文章编号:1000-5404(2006)24-2419-03

论著

陡脉冲对离体牛肝损伤效应的剂量学初探

喻金梅[1],熊正爱[1],凌晓娟[1],孙才新[2],姚陈果[2],洪 川[2],莫登斌[2],米 彦[2],王士彬[2] ([1]重庆医科大学附属第二医院妇产科,重庆 400010;[2]重庆大学高电压与电工新技术教育部重点实验室,重庆 400044)

提 要:目的 研究不同剂量的陡脉冲对离体牛肝的损伤效应。**方法** 不同作用时间、不同电压、不同频率的陡脉冲作用于新鲜离体牛肝组织,测量最大坏死直径,运用B超监测作用前后灰度变化,TTC染色和HE染色观察损伤效应,同时测量组织前后温度。**结果** 陡脉冲对离体牛肝组织的损伤为凝固性坏死,坏死直径随作用时间的延长而增大;随电压的升高而增大;随频率的增加而增大,作用后B超灰度增强,作用前后的温度变化无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 陡脉冲致牛肝组织的凝固性坏死有明显的量效关系,其值随剂量的增加而增加。

关键词:陡脉冲;离体牛肝;坏死直径;剂量学
中图法分类号:R-322;R312;R322.47 **文献标识码**:A

Metrological study on damaging effect of steep pulsed electric field on fresh excised calf liver

YU Jin-mei[1], XIONG Zheng-ai[1], LING Xiao-juan[1], SUN Cai-xin[2], YAO Chen-guo[2], HONG Chuan[2], MO Deng-bin[2], MI Yan[2], WANG Shi-bin[2] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010;[2]Key Lab of High Voltage Engineering and Electrical New Technology of Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: **Objective** To study the damaging effect of steep pulse on fresh excised calf liver. **Methods** Fresh excised calf liver tissues were exposed to steep pulsed electric fields set at different voltage, different time or different frequency, then the necrotic tissue diameter was measured. B-mode imaging was used to visualize the gray changes before and after steep pulse exposure. TTC and histological examination were used to observe the damaging effect. The temperature of the damaged tissues was measured. **Results** The damaged tissues were of coagulation necrosis by TTC and histological examination. The necrotic tissue diameter increased with the increasing of voltage, time and frequency of steep pulses. The temperature changes were not statistically significant before and after steep pulse exposure ($P>0.05$). **Conclusion** There is apparent dose-response relation in calf liver coagulation necrosis induced by steep pulses and the necrosis diameter.

Key words: steep pulse; fresh excised calf liver; necrotic tissue diameter; metrology

恶性肿瘤严重影响着人们的健康,其发病率每年都呈递增趋势。对于恶性肿瘤的治疗方法有手术治疗、化学治疗、放射疗法、热疗法和生物治疗等,各有禁忌证和适应证,因此肿瘤的治疗仍受到一定的限制。陡脉冲是电疗法中的一种,是上升时间为ns级的指数衰减脉冲电场,主要是致肿瘤细胞不可逆性电击穿,因此成为肿瘤治疗的又一手段。目前已有大量关于陡脉冲治疗离体和在体肿瘤的有效性和安全性的报道以及机制的探索,但有关陡脉冲剂量学的研究较少,建立不同剂量的陡脉冲在特定组织中所产生的杀伤范围的统一标准,在陡脉冲治疗学上有深远的影响,对指导脉冲临床治疗肿瘤具有重要的意义和巨大的应用价值。本研究以离体牛肝为研究对象,探讨陡脉冲剂量与坏死直径的对应关系,为进一步研究在体兔肝组织和荷瘤兔肝肿瘤组织提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

能量可控陡脉冲治疗样机,由重庆大学高电压与电工新技术教育部重点实验室研制生产,输出电压(0~300 V)、陡度(0~100 ns)、脉宽(0~10 μs)的陡脉冲信号,电极针用足铂金制

基金项目:国家自然科学基金资助项目(50477007)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(50477007)
作者简介:喻金梅(1977-),女,江西省新余市人,硕士,医师,主要从事妇科肿瘤电脉冲方面的研究。电话:(023)65398544
通讯作者:熊正爱,电话:(023)63784244
收稿日期:2005-10-17;**修回日期**:2006-06-18

成，采用7针电极共阳极（1正6负）排列，以正极为中心，距正极0.5 cm均匀排列6负极。新鲜离体牛肝市场订购。热电偶温度计（精确度±0.1 ℃），机电部仪表材料研究所研制。JC-型高强度聚焦超声系统中黑白B超仪，重庆医科大学超声研究所研制生产。2,3,5-氯化三苯基四氮唑（2,3,5-Triphenyl-2H-Tetrazolium Chloride，TTC）为美国Amresco公司产品。

1.2 离体牛肝的处理

屠宰后6 h内新鲜离体牛肝组织，浸泡在0.9%的生理盐水中，选择血管及结缔组织较少的新鲜牛肝组织充分冲洗至基本无血液为止，切成50 mm×50 mm×50 mm大小，复温至20 ℃，常规脱气25 min后备用。

1.3 TTC溶液的配制及保存

将TTC试剂用pH值为7.4～7.6的磷酸盐缓冲液（PBS）配制成1%的浓度，4 ℃冰箱避光保存。

1.4 实验分组

将处理好的牛肝分为3组，时间组、电压组和频率组。时间组：梯度改变作用时间5、10、15、20、25、30 min，固定参数为频率500 Hz、电压幅值300 V、电容0.01 μF、脉宽平均3.5 μs、陡度平均75 ns；电压组：梯度改变电压50、100、150、200、250、300 V，固定参数为频率500 Hz、作用时间20 min、电容0.01 μF、脉宽平均3.5 μs、陡度平均75 ns；频率组：梯度改变频率100、200、300、400、500 Hz，固定参数为电压幅值300 V、作用时间20 min、电容0.01 μF、脉宽平均3.5 μs、陡度平均75 ns。

1.5 实验方法

将处理好的牛肝置于治疗台上，调节好脉冲参数，插入电极针，引入电脉冲信号，按上述实验分组逐一引入脉冲剂量。用热电偶温度计探针测定组织损伤前和损伤后即刻的温度变化；采集组织损伤前后B超图像；脉冲作用后立即将牛肝组织放入1%的TTC溶液中，在37 ℃水浴箱中温育10～15 min，用PBS液洗去多余的染液，测量不着色处组织的最大直径；再分别在不着色区和着色区取一组织放入10%甲醛固定，石蜡包埋，HE染色，进行组织病理学观察。

1.6 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，应用SPSS 10.0统计软件进行配对t检验。

2 结果

2.1 组织肉眼改变

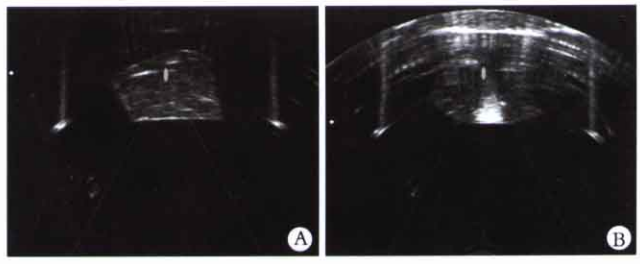
电极针周围有少量液体和气泡排出，以正极为中心可见坏死区并向四周扩散，组织变硬缺乏弹性，周围为一暗红色充血带包绕；TTC染色可见坏死区不着色，颜色呈灰白，周围正常组织颜色为甲紫红，坏死区和正常组织之间有一明显分界。

2.2 不同剂量的陡脉冲与组织坏死直径的关系

陡脉冲作用后测得坏死直径，在脉冲参数为电压幅值300 V、频率500 Hz、电容0.01 μF、脉宽平均3.5 μs、陡度平均75 ns剂量下，牛肝组织的坏死直径随作用时间的延长而增大；在脉冲参数为作用时间20 min、频率500 Hz、电容0.01 μF、脉宽平均3.5 μs、陡度平均75 ns剂量下，牛肝组织的坏死直径随电压的升高而增大；在脉冲参数为电压幅值300 V、作用时间20 min、电容0.01 μF、脉宽平均3.5 μs、陡度平均75 ns剂量下，牛肝组织的坏死直径随频率的增加而增大。

2.3 处理前后牛肝组织B超面积灰度改变

脉冲作用前，牛肝组织回升均匀，见图1A；陡脉冲损后，牛肝组织中央灰度值增高，见图1B。



A：损伤前；B：损伤后

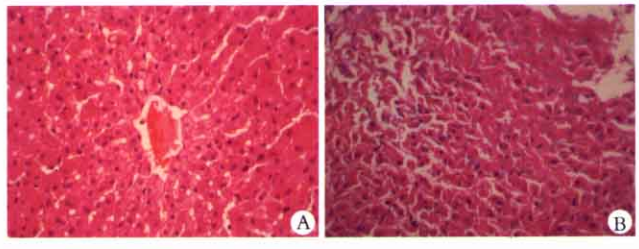
图1 损伤前后牛肝组织B超面积灰度改变

2.4 温度变化

处理前后，电场覆盖区组织温度升高不明显，处理前温度为（20.57±0.5）℃，处理后电极针处温度为（20.97±0.26）℃，脉冲作用前后，温度变化无统计学差异（$P>0.05$）。

2.5 组织病理学改变

陡脉冲损伤前见肝小叶结构清楚，呈放射状排列，细胞呈多边形，体积较大，细胞质染色淡，呈细颗粒状，有的出现空泡或水样变性，细胞核圆，染色浅，可见核仁，见图2A；脉冲损伤后肝组织结构解离，坏死的肝细胞只见其轮廓残影，细胞核固缩、破裂和溶解，见图2B。



A：损伤前；B：损伤后

图2 损伤前后牛肝组织病理学改变（HE×200）

3 讨论

电疗法[1]（electrical therapy，ECT）是近30年发展起来的治疗恶性肿瘤的新技术，对人体深部和浅部肿瘤的破坏性强，且可以使破坏肿瘤的范围得到有效的控制，不会损伤正常的组织，在肿瘤的局部治疗中已展现出广阔的应用前景。上升时间仅为ns级的指数衰减脉冲电场－陡脉冲电场是横跨生物医学、电工新技术和微电子技术等领域的新型学科，无需化疗药物，单独作用于肿瘤组织，促使肿瘤细胞不可逆电击穿而死亡。本课题组进行了大量的前期实验研究，对肿瘤

细胞[2]（人体卵巢腺 $SKOV_3$ 癌细胞、7721 人肝癌肿瘤细胞等）、荷瘤动物[3]（BALB/c 小鼠、Wistar 大鼠、新西兰大白兔等）从治疗机制方面进行了离体和在体实验，结果显示陡脉冲电场作用于肿瘤组织，使恶性肿瘤组织发生不可逆性电击穿[4]，破坏肿瘤的生存条件，从而达到杀死肿瘤细胞的目的。

陡脉冲治疗的剂量大小直接与其治疗的有效性和安全性密切相关，也是陡脉冲能否有效的应用于临床治疗的关键，剂量太小会影响治疗的有效性，剂量太大，又可能损伤周围正常组织，引起严重的并发症，因此，陡脉冲对恶性肿瘤的剂量学研究显得尤为重要。

陡脉冲是一种外加电场，由于外加电场远大于生物膜本身的跨膜电位，在电场覆盖下的组织，膜内外离子的平衡被打破，各种膜微孔开放，引起各种细胞破裂等生物物理现象的发生，微孔的开放是可逆的，因此这种细胞破裂也是可逆的，破裂的细胞完全恢复需要约 20 s 的时间，由于在实验中采用的陡脉冲是周期性的电脉冲而并非单脉冲，脉冲周期为 ms 级，远小于 20 s，所以当开放的微孔还没有来得及闭合时，新一轮的脉冲又开始，这样对膜结构就造成了不可恢复的破坏，即不可逆性电击穿。脉冲电场的覆盖范围可以通过脉冲治疗仪对输出参数的调节来实现的，输出的参数大小不同，陡脉冲形成的电场大小不同，通过对输出参数大小的调节，达到电场有效覆盖的组织范围的目的。本实验主要研究不同电压、不同作用时间和不同频率的陡脉冲电场对离体牛肝组织的杀伤范围。实验得出离体牛肝的最大坏死直径与脉冲电场大小有较好的量效关系，表现为随着脉冲剂量的加大，电场的杀伤直径渐扩大，组织的坏死直径增大，在其他参数不变的条件下，坏死直径随电压峰值增加而增大，这与胡勇等[5]理论模拟计算中发现电场分布范围随电压峰值增大而渐扩大的研究相一致；在陡度、脉宽和电容等参数不变的条件下，坏死直径随频率增加而增大，陡脉冲的作用时间、电压和频率与坏死直径的关系这与李大强等[6]研究的陡脉冲对新西兰兔肝组织和肾组织的损伤效应结论一致，组织的损伤范围与陡脉冲剂量有明显的量效关系。

陡脉冲作用后牛肝 TTC 染色不着色区的病理切片显示，肝细胞破裂，肝索离断，核仁消失，核固缩、碎裂、溶解，组织轮廓存在，显示损伤区组织为凝固性坏死，证明脉冲电场导致肝细胞不可逆性电击穿，本实验中采用的陡脉冲上升沿（即陡度）< 100 ns，在这一快速变化过程中包含了大量的高频、甚高频等频率成分，而陡脉冲的下降过程表现为缓慢的平稳过程，这一过程包含了大量的低频成分。姚陈果等[7]在关于不可逆电击穿机制研究中分析，高频电场容易进入细胞内，对细胞核等膜内细胞器产生较大的影响，而低频电场难以透入细胞内，主要作用在细胞膜上，对细胞膜产生较大影响，由于陡脉冲包含了直流、低频、高频、甚高频的极宽频谱范围，因此陡脉冲对作用组织的细胞膜以及细胞核等膜内细胞器具有很强的、广泛的、无选择的杀伤力。

热电偶温度计测得脉冲作用牛肝组织过程中，温度值变化不大，经统计学分析其差值无统计学意义（$P > 0.05$）。热疗法中一般温度需升高至 41 ~ 45 ℃组织中的蛋白质才开始变性坏死，高强度聚焦超声疗法中局部温度达到 65 ~ 100 ℃，组织才开始发生凝固性坏死，由此可见陡脉冲作用下，热效应在组织损伤中不起主要作用。

陡脉冲治疗的实时监控是陡脉冲临床实用化的另一关键性问题。本实验应用 B 超实时监测损伤区组织的灰度前后变化（图 1、2），损伤前，牛肝组织回声均匀，损伤后，在损伤区可见超声回声强度增强，灰度值增高。陡脉冲是一种微创治疗，当陡脉冲作用组织致组织发生凝固性坏死，即组织结构发生改变，形成新的界面，B 超灰度也发生改变，B 超灰度随着凝固性坏死体积的改变而改变，超声技术能对陡脉冲提供适时引导、准确的监控和良好的疗效评价，因此超声技术是一种有效的监控方法。

陡脉冲要真正应用于临床肿瘤的治疗还需要大量的医学实验和电气工程对仪器的不断改进、完善，以及医学实验和电场仿真理论的相互验证。

参考文献：

[1] OKINO M, MOHRI H. Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on *in vivo* growing tumors[J]. Jpn J Cancer Ros, 1987, 78(12): 1319 - 1321.

[2] 胡　娅，胡丽娜，米　彦，等. 能量可控陡脉冲对人卵巢癌细胞的体外作用[J]. 第三军医大学学报，2003，25(16)：1441 - 1445.

[3] 姚陈果，孙才新，米　彦，等. 陡脉冲电场对荷瘤 BALB/c 小鼠癌细胞杀伤效应和抑制作用的实验研究[J]. 中国生物医学工程学报，2004，23(6)：537 - 543.

[4] 姚陈果，孙才新，米　彦，等. 陡脉冲对恶性肿瘤细胞不可逆性电击穿的实验研究[J]. 中国生物医学工程学报，2004，23(1)：92 - 97.

[5] 胡　勇，于　杰. 体感诱发电位检测中经皮电极下电刺激分布模型的研究[J]. 生物医学工程学杂志，1999，16(4)：462 - 466.

[6] 李大强，熊　兰，胡丽娜，等. 能量可控陡脉冲对新西兰大白兔肝脏及肾脏组织损伤效应的初步探讨[J]. 中华实用医学，2003，5(3)：1 - 4.

[7] 姚陈果，孙才新，熊　兰，等. 陡脉冲不可逆性电击穿恶性肿瘤细胞的机理[J]. 重庆大学学报：自然科学版，2004，27(6)：32 - 35.

（编辑　汪勤俭）