基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0829-04

高强度聚焦超声治疗兔乳腺移植瘤的病理变化

邹文兵[1],牛陵川[1],向理科[2],朱 辉[1],王智彪[1]

(1.重庆医科大学生物医学工程系 超声医学工程重庆市市级重点实验室 重庆市生物医学工程学重点实验室,重庆 400016;2.重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察兔乳腺移植瘤经高强度聚焦超声(High intensity focused ultrasound, HIFU)治疗后的病理变化。方法:42只实验兔随机分成HIFU组(n=35)、对照组(n=7),HIFU组在B超监控下接受HIFU治疗,辐照后采集标本行病理检查。结果:HIFU辐照后靶区呈灰白色;即刻HE染色显示肿瘤细胞形态、排列与对照组无明显变化;电镜显示细胞膜、核膜断裂,细胞器破坏,胞质内出现无膜结构大小不等的空泡;琥珀酸脱氢酶(Succinate dehydrogenase,SDH)、增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)阴性表达,提示肿瘤细胞已死亡;随着时间的延长坏死肿瘤组织逐渐液化吸收,纤维化。结论:HIFU能有效地灭活肿瘤细胞,为HIFU开展治疗乳腺癌的临床应用提供参考价值。

【关键词】高强度聚焦超声消融;乳腺肿瘤;治疗;病理学

【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-10-20

Pathological changes of transplanted rabbit breast tumor treated with high intensity focused ultrasound

ZOU Wen-bing, et al

(*Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the histopathological changes of transplanted rabbit breast tumor treated with high intensity focused ultrasound (HIFU). *Methods*: Forty-two experimental rabbits were divided into HIFU group (n=35) and control group (n=7), HIFU ablation was completely performed in the HIFU group with ultrasound imaging guidance, and the pathological changes were examined immediately and on 1st, 3rd, 7th, 14th, 21st, 28th day after HIFU treatment. *Results*: The target area of tumor appeared gray immediately after HIFU treatment; the morphology and arrangement of the cellular nucleus showed no obvious alteration in HE stained sections after HIFU ablation; however, electron microscopy revealed that the cellular membrane and nuclear membrane was rupturing, cell organelle destructed and appearance of vacuolus without membrane in cytoplasm; Enzyme histochemical staining showed that the succinate dehydrogenase (SDH) in target area of tumor disappeared, also the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was negative examined by using immunohistochemical staining, suggesting the death of tumor cells; The coagulative tissue got liquefied and absorbed with the extension of time, then it was substituted by fibrous tissue finally. *Conclusion*: HIFU can effectively destroy the transplanted rabbit breast tumor, it provided referred value for clinical application of HIFU in the treatment of breast cancer.

【Key words】High intensity focused ultrasound ablation; Breast neoplasms; Therapy; Pathology

近年来,临床和动物实验证实高强度聚焦超声(High intensity focused ultrasound, HIFU)利用其热效应等机制可以原位灭活肿瘤,在乳腺癌保乳治疗上的应用有一定的研究,但对治疗后的病理变化尚缺乏深入、全面的认识。本实验从组织形态学、超微结构、酶活性、肿瘤相关抗原表达等方面详细探讨HIFU辐照兔乳腺移植瘤后不同时间段的病理改变,为临床治疗乳腺癌提供实验依据。

作者介绍:邹文兵(1978-),男,硕士,研究方向:乳腺癌的治疗。

通讯作者:朱 辉,男,教授,E-mail:zhuh@haifu.com.cn。

基金项目:教育部新世纪优秀人才支持计划(编号:NCET-05-0775)。

1 材料与方法

1.1 材料

健康纯种雌性新西兰兔42只,体重2.5~3.0 kg(重庆医科大学动物中心提供);VX_2荷瘤种兔1只(重庆医科大学超声医学研究所提供);JC200型聚焦超声肿瘤治疗系统(重庆海扶技术有限公司生产)治疗头参数:频率1.03 MHz、焦距159 mm、治疗声强9 917~12 397 W/cm^2;Envision二步法试剂盒(DAKO公司生产);抗兔PCNA单克隆抗体(Abvision公司

生产）。

1.2 动物模型的制作

消毒后于荷瘤种兔处切下 VX_2 肿瘤切成约 1 mm^3 大小的瘤块，取一粒植入兔乳腺组织内[1]，每兔移植一只乳腺，共 42 只。12 d 后于乳腺内触及直径约 6～8 mm 大小的肿块，随机分成 HIFU 组 35 只、对照组 7 只。

1.3 治疗过程

兔患部周围脱毛，麻醉后，俯卧位固定于治疗床，腹部浸泡入脱气水中，B 超定位好肿瘤位置，焦点位于肿瘤内，采用逐层点扫描，范围覆盖整个肿瘤及其周围约 2～5 mm 正常组织，治疗过程机载 B 超实时监控，灰度值增加 20 视为治疗有效。对照组除未启动治疗功率外，其余步骤与 HIFU 组相同。

1.4 标本采集及检测

HIFU 治疗后分即刻、1、3、7、14、21、28 d 7 个时间段，每个时间段随机切取 5 个肿瘤，予 10%中性甲醛固定，石蜡包埋行大切片 HE 染色；中央、边缘部位各取一粒大小约 1 mm^3 的组织，2%戊二醛固定，行电镜观察。即刻标本另作冰冻切片琥珀酸脱氢酶（Succinate dehydrogenase，SDH）酶组织化学染色（硝基蓝四唑盐法）及增殖细胞核抗原（Proliferating cell nuclear antigen，PCNA）检测（Envision 二步法）。

1.5 SDH、PCNA 判定与分析

SDH 定位于胞质，紫蓝色颗粒表示有活性，活性强弱评估见参考文献[2]。PCNA 定位于细胞核内，出现均质样棕黄色显色为 PCNA 阳性细胞，每例标本两张切片，每张切片光镜下高倍视野（400 倍）观察 5 个不重叠视野计算阳性率，取其平均值为每例阳性率[3]。

1.6 统计学处理

应用统计软件 SPSS13.0 进行秩和检验比较 SDH 活性和 PCNA 阳性率，$P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大体观察

正常肿瘤切面呈灰褐色鱼肉状，中心无明显的出血、坏死。超声辐照后即刻，靶区形成灰白色改变，无光泽；术后 3 d 整个靶区与周围组织分界清楚，肉眼可见明显的灰白色凝固性坏死改变，质硬；术后 3～7 d 坏死程度达高峰；14 d 靶区开始收缩，其周围有淡红色新生组织出现；21 d 凝固性坏死组织逐渐液化、吸收，体积变小，切面可见坏死组织被纤维组织包裹；28 d 靶区坏死组织明显缩小，小者被纤维结缔组织代替，大者被纤维组织包裹。

2.2 光镜观察

肿瘤细胞紧密排列呈实体巢状或条索状，瘤细胞体积较大，胞浆丰富，核膜清楚，异型性明显，染色质颗粒较粗，核分裂相多见，可见病理性核分裂像（图 1），细胞间纤维结缔组织较少。HIFU 辐照后即刻瘤细胞内出现大小不等的空泡，但组织学改变不明显，与未经 HIFU 辐照的肿瘤组织图像基本一致（图 2）；24 h 后瘤细胞间出现空白裂隙，使瘤细胞排列疏松，部分肿瘤细胞开始溶解，出现核碎裂，核固缩，伴有少许中性粒细胞和淋巴细胞浸润，靶区周围部分瘤细胞内仍可见大小不等的空泡；3 d 后肿瘤细胞核破裂、核固缩增多，并出现大量核溶解；7 d 后大多肿瘤细胞表现为核溶解，瘤细胞轮廓尚存（图 3），坏死周围有较多中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞，周围成纤维细胞和毛细血管明显增生；14～21 d，靶区坏死瘤细胞轮廓存在，靶区周边肿瘤细胞浆空泡样变仍然明显，伴钙盐沉积，坏死区周围纤维增生伴玻璃样变；4 周后形态学变化同 3 周，只是坏死周围纤维增生玻璃样变更明显（图 4）。

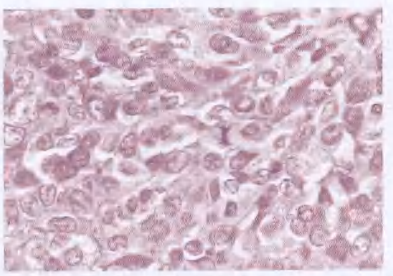


图 1 未经 HIFU 辐照肿瘤组织（HE 染色×400）

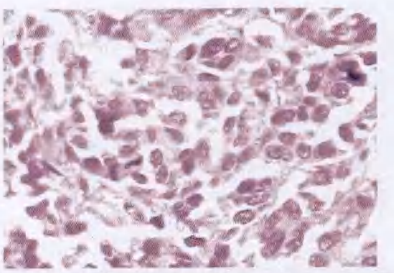


图 2 HIFU 辐照后即刻肿瘤组织（HE 染色×400）

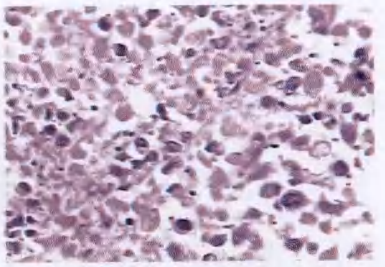


图 3 HIFU 辐照后 7 d 肿瘤组织（HE 染色×400）

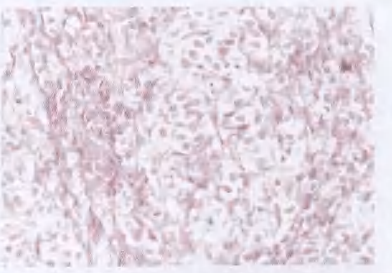


图 4 HIFU 辐照后 28 d 肿瘤组织（HE 染色×400）

2.3 透射电镜观察

正常肿瘤细胞内的细胞器结构正常,包膜完整、核膜增厚异染色体增多,核仁明显,出现双核仁(图 5)。HIFU 治疗后即刻肿瘤细胞明显水肿,细胞器肿胀,结构不清,部分瘤细胞胞质内出现大小不等、无膜结构的空泡,核膜失去连续性,染色质固缩、碎裂呈团块状(图 6);24 h 后见更多瘤细胞胞质出现无膜结构的空泡,甚至形成空白区,细胞膜、核膜断裂,瘤细胞出现核破裂、核固缩及核溶解,细胞器结构消失;第 3 d 后更多瘤细胞出现空泡及核破裂、核固缩和核溶解;7 d 后变化基本同第 3 d,并可见成纤维细胞增生;第 14 ~ 21 d 成纤维细胞增多;第 28 d 瘤细胞结构破坏,呈核溶解,核固缩,瘤细胞内仍可见无膜结构的大小不一的空泡,纤维细胞增生明显。

2.4 SDH 酶组织化学染色

对照组肿瘤细胞胞质内见大量紫蓝色颗粒沉积,SDH(+++)(图 7),复染后核呈红色;辐照组细胞质内无紫蓝色颗粒沉积,SDH (-)(图 8),2 组比较差异有统计学意义(表 1)。

2.5 PCNA 免疫组织化学检查

对照组 PCNA 阳性表达率为 85.60%(图 9),HIFU 辐照靶区 PCNA 不表达,阳性表达率为 0(图 10),两组比较差异有统计学意义(表 2)。

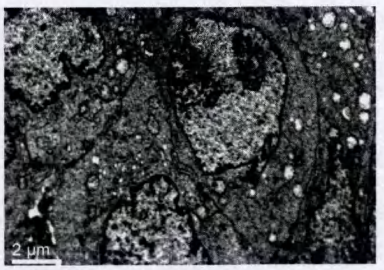


图 5 未经 HIFU 辐照肿瘤超微结构(透射电镜 × 6 000)

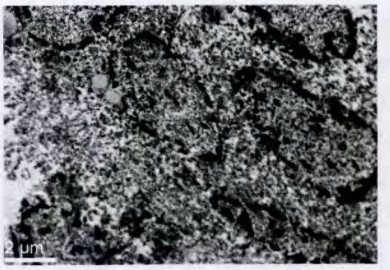


图 6 HIFU 辐照后即刻肿瘤超微结构(透射电镜 × 6 000)

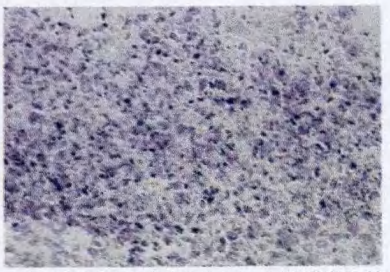


图 7 未辐照肿瘤组织 SDH 活性强阳性(酶组织化学染色 × 400)

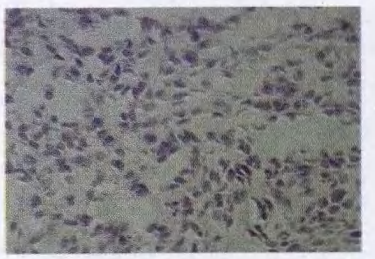


图 8 HIFU 辐照后肿瘤组织 SDH 阴性(酶组织化学染色 × 400)

表 1 HIFU 辐照后即刻与对照组 SDH 活性

组别	-	+	++	+++	动物数(只)
HIFU 组	5	0	0	0*	5
对照组	0	0	0	7	7

注:*$P<0.05$,与对照组比较

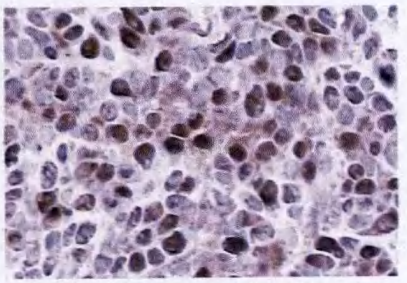


图 9 未辐照肿瘤组织 PCNA 强阳性(Envision 二步法 × 400)

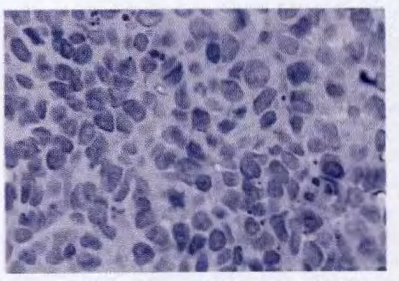


图 10 HIFU 辐照后肿瘤组织 PCNA 阴性(Envision 二步法 × 400)

表 2 HIFU 辐照后即刻与对照组 PCNA 表达

组别	PCNA 表达阳性率(%)	动物数(只)
HIFU 组	0*	5
对照组	85.60 ± 2.51	7

注:*$P<0.05$,与对照组比较

3 讨 论

高强度聚焦超声治疗是近年来兴起的体外肿瘤无创治疗技术[4]，该项技术主要利用超声在组织内良好的穿透性、方向性和可聚焦性，使高强度超声在体内聚焦，焦域内产生瞬态高温达 65℃以上，致使肿瘤组织凝固性坏死。HE 染色结果显示，HIFU 治疗后即刻靶区边缘瘤细胞内有空泡，但肿瘤细胞形态和排列与辐照前瘤细胞无明显变化，24 h 后出现典型的核碎裂、核固缩、核溶解，坏死组织逐渐液化吸收或纤维化，28 d 后小灶坏死组织可纤维结缔组织取代，大者形成纤维包裹。超微结构观察与此相似，不同的是即刻光镜下无明显病理改变的瘤细胞电镜显示细胞膜、核膜断裂，线粒体肿胀或破坏，证明瘤细胞已死亡。这种病理演变过程正好反映了 HIFU 热效应特性，热力作用往往导致组织的热固定，如同甲醛固定组织保持原有的形态[5]。有学者报道，HIFU 治疗乳腺癌后 2 周光镜下仍见不典型细胞[5,6]，但通过电镜或者酶活性检测证实是死亡细胞。热效应灭活肿瘤的同时也灭活溶酶体内的水解酶，死亡瘤细胞的溶解液化需要依赖于周围炎症细胞释放的水解酶，但因肿瘤周围血管网破坏或闭合[7]，循环到达此处的中性粒细胞、单核细胞数量减少，因此更加导致坏死肿瘤的液化吸收延迟。

SDH 是三羧酸循环标志酶，酶的活性反映瘤细胞的代谢功能。试验结果发现，对照组肿瘤细胞 SDH 呈强阳性表达，而 HIFU 辐照靶区肿瘤细胞不表达，说明 HIFU 热效应使酶活性下降。酶失活也意味着线粒体的功能丧失，这种变化发生早于细胞形态学上的变化，通过形态学和其他的影像检查不能清楚地显示这种变化。因此，检测 SDH 活性即使在没有形态上的改变也可以敏感地反映细胞是否存活。也有学者[8]检测 NADH-diaphorase 酶的活性来评价热消融效果，与本研究结果一致。

PCNA 是传统的衡量细胞增殖能力的指标，PCNA 表达程度越高肿瘤侵袭转移能力越强，预后越差，有关这方面的报道很多[9]。本研究发现对照组 PCNA 阳性率颇高，而 HIFU 辐照靶区无一例阳性表达，说明肿瘤细胞已经彻底失去了增殖能力，也就丧失了恶性行为。这可能是由于 HIFU 热效应和机械效应导致 PCNA 变性，破坏了抗原空间结构或者抗原表位的丢失，这种效应不仅作用于 PCNA，应该包括组织内所有蛋白质成分。

目前，微创治疗乳腺癌的方法有微波、射频消融、激光、冷冻治疗等技术，上述治疗均能有效灭活肿瘤组织，但不足是不能实时监控适形消融，而 HIFU 在 B 超或 MRI 监控下可以达到适形消融肿瘤的目的，降低术后复发率。

综上所述，HIFU 治疗乳腺癌的病理变化特点有 4 点：①HIFU 辐照后的肿瘤细胞，当光镜下无明显坏死的形态特征时，电镜观察证实瘤细胞已经死亡；②HIFU 辐照后的瘤细胞内的酶体系破坏、失活；③HIFU 辐照后 24 h 光镜下可表现出瘤细胞坏死的组织学特征（核碎裂、核固缩）；④随着时间的延长，坏死肿瘤组织可被逐渐吸收瘤体缩小纤维化或纤维包裹。HIFU 有望成为一种真正安全有效，美容效果好的保乳治疗技术。

参 考 文 献

[1] 吴传新，刘长安，伍 烽，等.高强度聚焦超声治疗兔移植性乳腺肿瘤的安全性评价[J].重庆医科大学学报，2003，28(6)：685-687.

[2] 刘大全，吕明德，谭进富，等.不同温度微波消融肝癌效果的酶组织化学检测[J].南方医科大学学报，2006，26(8)：1149-1151.

[3] 李 和，周 莉.免疫化学与免疫组织化学检测[M].北京：人民卫生出版社，2008.59.

[4] Hill CR，ter Harr GR.High intensity foused ultrasound - potential for cancer treatment[J].Br J Radiol，1995，68(816)：1296-1303.

[5] Feng Wu，Zhi-Biao Wang，You-De Cao，et al.Heat fixation of cancer cells ablated with high intensity focused Ultrasound in patients with breast cancer[J].The American Journal of Surgery，2006，192(10)：179-184.

[6] Feng Wu，Zhi-Biao Wang，You-De Cao，et al.A randomised clinical trial of high intensity focused ultrasound ablation for the treatment of patients with localised breast cancer[J].British Journal of Cancer，2003，89(12)：2227-2233.

[7] 伍 烽，陈文直，白 晋，等.高强度聚焦超声对恶性实体肿瘤血管的破坏作用[J].中华实验外科杂志，2002，7(19)：4314-4315.

[8] 曹友德，王智彪，伍 烽，等.高强度聚焦超声治疗乳腺癌的可行性研究[J].中华超声影像学杂志，2002，4(11)：215-218.

[9] Chu J S，Huang C S，Chang K T.Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immuno labelling as aprognostic factor in invasive ductal carcinoma of the breast in Taiwan[J]. Cancer Lett，1998，131(2)：142-152.

（责任编辑：关蕴良）

通 知

本刊所有投稿请登陆以下网址完成：

http://cyxb.cqmu.edu.cn/ch/index.aspx

本刊编辑部

2010 年 6 月