治疗提供了 新思路, 也激发了研究者们对超声波治疗机制的深 入探索<sup>[5]</sup>。随着医学技术的不断进步, MB 增强超 声空化效应的作用逐渐得到科学验证。这种效应 通过 MB 与超声波的相互作用,能够显著提高超声 治疗的效果<sup>[18]</sup>。目前,将LIPUS与MB结合的研 究已成为热点,这种超声空化治疗技术展现出显著 促血管扩张及增加血流量的潜力<sup>[19]</sup>。Belcik 等<sup>[14]</sup> 利用超声空化治疗成功实现了缺血模型治疗后 血流量的双倍增长,证实 LIPUS 联合 MB 治疗对 促进缺血组织微循环灌注疗效显著,为后续的临 床研究奠定了有力的基础。已有研究者通过相 关实验证实,占空比和MI可作为影响超声空化 治疗效果的关键参数,采用20%~30%的占空比 和 0.6~1.3 的 MI 能够确保治疗的安全性和有效 性<sup>[20-21]</sup>。尽管超声空化治疗在促进骨骼肌微循环 灌注方面的效果已得到验证, 但关于其在更长时间 内是否能够维持这一积极效果并用于相关疾病模型 治疗的研究数据尚显不足。基于前期文献<sup>[9,13,22]</sup>和 动物预实验结果,本研究选用 MI=0.6 作为有效实 验参数,借助苏州飞依诺科技股份有限公司生产的 G86 型超声诊断仪的 V-flash 空化治疗模式, 探索连 续超声空化治疗在促进缺血骨骼肌微循环灌注方面 的治疗效果。

为了确保研究对照一致性,本研究利用小鼠双 侧后肢骨骼肌对称部位进行自身对照,利用 CEUS 定量评估 MBF<sub>LR</sub>变化以评价不同治疗对小鼠缺血 左后肢微循环灌注的促进效果。在左后肢缺血小 鼠造模完成后,各组之间的 MBF<sub>LR</sub>差异均无统计 学意义,这证明本研究动物模型的构建具有较高的 一致性和可重复性。各组小鼠左后肢缺血损伤造 模后,对比 CEUS 图像,MB 的进入速度及 ROI 时 间-强度曲线的峰值强度显著降低,MBF<sub>LR</sub>均低于 50%,表明该小鼠模型成功模拟出 PAD 导致的肢体 微循环障碍状态,在此动物模型基础上,则能够在 更接近真实病理生理变化情况下,对不同治疗方法 改善肢体微循环灌注障碍的效果进行客观、准确的 评估。

本研究的模型组用于评估 PAD 所致微循环灌 注障碍的基础状态,另设置3个治疗组进行对比, 观察连续 LIPUS 治疗(LIPUS 组)和连续超声空 化治疗(LIPUS+MB组)在促进小鼠缺血后肢微 循环灌注方面的疗效。实验结果证实, 超声空化治 疗与单纯 LIPUS 治疗均可有效促进小鼠缺血左后 肢的微循环灌注, 但超声空化治疗促进缺血骨骼肌 微循环灌注的疗效优于单纯 LIPUS 治疗,并且超声 空化治疗促进缺血骨骼肌微循环灌注的疗效随着治 疗次数的增加逐步加强,这些结果与治疗性声学仪 器研究结果<sup>[19]</sup>相契合。为了验证实验结果的可靠 性,本研究还采用了H-E染色和CD31免疫组织化 学染色等方法,从病理组织微观结构变化层面进行 了疗效分析,结果显示在超声空化治疗促进微循环 灌注的治疗过程中, 小鼠左后肢缺血区域出现了积 极的修复效果,损伤部位在治疗后缺血状态得到缓 解。实验结果表明, 连续超声空化治疗不仅能够有 效促进小鼠左后肢缺血区域的微循环灌注,还能加 快缺血区域的组织修复进程。这一发现具有重要的 临床意义,有望为PAD患者带来更为安全、有效 的治疗方法。

值得关注的是,目前其他研究多通过特制的超 声治疗仪进行超声空化治疗,并辅以其他声学设备 分别进行诊断和评估<sup>[11,14]</sup>,或仅通过调节不同的 MI 在超声诊断仪上进行研究。而本研究则利用超 声诊疗一体机的 V-flash 空化治疗模式,通过相关 参数(F、PRF、PL、MI、占空比)调节,实现在 同一台超声设备上完成诊断、评估和无创治疗全过 程。这一研究改进不仅极大地提升了实验便利性和 研究效率,减少了操作复杂性和实验误差概率,同 时也能够更加精确评估微循环灌注,实时观察骨骼 肌微循环灌注情况,并有效地同步实施非侵入性超 声空化治疗,从而为 PAD 的诊疗一体化提供新的 解决方案。

本研究仍存在一定的局限性: (1)超声空化 治疗涉及参数复杂<sup>[7]</sup>,由于本研究选用的超声空 化治疗参数较为单一,最佳空化治疗参数有待进一 步研究; (2)本研究仅着重观察了超声空化治疗 对微循环灌注障碍的改善效果,相关分子机制并未 深入探究。未来将进一步探讨超声空化治疗改善微 循环灌注障碍的关键机制及信号通路。

综上所述,本研究通过小鼠左后肢缺血模型成 功模拟了动脉缺血性疾病的微循环灌注障碍状态, 并证实连续超声空化治疗在促进小鼠缺血后肢骨 骼肌微循环灌注方面具有比单一LIPUS治疗更显 著的稳定疗效。这一研究发现可为未来临床治疗 PAD等微循环灌注障碍类疾病提供新视角与新策 略,在促进缺血肢体微循环灌注和组织修复方面具 有广阔的临床应用前景,有望为PAD等动脉缺血 性疾病提供新的诊疗一体化手段。

## [参考文献]

- SHAH A J, PAVLATOS N, KALRA D K. Preventive therapies in peripheral arterial disease[J]. Biomedicines, 2023, 11(12): 3157. DOI: 10.3390/biomedicines11123157.
- SCHAWE L, RAUDE B, CARSTENS J C, et al. Effect of revascularization on intramuscular vascular endothelial growth factor levels in peripheral arterial disease[J]. Biomedicines, 2022, 10(2): 471. DOI: 10.3390/ biomedicines10020471.
- [3] JIA L, LI D, WEI X, et al. Efficacy and safety of focused low-intensity pulsed ultrasound versus pulsed shortwave diathermy on knee osteoarthritis: a randomized comparative trial[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 12792. DOI: 10.1038/s41598-022-17291-z.
- QIN H, LUO Z, SUN Y, et al. Low-intensity pulsed ultrasound promotes skeletal muscle regeneration via modulating the inflammatory immune microenvironment[J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(4): 1123-1145. DOI: 10.7150/ ijbs.79685.
- [5] 魏霞,李东倩,骆诗琪,等.低强度脉冲聚焦超声对小鼠膝关节软骨细胞损伤中炎症因子和焦亡蛋白的影响[J].海军军医大学学报,2024,45(3):268-276. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230516.
  WEI X, LI D Q, LUO S Q, et al. Effects of focused low-intensity pulsed ultrasound on inflammatory cytokines and pyroptosis-related proteins in mouse knee joint chondrocyte injury[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(3): 268-276. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230516.
- [6] IIDA K, LUO H, HAGISAWA K, et al. Noninvasive low-frequency ultrasound energy causes vasodilation in humans[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48(3): 532-537.
   DOI: 10.1016/j.jacc.2006.03.046.
- O'BRIEN W D Jr. Ultrasound-biophysics mechanisms[J].
   Prog Biophys Mol Biol, 2007, 93(1/2/3): 212-255. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.010.
- [8] HE J, LIU Z, ZHU X, et al. Ultrasonic microbubble cavitation enhanced tissue permeability and drug diffusion in solid tumor therapy[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(8): 1642. DOI: 10.3390/pharmaceutics14081642.
- [9] MASON O R, DAVIDSON B P, SHEERAN P, et al. Augmentation of tissue perfusion in patients with peripheral artery disease using microbubble cavitation[J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2020, 13(3): 641-651. DOI: 10.1016/j.jcmg.2019.06.012.
- SONG X, ZHANG Q, CHANG M, et al. Nanomedicineenabled sonomechanical, sonopiezoelectric, sonodynamic, and sonothermal therapy[J]. Adv Mater, 2023, 35(31): e2212259. DOI: 10.1002/adma.202212259.
- [11] LIU J, YOU Q, LIANG F, et al. Ultrasound-nanovesicles

interplay for theranostics[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2024, 205: 115176. DOI: 10.1016/j.addr.2023.115176.

- [12] MULLER M A, BELCIK T, HODOVAN J, et al. Augmentation of tissue perfusion with contrast ultrasound: influence of three-dimensional beam geometry and conducted vasodilation[J]. J Am Soc Echocardiogr, 2021, 34(8): 887-895. DOI: 10.1016/ j.echo.2021.02.018.
- [13] 张毅,冯爽,唐娜娇,等.超声诊疗一体机VINNO 70 空化调控功能及声学测量的研究[J].临床超声医学 杂志,2021,23(3):161-165. DOI: 10.3969/j.issn.1008-6978.2021.03.002.
- [14] BELCIK J T, DAVIDSON B P, XIE A, et al. Augmentation of muscle blood flow by ultrasound cavitation is mediated by ATP and purinergic signaling[J]. Circulation, 2017, 135(13): 1240-1252. DOI: 10.1161/ CIRCULATIONAHA.116.024826.
- ZAIED A A, BREWER L, REZAEE S, et al. Abstract 14054: monocyte vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling in peripheral artery disease[J]. Circulation, 2022, 146(Suppl\_1). DOI: 10.1161/circ.146. suppl\_1.14054
- [16] 徐振宏,颜小斌,李丽雅.超声造影评估2型糖尿病骨 骼肌微循环功能的研究[J].中国糖尿病杂志,2021, 29(3):200-204. DOI: 10.3969/j.issn.1006.
- [17] COOKE J P, MENG S. Vascular regeneration in peripheral artery disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020, 40(7): 1627-1634. DOI: 10.1161/ atvbaha.120.312862.
- [18] 汤晓轶,赵梦鑫,李威,等.基于纳米技术的新型超声 造影剂在肌肉骨骼关节疾病诊疗中的应用[J].海军 军医大学学报,2023,44(2):143-149. DOI: 10.16781/ j.CN31-2187/R.20220530.
  TANG X Y, ZHAO M X, LI W, et al. Application of novel ultrasound contrast agents based on nanotechnology in diagnosis and treatment of musculoskeletal joint diseases[J]. Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(2): 143-149. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220530.
- [19] MOCCETTI F, BELCIK T, LATIFI Y, et al. Flow augmentation in the myocardium by ultrasound cavitation of microbubbles: role of shear-mediated purinergic signaling[J]. J Am Soc Echocardiogr, 2020, 33(8): 1023-1031.e2. DOI: 10.1016/j.echo.2020.03.016.
- [20] ROUSOU C, SCHUURMANS C C L, URTTI A, et al. Ultrasound and microbubbles for the treatment of ocular diseases: from preclinical research towards clinical application[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(11): 1782. DOI: 10.3390/pharmaceutics13111782.
- [21] KELLER S B, SHEERAN P S, AVERKIOU M A. Cavitation therapy monitoring of commercial microbubbles with a clinical scanner[J]. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 2021, 68(4): 1144-1154. DOI: 10.1109/TUFFC.2020.3034532.
- [22] POULIOPOULOS A N. Evaluating drug delivery enhancement following ultrasound treatment[J]. Lancet Oncol, 2023, 24(5): 420-422. DOI: 10.1016/s1470-2045(23)00149-3.