文章编号:1000-5404(2006)18-1843-03

论著

纳米羟基磷灰石联合聚焦超声对家兔肝脏作用焦域效应的研究

刘丽萍,肖子文,肖雁冰,李发琪,王智彪,王燕芹,李崇雁,龚晓波 (重庆医科大学生物医学工程系,医学超声研究所,重庆 400016)

提 要: 目的 探讨纳米羟基磷灰石(nano-hydroxyapatite,nano-HA)静脉应用对聚焦超声治疗兔肝脏作用效应的影响。**方法** 新西兰大白兔40只,采用随机数字表法分为4组,分别给予生理盐水,纳米HA 50、100、150 mg/kg;每组家兔肝脏均接受聚焦超声体内定点辐照。测量每点辐照结束后聚焦超声作用焦域处中心的瞬时温升,24 h后处死动物并测量所形成的凝固性坏死灶体积。**结果** 纳米HA用药组3组在辐照5、10、15 s后焦域处的瞬时温度均较生理盐水组明显升高($P<0.01$),且随着纳米HA用量增加,焦域处温升增加。不同纳米HA剂量组所形成的凝固性坏死灶体积均较相应的生理盐水组明显增大($P<0.01$)。随着纳米HA的用量增加,所形成的凝固性坏死体积亦随之明显增加($P<0.01$)。**结论** 纳米羟基磷灰石可改变动物肝脏组织的声学环境,从而增强聚焦超声对兔肝的作用效应。

关键词: 羟基磷灰石; 纳米粒子; 聚焦超声; 兔; 肝
中图法分类号: R454.3;R575.05;R981 **文献标识码**: A

Effect of nano-hydroxyapatite on focal region of focused ultrasound to rabbit liver *in vivo*

LIU Li-ping, XIAO Zi-wen, XIAO Yan-bing, LI Fa-qi, WANG Zhi-biao, WANG Yan-qin, LI Chong-yan, GONG Xiao-bo (Department of Biomedical Engineering, Institute of Ultrasound Engineering in Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of nano-hydroxyapatite(HA) on the curative effect of focused ultrasound on rabbits' livers. **Methods** Forty New Zealand rabbits were divided into 4 groups randomly, and infused with saline 2 ml/ kg, HA 50 mg/kg, HA 100 mg/kg and HA 150 mg/kg respectively. Each liver was dot-exposured *in vivo* to focused ultrasound at same working parameters. Then the instantaneous temperature of focal region was measured just after exposure, and the volume of the coagulative necrosis in the liver was measured 24 h later. **Results** The mean temperature of the focal region was significantly higher in HA groups than in saline group after exposured for 5, 10 and 15 s respectively ($P<0.01$), and was increased in a dose-dependent manner. The mean volume of the coagulative necrosis was larger in HA groups than in control ($P<0.01$), and significant difference was observed between nano-hydroxyapatite at 50 mg/kg and 150 mg/kg ($P<0.01$). **Conclusion** Nano-hydroxyapatite can change the acoustic environment of the rabbit liver tissue, and enhance the curative effect of focal ultrasound.

Key words: hydroxyapatite; nanoparticle ; focal ultrasound; rabbit; liver

聚焦超声主要利用超声波良好的组织穿透性、方向性,在机体组织内汇聚形成高强度区域,通过瞬态高温效应、空化效应和机械效应等破坏焦域处靶组织,从而可达到治疗或外科"切除"的目的[1]。焦域(focal region,FR)是聚焦超声毁损式消融组织的基本单元,即指聚焦超声单次辐照声焦域与生物组织相互作用所产生的不可逆凝固性坏死区域[2]。已有研究表明,微泡超声造影剂可明显增强聚焦超声的作用效应[3],而一些固体质粒也可作为超声造影剂应用。纳米羟基磷灰石(nano-hydroxyapatite, nano-HA)因其具有良好的生物相容性及生物活性,且微粒直径比红细胞小,可以在血液中自由运行,因此我们对纳米HA固体质粒能否

基金项目:国家杰出青年基金资助项目(30325027)
Supported by National Crackajack Youth Foundation of China (30325027)
作者简介:刘丽萍(1974-),女,重庆市人,博士研究生,医师,主要从事肿瘤超声治疗方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68894343, E-mail: liuliu417325@163.com
收稿日期:2005-03-08;**修回日期**:2005-11-29

增强 HIFU 治疗的生物学效应进行了动物实验研究。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

纳米羟基磷灰石(HA)购自四川大学生物材料工程研究中心,为白色粉末,透射电镜下观察显示为棒状微晶体,粒径范围为(42.6 ~ 183.2) nm × (12 ~ 19.33) nm, 平均为 82.8 nm × 15.3 nm,呈正态分布。新西兰大白兔 40 只,购自重庆医科大学实验动物中心,体质量(2.7 ± 0.3)kg, 雌雄不拘。采用随机数字表法分为 4 组,每组 10 只。CZF 型聚焦超声治疗仪由重庆医科大学超声医学工程研究所提供。

1.2 实验方法

将纳米 HA 用9% 生理盐水分别配成浓度为 25 g/L 的乳白色混悬液,使用前经超声振荡仪 600 W 振荡 5 min,使其完全分散均匀。HIFU 术前 24 h 3 组纳米 HA 组家兔分别经耳缘静脉快速推注纳米 HA 50、100、150 mg/kg, 5 s 内推完,并给予 1 ml 生理盐水冲洗,确保药物完全进入体内;对照组每只家兔分别推注生理盐水 2 ml/kg。家兔右胸腹部 8% 硫化钠脱毛,术前速眠新 0.2 ml/kg 肌注麻醉,于无菌手术下切开腹壁,充分暴露肝脏。

聚焦超声治疗头工作参数如下:频率 9.85 MHz, 功率 5 W,焦距 4 mm,治疗方式采用定点辐照。每个肝脏辐照 2 ~ 3 组,每组 3 点,分别辐照 5、10 、15 s。每点辐照结束后均立即采用电偶合测温仪(台湾 TES 公司生产)检测靶区中心的瞬时温度。术后缝合切口,24 h 后经耳缘静脉快速推注空气 10 ml 处死家兔,取出肝脏,沿所形成的圆锥体形凝固性坏死灶的中心切开,测量各径线并计算其体积。

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 纳米 HA 对聚焦超声治疗靶区局部温升的影响

聚焦超声治疗结束后即可见靶区形成明显圆锥体形灰白色凝固性坏死。辐照 5、10 、15 s 后,4 组治疗靶区局部的温度均较辐照前依次升高,两两比较,差异显著($P<0.01$)。与生理盐水组比较,在辐照 5、10 、15 s 时,纳米 HA 组靶区局部的温度均有明显升高($P<0.01$)。在 3 组纳米 HA 不同剂量组间比较,辐照 5 s 及 10 s 时,三者治疗靶区的温度均无明显差异($P>0.05$), 只是在辐照 15 s 时,治疗靶区局部的温度随着纳米 HA 用量增多而依次升高,两两比较,差异显著 ($P<0.05$)。见表 1。

2.2 纳米 HA 对聚焦超声治疗作用所形成的凝固性坏死灶体积的影响

家兔肝脏在聚焦超声治疗结束后即可见靶区形成明显圆点状灰白色凝固性坏死,边界清楚。于术后 24 h 可见明显充血带,从表面观可见此时的凝固性坏死灶较术毕即刻有明显增大,剖面呈圆锥形,与聚焦超声治疗头的焦域形态一致(图 1)。在 4 组各组内,辐照 5、10 s 及 15 s 后所形成的焦域体积两两比较,随着辐照时间的延长明显增大,有显著性差异($P<0.01$)。在相同条件下,不同纳米 HA 剂量组经聚焦超声治疗后所形成的凝固性坏死体积均较相应的生理盐水组明显增大,差异均显著($P<0.01$)。不同纳米 HA 剂量组内比较,随着纳米 HA 的用量增加,在辐照时间相同时,所形成的焦域体积亦随之明显增加,差异均显著($P<0.01$)(表 2)。

表 1 不同纳米 HA 用量对聚焦超声治疗家兔肝脏靶区局部温升的影响($\bar{x} \pm s$, ℃)

药物	剂量	例数	辐照前	辐照 5 s 后	辐照 10 s 后	辐照 15 s 后
生理盐水	2 ml/kg	30	33.00 ± 1.52	67.36 ± 3.77^{b}	69.46 ± 2.85^{b}	72.24 ± 2.91^{b}
纳米 HA	50 mg/kg	30	32.91 ± 3.02	72.44 ± 2.70^{ab}	74.60 ± 2.35^{ab}	77.21 ± 3.12^{ab}
纳米 HA	100 mg/kg	25	31.20 ± 2.98	73.36 ± 3.93^{ab}	75.31 ± 2.48^{ab}	78.71 ± 2.19^{abc}
纳米 HA	150 mg/kg	21	34.11 ± 3.04	73.64 ± 2.91^{ab}	76.69 ± 3.72^{ab}	81.37 ± 2.83^{abcd}

a:$P<0.01$,与生理盐水组比较; b: $P<0.01$,与辐照前比较; c:$P<0.05$,与 50 mg/kg 剂量组比较; d: $P<0.05$,与 100 mg/kg 剂量组比较



图 1 纳米 HA 50 mg/kg 组聚焦超声治疗后所形成的凝固性坏死灶
从左到右,治疗时间分别为 15 、10 、5 s (图中标尺为 20 mm)

表 2 不同纳米 HA 用量对聚焦超声作用所形成的凝固性坏死灶体积的影响($\bar{x} \pm s$, mm^3)

药物	剂量	例数	辐照时间(t/s)		
			5	10	15
生理盐水	2 ml/kg	30	61.4 ± 15.3	95.3 ± 21.6^{a}	159.1 ± 50.1^{a}
纳米 HA	50 mg/kg	30	93.1 ± 25.6^{b}	153.1 ± 41.8^{a}	219.4 ± 49.3^{ab}
纳米 HA	100 mg/kg	25	106.5 ± 28.9^{bc}	223.2 ± 55.1^{abc}	346.8 ± 66.7^{abc}
纳米 HA	150 mg/kg	21	120.1 ± 42.2^{bcd}	287.7 ± 47.9^{abcd}	434.1 ± 98.5^{abcd}

a: $P<0.01$,与辐照 5 s 比较; b: $P<0.01$,与生理盐水组比较; c: $P<0.01$,与 50 mg/kg 剂量组比较; d: $P<0.01$,与 100 mg/kg 剂量组比较

2.3 组织学改变

正常肝组织肝小叶结构完整,肝板及肝索排列有序,肝细胞核大、圆形;而经聚焦超声治疗后靶区肝组织呈现大片凝固性坏死,肝板及肝索结构被破坏,肝细胞碎裂、多空泡,核固缩、溶解,与正常组织交界清楚,可见少量炎性细胞浸润(图 2)。

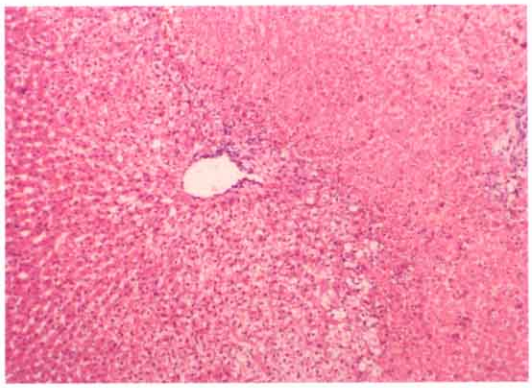


图 2　聚焦超声治疗后靶区肝组织的病理学组织观察　显示肝脏坏死灶组织与正常组织交界清楚（HE × 100）

3　讨论

聚焦超声治疗是根据超声波在生物组织内的具有能量渗透性、方向性、聚焦性、穿透性好的特点，将体外发射的超声波聚集于体内肿瘤组织，通过热效应、空化效应、机械效应、声化学效应等，使肿瘤组织不可逆凝固性坏死，使癌组织失去增殖、浸润、转移能力，从而由“恶性”转变为“良性”。而“良性化”的组织最终被机体溶解吸收[1,4]。这种治疗方法，好比是一把在体外操作，对人体肿瘤组织进行切除的“手术刀”。

临床实践中，我们发现在治疗深部肿瘤或大肿瘤时，要达到完全切除仍具有一定的困难，若通过增加聚焦超声的治疗剂量或减少声通道上的能量衰减来解决问题则同时会带来一系列的副作用，在临床实践中未得到患者及医生的完全接受。国内外研究已经证实，微泡超声造影剂不仅可明显提高超声诊断水平，也可明显增强聚焦超声的治疗效应[3]，即微泡通过血液循环到达靶区组织，改变了聚焦超声在靶区组织治疗作用的声环境，增强了聚焦超声的作用效应。我们在临床实践中发现高强度聚焦超声对骨肿瘤的治疗效果较其他实体肿瘤好[5]，这是否与其骨组织的特有成分钙盐有关呢？这正是本研究想要了解和证实的问题。

羟基磷灰石是骨盐的主要无机成分，外界合成的纳米羟基磷灰石具有很好的生物相容性和生物活性，在生物和医学界已得到了多方面的应用[6,7]。由于纳米微粒比红细胞还小许多，可以在血液中自由运行，小剂量静脉应用是安全可行的，且不会产生长期及严重的副作用[8,9]。纳米 HA 颗粒在注射后可很快到达肝脏，被肝内网状内皮细胞系统吞噬，甚至进入到肝细胞内，在一定时间可改变动物肝脏组织的结构和生物学特性。由于它到达并停留于肝组织中需要一定的时间，因此在本实验研究中我们考虑在纳米 HA 用药后 24 h 进行治疗。

从本研究中我们看到，在相同的治疗条件下，纳米 HA 组的焦域局部温度升高值及所形成的凝固性坏死灶体积均较对照组明显升高，且随着纳米 HA 的用量增加，对聚焦超声的治疗增强作用逐渐增强。这可能提示纳米 HA 经静脉应用后，可改变动物肝脏组织的结构和生物学特性，从而改变肝组织与声波之间的相互作用，增强聚焦超声对肝脏组织的作用效应。但纳米 HA 在肝组织的贮积和代谢时间，以及在其他重要器官的分布情况还有待进一步研究。由于纳米 HA 具有的良好的生物相容性，已经作为药物载体在临床应用，同时研究者们还发现纳米 HA 在体外可明显抑制各种肿瘤细胞的生长[10]。我们所用的纳米 HA 剂量远低于它对大鼠的最小致死剂量[9]，因此开发和研究纳米 HA 的新用途，作为聚焦超声治疗增效剂具有良好的临床应用前景。

参考文献：

[1] CHAUHAN S, MICHEL M S, ALKEN P, *et al*. High-intensity-focused-ultrasound (HIFU) induced homeostasis and tissue ablation [J]. Proceedings of SPIE, 2003, 4953: 237 - 244.

[2] 沙卫红，李瑜元，聂玉强，等. 高强度聚焦超声联用超声造影剂对治疗兔肝焦域效应的影响[J]. 中华超声影像学杂志，2004，13(4)：299 - 302.

[3] KENNEDY J E, TER-HAAR G R, WU F, *et al*. Contrast-enhanced ultrasound assessment of tissue response to high-intensity focused ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol, 2004, 30(6): 851 - 854.

[4] 杨　竹，胡丽娜，王智彪. 高强度聚焦超声治疗肿瘤的实验和临床研究现状[J]. 临床超声医学杂志，2004，16(2)：102 - 104.

[5] WU F, WANG Z B, CHEN W Z, *et al*. Extracorporeal high intensity focused ultrasound ablation in the treatment of 1 038 patients with solid carcinomas in China: an overview[J]. Ultrason Sonochem, 2004, 11(3 - 4): 149 - 154.

[6] VOOR M J, ARTS J J C, KLEIN S, *et al*. Evaluation of hydroxylapatite cement composites as bone graft substitutes in a rabbit defect model [J]. Key Engineering Materials, 2004, 254 - 256(2): 221 - 225.

[7] FRAYSSINET P, JEAN E, ROUQUET N. Hydroxyapatite Ceramic Particles As Material For Transfection[J]. Key Engineering Materials, 2004, 254 - 256(5): 861 - 864.

[8] TITOV A T, LARIONOV P M, SHCHUKIN V S, *et al*. Possible formation hydroxyapatite in blood[J]. Dokly Biochemi, 2000, 373(1-6): 132 - 134.

[9] AOKI H, AOKI H, KUTSUNO T, *et al*. An *in vivo* study on the reaction of hydroxyapatite-sol injected into blood[J]. J Mater Sci Mater Med, 2000, 11(2): 67 - 72.

[10] 唐胜利，袁　媛，刘志苏，等. 羟基磷灰石纳米粒子对人肝癌 BEL-7402 细胞毒性的评价[J]. 肝脏，2003，8(1)：21 - 24.

（编辑　王小寒）