DOI:10.16016/j.1000-5404.201509158

低声压超声调控微泡空化对大鼠 Walker-256 肿瘤血管效应的初步研究

董小小[1],高文宏[1],王 菲[2],高顺记[1],刘 政[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院超声科[1];650000 昆明,昆明医科大学第一附属医院超声科[2])

[摘要] **目的** 探讨低声压超声调控的微泡空化对大鼠 Walker-256 肿瘤产生的血管效应。**方法** 健康雄性 SD 大鼠 26 只,双侧大腿内侧细胞接种法移植 Walker-256 肿瘤 52 个,利用随机数字表法进行分组后,分别给予不同强度的治疗声压,即假照组($n=6$)、200 kPa 组($n=12$)、400 kPa 组($n=10$)、600 kPa 组($n=12$)、800 kPa 组($n=12$)。超声治疗占空比 1%,治疗时间 5 min。各不同声压治疗组中半数肿瘤在超声辐照同时经尾静脉注射 0.1 mL 脂质微泡。治疗前后分别进行超声造影,利用 Adobe Photoshop 软件对图像进行灰阶定量分析,得到肿瘤造影峰值平均灰阶值。治疗结束后获取肿瘤标本行病理检查。**结果** 假照组和各实验组在治疗前后的超声造影分析结果显示,肿瘤造影峰值平均灰阶值差异无统计学意义($P>0.05$),但病理检查发现 600 kPa 组肿瘤组织血浆外渗和轻度水肿,800 kPa 组肿瘤组织明显出血、水肿。**结论** 低声压超声联合微泡对大鼠 Walker-256 肿瘤的血流灌注影响不大,但 600~800 kPa 声压可引起血管通透性的增加。

[关键词] 低声压超声;微泡;肿瘤;血管效应

[中图法分类号] R454.3;R730.23;R944.9 [文献标志码] A

Vascular effect of rat Walker-256 tumor induced by low-pressure-amplitude ultrasound with microbubbles

Dong Xiaoxiao[1], Gao Wenhong[1], Wang Fei[2], Gao Shunji[1], Liu Zheng[1] ([1]Department of Ultrasonography, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Ultrasonography, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan Province, 650000, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the vascular effect of rat Walker-256 tumor induced by low-pressure-amplitude ultrasound (US) with microbubbles. **Methods** Fifty-two Walker-256 tumors in 26 male SD rats were treated with therapeutic ultrasound at 4 different acoustic pressures: 200 kPa ($n=12$), 400 kPa ($n=10$), 600 kPa ($n=12$), 800 kPa ($n=12$) or sham exposure ($n=6$) for 5 min. The duty cycle was set at 1%. For half of the tumors in every treatment group, 0.1 mL microbubbles were administered intravenously during US exposure. The tumor blood perfusion was imaged with contrast-enhanced US (CEUS) before and after treatment. The gray scale value (GSV) of tumor CEUS was quantified with Adobe Photoshop. All tumors were harvested for histological examination. **Results** There was no significant difference in GSV before and after treatment in all the groups ($P>0.05$). Plasma extravasation and slight tissue edema were observed in the tumors treated with 600 kPa US, and significant hemorrhage and tissue edema were found in the tumors treated with 800 kPa US, with or without microbubble administration during US exposure. **Conclusion** Low-pressure-amplitude US cannot induce significant changes of blood perfusion in rat Walker-256 tumor, but the tumor microvascular permeability is increased at the acoustic pressure of 600~800 kPa.

[基金项目] 国家自然科学基金科学仪器专项项目(81227004);国家高技术研究发展计划项目(863 计划,2012AA022702)

[通信作者] 刘 政,E-mail:liuzhengs@hotmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160309.0941.001.html(2016-03-09)

[**Key words**] low-pressure-amplitude ultrasound; microbubble; tumor; vascular effect

Supported by the Device Special Program of Natural Science Foundation of China (81227004) and the National High-tech R&D Program (863 Program, 2012AA022702). Corresponding author: Liu Zheng, E-mail: liuzhengs@hotmail.com

低峰值负压(简称声压)、低强度超声激励的微泡空化效应多被应用于肿瘤的靶向药物释放研究[1-3],然而,以往对其在肿瘤血管效应的研究主要集中在肿瘤药物浓度[4]和伊文思蓝染料通透性示踪等方面[2,5],对于这种效应可能产生的肿瘤整体血流灌注情况和病理变化研究却较少。已知肿瘤化疗敏感性差的重要原因是肿瘤组织药物浓度低和药物渗透性差,其原因与肿瘤乏血供相关[6-8]。前期研究发现,高声压(即峰值负压2.6~4.8 MPa)脉冲式超声联合微泡可以毁损动物肿瘤微血管,形成血肿和组织水肿,并阻断肿瘤的整体血液循环[9-11],但1.0 MPa的低声压却可能刺激兔VX2肿瘤的血流灌注增加[11]。基于此,为了进一步了解低强度超声激励微泡对肿瘤血流灌注的影响,本实验中采用不同低声压超声调控的微泡空化刺激大鼠Walker-256肿瘤,拟通过超声造影分析其血流灌注变化,并病理观察其血液内容物渗出情况。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性5周龄SD大鼠26只,体质量150~180 g,由第三军医大学新桥医院实验动物中心提供,饲养环境为清洁级。

1.2 设备与试剂

Vevo 2100(加拿大,VisualSonics公司生产)型高分辨率小动物超声仪,采用Vevo LAZR成像系统软件v1.6.0,本实验中使用大鼠探头MS-250,探头发射中心频率为20 MHz,配有肿瘤超声造影成像模式。

新型数字化超声声孔仪实验样机(深圳市威尔德医疗电子有限公司生产),治疗头采用单晶片圆形、非聚焦换能器,直径约2.5 cm,发射频率为1.0 MHz。声压值采用水听器法的声学检测系统(HNC-0400,ONDA公司)检测,100~1 500 kPa可调。本实验采用脉冲重复频率100 Hz,占空比1%,峰值负压采用200、400、600、800 kPa 4档。

造影剂微泡采用第三军医大学新桥医院超声科研制的"脂氟显"脂质微泡[9-10],外观呈乳白色凝乳状,其核心气体为全氟丙烷,微泡浓度为$(4\sim9)\times10^9$/mL,98%粒径<8 μm,平均粒径为2 μm。本实验中将0.05 mL造影剂微泡用无菌生理盐水稀释至1 mL,浓度为$(2\sim4.5)\times10^8$/mL。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠Walker-256皮下移植瘤模型的建立[9-10]

Walker-256细胞(由中科院医学药物研究所提供)于37 ℃水浴箱中复苏,加入含10%标准胎牛血清的RPMI1640培养基,在37 ℃、含5% CO_2的孵箱中培养、传代、增殖,以PBS稀释调整细胞悬液浓度为$(1\sim1.5)\times10^7$/mL。大鼠双侧大腿内侧区备皮、碘伏消毒后,取Walker-256肿瘤细胞悬液0.2 mL接种于皮下。注射针退出后以无菌棉球压迫穿刺点止血,并防止肿瘤细胞悬液漏出。

1.3.2 实验分组

待肿瘤生长至直径约1.0 cm时,利用随机数字表法对SD大鼠进行分组,分别给予不同强度的治疗声压,即分为假照组($n=6$)、200 kPa组($n=12$)、400 kPa组($n=10$)、600 kPa组($n=12$)、800 kPa组($n=12$),其中,各治疗组内一半肿瘤在治疗时注射微泡,另一半注射等量生理盐水。

1.3.3 常规超声及超声造影检查

荷瘤大鼠以3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,仰卧位固定,肿瘤生长处备皮后充分暴露,并建立尾静脉通道。应用常规二维超声及彩色多普勒血流成像,观察肿瘤大小、数目及回声特征,并选择血流信号丰富的肿瘤切面测量大小,同时进行造影。图像深度、总增益在整个实验过程中保持不变。造影时造影剂微泡剂量为0.05 mL稀释后的"脂氟显"溶液,经尾静脉团注后,跟注1 mL生理盐水冲管,数字化储存动态造影图像。

1.3.4 超声空化治疗

实验组按选取的超声切面方向分别予以200、400、600 kPa和800 kPa声压的超声辐照肿瘤,辐照时间为5 min。每只荷瘤鼠有2个肿瘤,随机选取一侧在超声辐照过程中不注射微泡,注射0.1 mL生理盐水,另一侧在辐照的同时经尾静脉缓慢注射微泡溶液0.1 mL,注射结束后跟注1 mL生理盐水冲管。假照组注射0.1 mL生理盐水,超声假照。所有治疗在超声造影后10 min进行(超声观察实验动物外周血管内均未见明显微泡)。治疗或假照结束后即刻再次行超声造影检查,并储存动态造影图像。

1.3.5 病理检查

造影结束后,静脉推注过量麻醉剂处死实验动物,即刻取出肿瘤组织标本,置于4%多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋切片,HE染色后光镜下

观察。

1.3.6　超声造影影像分析　　使用小动物超声仪自带的软件分析肿瘤治疗前后各时间点动态造影影像,以肿瘤病灶整体平均强度作出时间-强度曲线,在曲线上读出达峰时间,并将此刻的静态增强图像以 TIF 格式输出,然后用 Adobe Photoshop CC 的直方图功能对其进行灰阶定量分析,即选取整个肿瘤区域作为取样区,读取肿瘤造影峰值平均灰阶值(gray scale value, GSV)并进行对比[10]。

1.4　统计学分析

应用 SPSS 19.0 统计软件。各组肿瘤治疗前后造影峰值 GSV 均以 $\bar{x} \pm s$ 表示;各组内治疗前后比较采用配对样本 t 检验;治疗前及治疗后的组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。

2　结果

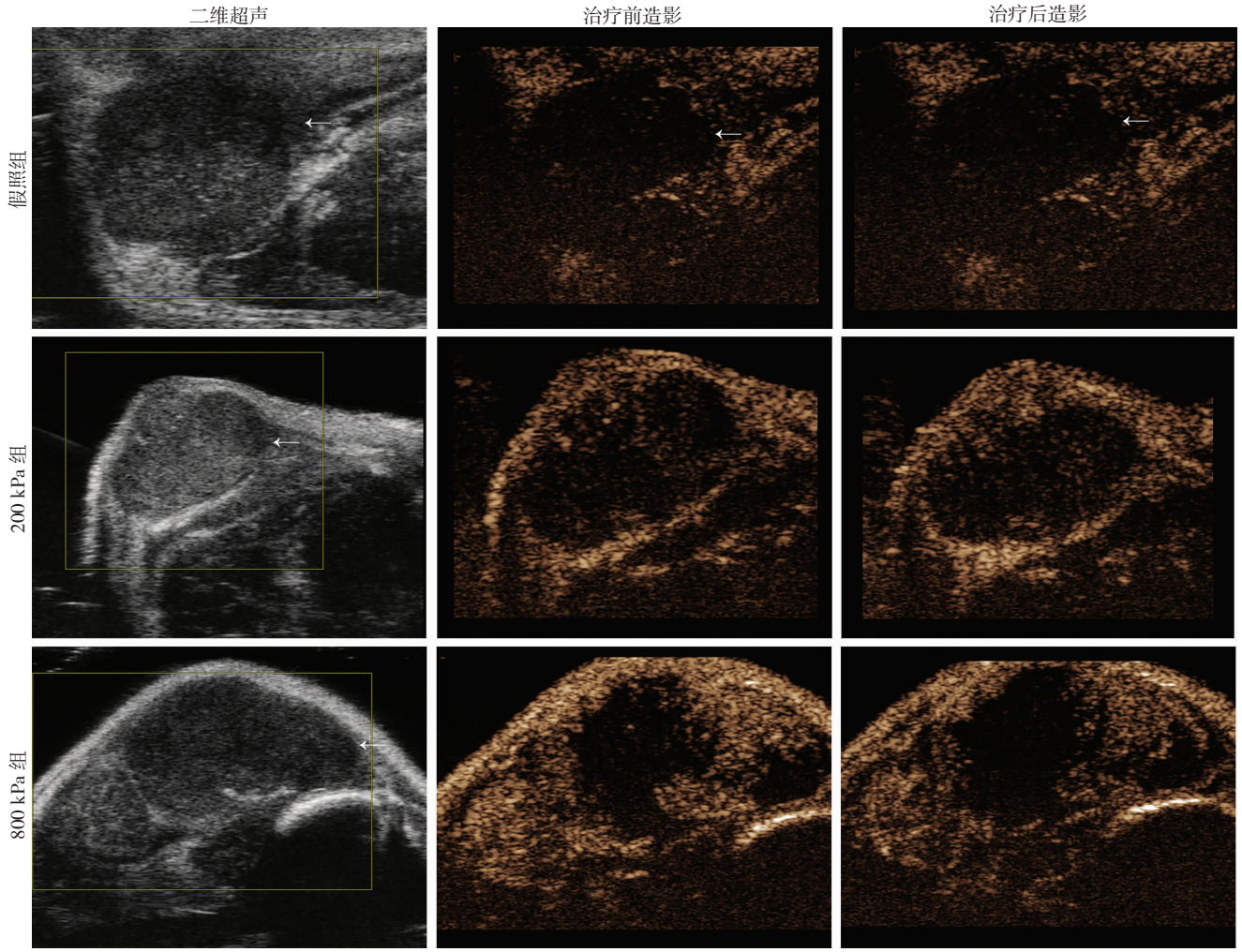
2.1　大鼠 Walker-256 皮下移植瘤模型建立结果

26 只大鼠双侧大腿内侧皮下注射肿瘤细胞悬液 6~7 d 后,共可见 52 个肿瘤生长,肿瘤最大径范围 1~2 cm。

2.2　肿瘤超声造影结果

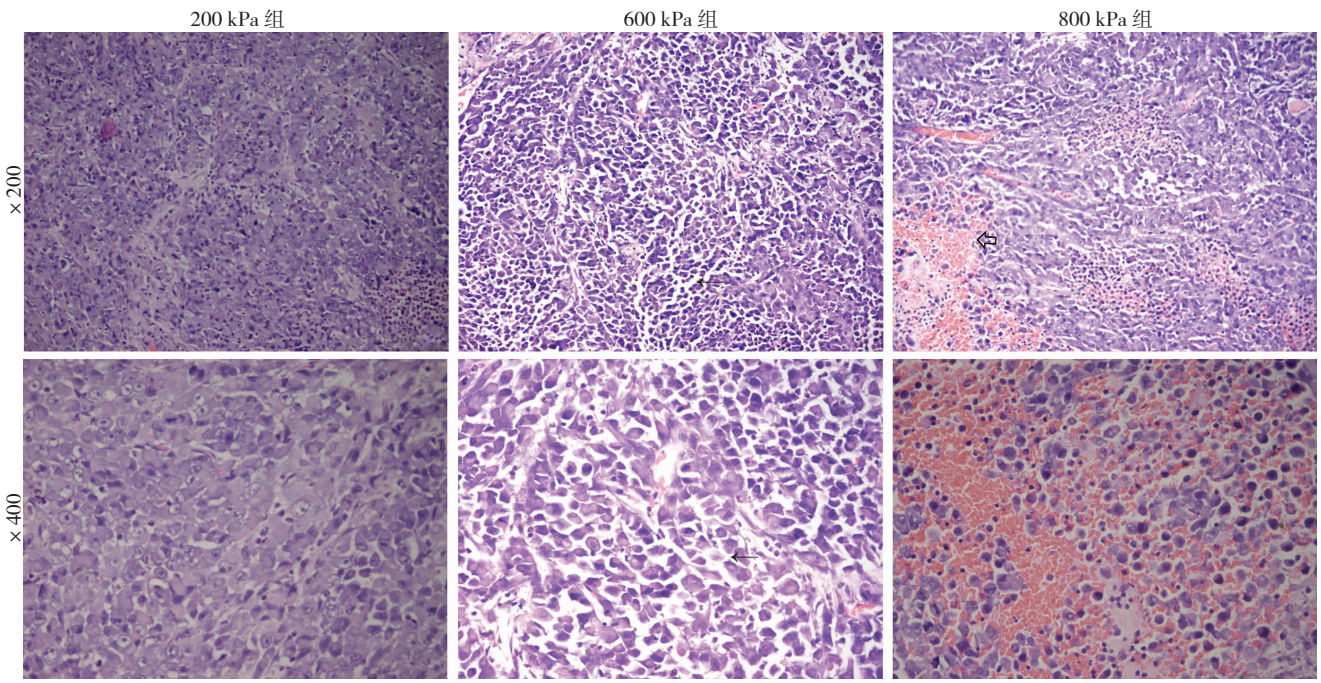
26 只大鼠(52 个肿瘤)均顺利完成超声造影及治疗。

2.2.1　声像图表现　　视觉评价超声造影血流灌注情况:治疗前造影检查提示各组肿瘤动脉相呈高灌注相,边缘区域血供丰富,多数肿瘤中心区域可见片状不规则充盈缺损区。治疗后造影发现,不同声压组间肿瘤血流灌注差异不大(图 1)。



↑:示肿瘤所在部位

图 1　假照组、200 kPa 组及 800 kPa 组声压治疗前后小动物超声仪超声造影图像



↑:示增宽的细胞间隙;⇧:示大片新鲜出血

图 2　HE 染色观察 200、600、800 kPa 组超声辐照后肿瘤标本病理学变化

2.2.2　造影定量分析　　各组治疗前后肿瘤超声造影峰值 GSV 的测量结果见表 1。各组治疗前后的超声造影峰值 GSV 配对样本 t 检验差异无统计学意义($P>0.05$),即治疗后较治疗前区别不大。对各组治疗前肿瘤造影 GSV 数据单因素方差分析显示方差齐同($F=1.509$,$P=0.182$),各组之间差异无统计学意义($P>0.05$),治疗后肿瘤造影 GSV 数据同样处理,结果为方差齐同($F=1.201$,$P=0.321$),两两组间比较差异均无统计学意义,即不同的声压对大鼠 Walker-256 肿瘤血流灌注影响不大。

表 1　SD 大鼠 Walker-256 肿瘤不同声压治疗前后超声造影峰值 GSV 对比($\bar{x}\pm s$)

组别	肿瘤个数	治疗前		治疗后	
		治疗时无微泡	治疗时有微泡	治疗时无微泡	治疗时有微泡
假照组	6	14.3±3.0	-	14.6±1.8	-
200 kPa 组	12	17.8±7.1	21.5±14.0	18.6±6.6	26.4±11.3
400 kPa 组	10	22.7±6.2	15.9±5.7	21.3±9.4	16.3±6.9
600 kPa 组	12	17.8±18.8	18.9±10.2	17.2±16.2	22.1±13.8
800 kPa 组	12	24.4±13.1	21.9±10.3	26.1±13.7	21.9±10.4

2.3　病理结果

假照组、200 kPa 组和 400 kPa 组的病理表现基本一致,主要表现为生长致密的肿瘤组织,伴有不规则的小片状坏死和陈旧性出血,无组织水肿和新鲜出血;600 kPa 组肿瘤组织内片状血浆外渗、轻度组织水肿、细胞间隙增宽,但未见红细胞外渗;800 kPa 组肿瘤组织内大片新鲜出血,明显组织水肿(图 2)。各组肿瘤组织内均可见局灶状细胞坏死。各声压水平分组中,治疗时有无微泡情况的病理改变基本类似。

3　讨论

超声空化效应的强度主要与声压幅度相关,声压是调控超声空化强度最重要的声学参数[12-13]。通过采用不同低声压激励肿瘤血管内的微泡空化,既可以发现有治疗效应的低声压水平,又可避免较高声压可能带来的副作用[14]和肿瘤血流阻断效应[9-11]。为此,本实验采用了 4 个不同水平的低声压(200、400、600 kPa 和 800 kPa)联合经静脉注射微泡刺激大鼠 Walker-256 肿瘤,结果显示,各低声压水平超声空化对肿瘤血流灌注影响不显著,但是在 600~800 kPa 水平却有较明显的病理改变。

超声造影所用造影剂微泡平均粒径为 2 μm,局限于血循环内,不会进入细胞外间隙,是一种血池显像,可以较好地反映组织的血流灌注情况[15]。在假照及 4 个低声压水平的治疗实验中,各组治疗前后肿瘤超声造影显示血流灌注强度差异不大,对造影峰值的平均灰阶值定量分析显示结果与视觉评价一致,无明显差异,说明本研究采用的低声压水平的微泡超声空化

可能不足以对肿瘤血流灌注产生影响。以往文献[12]报道的微泡超声空化对肿瘤产生的血管效应研究主要集中在1~9 MPa以上的相对高声压水平,产生的效应以微小血管壁毁损、血栓形成和血流阻断为主,而在低声压水平空化对肿瘤血流灌注影响研究方面少见报道。

虽然低声压超声空化对肿瘤血流灌注影响不显著,但是在600~800 kPa水平却有较明显的病理改变。具体表现在600 kPa水平肿瘤组织内有片状血浆外渗和轻度组织水肿,说明血管通透性有一定程度提高;而800 kPa水平肿瘤血管通透性进一步增加,出现大片的红细胞漏出和明显的组织水肿。而以上改变在400 kPa及以下水平不明显。尽管文献[12]报道声压超过1.0 MPa的微泡空化才可以引起正常组织血管内皮的损伤,血管通透性增加。但本研究的对象为肿瘤新生血管,具有先天性的发育缺陷,管壁结构比较薄弱,比正常微血管更易受到空化的机械损伤[10,16]。因此,声压600 kPa水平完全可能造成肿瘤微血管轻度损伤,可能是刺激肿瘤血管通透性增加的声压阈值水平。由于该低声压水平(600~800 kPa)明显低于文献[10]报道中产生副作用的声压水平,可能是适合增强靶向药物释放和基因转染的安全而又有效的声压水平。在微泡介导的空化治疗中,尽管治疗超声的发射也是脉冲式、低强度,但其占空比不仅可调,而且高于诊断超声(占空比约0.001%)约1 000倍以上,更有利于微泡惯性空化和产生生物学效应。反观文献中,脉冲极其短暂的诊断超声,在机械指数即使达到1.6(声压超过2 000 kPa)的情况下,也未能产生明显的肿瘤血管病理改变[2]。

本实验还考察了在治疗过程中是否追加微泡对实验结果的影响。理论上在超声辐照时,经静脉注射的微泡作为空化核可以显著增强超声空化效应,造成微血管轻度损失和通透性增高等生物学效应[17],但在本实验中对肿瘤血流灌注和病理均影响不大。其原因可能为:为了避免对实验动物反复增加麻醉药物,治疗前超声造影后仅间隔10 min即开始治疗,尽管超声造影所用微泡量仅为0.05 mL,10 min后诊断超声也未观察到循环中有明显微泡残留,但脂氟显微泡的核心气体为全氟丙烷,几乎不溶于水。因此,该气体仍然可能作为无包膜的自由微泡在动物体内残留达50 min以上[18]。这种自由微泡的诱导空化作用比一般包膜微泡更强。因此600 kPa以上声压水平中,即使治疗过程中未追加微泡也可能产生血管通透性增加的血管效应。另外本实验采用的超声脉冲属于低声压水平,微泡谐振的幅度有限,故治疗中追加微泡,即增加空化核浓度可能并不会显著增强空化的强度及其损伤效应。

本研究各组样本量较少,同时考虑到空化效应即刻产生,治疗后只进行了即刻的观察,未观察其远期效应,具有一定的局限性。同时对病理结果仅进行了定性分析,未采用半定量或定量分析,为后期实验中需要进一步完善的方面。另外本研究所用肿瘤模型为大鼠Walker-256皮下移植瘤,为来源于大鼠、自然生长的乳腺癌,血供丰富[19],肿瘤细胞接种于SD大鼠后有较高的成瘤率,成瘤周期短,故广泛地用作大鼠肿瘤模型用于实验研究,但其生物学行为与自发性肿瘤可能有一定的区别,故本实验观察到的血管效应有待在自发性肿瘤模型中进一步验证。

综上所述,本研究初步证明,尽管低声压超声联合微泡对大鼠Walker-256肿瘤的血流灌注影响不大,但在600~800 kPa声压水平可引起血管通透性的增加,对于今后微泡超声介导的基因转染和靶向药物释放提供一定的声学参数参考价值。

参考文献:

[1] Wood A K, Sehgal C M. A review of low-intensity ultrasound for cancer therapy[J]. Ultrasound Med Biol, 2015, 41(4): 905-928. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2014.11.019

[2] Chen H, Hwang J H. Ultrasound-targeted microbubble destruction for chemotherapeutic drug delivery to solid tumors [J]. J Ther Ultrasound, 2013, 1:10. DOI: 10.1186/2050-5736-1-10

[3] Kotopoulis S, Delalande A, Popa M, *et al*. Sonoporation-enhanced chemotherapy significantly reduces primary tumour burden in an orthotopic pancreatic cancer xenograft[J]. Mol Imaging Biol, 2014, 16(1): 53-62. DOI: 10.1007/s11307-013-0672-5

[4] Li T, Wang Y N, Khokhlova T D, *et al*. Pulsed high-intensity focused ultrasound enhances delivery of doxorubicin in a preclinical model of pancreatic cancer[J]. Cancer Res, 2015, 75(18): 3738-3746. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0296

[5] Negishi Y, Yamane M, Kurihara N, *et al*. Enhancement of Blood-Brain Barrier Permeability and Delivery of Antisense Oligonucleotides or Plasmid DNA to the Brain by the Combination of Bubble Liposomes and High-Intensity Focused Ultrasound[J]. Pharmaceutics, 2015, 7(3): 344-362. DOI: 10.3390/pharmaceutics7030344

[6] Jacobetz M A, Chan D S, Neesse A, *et al*. Hyaluronan im-

pairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer[J]. Gut, 2013, 62(1): 112 - 120. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302529

[7] Erkan M, Hausmann S, Michalski C W, *et al*. The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012, 9(8): 454 - 467. DOI: 10.1038/nrgastro.2012.115

[8] Jain R K. An indirect way to tame cancer[J]. Sci Am, 2014, 310(2): 46 - 53.

[9] Liu Z, Gao S, Zhao Y, *et al*. Disruption of tumor neovasculature by microbubble enhanced ultrasound: a potential new physical therapy of anti-angiogenesis[J]. Ultrasound Med Biol, 2012, 38(2): 253 - 261. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2011.11.007

[10] 高顺记, 李佩倞, 赵洋, 等. 微泡增强的超声空化阻断肿瘤微循环的初步研究[J]. 中国超声医学杂志, 2010, 26(2): 110 - 112. DOI: 10.3969/j.issn.1002-0101.2010.02.005

[11] 薛雯, 张莉, 李莎, 等. 超声峰值负压与肿瘤微循环阻断程度的相关性研究[J]. 中国超声医学杂志,2014, 30(4): 372 - 375.

[12] Hwang J H, Tu J, Brayman A A, *et al*. Correlation between inertial cavitation dose and endothelial cell damage *in vivo*[J]. Ultrasound Med Biol, 2006, 32(10): 1611 - 1619.

[13] Miller D L, Gies R A. The influence of ultrasound frequency and gas-body composition on the contrast agent-mediated enhancement of vascular bioeffects in mouse intestine[J]. Ultrasound Med Biol, 2000, 26(2): 307 - 313.

[14] 李莎, 张金龙, 崔海, 等. 微泡增强的超声空化效应对兔肌肉和肺微血管的损伤作用[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(22): 2439 - 2442.

[15] 陈敏华, 严昆, 戴莹, 等. 肝超声造影应用指南(中国)(2012 年修改版)[J]. 中华超声影像学杂志, 2013, 22(8): 696 - 722. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1004-4477.2013.08.018

[16] Goel S, Duda D G, Xu L, *et al*. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases[J]. Physiol Rev, 2011, 91(3): 1071 - 1121. DOI: 10.1152/physrev.00038.2010

[17] American Institute of Ultrasound in Medicine (AIUM). Section 6--mechanical bioeffects in the presence of gas-carrier ultrasound contrast agents[J]. J Ultrasound Med, 2000, 19(2): 120 - 142, 154 - 168.

[18] Liu P, Wang X, Zhou S, *et al*. Effects of a novel ultrasound contrast agent with long persistence on right ventricular pressure: Comparison with SonoVue[J]. Ultrasonics, 2011, 51(2): 210 - 214. DOI: 10.1016/j.ultras.2010.07.008

[19] Khegay I I, Ivanova L N. Regression of Walker 256 carcinosarcoma in vasopressin-deficient Brattleboro rats is accompanied by a changed laminin pattern[J]. Biochem Genet, 2015, 53(1/3): 1 - 7. DOI: 10.1007/s10528-015-9665-1

(**收稿**:2015-09-29;**修回**:2015-11-29)

(编辑 栾 嘉)