文章编号:1000-5404(2009)14-1333-04

论著

高强度聚焦超声波对棘球蚴的杀伤效果

王俊安[1],邹晓毅[1],叶 彬[1],张成武[2],赵发生[2],韩秀敏[3],李发琪[4],邹建中[4] (重庆医科大学:[1]病原生物学教研室,[4]医学超声工程研究所,重庆 400016;[2]青海大学医学院附属医院 HIFU 治疗中心,西宁 810001;[3]青海省地方病预防控制所,西宁 811602)

摘 要:目的 探索高强度聚焦超声波(high intensity focused ultrasound,HIFU)杀伤棘球蚴(*Echinococcus cysts*)的效果。**方法** 采集感染棘球蚴的新鲜羊肝,选取囊壁较薄、触摸弹性较好、直径<50 mm的棘球蚴囊25个,采用随机区组设计的方法分为5组,每组5个。实验组分别用100、150、200、250 W声功率HIFU对棘球蚴囊进行沿着囊壁多层面的环形照射,覆盖棘球蚴囊囊壁,层面间距为5 mm,每个层面沿囊壁环形扫描1遍,环形扫描速度为3 mm/s,扫描1次,照射时间2~10 min;对照组用普通超声照射2 min。以原头蚴的死亡率作为效应指标,同时检测囊液中乳酸脱氢酶、碱性磷酸酶活性。**结果** HIFU照射后棘球蚴的原头蚴急性死亡率显著升高($F=38.00$,$P<0.01$),囊液内的乳酸脱氢酶活性显著升高($F=14.75$,$P<0.01$),碱性磷酸酶活性显著升高($F=12.00$,$P<0.01$)。**结论** HIFU沿棘球蚴囊壁多层面环形照射的方法对棘球蚴有损伤的效果。

关键词: 高强度聚焦超声波;细粒棘球绦虫;棘球蚴
中图法分类号: R-33;R454.3;R532.320.5 **文献标识码:** A

High intensity focus ultrasound kills hydatid cysts of *Echinococcus granulosus*

WANG Jun-an[1], ZOU Xiao-yi [1], YE Bin[1], ZHANG Cheng-wu[2], ZHAO Fa-sheng[2], HAN Xiu-min[3], LI Fa-qi[4], ZOU Jian-zhong[4] ([1]Department of Pathobiology, College of Basic Medical University, [4]Institute of Ultrasound Engineering in Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, [2]Affiliated Hospital of Medical College of Qinghai University, Xining 810001; [3]Institute of Prevention and Control of Qinghai Province, Xining 811602, China)

Abstract: Objective To explore the killing effects of high intensity focus ultrasound (HIFU) on the hydatid cysts of *Echinococcus granulosus*. **Methods** Totally 25 hydatid cysts with thin walls, in good texture and lesser than 50 mm in diameter, were selected from fresh sheep livers, and divided into 5 groups by the stratified sampling method. The control group was treated by common ultrasound. The experimental groups were treated with HIFU at a sound power of 100, 150, 200 and 250 W respectively by multilayer circular radiation around the cyst wall. The instant death rates of protoscolecesin the treated cysts were investigated by trypan blue exclusion assay. The activities of lactic acid dehydrogenase (LAD), alkaline phosphatase (AKP) in the cyst fluids were detected. **Results** The instant death rate of protoscolecesin the cysts was increased significantly with the elevation of sound power of HIFU ($F=38.00$, $P<0.01$). The activities of LAD in the treated groups were higher significantly than those in the control group ($F=14.75$, $P<0.01$); The activities of AKP in the treated groups were higher significantly than those in the control group ($F=12.00$, $P<0.01$). **Conclusion** The multilayer circular radiation of HIFU is effective to injure hydatid cysts of *Echinococcus granulosus*.

Key words: high intensity focus ultrasound; *Echinococcus granulosus*; hydatid

细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*)寄生于犬科食肉动物,其幼虫棘球蚴(hydatid)可寄生于人和多种食草动物,引起包虫病。目前包虫病的治疗仍面临较多困难,手术治疗是首选的方法,但若操作不当,可引起棘球蚴扩散,囊液所含的抗原性物质外溢可使机体发生过敏[1]。对处于病程早期或不能耐受手术的患者常采用药物治疗,目前常用苯并咪唑类药物,但其有效率仅为70%左右,治愈者约1/3,而且服药时间长,药物的副作用较大[2,3]。

基金项目: 国家自然科学基金(30371258)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371258)
作者简介: 王俊安,男,四川省乐山市人,博士研究生,讲师,主要从事包虫病方面的研究。E-mail:lswja1971@yahoo.com.cn
通信作者: 叶 彬,电话:(023)68485193, E-mail: yebina@sohu.com
收稿日期: 2008-09-10;**修回日期:** 2008-10-13

高强度聚焦超声（high intensity focused ultrasound，HIFU）治疗作为一种新兴的无创性治疗技术，已经广泛用于实性肿瘤的治疗。HIFU 技术是利用超声声束的可汇聚性、穿透性等物理特点，将体外低能量超声聚焦于体内肿瘤靶区处，通过产生瞬态高温效应、空化效应、机械效应等，使超声聚焦焦域处的肿瘤靶组织发生凝固性坏死，而周围组织极少或不受损伤，达到无创“切除”肿瘤的效果[4]。本研究拟通过体外实验评价 HIFU 杀伤棘球蚴的效果，探索高强度聚焦超声治疗包虫病的有效方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

羊肝采自青海省西宁市某屠宰场，取新鲜的感染棘球蚴的羊肝，选取囊壁较薄、触摸较柔软的棘球蚴囊作为实验材料。棘球蚴囊用冰盒立即送青海大学附属医院进行实验。棘球蚴囊的直径大小通过 B 型超声测量，直径 <50 mm。

JC 型聚焦超声治疗系统（Ⅰ类 B 型，重庆海扶技术有限公司设计制造）由青海大学附属医院提供。超声系统参数设计：探头直径 150 mm，以透镜聚焦，焦距为 110 mm。输出声功率 0～300 W，连续可调，声波频率 0.8 MHz，实验中全部采用连续波。OLYMPUS AU2700 全自动生化分析仪由青海大学医学院提供。

1.2 实验分组

由于本实验以及相关检测样本量会逐渐增加，考虑到实验组的均衡性，参照文献[5]，采用随机区组设计方法分组（因考虑到除 HIFU 照射功率外，棘球蚴囊大小也可能是影响效应的因素）。根据棘球蚴囊的大小不同分为 5 个区组，Ⅰ区组：棘球蚴囊直径 <10 mm；Ⅱ区组：棘球蚴囊直径为 10～20 mm；Ⅲ区组：棘球蚴囊直径为 20～30 mm；Ⅳ区组：棘球蚴囊直径为 30～40 mm；Ⅴ区组：棘球蚴囊直径为 40～50 mm。然后从每 1 个区组中随机抽出 1 个样本，组成 1 个实验组和 4 个对照组，每组各 5 个棘球蚴囊。

1.3 方法

将棘球蚴囊固定于聚焦超声实验专用的照射桶内，外包 1 层保鲜膜，以高强度超声波由下向上照射，聚焦于棘球蚴囊。聚焦超声照射方法：采用扫描线进行多层面的沿囊壁闭环扫描，层面间距均为 5 mm。4 个实验组的聚焦超声照射的声功率分别为 100、150、200、250 W；每个层面沿囊壁环形扫描 1 遍，环形扫描速度为 3 mm/s，照射时间 2～10 min。1 个对照组用 HIFU 治疗仪上锚定的定位超声仪（为 B 型诊断超声仪）照射 2 min，其声功率为 0.3～0.5 W，声波频率为 3.5 MHz。见图 1。

1.4 HIFU 照射效果检测

HIFU 照射后立即取出棘球蚴囊，抽取囊液充分摇匀后，涂片 3 张，台盼蓝染色计数原头蚴的死亡率，观察 3 个以上视野，计数 50 个原头蚴，并求出原头蚴死亡率的平均数。以原头蚴的平均死亡率作为效应指标。

原头蚴死亡率（%）=（死亡的原头蚴数/总原头蚴数）×100%

囊液中的酶活性检测：超声照射后立即取出棘球蚴囊，抽取囊液 2～5 ml，1 000 r/min 离心 5 min 后取其上清液送检。乳酸脱氢酶活性用 GENMED 乳酸脱氢酶（LDH）总量活性检测试剂盒进行测定。碱性磷酸酶活性用 GENMED 细胞碱性磷酸酶活性比色法定量检测试剂盒进行测定。生化检测试剂盒由上海杰美生物科技有限公司提供。

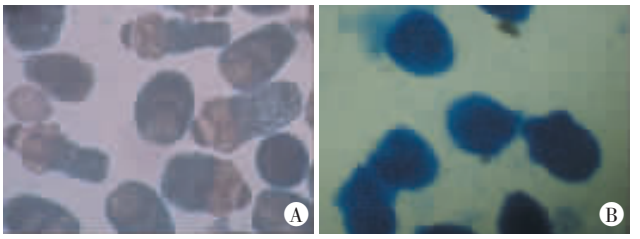
1.5 统计学分析

采用 SAS 8.2 统计软件进行方差分析。

2 结果

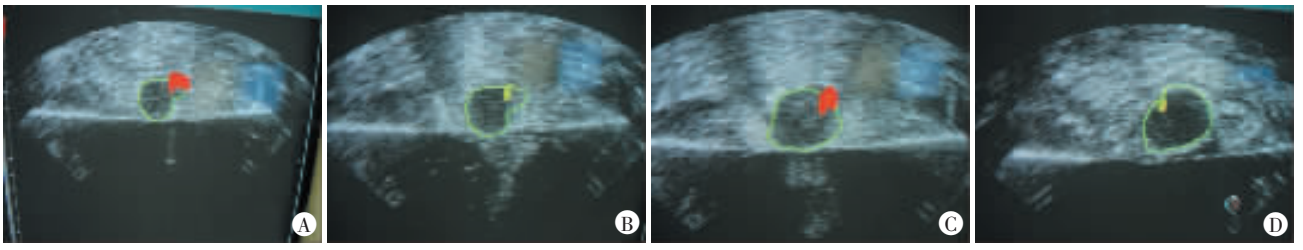
2.1 原头蚴的急性死亡率

HIFU 照射后原头蚴急性死亡，镜下观察发现死亡原头蚴经台盼蓝染色呈蓝色（图 2），原头蚴的急性死亡率见表 1，原头蚴的死亡率可以达到 80%。统计结果显示不同声功率 HIFU 照射实验组差别有统计学意义（$F=38.00$，$P<0.01$），即 HIFU 照射对原头蚴的死亡率有影响，随着扫描功率的增加原头蚴的急性死亡率也增加。经随机区组资料方差分析，在相同声功率 HIFU 照射下，由于棘球蚴囊直径区组差别有统计学意义（$F=5.13$，$P<0.05$），HIFU 致原头蚴死亡会受棘球蚴囊大小的影响，随着棘球蚴囊直径的增加原头蚴的急性死亡率降低。



A：对照组，活原头蚴未被台盼蓝染成蓝色；B：实验组，经 HIFU 照射后大部分死亡的原头蚴被台盼蓝染成深蓝色

图 2 HIFU 照射对原头蚴急性死亡率的影响 （×100）



绿色环形线示扫描时 HIFU 焦点的扫描路线，红色区域示扫描时焦点覆盖范围 A：HIFU 扫描的第 1 个层面，距包囊一侧 5 mm；B：HIFU 扫描的第 2 个层面，距第 1 个层面 5 mm；C：HIFU 扫描的第 3 个层面，距第 2 个层面 5 mm；D：HIFU 扫描的第 4 个层面，距第 3 个层面 5 mm

图 1 HIFU 多层面闭环扫描棘球蚴囊

2.2　乳酸脱氢酶的活性变化

HIFU 照射后囊液乳酸脱氢酶的活性变化见表 2。统计结果显示不同声功率 HIFU 照射的实验组差别有统计学意义($F=14.75$,$P<0.01$),即 HIFU 照射对棘球蚴囊囊液乳酸脱氢酶的活性有影响,随着 HIFU 功率的增加棘球蚴囊囊液乳酸脱氢酶的活性也增加。经随机区组资料方差分析,在相同声功率 HIFU 照射下,由于棘球蚴囊直径大小的区组差别无统计学意义($F=0.84$, $P>0.05$),未显示 HIFU 照射后棘球蚴囊囊液乳酸脱氢酶的活性会受棘球蚴囊大小的影响。

2.3　碱性磷酸酶的活性测定

HIFU 照射后囊液碱性磷酸酶的活性变化见表 3。统计结果显示不同声功率 HIFU 照射的处理组差别有统计学意义($F=12.00$,$P<0.01$),即不同声功率 HIFU 照射对棘球蚴囊囊液的碱性磷酸酶的活性有影响。随着 HIFU 声功率的增加棘球蚴囊囊液碱性磷酸酶的活性也增加。经随机区组资料方差分析,在相同声功率 HIFU 照射下,由于棘球蚴囊直径大小的区组差别无统计学意义($F=0.26$,$P>0.05$),未显示 HIFU 照射后棘球蚴囊囊液碱性磷酸酶的活性会受棘球蚴囊大小的影响。

表 1　HIFU 照射对原头蚴急性死亡率的影响(%,$\bar{x}\pm s$)

组别	棘球蚴囊直径(mm)				
	<10[b]	<20[b]	<30[b]	<40[b]	<50[b]
对照组	16.40±2.23	18.50±1.93	22.60±1.68	14.30±2.11	19.20±1.84
实验组[a]					
100 W	45.40±3.36	48.60±5.71	42.30±4.22	39.20±4.07	40.50±3.27
150 W	58.00±4.92	48.20±4.03	55.60±6.54	57.50±3.85	47.40±3.69
200 W	77.60±6.51	62.30±5.66	63.50±4.77	58.30±4.63	51.70±4.85
250 W	88.50±6.12	82.40±7.49	75.30±6.92	70.30±6.12	65.20±6.86

a: $F=38.00$, $P<0.01$,实验组组间比较; b: $F=5.13$, $P<0.01$, 5 个区组间比较

表 2　HIFU 照射对囊液乳酸脱氢酶活性的影响(U,$\bar{x}\pm s$)

组别	棘球蚴囊直径(mm)				
	<10	<20	<30	<40	<50
对照组	12.60±1.76	21.30±2.56	14.60±2.91	17.40±2.17	17.00±3.16
实验组[a]					
100 W	28.20±1.86	26.50±3.44	31.30±2.52	26.40±2.39	24.30±1.29
150 W	39.40±3.54	52.20±4.65	61.10±4.75	56.50±5.04	43.20±5.24
200 W	75.30±6.22	63.30±5.38	37.10±6.36	75.50±6.31	68.20±6.19
250 W	77.80±5.31	64.50±4.74	55.10±4.72	76.50±7.15	63.70±5.37

a: $F=14.75$, $P<0.01$,实验组组间比较

表 3　HIFU 照射对囊液碱性磷酸酶活性的影响(U,$\bar{x}\pm s$)

组别	棘球蚴囊直径(mm)				
	<10	<20	<30	<40	<50
对照组	14.60±2.97	13.90±1.88	13.20±1.65	16.50±1.27	17.80±2.03
实验组[a]					
100 W	51.30±3.81	52.10±4.99	43.70±3.28	45.30±5.15	52.60±3.78
150 W	72.30±5.29	64.60±5.17	59.10±6.01	63.60±4.77	54.80±5.54
200 W	68.20±3.71	73.70±3.72	75.40±4.99	59.30±7.89	69.60±6.92
250 W	74.90±6.67	76.30±7.06	77.70±3.48	84.20±9.53	73.20±4.72

a: $F=12.00$, $P<0.01$,实验组组间比较

3　讨论

目前 HIFU 已广泛用于临床实体肿瘤的治疗,它是利用超声声束的可汇聚性、穿透性等物理特点将体外较低能量超声聚焦于体内肿瘤靶区处,使靶区温度急骤升高,组织发生凝固性坏死,同时还能产生空化效应,将细胞拉成碎片。热效应和空化效应是 HIFU 损伤细胞的主要机制,HIFU 治疗方法是按照由生物学焦域(biological focal region,BFR)→束损伤→片损伤→块损伤的治疗原理,在组织中形成不同治疗深度的束损伤、片损伤和块损伤,从而实现完整"切除"组织块[6]。

由于囊性的棘球蚴与实体肿瘤的组织结构明显不同,本实验探索性地选择聚焦于囊壁的多层面环形照射方法照射棘球蚴囊。棘球蚴为囊性,由厚约 1 mm 的囊壁和囊内容物组成,囊内充满囊液和原头蚴等组成的棘球蚴砂。研究表明棘球蚴囊液是 HIFU 良好的传播媒介和热传导体[7],HIFU 在囊液中传播的声衰减和声吸收都较小,而热传导却很快。若 HIFU 聚焦于囊液内,囊液将把焦点部位的高强度的声强传向四周,不会产生明显的升温效应。基于上述原因,本研究选择聚焦于棘球蚴囊的囊壁,棘球蚴囊囊壁能产生明显的瞬间高温效应,且采用多层面的沿囊壁的环形照射,棘球蚴囊的囊壁较薄,照射的环形线沿着囊壁走行,焦域能覆盖整个囊壁的厚度。按照 HIFU 生物学焦域治疗理论只要层面间距选择恰当,损伤区可以全部覆盖棘球蚴囊的囊壁,破坏囊壁的角皮层,从而杀死整个囊壁内的活细胞。

原头蚴和生发层细胞是棘球蚴的活性细胞,且原头蚴是引起继发感染的源头,所以将原头蚴死亡率作为效应指标能反映 HIFU 照射后的棘球蚴的损伤程度。原头蚴主要附着在囊壁上,HIFU 照射是沿着囊壁进行的,原头蚴受到瞬间高温效应的作用而死亡,随之脱落而出现在囊液中被检测到。死亡的原头蚴部分来源于囊壁,原头蚴的死亡也就暗示着生发层细胞的损伤。实验组的原头蚴急性死亡率未达到 100%,其原因可能是部分囊液中损伤较轻的原头蚴需要一段时间才会发生死亡,也可能是部分原头蚴离焦点距离远未发生死亡。此外,我们进行的 HIFU 杀伤离体原头蚴实验证实 HIFU 对原头蚴有迟发的损伤效果,即经 HIFU 处理后有部分原头蚴在培养过程中逐渐死亡,而相同条件培养的对照组原头蚴生长良好。

除原头蚴的死亡率外,本实验还以生化方法检测囊液的组分变化。乳酸脱氢酶为细胞糖代谢的关键酶,存在于胞液中;碱性磷酸酶是细胞内质网功能的标志酶[8]。研究表明,HIFU 空化效应使能量被聚焦到极小的体积内,在气泡爆裂和振动时产生强烈的作用,改变细胞膜的脂质双分子层结构,增加细胞膜、线粒体膜、内质网膜等的通透性,可引起肿瘤细胞以及微生物

的损伤和破坏作用[9]。本实验观察到HIFU照射棘球蚴后囊液内的乳酸脱氢酶、碱性磷酸酶活性升高,可能是这2种酶从损伤的棘球蚴细胞内释放出来所致。

本研究表明HIFU照射有杀灭部分原头蚴的效应,可导致囊液乳酸脱氢酶和碱性磷酸酶活性升高,显示了HIFU对棘球蚴的损伤效果,为进一步进行HIFU杀伤实验动物体内棘球蚴的研究提供了资料,为研究HIFU治疗包虫病奠定了基础。

参考文献:

[1] Brunetti E, Filice C, Meroni V, *et al*. Comment on percutaneous treatment of liver hydatid cysts[J]. AJR Am J Roentgenol,2006,186(4):1198-1199.
[2] 柴君杰,肖树华,高芳华, 等. 囊型包虫病药物治疗研究[J]. 医学研究杂志, 2006, 35(4): 29-30.
[3] Schipper H G, Kager P A. Diagnosis and treatment of hepatic echinococcosis: an overview[J]. Scand J Gastroenterol Suppl, 2007, (241): 50-53.
[4] 冀 敏, 赵 洪, 滑炎卿. 聚焦超声波治疗肿瘤的物理机制及有关问题探讨[J]. 上海医学影像, 2005, 14(4): 310-312.
[5] 颜 虹. 医学统计学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005: 136-139.
[6] 李发琪, 王智彪, 杜永洪, 等. 高强度聚焦超声"切除"组织的剂量学研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2006, 23(4): 839-843.
[7] 李发琪, 张 檣, 杜永洪, 等. 高强度聚焦超声治疗剂量对组织温升影响的研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2003, 20(3): 466-471.
[8] 常淑芳, 朱深银, 胡 凯, 等. 高强度超声治疗对肿瘤组织内酶活性的影响[J]. 中国超声医学杂志, 2002, 18(7): 486-488.
[9] 张 婷, 李发琪. HIFU治疗中的空化效应及其应用[J]. 中国医学影像技术, 2007, 23(7): 1097-1099.

(编辑 张 维)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)14-1336-01

长期或间歇吸入布地奈德干预婴幼儿喘息发作的临床对照分析

孙 萍 (南昌大学第一附属医院儿科,南昌 330006)

婴幼儿喘息是3岁以下患儿常见临床表现,反复发作会严重影响其生活质量。哮喘可在婴幼儿期表现为喘息,病毒感染也可喘息,两者在早期难以鉴别[1]。我们对117例患儿进行干预治疗,以探讨干预治疗后能否减少喘息发生的急性症状及复发性喘息发生,以利于临床对该病进行合理防治。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2005年1月至2006年12月我院门诊或住院部收治的喘息发作的婴幼儿,选择符合下列条件之一的病例117例:①喘息反复发作≥3次;②喘息发作不足3次,但患儿具有特应性体质,如湿疹、过敏性鼻炎史或一级亲属有哮喘、过敏性鼻炎、变异性皮炎之一;③喘息首次发作,但临床诊断为毛细支气管炎。除外支气管异物、结核感染、先天性喉喘鸣及先天性心脏病等。

1.2 方法

117例患儿中男性76例,女性41例,4个月至1岁47例,~2岁35例,~3岁35例。分为3组,每组39例:长期吸入布地奈德组(A组)、间歇吸入布地奈德组(B组)、对照组(C组)。A组在喘息急性发作控制后开始采用有活瓣面罩的储雾罐吸入布地奈德气雾剂(普米克气雾剂,阿斯利康公司生产),开始每日2次,每次1喷(含布地奈德200 μg),3个月后减为每日1次,根据临床表现用6个月至1年。B组在喘息急性发作控制后继续选用布地奈德混悬液(普米克令舒,阿斯利康公司生产),用德国百瑞公司生产的PARI BOY空气压缩泵机进行雾化吸入,每次1 μg ×1/3支或1/2支(含布地奈德333 μg或500 μg)+生理盐水1 ml,每日2次,每次吸入时间5~10 min,1周停用,以后一旦接触过敏源如冷空气或出现咳嗽、流涕,即家属所谓的"感冒"早期,不管是否伴喘息,立即再次雾化吸入上述剂量布地奈德混悬液,每日2次,至症状消失后1~2 d,一般2~5 d。C组在喘息急性发作控制后不作特殊治疗。病例在喘息急性发作时均可雾化吸入布地奈德混悬液+硫酸特布他林液(博利康尼)或静脉运用皮质激素加常规治疗(控制感染、化痰等);由专人登记管理各组患儿开始干预治疗后1年内喘息例数、发作次数、发作天数和临床分度。每1~2个月随访1次。

1.3 统计学分析

采用SPSS 11.5统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,治疗前后比较采用配对 t 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验。

2 结果

A、B组与C组比较喘息发生率低,A组10例(25.64%),B组9例(23.08%),C组20例(51.28%),差异有统计学意义($\chi^2=5.42$、5.49, $P<0.05$);但A组与B组比较差异无统计学意义($\chi^2=0.07$, $P>0.05$)。A、B组均较C组发作次数减少,A组(1.70±0.67)次,B组(1.67±0.52)次,C组(2.25±0.85)次,差异有统计学意义($t=2.23$、2.45, $P<0.05$);但A组与B

(下转1348页)

作者简介:孙 萍,女,江西省万年县人,主任医师,主要从事小儿呼吸系统疾病方面的研究,发表论文20余篇。电话:(0791)8692645,E-mail:supping158@163.com

收稿日期:2008-10-14;修回日期:2009-01-16