维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)05-0641-04

兔脑在高强度聚焦超声作用下的耐受性研究

卞 伟[1]，支兴刚[2]，王智彪[3]，白 晋[3]，李发琪[3]，谭启华[3]，李崇雁[3]

（1.重庆肿瘤医院神经外科，重庆 400030；2.重庆医科大学附属第一医院神经外科，重庆 400016；
3.重庆医科大学医学超声工程研究所，重庆 400016）

【摘 要】目的：观察正常兔脑组织在不同剂量高强度聚焦超声（High intensity focused ultrasound，HIFU）作用后的反应和生存状态，探讨 HIFU 对脑部疾病治疗的可行性。方法：在总辐照时间不变的情况下，分组用不同的单次时间对 24 只新西兰兔脑组织进行定位损伤。观察实验兔的反应及生存状况，5 周后处死取材，先用氯化三苯基四氮（triphenyl tetrazolium choloride，TTC）染色观察后，常规 HE 染色，光镜下观察组织学变化。结果：观察期内实验兔的生存状态在单次作用时间≥20s 后明显变差，与作用次数无明显关系，组织学变化提示单次作用时间 5~10s 效果为最佳。结论：HIFU 能有效定位损伤深部脑组织，单次作用剂量适宜时是安全的，而与作用次数无关。

【关键词】高强度聚焦超声；耐受性；脑组织
【中国图书分类法分类号】R364 【文献标识号】A 【收稿日期】2006-2-21

Endurance of normal New Zealand Rabbits' brain tissue after high intensity focused ultrasound ablation

BIAN Wei, et al

(*Department of Neurosurgery, the Chongqing Tumor Hospital*)

【Abstract】*Objective*: The purpose of this study is to determine if HIFU is feasible for the treatment of brain diseases by observing New Zealand Rabbits' reaction, living status and variation in microscope after different dosages of ablation. *Methods*: By using the same total time of HIFU exposure, we took different divided time to sonicate localized brain tissues of 24 New Zealand Rabbits for several times, to observe the rabbits' reaction and living status. All animals were sacrificed after 5 weeks. Then we applied TTC stain to observe the gross changes and HE stain to observe histological changes in microscope. *Results*: During the observation period, the rabbits' living status was apparently getting worse when the single exposure was ≥ 20 second (s). The times of exposure were not correlated with living status. According to our observation, the rabbits could tolerate the dose of HIFU exposure < 5W × 20s, hut histological and statistic study indicated that the best single exposure time was 5~10s. *Conclusion*: HIFU could ablate deep localized brain tissue with little effect on the superficial tissue. The toleration to HIFU exposure for brain tissue is correlated with single dose of sonication, hut independent from times of exposure.

【Key word】High Intensity Focused Ultrasound; Endurance; Brain tissue

高强度聚焦超声是近年发展起来的一种治疗肿瘤的新技术。掌握脑组织对 HIFU 治疗的耐受程度对其将来在治疗脑部疾病的临床应用中是非常重要的。

1 材料与方法

作者介绍：卞 伟(1971-)，男，主治医师，硕士，主要研究方向：神经肿瘤。

基金项目：国家自然科学基金资助杰出青年基金资助项目(30325027)。

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 2~3 月龄新西兰大白兔 24 只，体重 1.2~1.5kg，雌雄各半，由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 仪器设备

1.1.2.1 CZF-II 型超声治疗仪 重庆海扶（HIFU）技术有限公司研制，重庆医科大学医学超声工程研究所提供。本研究采用的治疗头频率为 9.7MHz，直径 9.5mm，焦距 4.5mm，脉冲 1MHz，最大输出功率 5W，焦点处声强 2500W/cm^2。

1.1.2.2 电耦合测温仪 台湾 TES 电子公司生产。

1.2 实验方法

新西兰大白兔 24 只，随机分组，每组雌、雄各 2 只，共 6

维普资讯 http://www.cqvip.com

组，麻醉成功后，于颅顶正中取骨窗，保持硬脑膜完整。首先测定硬脑膜表面温度作为实验兔的基础温度，然后将 HIFU 治疗探头置于骨窗内进行照射，按单次作用时间不同设定为 5s 组、10s 组、15s 组、20s 组、30s 组和假照组，假照组为开颅后探头每次置入 15s，每只兔总作用时间均为 60s。本研究全部采用相同输出功率及相应的最适参数。每次作用后即刻于作用处测温，待温度与作用前基本一致后，进行下一次照射，完毕后缝合头皮。麻醉清醒后先观察其急性期反应，然后送实验动物中心标准饲养间，按实验动物标准喂养 5 周后将存活兔处死并取材，先观察 TTC 染色情况。然后取靶区组织，常规 HE 染色，光镜观察。

1.3 结果观察

首先，记录每次 HIFU 作用后即刻硬脑膜表面作用中心点的温度，并将其与作用前的基础温度相比较。其次，记录试验兔在观察期内的表现及预后结果。最后，先观察存活兔脑组织的 TTC 染色情况，然后在标本固定后进行肉眼和光镜检查。肉眼下观察脑组织形态学的大体改变，损伤灶的范围。取靶区组织，在不同倍数（10 倍，40 倍）的光镜下观察病理学改变。

2 结 果

2.1 HIFU 作用后硬脑膜表面温度的变化（室温=26℃）

各组升温幅度比较（表 1）。

表 1 各组升温幅度比较（℃）（$\bar{x}\pm s$，n =24）

	control	5s	10s	15s	20s	30s
升温幅度	0.00 ±0.59	9.43 ± 1.69	21.07 ± 4.49	20.70 ± 3.18	18.33 ± 3.82	29.05 ± 2.19
	1.23 ±0.89	9.27 ± 1.38	17.82 ± 2.25	23.08 ± 2.52	24.53 ± 3.26	26.60 ± 0.71
	−1.42 ± 1.05	8.78 ± 3.58	21.30 ± 4.30	24.08 ± 2.00	22.50 ± 2.52	25.55 ± 1.20
	−0.12 ± 2.61	9.07 ± 1.95	19.45 ± 2.57	18.18 ± 3.56	24.17 ± 1.93	28.40 ± 0.85
平均升温	−0.08	9.14	19.91	21.51	22.38	27.40

脑组织在 HIFU 作用初期升温较急骤，当单次作用时间超过 10s 后，升温幅度平缓，而 20s 后又出现升温幅度加大。而 10s 组和 20s 组的平均升温通过配对 t 检验，得 $P>0.05$，两组升温无显著差异。

2.2 实验兔在 5 周内的预后结果

作用后麻醉恢复较好，多在 2h 内清醒。30s 作用组有两只实验兔分别于当天和第 2 天死亡，另外两只于第 3 天死亡。死亡兔于 12h 内解剖，发现硬脑膜张力高，打开脑膜后见脑组织明显水肿，并从骨窗内向外膨出。20s 组仅 1 只存活，其他分别死于第 3 天、第 14 天和第 26 天，解剖时见水肿程度较 30s 组为轻。其它各组均存活，体重变化见表 2。

本实验特意选取未成年兔作为研究对象，以便观察 HIFU 对生长发育的影响。表 2 提示当单次作用时间≥20s 后，实验兔的生存、发育状况明显变差。

表 2 存活兔的体重变化（kg）

	control		5s		10s		15s		20s	
	O*	A**	O	A	O	A	O	A	O	A
1	1.2	2.5	1.3	2.6	1.3	2.4	1.5	2.6	–	–
2	1.4	2.6	1.4	2.5	1.4	2.6	1.4	2.5	–	–
3	1.2	2.4	1.3	2.7	1.4	2.8	1.2	2.3	1.4	1.8
4	1.3	2.6	1.5	2.8	1.5	2.7	1.3	2.5	–	–
Averagerise（kg）	1.25		1.28		1.22		1.12		0.4	

O*= 初始体重 A** = 5 周后体重

2.3 HIFU 治疗 5 周后的组织学变化

2.3.1 大体观察

2.3.1.1 一般情况 损伤灶表面与硬脑膜有粘连，硬脑膜与作用区局部的脑组织的粘连程度随单次作用时间的延长呈明显加重的趋势。假照组与 5s 组未见明显异常脑损伤灶。其余各组粘连轻者剥离硬脑膜，重者保留粘连处脑膜，沿大脑中缝矢状切开，可见从大脑皮层到皮层下约 4mm 处有大小不等的异常脑组织，色泽暗褐，形状呈类圆形，涉及左右大脑半球。

2.3.1.2 TTC 染色结果 正常脑组织被染成红色，损伤灶则呈灰白色，属未染色区（表 3，图 1）。

表 3 提示 TTC 未染色区所标识的损伤灶的范围随着单次作用时间的延长而扩大。

2.3.2 光镜下表现

假照组：表现为正常白质。

5s 组：组织结构较清晰，局部可见染色稍浅淡

表 3 各组 TTC 未染色区平均最大径比较（$\bar{x}\pm s$）

	对照（mm）	5s（mm）	10s（mm）	15s（mm）	20s（mm）	30s（mm）
未染色区最大位	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	1.00 ± 0.25	2.25 ± 0.50	3.00 ± 0.00	–

维普资讯 http://www.cqvip.com

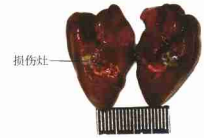


图 1 TTC 染色后的脑组织

的损伤区，与周围组织分界不清，周围组织细胞增生，但结构正常（图 2）。

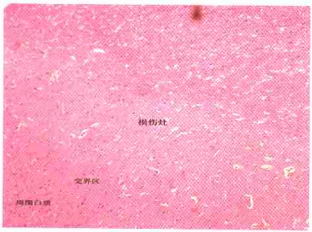


图 2 5 周后 5s 组镜下表现 HE×100

10s 组：组织结构较紊乱，局部可见细胞排列较稀疏的损伤区，与周围组织分界较清晰，交界区较窄，可见增生活跃的组织细胞（图 3）。



图 3 5 周后 10s 组镜下表现 HE×100

15s 组：组织结构紊乱，损伤灶细胞排列更疏松，见钙盐沉积，交界区更窄，周围见组织细胞增生（图 4）。



图 4 5 周后 15s 组镜下表现 HE×100

20s 组：组织结构更紊乱，损伤灶内细胞更加稀疏，交界区明显增宽并有较多空泡出现（图 5）。

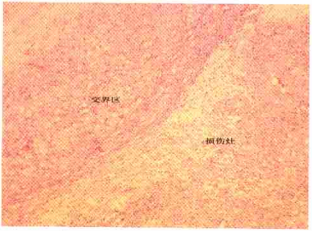


图 5 5 周后 20s 组镜下表现 HE×100

由此可见，除假照组和 5s 组外，其余各组的镜下表现随单次作用时间的延长，损伤区组织细胞排列更加松散，局部组织结构紊乱程度加剧，交界区出现由不明显到明显，直至增宽并出现空泡样改变。

3 讨 论

3.1 HIFU 治疗的剂量学研究

HIFU 治疗的剂量主要由焦点处的声强与治疗时间决定。由于受多种因素的影响，对活体生物细胞剂量学研究较为困难。王智彪[1]于 1998 年首先提出生物学焦域的概念，为高强度聚焦超声的剂量学研究奠定了一定的基础和方向。目前有关脑组织的 HIFU 剂量学研究，国内外尚未见报道。

3.1.1 治疗的剂量与靶区温度的关系

维普资讯 http://www.cqvip.com

HIFU是使超声束聚焦于靶区,产生 > 65℃的瞬态高温,迅速使靶区组织出现凝固性坏死而达到治疗目的。因此,温度监控在研究中极为重要。

本实验的研究对象是脑组织的慢性期损伤,由于所用 HIFU 探头焦距不深, 因此根据组织表面的温度上升可以判断靶点的升温情况,所以采用热敏电阻温度计硬脑膜表面测温的方法,既避免了组织损伤,结果又比较直观。硬脑膜表面温度变化可理解为靶点温度通过热传导衰减后的结果,代表靶点周围组织的升温。

按实验设定治疗仪 (换能器) 的工作参数发现,随着单次作用时间的延长,硬脑膜表面的温度呈线性增高,升温幅度亦呈线性增高。当单次作用时间为 10~20s 时, 温度与升温幅度都没有明显变化。该作用平台期的出现可能与 Malcom 等[2]发现的损伤 - 损伤干涉效应有关,即由于高温热效应使组织的特性发生了改变,受损组织比正常组织的衰减系数高,对产生能量的吸收与出现损伤之前有明显差异。因此我们认为再增加治疗剂量虽能使局部温度继续上升, 但是将以增加周围组织的损伤为代价,实验兔在观察期内的生存状况证实了我们的推测。根据统计学分析认为本实验中每次作用时间 10s 和 20s 的升温效果没有差异, 而从临床治疗的角度,单次作用时间越短越有实用价值。

从物理学角度[3],假设脑组织密度和比热容 cm 与水相同为: $\rho = 1.00 g/cm^3$, $cm = 4.18 J/g℃$, 且产生的热量不失散,则辐照 t 秒后组织的温升为:

$$\Delta T = (2 \times 0.026 / \rho c_m) I t f^{1.1}$$

$$= 0.012 I t f^{1.1} (℃)$$

本实验中, $f = 1MHz$, $I = 2500 W/cm^2$, 则 $\Delta T \approx 36t$(℃),即作用 1s 能使焦点处升温 36℃,这与实测结果差距较大,可以认为热能在向周围组织传导的过程中,逐步消耗所致。而且差距越大,焦点周围组织吸收的热能越多,热损伤越重。因此,缩短靶点的作用时间可以减少周围组织的热损伤。

3.1.2 预后与治疗模式的选择

本实验中由于总辐照时间确定,所以单次作用时间越短,作用次数越多。预后结果表明,当单次作用时间≥20s 后, 实验兔的生存状态明显变差,20s 组仅 1 只存活,生存率为 25%,而 30s 组则全部死亡。同时因本实验选取的是未成年兔,因此体重的变化也能反映生存状态,20s 组里唯一的生存兔体重增加明显差于其它各组,也说明它的生存质量下降。由此说明在相同条件下,若单次作用时间≥20s,则无法保证 HIFU 治疗的安全性, 而辐照次数与实验兔的预后好坏无关。理想的治疗模式是在保证有效性的前提下,尽量缩短治疗时间,在本实验中,5s 和 10s 是比较理想的单次作用时间。

3.1.3 治疗的剂量与凝固性坏死体积的关系

在实际治疗中,组织凝固性坏死的大小是一个非常重要的参数。现已证明大多数哺乳动物细胞在 42℃以上迅速失去活性;43℃以上温度每升高 1℃, 作用时间可缩短 1/2。因此焦点处温度要 > 42℃才能产生效应,理想的作用时长应为达到效应温度后产生坏死效应的时间。聚焦超声的损伤范围是治疗效果和安全性得到统一的关键,而超声生物学焦域的大小、超声剂量、组织的热敏感性、组织的导热性及血流速度共同决定了靶组织的损伤范围。

由于本实验的研究对象是损伤灶的慢性期表现,观察期结束时凝固性坏死灶通过局部组织的星型胶质细胞和小胶质细胞反应性增生修复,病灶已部分吸收,此时的损伤灶较损伤当时所形成的凝固性坏死灶,体积已有明显缩小。McDannold 等[4]在研究猕猴脑组织损伤的过程中,证实了在去除颅骨的情况下,HIFU 能定位损伤深部脑组织,探头的理论焦距与实际靶点基本重合,而超声波对周围组织的作用低于损伤阈值,与本实验结果一致。

3.2 HIFU 辐照效果的观察

本实验的主要研究对象为慢性期损伤,未进行实时监测。TTC 是一种用于评价组织内脱氢酶活性的大体标本染色法,主要用于帮助肉眼下分辨坏死组织。TTC 染色最早应用于心肌梗塞的病理学观察,目前应用范围较广。Lili Chen 等[5]通过比较兔脑在 HIFU 作用后 4h 的 MRI 影像、TTC 染色结果,光镜和电镜下观察情况,发现前三者的大小范围基本吻合。本实验发现在 HIFU 作用后 5 周,TTC 未染色区面积大小与单次作用时间的长短相关,位置均在组织深部,单次作用时间短的实验组大脑皮层未见明显损伤,可以认为随着作用时间的延长,所产生的累积升温效应将影响靶区周围正常组织的细胞活性,阻碍损伤灶的修复。光镜下所观察到的组织学变化证实了上述推论。

本实验结果表明 HIFU 能有效损伤脑组织,作用剂量适宜时是安全的。

(下转第 661 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

20~25℃，PQ 片段的长度应在 300~1000bp 之间。

引物 A 和 B 的 Tm 值比 PQ 片段的 Tm 值约低 35℃左右，此时 PCR 反应可有较好的特异性和较高的扩增效率。

3.4 Bi-PASA 法反应优化

Ta(退火温度)比 PQ 片段的 Tm 值低 20℃左右，或比内侧引物 A、B 的 Tm 值高 5~7℃。较高的 Ta 值可避免在 PCR 反应中非特异性条带的产生，但可能会导致引物 A、B 难以与模板结合。

对引物浓度进行优化，先固定外侧引物 P、Q 的浓度，改变内侧引物 A、B 的浓度。

PCR 循环次数在 35 个循环以内，32 个循环即可达到较高的扩增效率。过多的循环次数不利于 PCR 产物的保存。

Bi-PASA 法作为一种检测 SNP 行之有效的方法，其优点在于该方法不需要高档大型仪器设备及昂贵的 ExTaq 聚合酶，PCR 反应条件简单，仅需一次 PCR 反应即可完成一份样本 SNP 的检测。内侧引物 5' 端的 GC 尾能有效提高 PCR 反应目的条带的扩增效率，同时有效减少非特异条带的产生，避免假阳性或假阴性的产生，从而更便于观察结果。本文应用 Bi-PASA 法检测了 220 例汉族自然人群的 PTEN 基因的 rs9651492 和 rs2673835 位点，证明该方法具有较高的特异性，可重复性和实验费用低廉等优点。而实验成功的关键在于多重 PCR 反应的引物设计和各项反应条件优化。

国外学者[8]应用等位特异 PCR 法（allele-specific amplification PASA）对肾上腺 β_2 受体基因上位与 -645 到 79 之间的 SNPs 进行检测。证明该方法具有较高的特异性和稳定性，提出内侧引物 5 端的 GC 尾有助于 PCR 反应退火温度的提高，从而提高了检测的特异性，但应用 PASA 法检测一个样本的多态性位点需两次 PCR 反应。而本文所应用的 Bi-PASA PCR 技术检测一份样本仅需一次 PCR 反应，从而实现了高效低成本大批量检测 SNP。经直接测序也证明 Bi-PASA PCR 法检测 SNP 准确性高，特别适合于已知 SNP 的检测和人群中突变 SNP 的筛查。值得在基因组 SNP 以及微缺失和插入研究中进一步推广。

（通讯作者：彭惠民，重庆医科大学细胞生物学及遗传学教研室，400016，E-mail:penghuimin6@sohu.com）

参 考 文 献

[1] Nollau P, Wagener C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment.IFCC Scientific Division, Committee on Molecular Biology Techniques[J].Clin Chem, 1997;43:1114-1128.

[2] Collins A, Lonjou C, Morton NE.Genetic epidemiology of single-nucleotide polymorphisms [J].Proc Natl Acad Sci USA, 1999;96:15173-15177.

[3] Tost O, Brandt F, Boussicault D, et al. Molecular haplotyping at high throughput [J]. Nucleic Acids Res, 2002;30:96- 99.

[4] Ishihara H, Sasaoka T, Lagawa S, et al.Association of the polymorphisms in the 5' -untranslated region of PTEN gene with type 2 diabetes in a Japanese population[J]. FEBS Lett, 2003;20(554):450-454.

[5] Nichols WC, Liepnieks JJ, McKusick VA, et al. Direct sequencing of the gene for Maryland/German familial amyloidotic polyneuropathy type II and genotyping by allele-specific enzymatic amplification [J].Genomics, 1989;5:535-540.

[6] Liu Q, Thorland EC, Heit JA, et al. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles:a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes [J].Genome Res, 1997;7:389-398.

[7] Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al. Analysis of any point mutation in DNA.The amplification refractory mutation system (ARMS) [J]. Nucleic Acids Res, 1989;17:2503-2516.

[8] Wijesekara N, Konrad D, Eweida M, et al.Muscle-Specific Pten Deletion Protects against Insulin Resistance and Diabetes [J].Mol Cell Biol, 2005;25:1135-1145.

（上接第 644 页）

参 考 文 献

[1] 王智彪.生物学焦域的概念及在高强度聚焦超声切除组织中的作用[J].临床超声医学杂志，1998;9(4):217-218.

[2] Malcolm AL, ter Haar GR.Ablation of tissuvolumes using high intensity focused ultrasound [J].Ultrasound in Med.Biol, 1996;22(5):659-669.

[3] 冯 若.高强聚焦超声“切除”肿瘤的机理[J].中国超声医学杂志，2000;16(12):881-884.

[4] McDannold N, Moss M, Killiany R.MRI-guided focused ultrasound surgery in the brain:tests in a primate model [J].Magn Reson Med, 2003;49(6):1188-1191.

[5] Chen L, Bouley DM, Harris BT, et al.MRI study of immediate cell viability in focused ultrasound lesions in the rabbit brain [J].Magn Reson Imaging, 2001;13(1):23-30.