

经颅聚焦超声开放小鼠血脑屏障的脉宽筛选及可逆性研究*

罗凯旋¹ 王钰宏¹ 宋宇婷¹ 井治聪¹ 陈茉弦¹ 敖丽娟^{1,2}

摘要

目的:利用聚焦超声(focused ultrasound, FUS)治疗系统,固定基础频率等其他参数,探索脉宽对FUS经颅开放血脑屏障(BBB)有效性及安全性的影响,筛选出合适的脉宽值,并验证FUS开放BBB的可逆性。

方法:将73只SPF级昆明小鼠,随机分为脉宽筛选组(共45只)和可逆性研究组(28只)。脉宽筛选组又分为0ms组、1ms组、10ms组、100ms组和200ms组共5个亚组,用不同脉宽的FUS经颅辐照靶脑区后经尾静脉注射伊文思蓝(Evans blue, EB)溶液,4h后取材,对BBB开放与否进行定性评价并测量脑组织EB含量,辐照区域脑组织行HE染色;可逆性研究组分为4个亚组(每组7只):-1—0h组、0—1h组、1—8h组和8—9h组,分别于相应时间点进行FUS经颅辐照、EB注射,取材,对脑部EB含量进行测量。

结果:0ms组小鼠BBB未开放,小鼠脑部EB含量为 $(4.67 \pm 2.14) \mu\text{g/g}$,其余各组小鼠BBB均有不同程度开放。1ms、10ms、100ms、200ms组小鼠脑部EB含量分别为 $(9.63 \pm 3.31) \mu\text{g/g}$ 、 $(19.16 \pm 2.47) \mu\text{g/g}$ 、 $(20.75 \pm 7.77) \mu\text{g/g}$ 、 $(29.48 \pm 10.42) \mu\text{g/g}$,其中1ms、10ms、100ms、200ms组小鼠脑部EB含量与对照组(0ms组)相比有显著性意义,且10、100、200ms组BBB开放效率明显高于1ms组。0ms组、1ms组、10ms组小鼠FUS辐照中心区域脑组织未见红细胞渗出,100ms组、200ms组FUS辐照中心区域有少量红细胞渗出;-1—0h组、8—9h组小鼠BBB未开放,0—1h组、1—8h组小鼠BBB有不同程度开放。-1—0h组、0—1h组、1—8h组、8—9h组小鼠脑部EB含量分别为 $(1.50 \pm 0.19) \mu\text{g/g}$ 、 $(8.60 \pm 1.89) \mu\text{g/g}$ 、 $(2.63 \pm 0.76) \mu\text{g/g}$ 、 $(1.57 \pm 0.46) \mu\text{g/g}$ 。与对照组相比,0—1h组、1—8h组小鼠脑部EB含量明显增高。8—9h组与对照组相比无显著性意义,同时,0—1h组与其他各组相比均有显著性意义。

结论:利用现有聚焦超声治疗系统,当FUS基础频率为1MHz,总辐照时间120s,输出电压200mV,脉冲重复频率为1Hz,SonoVue®六氟化硫微泡剂量 $2.5 \mu\text{l/g}$ 情况下,脉宽10ms可经颅、高效、安全开放BBB,是较为合适的脉宽值。该参数条件下FUS开放BBB是动态可逆的。

关键词 血脑屏障;聚焦超声;微泡;可逆性;神经调控

中图分类号:R743,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2023)-02-0151-08

Screening out appropriate burst duration of transcranial focused ultrasound that mediated blood-brain barrier opening and exploring its reversibility/LUO Kaixuan, WANG Yuhong, SONG Yuting, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2023, 38(2): 151—158

Abstract

Objective: To explore the influence of burst duration on effectiveness and safety of opening the blood-brain barrier (BBB) by focused ultrasound (FUS), to screen out the appropriate value of burst duration of focused ultrasound therapy system with other parameters fixed, and to explore the reversibility of FUS-mediated BBB opening.

Method: Seventy-three SPF male KM mice were randomly divided into burst duration groups($n=45$) and revers-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2023.02.003

*基金项目:国家自然科学基金(81660381,81960421);云南省教育厅科学研究基金(2020Y0139)

1 昆明医科大学康复学院,云南省昆明市,650500; 2 通讯作者

第一作者简介:罗凯旋,男,硕士研究生,助教; 收稿日期:2021-07-17

ibility exploring groups($n=28$). Burst duration groups included 0ms group, 1ms group, 10ms group, 100ms group, 200ms group and were transcranially given FUS irradiation with corresponding burst duration. Evans blue(EB) was injected through the tail vein after FUS. The brain samples were collected 4h later. BBB opening state was observed and the content of EB in brain was measured, target brain region was hematoxylin-eosin(HE) stained. The reversibility exploring groups were divided into 4 subgroups(7 rats in each group): - 1—0h group, 0—1h group, 1—8h group and 8—9h group. mice were subjected to transcranial FUS irradiation, EB injection and sampling were done at corresponding time points respectively. The EB content in the brain was measured.

Result: BBB of 0mV group stayed unopen, and the content of EB in the brain was $(4.67\pm2.14)\mu\text{g/g}$. BBB in the other groups were open to different degrees. EB contents in the brains of 1ms, 10ms, 100ms and 200ms groups were $(9.63\pm3.31)\mu\text{g/g}$, $(19.16\pm2.47)\mu\text{g/g}$, $(20.75\pm7.77)\mu\text{g/g}$ and $(29.48\pm10.42)\mu\text{g/g}$, respectively. The EB contents of 1ms, 10ms, 100ms and 200ms group were statistically significant compared with that of the control group. The BBB opening efficiencies of the 10, 100, 200ms groups were remarkably higher than that of the 1ms group. No erythrocyte exudation in the brain tissue was observed within FUS sonicated area in the 0ms, 1ms and 10ms groups. As for the 100ms and 200ms groups, a small amount of red blood cells exudated in the sonicated brain tissue. The BBB of -1—0h and 8—9h groups stayed unopen. The BBB of 0—1h and 1—8h groups were open to different degrees. The EB contents in the brains of -1—0h, 0—1h, 1—8h and 8—9h groups were $(1.50\pm0.19)\mu\text{g/g}$, $(8.60\pm1.89)\mu\text{g/g}$, $(2.63\pm0.76)\mu\text{g/g}$ and $(1.57\pm0.46)\mu\text{g/g}$, respectively. Compared with the control group, the contents of EB in the brain of 0—1h and 1—8h groups were significantly higher. And there was no statistical significance between the 8—9h group and control group. There were statistical significances between the 0—1h group and other groups.

Conclusion: 10ms is an appropriate burst duration value to open the BBB. Under parameters of fundamental frequency 1MHz, total exposure time 120s, output voltage 200mV, pulse repetition frequency 1Hz, micro-bubble (SonoVue®) dose $2.5\mu\text{l/g}$, the BBB can be opened transcranially, effectively, safely and reversibly when the burst duration is set to 10ms using existing FUS therapy system.

Author's address The School of Rehabilitation, Kunming Medical University, Kunming, 650500

Key word blood-brain barrier; focused ultrasound; micro-bubbles; reversibility; neuromodulation

超声波是康复医学中常见的物理因子治疗方法,长期以来被用于关节炎、周围神经损伤等所致水肿、炎症、组织粘连等症状的治疗。随着研究深入,研究人员发现了超声波的更多生物学效应。聚焦超声(focused ultrasound, FUS)是以聚焦方式工作的超声波,FUS技术可有效开放血脑屏障(blood-brain barrier, BBB),增加透过率,提升药效^[1-2]。同时,FUS开放BBB可影响中枢神经的功能状态,具有中枢神经调控作用^[3]。这为改变大脑特定区域的活动水平以谋求患者的功能进步提供了可能,也为拓展超声在康复医学领域的应用提供基础。

BBB是血液循环与脑组织之间的一道屏障,其特殊的结构可以保持大脑微环境的稳态并阻止外周有毒物质对脑组织的损害^[4-5]。然而,BBB的存在也成为脑部疾病治疗的一大挑战,几乎100%的大分子

药物和超过98%的小分子药物均不能透过BBB^[6]。FUS开放BBB有利于克服这一障碍,并发挥中枢神经调控作用。FUS的生物学效应包括热效应、机械效应和空化作用等。热效应常被用于热消融治疗(如脑肿瘤、原发性震颤、帕金森病等的治疗),机械效应或是FUS神经调控的基础之一。空化作用则是FUS开放BBB的重要机制,当循环系统中的微泡流经FUS作用区域时,微泡内的气体会交替膨胀、压缩(稳定空化)甚至爆裂(惯性空化),使内皮细胞间的紧密连接出现松动,进而开放BBB^[7-8]。相较于静脉滴注甘露醇、电穿孔等方法,FUS开放BBB具有无创、安全、高精度等优势,为靶向局部开放BBB、增加治疗物质的递送效率和中枢神经系统调控提供了新的可能。适宜的参数对于FUS开放BBB的有效性和安全性至关重要。其中,脉宽(burst duration)是

影响FUS开放BBB效果的主要因素之一^[9],在脉冲重复频率固定的情况下,脉宽值的大小与占空比高低成正比。为了探索可以安全、有效开放BBB的FUS脉宽值,本实验用脑组织中伊文思蓝(evans blue, EB)含量表征FUS开放BBB的有效性,并用HE染色探查安全性,将FUS脉冲重复频率固定为1Hz,基础频率固定为1MHz,输出电压为200mV,总辐照时间为120s,微泡选用SonoVue®注射用六氟化硫微泡,剂量为2.5 μ l/g。通过观察脉宽分别为0、1、10、100、200ms(对应占空比0、1‰、1‰、10‰、20‰)时FUS开放BBB的有效性及安全性,筛选出合适的脉宽值,最后对FUS开放BBB的可逆性进行验证。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SPF级昆明小鼠73只,8—9周龄,体重28g以上,雄性,由昆明医科大学实验动物学部提供(动物实验环境设施许可证号:SYXK(滇)K2015-0002),本实验事先通过昆明医科大学动物实验伦理审查(批号:KMMU2019078)。实验试剂及仪器:SonoVue®注射用六氟化硫微泡,购自云南省医药有限公司, Sigma®伊文思蓝、甲酰胺(阿拉丁)、Biosharp®4%多聚甲醛溶液、苏木素伊红染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)购于昆明春旭科技有限公司。FUS设备为课题组现有的FUS治疗系统,包括信号发生器、功率放大器、聚焦式超声换能器等组成,FUS换能器最长处为2.05cm,高1.2cm,重6.8g(图1),焦点在距换能器表面约2.34cm处。为了使焦点落在靶脑区,我们设计并3D打印了FUS换能器适配器。

1.2 分组及干预方法

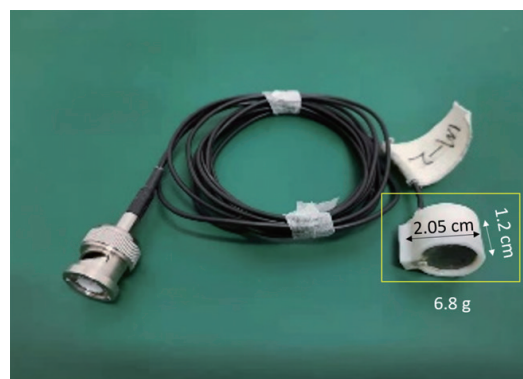
按随机数字表法将73只昆明小鼠随机分为脉宽筛选组(共45只)和可逆性研究组(28只)。脉宽筛选组又分为0ms组、1ms组、10ms组、100ms组和200ms组共5个亚组,每组9只,其中6只用于脑组织中EB含量评价,3只用于病理学检查。先将换能器适配器与换能器用封口膜包封,中间填充超声耦合剂,然后将聚焦超声系统连接好并检查系统是否正常工作,设置好参数(基础频率1MHz,输出电压200mV,总辐照时间120s,脉冲重复频率1Hz,根据分组,分别将脉宽设为0ms、1ms、10ms、100ms、

200ms);用小动物麻醉机将小鼠麻醉并用电推剪和脱毛膏脱毛,期间轻柔操作避免损伤头皮和刺激小鼠眼部,脱毛后固定于小鼠适配器上,隔头皮找到Bregma,以此为参照,将探头中心对准(铁架台固定)辐照靶点(Bregma-2.7mm, lateral+2.5mm),探头紧贴皮肤,中间用耦合剂填充(图2)。按照说明书方法配置六氟化硫微泡溶液,并按照小鼠体重经尾静脉给予相应剂量的微泡(2.5 μ l/g)。10s后打开FUS输出开关,经头皮和颅骨对小鼠进行辐照,辐照完毕经尾静脉注射2%的EB溶液,4h后取材。可逆性研究组分为4个亚组(每组7只),验证所筛选出的FUS超声参数下,BBB的开放是否具有可逆性:①-1—0h组:在-1h(实验开始前1h)予小鼠尾静脉注射2%的EB溶液,于0h经尾静脉注射微泡,并行安慰性FUS辐照,随后取脑;②0—1h组:于0h给予小鼠尾静脉微泡注射及FUS辐照,辐照完毕予尾静脉注射2%的EB溶液,小鼠于1h取脑;③1—8h组:于0h给予小鼠尾静脉微泡注射及FUS辐照,于1h予尾静脉注射2%的EB溶液,小鼠于8h取脑;④8—9h组:于0h给予小鼠尾静脉微泡注射及FUS辐照,于8h予尾静脉注射2%的EB溶液,小鼠于9h取脑。以上操作中,2%的EB溶液注射剂量均为(2.5 μ l/g)。

1.3 取材

将深度麻醉的小鼠固定于灌注板上,用眼科剪于小鼠剑突下,迅速开胸露出心脏,用与蠕动泵连接的输液针沿心尖最白处进针刺破左心室至升主动脉,剪开右心耳,经蠕动泵输入生理盐水直至右心耳流出来的液体清亮、肝脏颜色变浅,用于EB定量分析的小鼠常规取脑,待后续处理;用于病理学检查的

图1 FUS换能器



样本继续灌注4%的多聚甲醛溶液至小鼠全身僵硬,取脑后浸泡于4%的多聚甲醛溶液中。

1.4 BBB是否开放的定性评价

对脑组织上视面及冠状面进行蓝染与否及蓝染程度观察,以此判断BBB是否开放,并用单反相机拍照。

1.5 BBB开放程度评价(脑组织蓝染程度的定量评价)

脑组织去除嗅球和小脑后称重、切成小块置于离心管中,加入3ml甲酰胺溶液于37℃恒温箱中进行萃取。24h后取出,以3000r/min的速度于25℃下离心10min,取离心后的萃取液上清1ml于比色杯中,以同体积甲酰胺为空白对照调零液,用日立U3010紫外分光光度计在EB最大吸收峰(620nm)处对样本溶液的吸光度进行测定,每个样本进行3次测量后取平均值。根据回归方程: $y=12x+0.0925$ (y 为EB浓度, x 为吸光度, $R^2=0.9999$)将吸光度换算成EB含量。将3ml甲酰胺中EB总含量除以脑组织总重量得每克脑组织的EB平均含量。计算公式为:

脑组织EB平均含量 (μg/g) = $\frac{\text{萃取液中EB总量}(\mu\text{g})}{\text{脑组织重量}(g)}$

1.6 HE染色

小鼠脑组织经常规固定、脱水后用OTC包埋,选取FUS辐照中心区域切片,用LEICA冰冻切片机制备厚度为10μm的冰凍切片。将小鼠脑切片用苏木素和伊红染色,经脱水、透明后中性树脂封片。在显微镜下观察不同分组小鼠脑组织的变化并进行图像采集。

1.7 统计学分析

运用IBM SPSS 20对实验结果进行分析,计量资料以均数±标准差表示,先对数据进行方差齐性分析,若方差齐则进行单因素方差分析,两两比较采用LSD- t 检验;方差不齐则选用H检验,若有显著性

意义,对数据进行秩变换后再行两两比较(LSD- t 检验), $P<0.05$ 视为有显著性意义。

2 结果

2.1 脉宽筛选组BBB是否开放的定性评价

对照组(0ms组)小鼠脑组织无EB渗入脑组织。实验组(1ms组、10ms组、100ms组和200ms组)均有不同程度的EB渗入脑组织,即BBB开放。实验组BBB开放位置局限于聚焦超声作用区域,远离FUS作用区域的脑区无EB渗出,即远离FUS作用区域的血脑屏障未被破坏,呈完好状态。肉眼观1ms组小鼠BBB开放区域最小,而10ms、100ms组较大,200ms组最大,10ms和100ms组BBB开放面积无显著性差异(图3)。

2.2 脉宽筛选组BBB开放程度评价

对各组小鼠脑部EB含量结果进行统计分析。结果显示:对照组(0ms组)小鼠脑部EB含量为(4.67±2.14)μg/g。1ms、10ms、100ms、200ms组小鼠脑部EB含量分别为(9.63±3.31)μg/g、(19.16±2.47)μg/g、(20.75±7.77)μg/g、(29.48±10.42)μg/g。经检验,数据方差不齐,H检验中H值为22.361, $P<0.001$,即各组小鼠脑部EB含量不全相等,经秩变换后行两两比较,1ms、10ms、100ms、200ms组小鼠脑部EB含量与对照组相比有显著性意义($P<0.05$),即脉宽设置为1、10、100、200ms均可有效开放BBB。10ms、100ms、200ms组小鼠脑部EB含量明显高于1ms组($P<0.05$),说明当脉宽设置为10ms、100ms、200ms时,BBB开放效率优于1ms。100ms组小鼠脑部EB含量与10ms组相比无显著性意义($P>0.05$),提示在一定范围内增加脉宽并不能提高BBB的开放效率。而200ms组小鼠脑部EB含量明显高于10ms组($P<0.05$),提示当脉宽增加超出一定幅

图2 FUS辐照示意图

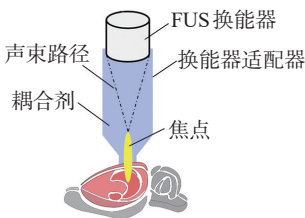
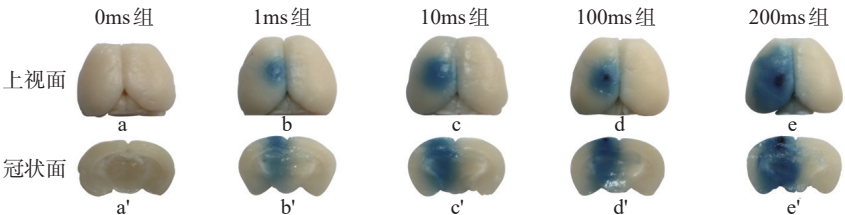


图3 不同脉宽下FUS开放BBB的脑组织蓝染情况



注:a—e为各组小鼠大脑上视面EB渗出情况;a'—e'为相应组小鼠冠状面EB渗出情况

度,BBB开放效率继续增加(表1)。

2.3 脉宽筛选组辐照中心区域脑组织HE染色结果

0ms组(对照组)无红细胞渗出,1ms组、10ms组小鼠FUS辐照中心区域亦未见红细胞渗出,提示本实验条件下,脉宽1ms和10ms(对应占空比1‰、1%)时,FUS可开放BBB,且无出血现象。100ms组、200ms组虽然可以开放BBB,但HE染色示FUS辐照中心区域有少量红细胞渗出,提示本实验条件下,脉宽100ms、200ms(对应占空比10%、20%)时虽然BBB亦呈现开放状态,但会伴随出血,不能兼顾安全性(图4)。

2.4 可逆性研究组BBB是否开放的定性评价

肉眼观察对照组(-1—0h组)和8—9h组无EB渗出,说明对照组和FUS辐照后第8—9h BBB处于关闭状态;0—1h组、1—8h组有EB渗出,但无论从上视面还是冠状切面观察,0—1h组渗出最多,1—8h组渗出较少(图5)。

表1 不同脉宽组小鼠脑部伊文思蓝浓度结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	伊文思蓝浓度($\mu\text{g/g}$)	H值	P值
0ms	6	4.67 $\pm$ 2.14	22.361	<0.001
1ms	6	9.63 $\pm$ 3.31 ^①		
10ms	6	19.16 $\pm$ 2.47 ^{②③}		
100ms	6	20.75 $\pm$ 7.77 ^{②③}		
200ms	6	29.48 $\pm$ 10.42 ^{②④⑤}		

注:①与0ms组相比, $P<0.05$;②与0ms组相比, $P<0.001$;③与1ms组相比, $P<0.01$;④与1ms组相比, $P<0.001$;⑤与10ms组相比, $P<0.05$ 。

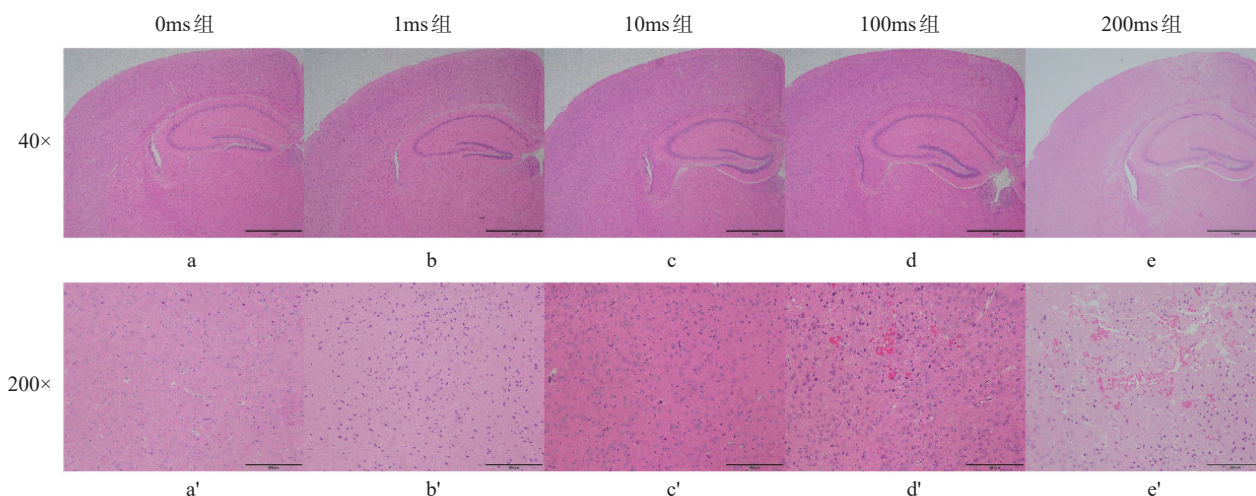
2.5 可逆性研究组BBB开放程度的评价

经统计分析,对照组(-1—0h组)小鼠脑部EB含量为(1.50 ± 0.19) $\mu\text{g/g}$,0—1h组、1—8h组、8—9h组小鼠脑部EB含量分别为(8.60 ± 1.89) $\mu\text{g/g}$ 、(2.63 ± 0.76) $\mu\text{g/g}$ 、(1.57 ± 0.46) $\mu\text{g/g}$ 。经检验,数据方差不齐,非参数H检验中H值为20.835, $P<0.001$,即各组小鼠脑部EB含量不全相等。经秩变换后行两两比较,结果显示:与对照组相比,0—1h组、1—8h组小鼠脑部EB含量明显增高($P<0.001$),说明0—8h内BBB处于开放状态,EB渗出明显;8—9h组与对照组相比无显著性意义($P>0.05$),说明8h以后BBB处于关闭状态。同时,1—8h组小鼠脑部EB含量明显低于0—1h组($P<0.05$),提示BBB开放高峰出现在0—1h内,1h后BBB开放程度降低,8h后BBB处于关闭状态(表2)。

3 讨论

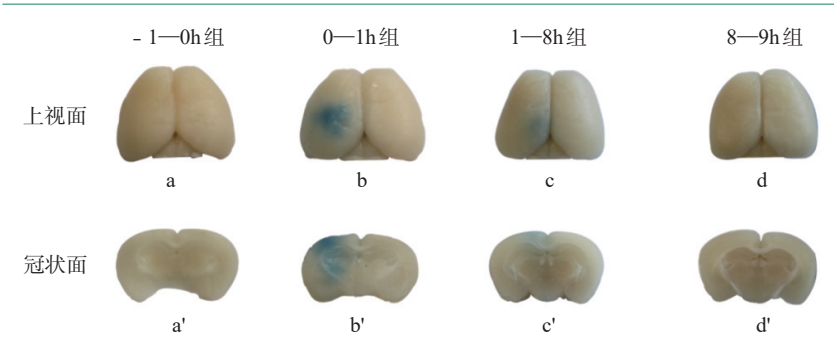
超声波是频率高于20000Hz的声波,可分为平面超声和FUS。不同于平面超声,由于FUS聚焦的特性可将声能集中于局部发挥作用(类似于放大镜^[10])而常被用于超声生物效应的研究。对于开放BBB递送药物、神经调控以治疗脑部疾病等应用,FUS独具优势。FUS可穿透颅骨作用于脑组织,其作用深度可达10cm以上,精确至亚毫米级别^[11],且

图4 不同脉宽下FUS开放BBB的小鼠脑部HE染色结果



注:a—e比例尺1mm, a'—e'比例尺200 μm 。n=3。

图5 FUS开放BBB不同时间段小鼠脑部伊文思蓝浓度结果



注:a—d为各组小鼠大脑上视面EB渗出情况;a'—d'为相应组小鼠冠状面EB渗出情况

表2 FUS辐照不同时间段组小鼠脑部伊文思蓝浓度结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	伊文思蓝浓度($\mu\text{g/g}$)	H值	P值
-1—0h	7	1.50 $\pm$ 0.19	20.835	<0.001
0—1h	7	8.60 $\pm$ 1.89 ^①		
1—8h	7	2.63 $\pm$ 0.76 ^{①②}		
8—9h	7	1.57 $\pm$ 0.46 ^{③④}		

注:①与-1—0h组相比, $P<0.001$;②与0—1h组相比, $P<0.05$;③与0—1h组相比, $P<0.001$;④与1—8h组相比, $P<0.05$ 。

FUS是机械波,可与磁共振等影像手段共同使用实现术中精确定位和监测,提升安全性。2016年美国食品与药品管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准了聚焦超声热消融用于原发性震颤的治疗。作为一种非侵入式的新兴治疗方法,目前已有将FUS技术运用于人类意识障碍、脑肿瘤、特发性震颤、癫痫、神经病理性疼痛等疾病治疗的临床报道^[12]。BBB由内皮细胞、星形胶质细胞、神经元、小胶质细胞、周细胞等结构构成^[13],虽然BBB对于维持脑内环境稳态具有重要意义,然而当脑部疾病(如脑肿瘤)发生时,BBB也限制了治疗性物质的进入。静脉滴注甘露醇可短暂性地开放BBB,但研究显示,甘露醇开放BBB后会出现短暂脑水肿和颅内压增高^[14],且该方法所致BBB开放是广泛的,大大增加了感染等风险。本实验证明了FUS可局部开放BBB,与他人研究一致^[2,15-17],这为脑部疾病的药物治疗提供了一种新的增效途径,也为后续FUS开放BBB的中枢调控作用研究提供基础。

有效且安全地开放BBB是将FUS应用于疾病治疗的前提。FUS参数是影响BBB开放有效性和安全性的关键因素。占空比是超声检查和治疗中一

个尤为重要的参数,占空比大小主要受脉宽和脉冲重复频率的影响,当脉冲重复频率固定时,占空比与脉宽呈正比。占空比过高易导致超声的热效应明显,可能会损害FUS路径上的生物组织,占空比过低则可能难以保障其生物学效应。本实验通过保持脉冲重复频率不变,改变脉宽的方式来改变占空比,当脉冲重复频率为1Hz时,0ms、1ms、10ms、100ms、200ms的脉宽分别对应的占空比为0、1‰、

1‰、10‰和20‰。实验结果显示,在FUS基础频率为1MHz,输出电压200mV,总辐照时间120s,脉冲重复频率为1Hz,SonoVue®注射用六氟化硫微泡剂量2.5 $\mu\text{l/g}$ 的情况下,1‰、1‰、10‰和20‰的占空比均可开放成年KM鼠的BBB;占空比为1‰时BBB开放效率不高,占空比为1‰、10‰和20‰时BBB开放效率高,但1‰和10‰的占空条件下小鼠脑组织中EB含量无显著性意义($P>0.05$),即两组BBB的开放效率并无显著性差异,当占空比高至20‰时,BBB开放的效率相比1‰组明显提升。就安全性而言,1‰、1‰的占空时BBB可安全开放,10‰和20‰占空时BBB高效开放的同时,靶脑区有出血现象,不具备安全性。即当占空比较低时FUS开放BBB的效率较低,随着占空比增高,FUS开放BBB的效率随之增加,当占空比增加到一定程度时,小范围内升高占空比并不能有效提高BBB的开放效率,只有增幅超过一定范围才可增加BBB开放效率;对于安全性来说,低占空比安全性高,占空比过高则不能保证安全性。当然本实验是通过改变脉宽的方式以改变占空比,不能代表改变脉冲重复频率所致占空比变化的结果。结果显示,在本实验条件下,当FUS基础频率为1MHz,输出电压200mV,总辐照时间120s,脉冲重复频率1Hz,SonoVue®注射用六氟化硫微泡剂量2.5 $\mu\text{l/g}$,脉宽设为10ms时,FUS可经颅、安全、高效地开放成年KM鼠的血脑屏障。

10ms是当前FUS开放BBB实验中使用较多的脉宽值,Shin J等^[9]使用中心频率为515KHz的单阵元FUS探头对SD大鼠进行了BBB开放的参数探

索,结果发现,声压的幅度和脉宽的大小对于BBB开放的效率影响巨大,但是这2个参数也与辐照区域的组织损害密切相关,该实验中,10ms可有效开放BBB且不引起组织损伤。另外,Jung B等^[18]利用FUS开放BBB向大鼠脑内递送阿霉素的实验,Hsu PH等^[19]运用FUS开放BBB递送治疗物质以治疗APP/PS1转基因小鼠的实验亦采用10ms作为脉宽值,本实验结果与前人报道一致。然而,Xu L等^[20]使用55ms作为脉宽值,利用FUS成功开放BBB递送药物入大鼠大脑,即10ms并不是FUS开放BBB的唯一合适脉宽值。笔者认为超声的总体作用来源于各项参数的组合,相同情况下改变其中任一参数值均有可能导致总体结果的变化,而超声参数的排列组合无数,无法精确、绝对的探讨出最合适的某个参数值,较实际情况多倾向于寻找一种可以安全且有效开放BBB的FUS参数组合。本实验在其他参数固定的情况下寻找较合适的脉宽,从一定意义上说,也是在寻找合适的参数组合。

虽然BBB的局部开放有利于治疗物质入脑,并发挥神经调控作用,但是BBB开放亦会带来相应风险。BBB开放时间过长可增加外周感染源等有害物质进入脑组织的概率,因此在FUS开放BBB的治疗性实验中,BBB开放是否具有可逆性及开放时间窗的长短尤为重要。在本实验条件下我们发现,FUS开放BBB是动态可逆的,开放高峰出现在0—1h内,1h后BBB开放程度逐渐下降,8h后BBB即处于关闭状态。目前,相关研究显示FUS处理后BBB的关闭时间可长达24h^[21]。对于目的为借助FUS开放BBB增加药物透过率的实验来说,较长时间的BBB开放为时间窗内多次给药创造了条件,但是过长的开放时间窗会增加外周感染源进入脑组织的风险;对于运用FUS开放BBB神经调控作用的治疗性研究来说,过长的开放时间窗亦会增加感染风险。本实验条件下,FUS辐照后BBB于8h内关闭。综上,本实验条件下,10ms是可以经颅、安全、有效开放BBB的FUS脉宽值,且FUS开放BBB是一个动态可逆的过程,8h后BBB处于关闭状态,进一步验证了超声参数的安全性,为FUS开放BBB神经调控作用治疗疾病的研究提供了重复性操作的科学依据。

超声波是康复医学领域常见的临床物理因子疗

法之一。目前,超声波主要被应用于消肿、增加局部血液循环、预防软组织粘连等。而开放BBB、神经调控等生物作用的发现和研究为超声在康复医学领域的应用扩展提供了基础。据报道,FUS开放BBB可对大鼠躯体感觉诱发电位产生长达一周的抑制作用,这种抑制作用的大小因超声参数不同而改变。FUS的神经调控作用为神经病理性疼痛、帕金森病等疾病的康复提供了中枢调控的可能手段。通过改变脑部特定功能核团的活动水平,以达到改善患者症状、提高功能的目的,配合其余康复手段进行综合康复,以谋求患者功能改善的最大化,或不失为一种明智的康复策略。1981年,WHO指出康复是应用各种有用的措施以减轻残疾的影响和使残疾人重返社会^[22]。尝试探索物理因子对中枢神经系统的调控作用,对其不同的功能参数进行探讨,以图其在疾病康复中的应用,将有助于丰富和发展康复治疗的内涵。

参考文献

- [1] Liu HL, Hsu PH, Lin CY, et al. Focused ultrasound enhances central nervous system delivery of bevacizumab for malignant glioma treatment[J]. *Radiology*, 2016, 281(1): 99—108.
- [2] Liu HL, Huang CY, Chen JY, et al. Pharmacodynamic and therapeutic investigation of focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening for enhanced temozolomide delivery in glioma treatment[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114311.
- [3] Chu PC, Liu HL, Lai HY, et al. Neuromodulation accompanying focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening[J]. *Sci Rep*, 2015(5): 15477.
- [4] Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, et al. Structure and function of the blood-brain barrier[J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 37(1): 13—25.
- [5] Langen UH, Ayloo S, Gu C. Development and cell biology of the blood-brain barrier[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2019, 35: 591—613.
- [6] Pardridge WM. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development[J]. *Mol Interv*, 2003, 3(2): 90—105+51.
- [7] 罗凯旋, 林爱金, 陈莱弦, 等. 聚焦超声热消融及开放血脑屏障治疗脑部疾病的研究进展[J]. *临床超声医学杂志*, 2020, 22(6): 448—451.
- [8] 罗凯旋, 冯湘君, 陈莱弦, 等. 低强度聚焦超声对神经调控作用研究进展[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(7): 41—44.
- [9] Shin J, Kong C, Cho JS, et al. Focused ultrasound-mediated

- ed noninvasive blood-brain barrier modulation: preclinical examination of efficacy and safety in various sonication parameters[J]. Neurosurg Focus,2018,44(2):E15.
- [10] Ter Haar G. Heat and sound: focused ultrasound in the clinic[J]. Int J Hyperthermia,2015,31(3):223—224.
- [11] Rezayat E, Toostani IG. A review on brain stimulation using low intensity focused ultrasound[J]. Basic Clin Neurosci,2016,7(3):187—194.
- [12] Krishna V, Sammartino F, Rezai A. A review of the current therapies, challenges, and future directions of transcranial focused ultrasound technology: advances in diagnosis and treatment[J]. JAMA Neurol,2018,75(2):246—254.
- [13] Hynynen K. Ultrasound for drug and gene delivery to the brain[J]. Adv Drug Deliv Rev,2008,60(10):1209—1217.
- [14] 徐猛,李延锋,杨本强,等. 血脑屏障开放及其灌注成像的影像评估[J]. 中国CT和MRI杂志,2014,12(5):109—111+115.
- [15] Lin CY, Hsieh HY, Pitt WG, et al. Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening for non-viral, non-invasive, and targeted gene delivery[J]. J Control Release,2015(212)1—9.
- [16] Jordão JF, Thévenot E, Markham-Coultes K, et al. Amyloid- β plaque reduction, endogenous antibody delivery and glial activation by brain-targeted, transcranial focused ultrasound[J]. Exp Neurol,2013(248)16—29.
- [17] Burgess A, Dubey S, Yeung S, et al. Alzheimer disease in a mouse model: MR imaging-guided focused ultrasound targeted to the hippocampus opens the blood-brain barrier and improves pathologic abnormalities and behavior[J]. Radiology,2014,273(3):736—745.
- [18] Jung B, Huh H, Lee EH, et al. An advanced focused ultrasound protocol improves the blood-brain barrier permeability and doxorubicin delivery into the rat brain[J]. J Control Release,2019(315)55—64.
- [19] Hsu PH, Lin YT, Chung YH, et al. Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening enhances GSK-3 inhibitor delivery for amyloid-beta plaque reduction[J]. Sci Rep, 2018,8(1):12882.
- [20] Xu L, Lee W, Rotenberg A, et al. Localized disruption of blood albumin-phenytoin binding using transcranial focused ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol, 2020, 46(8): 1986—1997.
- [21] O'Reilly MA, Hough O, Hynynen K. Blood-brain barrier closure time after controlled ultrasound-induced opening is independent of opening volume[J]. J Ultrasound Med,2017, 36(3):475—483.
- [22] 关骅. 康复医学与治疗医学关系的探讨[J]. 中国康复医学杂志,2003,18(9):552—554.

