论著

文章编号:1000-5404(2011)02-0116-03

首次低剂量超声辐照对 HIFU 消融兔肝 VX2 瘤的影响

邹海蓉,邹建中,欧 霞,王 雁,张 奕 (400016 重庆,重庆医科大学生物医学工程系,省部共建超声医学工程国家重点实验室,超声医学工程重庆市市级重点实验室)

【摘要】 **目的** 探讨首次辐照不同低剂量的超声对 HIFU 消融兔肝 VX2 瘤的影响。**方法** 45 只荷瘤兔按随机数字表法分为 3 组:A 组首次辐照功率为 0 W,B 组 80 W,C 组 100 W;均于第 2 天接受声功率为 180 W 的消融治疗。**结果** 产生相同的凝固性坏死体积 B 组所用的时间较 A 组少($P<0.05$);B 组与 C 组达到消融坏死的时间无明显差异,但 C 组所产生的凝固性坏死体积更大($P<0.05$);3 组比较,A 组的能效因子(energy efficiency factor, EEF)值(46.43±13.67)最大,C 组最小(7.01±1.33, $P<0.05$)。**结论** 首次低剂量辐照的功率越大,增效作用越明显。

【关键词】 高强度聚焦超声;低剂量超声辐照;消融;增效
【中图法分类号】 R73-354;R730.5;R735.7 【文献标志码】 A

Effect of firstly low-dose ultrasound irradiation on ablation of rabbit liver VX2 tumor with high intensity focus ultrasound therapy

Zou Hairong, Zou Jianzhong, Ou Xia, Wang Yan, Zhang Yi (State Key Laboratory of Ultrasound Engineering in Medicine Co-founded by Chongqing and Ministry of Science and Technology, Chongqing Key Laboratory of Ultrasound in Medicine and Engineering, Faculty of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effect of ultrasound irradiation at different low doses on the curative effect of high intensity focus ultrasound (HIFU) on rabbit VX2 liver tumor. **Methods** Forty-five rabbits bearing VX2 tumors at a diameter of 1.2 to 2.2 cm were randomly and equally divided into 3 groups. Group A received only HIFU irradiation (180 W) without firstly low-dose irradiation. Group B and group C both received firstly low-dose irradiation (80 and 100 W respectively) and then received HIFU ablation (180 W) in 24 h later. The tumor mass was observed with light and electron microscopy before and after ablation. TCC staining was used to evaluate the volume of coagulation necrosis and to calculate the energy efficiency factor (EEF). **Results** Group B spent lesser time than group A for the same volume of coagulation necrosis ($P<0.05$), but group B and C had no significant difference in the time for coagulation necrosis though group C had a larger volume of coagulation necrosis ($P<0.05$). Compared the 3 groups, the EEF of group A (46.43±13.67) was maximal ($P<0.05$), and that of group C (7.01±1.33) was minimal ($P<0.05$). **Conclusion** The greater power of the first irradiation is, the more obvious efficiency will be achieved. However, it is not wise to blindly increase the power of the first irradiation in oreder to guarantee the safety in clinical HIFU therapy.

【**Key words**】 high intensity focused ultrasound; firstly low-dose ultrasound irradiation; ablation; efficiency

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (30830040). Corresponding author: Zou Jianzhong, Tel: 86-23-68485022, E-mail: zoujz@haifu.com.cn

高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)治疗肝癌已得到临床的证实[1]。但一次性消融所用的功率高、时间长,以至于并发症多。先用低剂量的超声辐照至靶组织发生病理改变,1 d 后再进行 HIFU 消融治疗,可以达到缩短治疗时间、减少治疗剂量、提高 HIFU 疗效的目的[2]。由于首次辐照剂量不同,对靶区就会产生不同的影响,本实验就针对不同低剂量的首次辐照对 HIFU 消融兔肝 VX2 肿瘤的影响进行了研究,拟探讨首次低剂量超声辐照提高 HIFU 疗效的机制。

【基金项目】 国家自然科学基金重点项目(30830040)
【通信作者】 邹建中,电话:(023)68485022, E-mail:zoujz@haifu.com.cn

1 材料与方法

1.1 实验设备

采用重庆海扶(HIFU)技术有限公司生产的 JC 200 型聚焦超声肿瘤治疗系统(海扶®超声聚焦刀)。该系统包括:循环脱气水装置、高频功率发生器、组合治疗头、六自由度运动系统、计算机控制系统和二维超声监控系统。治疗头参数:频率 1.0 MHz,焦距 156 mm。

1.2 兔肝 VX2 肿瘤模型建立

纯种新西兰大白兔 45 只,雌雄不拘,3 ~ 4 月龄,体质量 2.0 ~ 2.5 kg(重庆医科大学实验动物中心提供);VX2 种兔 1 只(重庆医科大学医学超声工程研究所提供)。种兔肌注陆眠灵麻醉,无菌下剥离肿瘤,取瘤体边缘生长旺盛无坏死的肿瘤组织切成 1 mm^3 左右,放入生理盐水中备用。实验兔 45 只全麻后无菌条件下沿上腹正中切口入腹,露出肝脏,于肝左中叶距其下缘约 1 cm 处用眼科镊穿破肝组织形成窦道,采用包埋法将瘤块包埋其中,纱布压迫止血后清创缝合即制成荷瘤兔。海扶®超声聚焦刀机载超声扫描观察肿瘤生长情况,接种后 20 d 左右观察肿瘤直径大小为 1.2 ~ 2.2 cm,提示建模成功。

1.3 实验方法

于接种后 20 d 进行实验。术前 1 d 用 8% 硫化钠将荷瘤兔腹部脱毛,禁食 12 h 后,在全麻状态下将荷瘤兔俯卧固定于治疗床上接受超声辐照。45 只荷瘤兔按随机数字表法平均分为 3 组,每组 15 只,A 组首次辐照声功率为 0 W,B 组为 80 W,C 组 100 W,均按"线-面-体"方式由深至浅逐层扫描肿瘤 1 遍,两层间距 4 mm,两线间距 5 mm,扫描速度均为 3 mm/s;均于 24 h 后接受 HIFU 消融辐照,3 组消融辐照功率均为 180 W,均采用直线扫描,线长 10 mm,靶点距体表距离均为 10 mm,靶区出现稳定的回声增强时立即终止辐照[3]。

1.4 观察内容

①首次低剂量超声辐照后 24 h(即 HIFU 消融辐照前),3 组各解剖 5 只荷瘤兔,取肿瘤组织行光镜与电镜检查。②余下每组各 10 只荷瘤兔接受 HIFU 消融辐照,记录其辐照的时间。③消融后即刻,处死余下的荷瘤兔,取辐照区域组织,置于 37 ℃ 的氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液中染色,被破坏的组织呈苍白色[4]。测量凝固性坏死的长径、宽径和厚径,凝固性坏死的体积(mm^3) = (4/3)π × (1/2)长径 × (1/2)宽径 × (1/2)厚径[5]。根据公式[6] 能效因子(energy efficiency factor, EEF)(J / mm^3) = P × t/V 计算能效因子,式中 EEF 指损伤单位体积的肿瘤(组织)所需的超声能量[7];P (W) 为 HIFU 消融辐照声功率;t (s) 为 HIFU 消融辐照时间;V (mm^3) 为坏死体积。④病理检查:取消融辐照后的肿瘤组织行光镜与电镜检查。

1.5 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件,采用完全随机设计资料的 t 检验。

2 结果

2.1 3 组凝固性坏死体积、HIFU 消融辐照时间及其 EEF 的比较

A 组与 B 组靶区所产生的凝固性坏死体积无明显差异($P > 0.05$),但 A 组所需的时间明显长于 B 组($P < 0.05$);B 组与 C 组比较,使靶区出现稳定增强回声所需的消融辐照时间无明显差异($P > 0.05$),但 C 组所产生的凝固性坏死体积更大;3 组相比较,EEF 值 A 组最大,C 组最小,提示随着首次低剂量超声辐照的功率增高,EEF 值明显降低($P < 0.05$)。说明 B、C 两组的首次低剂量超声辐照后明显提高了 HIFU 消融肿瘤的效率;且 C 组增效作用最明显,明显缩短了消融辐照时间,即随着首次辐照功率的增高,对 HIFU 消融的增效作用越明显(表 1)。

表 1　3 组凝固性坏死体积、HIFU 消融辐照时间及其 EEF 的比较
($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	首次辐照功率	凝固性坏死体积(mm^3)	HIFU 消融辐照时间(s)	EEF (J/mm^3)
A 组	0 W	78.88 ± 12.42	34.67 ± 16.71	46.43 ± 13.67
B 组	80 W	123.76 ± 41.86	17.16 ± 4.95[a]	11.83 ± 5.39[a]
C 组	100 W	496.70 ± 205.70[ab]	13.56 ± 6.97[a]	7.01 ± 1.33[ab]

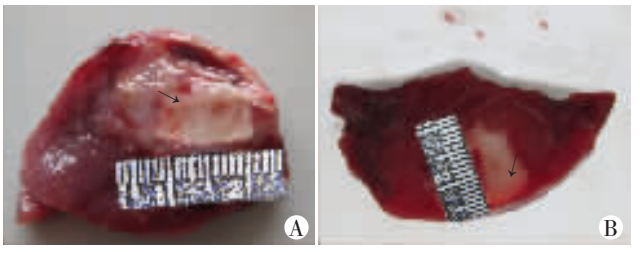
a:$P < 0.01$,与 A 组比较;b:$P < 0.01$,与 B 组比较

2.2 肉眼观察

瘤体呈类球形或椭球形,为灰白色鱼肉样组织,与周围正常肝组织边界清,但未见确切包膜,部分内部出现液化坏死。HIFU 消融辐照后,经 TTC 染色,靶区内均可见椭球形苍白色 TTC 不着色区,即凝固性坏死区,与周围未辐照组织区分界清楚(图 1)。

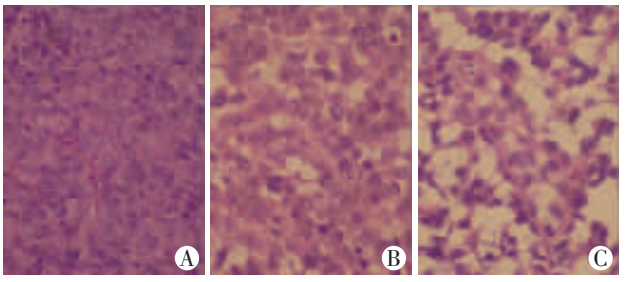
2.3 病理组织学观察

首次低剂量超声辐照 24 h 后(即再次辐照消融前):光镜下,A 组 VX2 肿瘤细胞正常,呈团片状分布,细胞异型性大,核大深染,见较多核分裂象;B 组肿瘤细胞明显肿胀,核大,细胞质疏松淡染,细胞间隙明显增宽,内见空泡状改变;C 组肿瘤细胞细胞质淡染更明显,细胞内外见大小不等空泡,及少量核固缩细胞(图 2)。



A:瘤体内凝固性坏死为箭头所示的苍白区,与周边组织分界清楚;B:TTC 染色显示的瘤体凝固性坏死区,箭头示未红染的苍白区

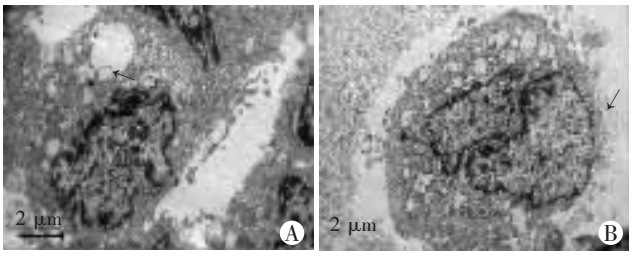
图 1　C 组兔肝肿瘤体内凝固性坏死区大体标本



A:A 组(首次辐照为 0)肿瘤细胞大小形态正常;B:B 组(首次辐照功率 80 W)肿瘤细胞轻至中度水肿,可见"空泡"样改变;C:C 组(首次辐照 100 W)肿瘤细胞重度水肿,内见大量"空泡"改变

图 2　3 组兔肝肿瘤消融前的病理组织图　(HE ×400)

电镜下,A组瘤细胞大小不等,核大畸形,见核分裂象,异染色质丰富;B组瘤细胞细胞质内大量线粒体肿胀、内质网扩张,细胞质内外见少许空泡;C组细胞器肿胀更明显,细胞质内见大小不等的空泡,部分细胞核固缩,染色质边集,还可见部分细胞膜"刀切样"缺损,细胞间隙增宽(图3),另可见少许细胞膜溶解,细胞内见脂滴。



A:肿瘤细胞损伤严重,细胞内见空泡(箭头示);B:肿瘤细胞的不可逆损伤,细胞膜"刀切"样损失(箭头示)

图3 透射电镜观察C组兔肝肿瘤消融前(首次辐照100 W 1 d后)的超微结构

HIFU消融辐照后,3组靶区组织均发生了典型的凝固性坏死:光镜下,肿瘤细胞核固缩、深染,肿瘤间质内见大量红细胞溢出;电镜下,凝固性坏死区域内细胞已经不可逆死亡,肿瘤细胞膜消失,细胞器破坏,核膜消失。

3 讨论

临床中,HIFU一次性消融良恶性肿瘤疗效肯定,但存在一个突出的问题就是疗效常较低,为了达到治疗目的,常增大功率与治疗时间,结果周边脏器损伤等严重并发症亦随之而来,如何提高HIFU治疗疗效成为国内外学者研究的焦点,特别是在治疗深部肿瘤、较大肿瘤方面。研究证实,改变组织声环境可以提高HIFU治疗的疗效[8]。如何改变组织的声环境?国内外研究的最多的就是将碘油[9]、微泡超声造影剂[10]、纳米羟基磷石灰石[11]及脂肪乳剂[12]等外界物质引入靶组织内,但这些都是外界物质,引入操作的不便及引入物的副作用等限制了其发展。于是,我们提出了用低剂量超声辐照使靶组织有所损伤,以达到改变其自身声环境的目的。前期试验研究已经证实:通过首次低剂量的超声辐照后第2天再进行HIFU消融治疗可以提高HIFU消融肿瘤的效率。但首次辐照的剂量与增效HIFU之间有何关联呢?这就是本研究想要了解和证实的问题。

本实验结果中,B、C组的EEF值明显低于A组,提示首次辐照低剂量超声能显著提高HIFU消融肿瘤的疗效,其机制可能为首次低剂量超声辐照改变了靶区的声环境,增强了对超声能量的吸收[2]。低剂量超声辐照后1 d发生了一系列病理损伤改变,如不明"空泡"的增多、病理脂滴的出现及包膜的缺损等,这些会明显改变靶区组织的声环境。随着首次辐照功率的增加,其增效作用越明显,可能与首次低剂量超声辐照的功率增大所致的靶区组织病理损伤改变增加有关,病理损伤改变增加,声环境改变也越明显,超声能量就越容易沉积在组织内,越容易在肿瘤内形成较大的凝固性坏死。但是,并不是首次辐照功率越大越好,功率过大,其安全性就会受到威胁[13]。

本实验仅从组织的病理学改变方面分析了首次低剂量超声辐照后的增效作用,尚缺少其引起的声环境改变的其他证据,其具体的增效机制有待进一步探索。

参考文献:

[1] Dubinsky T J, Cuevas C, Dighe M K, *et al*. High-intensity focused ultrasound: current potential and oncologic applications [J]. AJR Am J Roentgenol, 2008, 190(1): 191-199.

[2] 张奕, 陈菲, 邹建中, 等. 高强度聚焦超声二次辐照兔肝VX2移植瘤的试验研究[J]. 中国超声医学杂志, 2010, 26(5): 400-403.

[3] Rabkin B A, Zderic V, Crum L A, *et al*. Biological and physical mechanisms of HIFU-induced hyperecho in ultrasound images[J]. Ultrasound Med Biol, 2006, 32(11): 1721-1729.

[4] 常淑芳, 顾美礼, 伍烽, 等. 氯化三苯基四氮唑染色在高强度超声生物学焦域观测中的应用[J]. 中国超声医学杂志, 2000, 16(9): 641-644.

[5] ter-Haar G, Rivens I, Chen L, *et al*. High intensity focused ultrasound for the treatment of rat tumours[J]. Phys Med Biol, 1991, 36(11): 1495-1501.

[6] 刘宝琴, 熊树华, 王智彪, 等. 体外不同频率高强度聚焦超声的生物学焦域[J]. 中国超声医学杂志, 2002, 18(6): 417-420.

[7] 李发琪, 杜永洪, 王智彪, 等. HIFU体外块"切除"动物肝脏、肾脏和肌肉的剂量研究[J]. 中国超声医学杂志, 2005, 21(4): 252-255.

[8] Zhang L, Fan W J, Huang J H, *et al*. Comprehensive sequential interventional therapy for hepatocellular carcinoma [J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(19): 2292-2298.

[9] 肖雁冰, 梁志刚, 孙丽君, 等. 碘化油增强HIFU损伤离体子宫肌瘤效果的实验研究[J]. 中国超声医学杂志, 2009, 25(8): 735-737.

[10] Yu T, Hu D, Xu C. Microbubbles improve the ablation efficiency of extracorporeal high intensity focused ultrasound against kidney tissues [J]. World J Urol, 2008, 26(6): 631-636.

[11] 刘丽萍, 肖子文, 肖雁冰, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(18): 1843-1845.

[12] 肖雁冰, 肖子文, 刘丽萍, 等. HIFU联合HL-1损伤正常兔肝脏组织的体内实验研究[J]. 中国超声医学杂志, 2005, 21(2): 96-99.

[13] Coussios C C, Farny C H, Haar G T, *et al*. Role of acoustic cavitation in the delivery and monitoring of cancer treatment by high-intensity focused ultrasound (HIFU) [J]. Int J Hyperthermia, 2007, 23(2): 105-120.

(收稿:2010-08-11 修回:2010-09-17)

(编辑 龙 亮)