论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1445-05

聚焦超声手术钳联合声诺维辅助肝部分切除术的实验研究

胡晓东[1]，王济明[1]，缪继东[2]，赵 毅[2]，赵纯亮[2]，伍 烽[2]

（1. 重庆医科大学附属第一医院肝胆外科；2. 重庆医科大学生物医学工程系、医学超声工程研究所，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨聚焦超声手术钳（Focused ultrasond surgical clamp，FUSC）在肝部分切除术中应用的可行性和有效性及SonoVue对FUSC的增效作用。方法：12只健康山羊分为Ⅰ组（FUSC组，n=6）为对照组，Ⅱ组（FUSC+SonoVue组，n=6）为实验组。FUSC由固定在钳状手柄上，中轴线重合，能产生两束方向相对应的聚焦超声波的二个超声换能器构成。手术进腹暴露游离肝脏，在超声频率为1.6 MHz，声功率为150 W条件下，使用FUSC沿制订的预切线对肝脏进行辐照后，行肝左外叶切除术。对照组动物直接接受FUSC辐照肝脏靶区，实验组动物注射声诺维即刻接受FUSC辐照。术后局部取材进行组织病理学检查，记录肝切除术出血量、FUSC辐照时间和手术时间、肝断面面积、术后并发症和死亡率，观察动物血常规、肝功能的变化。结果：所有实验动物无死亡和并发症。Ⅰ组出血量为（16.9±4.2）ml，辐照时间为（174±9）s；Ⅱ组出血量为（16.3±3.5）ml，辐照时间为（122±9）s。Ⅰ组和Ⅱ组在单位面积断面的平均出血量上无显著性差异（P>0.05）；Ⅰ组和Ⅱ组在单位面积断面的平均FUSC辐照时间上存在统计学差异（P<0.05）。组织病理学检查可见靶区肝组织凝固性坏死和小血管坏死及闭塞；两组动物手术后血清ALT、AST、TB、DB术后均有一过性的增高，术后7 d恢复到术前水平。结论：聚焦超声手术钳辅助肝部分切除术是可行和有效的，具有出血少、手术时间短、操作方便等优越性，联合应用SonoVue可增强FUSC的生物学效应，提高FUSC效率，进一步缩短手术时间。

【关键词】聚焦超声手术钳；高强度聚焦超声；微泡造影剂；声诺维；肝切除；出血量；山羊；实验研究

【中国图书分类法分类号】R657.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-07

Experimental study of using focused ultrasound surgical clamp (FUSC) combined with SonoVue for bloodless partial hepatectomy

HU Xiao-dong, et al

(*Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical university*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the feasibility and efficacy of focused ultrasound surgical clamp(FUSC)for partial hepatectomy, and find out the enhancement effect of SonoVue to FUSC. *Methods*: Twelve healthy goats were randomly divided into a FUSC group(n=6) in which FUSC was only used for the liver ablation, and a SonoVue + FUSC group(n=6) in which FUSC was performed immediately after iv injection of ultrasound contrast agent SonoVue. A FUSC was comprised of two ultrasound transducers fixed on a forceps-like handle. The directions of focused ultrasound beams produced by both transducers were opposite, with the same central axes. Ultrasound energy was continuously delivered by two transducers to ablate liver tissue located between both transducers. The frequency was 1.6 MHz, and the acoustic power was 150 W. All goats in both groups underwent laparotomy, and then the liver was totally exposed for an ablative procedure. Blood loss, FUSC exposure time, operation time required for the hepatectomy and the cross-section area of the resected liver were recorded. Histological changes were observed in the removed liver, and 10ml blood samples were collected in each goat to measure blood cells and hepatic functions after surgical procedure. All goats were followed up for complications and survival. *Results*: After surgical procedure, all animals survived well, and no complications were observed during follow-up period. Mean blood loss and mean exposure time were(16.9±4.2) ml and(174±9) s in the FUSC group, and(16.3±3.5) ml and(122±9) s in the SonoVue+FUSC group respectively. A statistical difference of average FUSC exposure time per unit area(P<0.05) was significantly observed between two groups. There was no significant difference of average blood loss per unit area(P>0.05) in both groups. Pathological examination showed coagulation necrosis of the targeted liver tissue, and small blood vessels were severely destroyed, with the occlusion of the ablated

作者介绍：胡晓东（1982- ），男，硕士，研究方向：肝胆外科。

通讯作者：王济明，男，教授，E-mail：wjm@hospital-cqmu.com。

基金项目：国家教育部创新团队发展计划（教科函[2005]33号）。

vessels. There was a transient increase of serum ALT, AST, TB and DB levels postoperatively in all goats, and they reduced to a normal level 7 days after surgical procedure. *Conclusion*: FUSC is feasible and effective for partial hepatectomy, which has advantage of convenience, less time and blood loss. FUSC combined with microbubble contrast agent(SonoVue) can enhance the biological effects of FUSC and improve the efficiency of FUSC.

【Key words】 Focused ultrasound surgical clamp(FUSC); High intensity focused ultrasound; Microbubble contrast agent; SonoVue; Liver resection; Blood loss; Goat; Experimental study

迄今为止,肝切除仍被认为是肝脏原发和继发肿瘤的最佳治疗手段。但肝脏血流丰富,因而减少和控制出血就成为肝切除术中首要的任务,这对于确保手术成功及患者愈后都具有重要意义。目前,控制肝切除术中出血的手段主要有:出入肝血流阻断法,器械止血法,机械止血法,生物化学止血法等[1,2]。由于出入肝血流阻断法会在不同程度上影响肝血流动力学,引起肝组织的缺血再灌注损伤,甚至引起术后肝功能衰竭等严重并发症。因此,用于肝断面止血的无血切肝器械的发展备受关注,如高频电刀、微波凝固器、射频消融器等。

高强度聚焦超声 (High intensity focused ultra sound, HIFU)在止血方面的作用近年来逐渐受到重视。HIFU 利用超声波良好的组织内聚焦性、方向性和能量的可渗透性,将低能量超声波聚焦在体内特定靶区内,通过焦域处高能量超声波所产生的瞬态高温效应、空化效应使靶区内组织发生凝固性坏死及闭塞血管。声诺维(SonoVue)是一种用磷脂包裹六氟化硫微泡的超声造影剂。微泡造影剂被确认为是增加 HIFU 辐照后凝固范围和提高 HIFU 疗效的一种重要增效剂,可以同时加强超声的热效应和空化效应。

本实验利用重庆医科大学医学超声工程研究所最新研制的聚焦超声手术钳(Focused ultrasond surgical clamp, FUSC),联合 SonoVue,初步探讨 FUSC 在肝部分切除术中应用的可行性和有效性及 SonoVue 对 FUSC 的增效作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 山羊 12 只(由重庆医科大学动物实验中心提供),质量(30±3) kg,雌雄不拘。

1.1.2 仪器 H2004 型聚焦超声外科手术钳(由重庆医科大学医学超声工程研究所研制)(如图 1),它由正对排列的二片聚焦超声换能器、水囊、功率源等组成。换能器规格:4 cm × 3 cm,频率:1.6 MHz,焦距:50 mm,声功率:150 W,扫描方式:连续线扫。测温设备:铜 - 康铜热电偶热敏探针(直径 0.6 mm,重庆医科大学超声研究所研制),温度测量仪(余姚市长江温度仪表厂)。

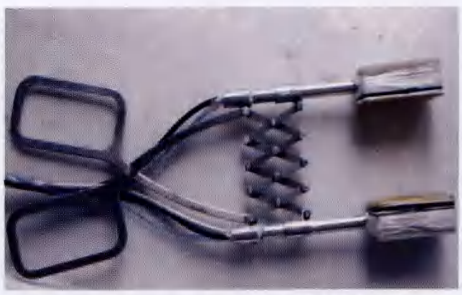


图 1 H2004 型聚焦超声外科手术钳

1.1.3 实验药品 SonoVue®是意大利博莱科公司(Bracco)生产的新型脂质膜包裹六氟化硫(SF6)形成的第二代超声微泡造影剂,微泡平均直径为 2.5 μm,90%的微泡粒径小于 6 μm,通常静注后 6~14 s 达到峰值增强, 注入造影剂 15 s 内开始出现动脉相,静注造影剂 15~45 s 可全部分布于肝动脉系统。SonoVue 的血流动力学是非剂量依耐的, 进入体内后很快经肺排出,平均消除半衰期为 12 min,在注入的第 1 min 即有 40% ~ 50%的 SonoVue 被排出,11 min 后 80% ~ 90%被排出。

1.1.4 循环脱气水标准 含气量≤3ppm。

1.2 动物分组及实验方法

12 只健康山羊分为 Ⅰ 组(FUSC 组,n=6)为对照组,Ⅱ 组(FUSC+SonoVue 组,n=6)为实验组。动物术前 8 h 禁食禁饮,静脉注射戊巴比妥钠 30 mg/kg,手术野备皮,常规消毒、铺巾。取右侧肋缘下切口,进腹后游离肝周韧带,充分暴露肝脏。Ⅰ 组实验动物直接用 FUSC 沿预定切除线依次辐照肝左叶与右叶交界处的肝组织(如图 2);Ⅱ 组实验动物通过耳缘静脉注入 SonoVue(0.03 ml/kg)后即刻用 FUSC 辐照上述部位。辐照过程中,可通过测温针来判断组织是否发生凝固性坏死,测温针从一侧换能器边缘斜插入靶区肝脏, 插入深度为手术钳下 0.5 cm。连续观察测温仪上的温度变化,当靶区域温度上升至 60℃,继续辐照 5 s,直至整条预切带肝组织完全固化为止后停止。辐照完毕后(如图 3),在凝固带正中用手术刀切开肝被膜,继而用刀柄剥离肝实质,断面血管在 2 mm 以上者用丝线结扎,直至整个肝左外叶切除(如图 4,图 5)。断面不予缝合,亦不用大网膜包裹。用坐标纸做图法计算出断面面积(精确到 0.1 cm^2),用纱布称重法算出出血量(精确到 0.1 g)。检查术野无活动性出血后关腹, 手术当天及术后 2 d 肌肉注射青霉素 80 万 U,每天 2 次,以预防感染。

1.3 观察指标

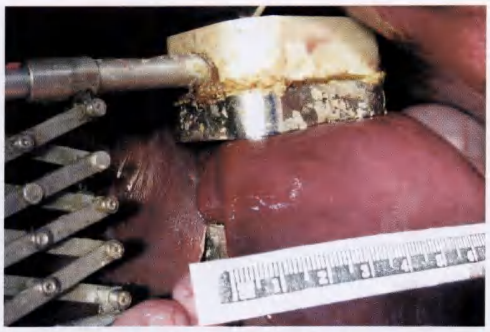


图 2 聚焦超声手术钳沿预切线凝固辐照肝脏的过程

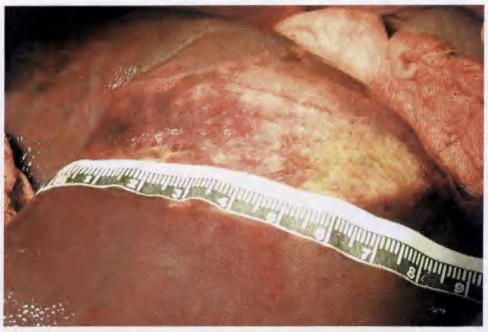


图 3 辐照结束后肝脏表面见灰白色的凝固性坏死带

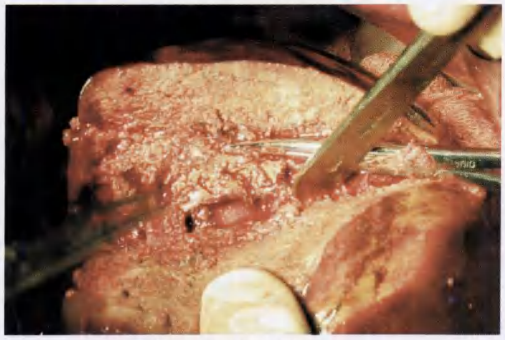


图 4 肝切除过程中



图 5 肝切除后断面，见整个断面连续性凝固性坏死

1.3.1 出血量 采用纱布称重法计算，即取 2 块大小相同的干纱布用白纸包好并编号，采用高压蒸汽灭菌，使用前用天平称重（精确到 0.1 g）每包纱布并记录，手术过程中的出血量完全用纱布吸收，术后再对用过的每包纱布称重，术后与术前之差即为出血量。计算出每只动物单位断面面积的平均出血量（ml/cm²）。血重量 1.05 g= 血体积 1 ml。

1.3.2 手术时间 单次 FUSC 辐照时间是指每次从辐照开始至组织发生凝固性坏死的总时间，手术时间是指 FUSC 辐照时间、切肝、止血的总时间。计算出每只动物单位断面面积的平均 FUSC 辐照时间（s/cm²）。

1.3.3 动物手术前后的血常规、肝功能变化 分别在术前，术后即刻，术后 3 d、7 d、14 d 颈静脉采血 10 ml，检测血常规、肝功能的变化。检测指标有红细胞计数（RBC）、血红蛋白（HGB）、谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）、总胆红素（TBIL）、直接胆红素（DBIL）。

1.3.4 组织病理学检查 于术后即刻分别选 FUSC 辐照区、交界区和含有较大血管的辐照区肝组织，切取组织标本行光镜观察。

1.4 统计学处理

SPSS 13.0 软件统计分析，结果以均数 ± 标准差表示，统计方法采用 t 检验，$P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结 果

2.1 围手术期的动物观察

所有动物在整个手术过程中，生命体征平稳，对 FUSC 辐照和肝左外叶切除耐受性好。术后第 1 d 即恢复进食、饮水，术后 3 d 内均出现不同程度的食欲下降，7 d 后一般情况基本恢复正常，存活至 28 d 处死。所有动物均无腹腔内出血、胆漏、胃肠穿孔、腹腔内感染等并发症发生或死亡。

2.2 出血量

对照组动物的出血量为（16.9 ± 4.2）ml，单位面积的平均出血量为（0.8 ± 0.2）ml/cm²；实验组动物的出血量为（16.3 ± 3.5）ml，单位面积的平均出血量为（0.9 ± 0.2）ml/cm²。实验组和对照组在单位面积的平均出血量上无明显差异（$P>0.05$）。

2.3 手术时间

对照组动物手术时间为（424 ± 27）s，FUSC 辐照时间共为（174 ± 9）s，平均单位面积 FUSC 辐照时间为（8.7 ± 0.8）s/cm²。实验组动物手术时间为（374 ± 12）s，FUSC 辐照时间共为（122 ± 9）s，平均单位面积 FUSC 辐照时间为（6.8 ± 0.8）s/cm²。实验组和对照组在平均单位面积的 FUSC 辐照时间上存在统计学差异（$P<0.05$）。

2.4 动物手术前后血常规、肝功能变化

所有实验动物手术前后 RBC、HGB 无显著变化，ALT、AST、TB、DB 术后均有一过性的增高，除 AST 外，升高幅度都不大，一般于术后 7 d 恢复到术前水平。

2.5 组织病理学结果

术后即刻，肉眼观见肝断面呈黄白色的凝固性

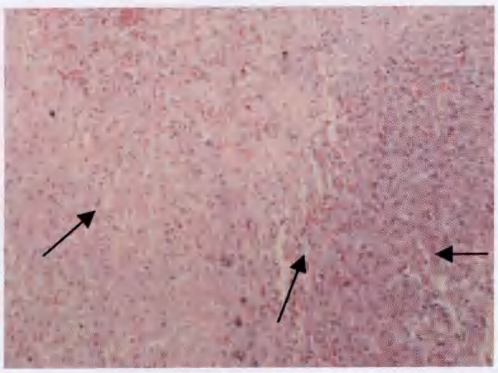


图 6 羊肝辐照后光镜下表现。从右至左可见正常区、充血水肿区和坏死区（HE×100）



图 7 凝固性坏死区肝内中等大小血管内可见红色血栓形成（HE×40）

坏死区，无活动性出血（图 5）。光镜下，从切面向内，呈连续性组织学改变，即坏死区、充血水肿区、正常区（图 6）。凝固性坏死区肝板和肝细胞索结构破坏，肝小叶结构消失，小叶中央静脉塌陷、肝血窦明显扩大，细胞核出现固缩。肝内血管壁塌陷，有红色血栓形成（图 7）。用显微测微尺测定 HIFU 破坏封闭的血管直径，最大的血管为直径 2.5 mm 的静脉。

3 讨 论

HIFU 的止血作用首先是在治疗肿瘤时发现的。Chen 等[3]在研究 HIFU 治疗肝肿瘤时，发现 HIFU 治疗区肿瘤组织发生凝固性坏死；同时，靶区内血管闭塞使从正常组织到治疗区血流明显减少或消失，提示 HIFU 有致血管闭塞作用。Hynynen 等[4]应用 HIFU 使直径 0.6 cm 的兔肾动脉分支闭塞，Rivens 等[5]应用声强 4 660 W/cm^2、频率 1.7 MHz 的 HIFU 使直径为 0.5 cm 的鼠股动脉和 1.5 cm 的鼠股静脉闭塞。并且，HIFU 对创伤性肝、脾破裂出血也有良好的止血作用[6,7]。

3.1 HIFU 止血的原理

3.1.1 热效应 热效应是指超声波作用于组织时，声能量被组织吸收，转换为热能而使组织温度升高[8]。HIFU 的热效应能使肝组织发生凝固性坏死，从而减少肝组织渗血；并能使血管塌陷、血管内皮细胞破坏，胶原的破坏、暴露，触发凝血链级反应，使管腔内相继有红色血栓、混合血栓形成，从而闭塞血管，进一步达到止血目的。Hynynen 等[9]认为 HIFU 对血管的效应与血管管径、声强、频率和辐照时间有关，大血管管径较粗，血流速度快，易带走 HIFU 在靶区内产生的热而明显降低 HIFU 的热损伤效应，故大血管不易被 HIFU 损伤。目前认为，当声强在空化效应阈值 2 000 W/cm^2 以上时，HIFU 才能损伤较大血管，而在这阈值之下则只能损伤直径在 0.2 mm 以内的血管[10~12]。

3.1.2 空化效应 超声空化是指液体中存在的微小气泡（空化核）在超声波作用下产生的振荡、膨胀、收缩以至内爆等一系列动力学过程。在这一过程中，空化泡可发生崩溃，产生高温和冲击波，最终导致细胞和细胞内膜性结构的破坏。同时，高能量冲击波还能破坏细胞大分子的高能化学键，产生自由基，进一步破坏靶细胞结构[13]。Poliachi 等[14]将富含血小板的血浆经 HIFU 处理后，发现血小板的激活与空化效应密切相关，认为空化效应能促进血小板激活，增加其聚集、粘附力。

3.1.3 声流效应 当 HIFU 的声强达到 1 000 W/cm^2 时就能产生明显的声流效应，声强越大声流效应越明显[15]。在 HIFU 止血中，HIFU 产生的声流能将血液推开或推入破损的血管里。这样由于局部血液的减少，有利于 HIFU 能量的沉积；同时，由于将血液推开，降低了血管张力，有利于血管破损处的闭合。Vaezy 等[8]认为，强大的声流甚至可能将破碎的肝组织、血管床组织向血管内推，起到暂时将血流阻断的作用，从而使血栓更易、更快形成。

3.2 SonoVue 对 FUSC 的增效作用

近来的研究表明微泡造影剂在提高 HIFU 治疗效率方面也能起重要的作用。Keneko 等[16]的研究发现，加入声学造影剂 Levovist 后，HIFU 对兔肝脏组织所产生的坏死范围较无造影剂组扩大 2.8 倍，且两组病理学变化相同。2003 年 Sokka 等[17]报道了在 MRI 引导下以新西兰兔作为动物模型，用微泡造影剂增强聚焦超声热效应的体内实验，实验发现造影剂增强组的组织升温速度明显比对照组快，组织损伤面积约为对照组的 2~3 倍。目前，SonoVue 作为一

种新型的微泡造影剂已广泛的应用于超声诊断,其能否增强 HIFU 对组织损伤的效率，目前正受到广泛关注。本实验以山羊作为实验对象,探讨了 SonoVue 能否改变山羊肝脏组织声学环境,增加靶区组织能量沉积以增强 FUSC 疗效,缩短 FUSC 辐照时间。结果显示 FUSC 联合 SonoVue 组在相同治疗参数下与单纯 FUSC 组相比,可以缩短辐照时间,使靶区组织更容易被损伤,明显提高 FUSC 的治疗效率。其机制可能为:①动脉期微泡富集于肝组织内,增加了空化核的数量,在高强度聚焦超声声场中使得组织内的空化作用得以增强,同时降低了空化阈值[18](在液体中产生空化气泡所需的最低声压或声强值)使得空化效应更易于发生。②微泡的存在增加了组织对超声波的吸收从而快速升高组织温度。

3.3 FUSC 切肝的优点

通过本实验研究,我们发现 FUSC 辅助肝部分切除术是可行、有效的,且具有以下优点:①术中出血少。几乎达到了无血切肝的目的。②手术时间短。③操作简单。对于术中未闭的较大血管、胆管(直 >2 mm),由于肝组织发生凝固性坏死,创面已无渗血,术野干净,因而容易辨别和分离结扎,使手术操作简化,提高了手术效率。④断面止血彻底。所有实验动物术后断面未发生再出血。同时,由于局部高温的作用,如在肝癌切除术中，可杀灭肝断面上可能残存的癌细胞和肝断面胆管内可能存在的细菌，对减少肝癌局部复发和感染有重要意义。⑤对周围肝组织损伤轻,并发症少。组织病理学观察发现:凝固性坏死区与其以外的区域有一条清楚的过度带，即一个很锐利的边界。同时,由于术中无需进行肝血流阻断,避免了肝缺血 - 再灌注损伤及对内环境的影响，减少了手术并发症的发生;另外,手术中减少结扎止血和缝扎止血的线结,止血过程无炭化、不粘连,异物反应也随之减少。当然,在实际使用过程中,我们也发现,由于目前的聚焦超声外科手术钳的两个治疗头较厚,体积较大,因而术中需暴露充分,不然会影响操作;再加上肝脏形状不规则,厚薄不均,在同一次钳夹辅助过程中，较薄处的肝脏可能由于与治疗头结合不紧密而影响 FUSC 治疗效果，因而目前的聚焦超声外科手术钳还有待进一步改进。

综上,聚焦超声手术钳在肝部分切除术中的应用是可行和有效的,具有出血少、止血好、手术时间短、操作方便等优越性,联合应用 SonoVue 可增强 FUSC 止血效果,进一步缩短手术时间,提高 FUSC 的效率。

参 考 文 献

[1] 窦科峰,王德盛.肝脏手术中止血方法的新进展[J]. 中国实用外科杂志,2005,25(1):62-64.

[2] 施 杨,徐金锋.超声造影早期诊断肝纤维化和肝硬化[J]. 重庆医学,2007,36(21):2226-2228.

[3] Chen L,Rivens I,ter Haar G,et al. Histological changes in rat liver tumours treated with high intensity focused ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol,1993,19:67-74.

[4] Hynynen K,Chung A. Noninvasive arterial occlusion using high intensity focused ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol,1996,8:1071-1077.

[5] Rivens I,Rowland I. Focused ultrasound surgery induced vascular occlusion in fetal medicine[J]. Eur J Ultrasound,1999,9:89-97.

[6] 张 军,伍 烽.高强度聚焦超声对创伤性肝脾破裂出血的止血作用[J]. 中华实用医学,2003,5(6):51-52.

[7] Cornejo C J,Vaezy S,Jurkovich G J,et al. High-intensity ultrasound treatment of blunt abdominal solid organ injury:An animal model[J]. J Trauma,2004,57:152-156.

[8] Vaezy S,Martin R, Schmiedl U,et al. Biological Mechanisms of acoustically-induced hemostasis[J]. IEEE Ultrasonics Symposium,1999,2:1401-1404.

[9] Hynynen K, Chung A,Colucci V,et al. Potential adverse effects of high-intensity focused ultrasound exposure on blood vessels in vivo[J]. Ultrasound Med Biol,1996,22(2):193-201.

[10] Yang R,Reilly C R,Rescorla F J,et al. High-intensity focused ultrasound in the treatment of experiment liver cancer[J]. Arch Surg,1991,126:1002-1010.

[11] ter Haar G,Robertson D.Tissiue destruction with focused ultrasound in vivo[J]. Eur Urol,1993,23(1):8-11.

[12] Yang R,Griffith S L,Reilly C R,et al. Feasibility of using high intensity focused ultrasound for the treatment of unresectable retroperitoneal malignancies[J]. Ultrasound Med Biol,1992,11:37.

[13] Hynynen K,Chung A,Colucci V,et al. Noninvasive arterial occlusion using high intensity focused ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol,1996,8:1071-1077.

[14] Poliachik S L,Chandler W L,ourad P D,et al. Activation, Aggregation and Adhesion of platelets exposed to high-intensity focused ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol,2001,11:1567-1576.

[15] ter Haar G. Ultrasound focal beam surgery[J]. Ultrasound Med Biol,1995,21:1089-1100.

[16] Keneko Y,Maruyama T,Takegami K,et al. Use of a microbubble agent to increase the effects of high intensity focused ultrasound on liver tissue[J]. Eur Radiol,2005,15(7):1415-1420.

[17] Sokka S D,King R,Hynynen K. MRI-guided gas bubble enhanced ultrasound heating in vivo rabbit thigh[J]. Phys Med Biol,2003,48(2):223-241.

[18] Chang P P,Chen W,Mourad P D,et al. Thresholds for inertial cavitation in albunesuspensions under pulsed ultrasound conditions[J]. IEEE Trans Ultrason Ferroelect Freq control,2001,48:161-170.

(责任编辑:关蕴良)