维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0494-04

高强度聚焦超声作用下兔脑的病理转归

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:通过研究高强度聚焦超声(High intensity focused ultrasound,HIFU)对正常兔脑组织作用后损伤灶的病理转归,探讨其治疗脑肿瘤的安全性和可行性。方法:选取合适的 HIFU 作用剂量,对 12 只新西兰兔左右两侧脑组织分别照射 5s 和 10s,于即刻、3 天、7 天、14 天、28 天及 60 天处死取材,大体和组织学观察照射后损伤灶的生物学特性及靶区组织病理学变化,并在电镜下观察损伤即刻的超微结构变化。结果:大体与光镜观察发现在作用时间为 5s 和 10s 的不同情况下,二者损伤程度以 28 天差异最大,最终 10s 区转归为神经胶质瘢痕,5s 区则未见明显损伤痕迹。在 HIFU 损伤即刻,电镜下可见 10s 区出现细胞、血管结构完整性受破坏,而 5s 作用区仍具有完整性。结论:HIFU 能定位损伤大脑深部组织,对浅表组织的影响较小。损伤灶的修复方式与照射的剂量有关,提示用适当剂量 HIFU 治疗脑肿瘤是安全的和可行的,为将来应用 HIFU 临床治疗脑肿瘤提供了实验依据。

【关键词】高强度聚焦超声;脑损伤;病理转归;作用时间
【中国图书分类法分类号】R364 【文献标识号】A 【收稿日期】2006-2-21

Pathological regression at the focus in 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:* To determine if HIFU is secure and effective for the treatment of intracranial neoplasm by observing pathological regression at the focus in normal New Zealand Rabbits' brain tissue after ablation. *Methods:* We selected suitable doses of exposure to ab-late 12 rabbits' brain tissue, and sacrificed them successively at 1, 3, 7, 14, 28 and 60 days(d) after sonication, observing target lesions grossly and microscopically to identify the biological characteristic and pathologic changes. The ultra-structural changes were also observed immediately after sonication. *Results:* We took the 5s and 10s for each exposure time in the studies. Different ranges of lesions were pro-duced after different exposure time, especially on 28d, although grossly and microscopically the lesion were almost the same in early period. Finally the 10s sonicated area regressed to scar of glia, but no apparent lesion was found in the 5s area. Ultra-structural examination showed the integrity of cell and vascular structure were destructed in 10s area, but remained intact in 5s area. *Conclusion:* HIFU could ab-late deep localized brain tissue with little effect on the superficial brain tissue. The restoring mode of sonicated lesion is correlated with ex-posed doses, and it is reversible when using suitable dose of exposure. In conclusion, it is secure and effective to use suitable dose of HIFU in the treatment of intracranial neoplasm and some experimental data are provided for future clinical investigation.

【Key words】High intensity focused ultrasound; Brain injury; Pathologic regression; Time of exposure

目前国外的研究机构在 HIFU 对脑组织的急性损伤反应方面研究较多,而对损伤后的病理转归却少见报道。本实验是选取新西兰兔耐受较好的作用剂量,分别作用于其大脑两侧,在不同的时间段取材,然后通过肉眼、光镜和电镜观察,从而了解脑组织在不同剂量 HIFU 损伤后的病理转归。

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 材料与方法

1.1 实验材料

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1.1 实验动物 3～4 月龄新西兰大白兔 12 只，体重 1.8～2.2kg，性别不限，由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 仪器设备 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。

1.2 实验方法

新西兰大白兔麻醉成功后，常规消毒铺巾，于颅顶正中取骨窗约 3.0×2.0cm^2 大小，保持硬脑膜完整。作用时，将探头置于骨窗内，紧贴硬脑膜，用无菌生理盐水作为耦合剂。本实验采用治疗仪最大输出功率 5W，先在骨窗左侧进行 HIFU 照射 5s，用生理盐水冲洗冷却后，再置探头于骨窗右侧作用 10s，完成后缝合头皮。即刻将 1 只兔处死，取新鲜靶区组织送电镜观察超微结构变化，另 1 只兔采用 4% 多聚甲醛心脏灌注处死后观察组织学变化。其余实验兔麻醉清醒后按实验动物标准喂养，并于术后 3 日内，每日肌注青霉素 80 万单位 1 次。分别于 3 天、7 天、14 天、28 天及 60 天随机各取 2 只兔，采用 4% 多聚甲醛心脏灌注处死，取出兔脑用 10% 甲醛溶液继续固定 24h，先大体观察损伤灶的变化，然后 HE 染色，镜下观察靶区组织病理学变化。

2 结 果

2.1 一般表现

实验兔在 HIFU 照射后，麻醉恢复较好，多在术后 2h 内清醒。观察期内无明显功能障碍。

2.2 大体观察情况

2.2.1 HIFU 照射后不同时段的大体表现

即刻：在兔脑表面可见暗红色损伤灶，冠状及矢状切面可见类圆形损伤灶。损伤范围在皮层下，中心为凝固性坏死，并被局限性的出血病灶所包裹，周围水肿带，边界不甚清楚。

第 3 天：损伤灶表面颜色变深，切面可见边界较即刻时清楚，灰白色凝固性坏死范围扩大，周围的出血带变窄，水肿带增宽，病灶边缘波及皮层。

第 7 天：损伤灶范围扩大，整个病灶呈暗褐色，无法分辨凝固性坏死和出血带，边缘仍可见薄层水肿带，病灶内填充物较疏松与周围正常组织分界明显。

第 14 天：左右两侧出现不同表现，冠状切面见右侧损伤灶（10s 作用区）范围明显大于左侧损伤灶（5s 作用区）。右侧病灶色泽变深，左侧病灶色泽变浅。

第 28 天：左侧病灶缩小，表面观已无明显损伤痕迹。右侧仍可见边缘不清的一块青灰色痕迹，矢状切开后见病灶呈均匀褐色，边缘为胶质增生带。

60 天：表面已看不出损伤痕迹，在左侧靶区各切面也未见明显异常，右侧靶区位置可见一小块组织较周围组织苍白。

2.2.2 不同时段损伤灶大小比较

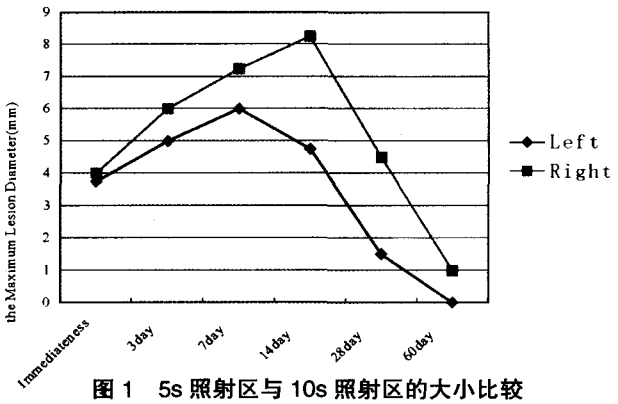


图 1 5s 照射区与 10s 照射区的大小比较

图 1 说明，两个不同作用剂量造成的损伤灶大小在 14～28 天时差异最大，但最终都趋于缩小甚至消失。通过配对 t 检验进行统计分析，比较 2 个不同的 HIFU 作用时间所造成的损伤灶大小，$P<0.05$，二者的差异有显著意义。

2.3 镜下观察

HIFU 作用后即刻组织结构形态仍保持，靶区内出现大小不一的空泡，高倍视野下可见神经胶质细胞核浓缩、核溶解，神经元核偏位、尼氏体消失，说明已有损伤发生(图 2、3)。

第 3 天：靶区内空泡已不明显，代之以疏松的坏死组织，其中细胞结构已被破坏，仅见边缘模糊的细胞核，染色较周围正常组织浅淡。

第 7 天：查见靶区组织大片坏死，表现为均匀的红染物质，已不见细胞残骸，交界区出现炎症细胞浸润带。

第 14 天：靶区边缘炎症细胞浸润范围扩大，坏死区周围神经胶质细胞增生，向坏死区延伸，有少量胶质结形成（图 4、5）。

在此期间，左侧（作用时间为 5s）与右侧（作用时间为 10s）的镜下表现基本一致。

第 28 天：左右侧表现不一致，左侧主要表现为靶区与周围正常组织分界不清，有较多增生的胶质细胞，能看见散在正常神经元；右侧靶区与周围正常组织仍有明显分界，靶区广泛分布肿胀的神经胶质细胞，并有钙盐沉积，周围组织表现为正常白质。（图 6、7）

第 60 天：左侧表现为完全正常白质，未见明显

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 2 HIFU 作用后即刻 HE ×400 左侧(作用时间为 5s)

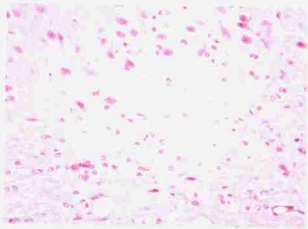


图 3 HIFU 作用后即刻 HE ×400 右侧(作用时间为 10s)

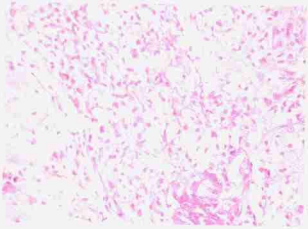


图 4 HIFU 作用后 14 天 HE ×400 左侧(作用时间为 5s)

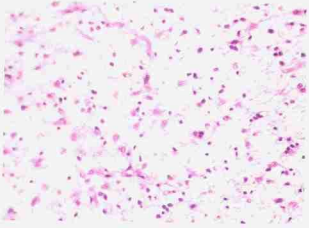


图 5 HIFU 作用后 14 天 HE ×400 右侧(作用时间为 10s)



图 6 HIFU 作用后第 28 天 HE ×400 左侧(作用时间为 5s)

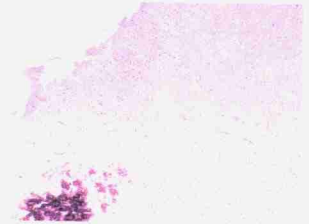


图 7 HIFU 作用后第 28 天 HE ×100 右侧(作用时间为 10s)

损伤痕迹;右侧靶区明显缩小,与周围组织分界模糊,主要表现为胶质纤维富集的区域,其中细胞成分比周围组织明显较少。

2.4 超微结构变化

在 HIFU 辐照后即刻,5s 区细胞、血管仍具有完整性,10s 区则表现为完整性受破坏,即出现毛细血管破裂、髓鞘破坏、神经胶质细胞损伤及破坏、暗神经元。其中神经元和胶质细胞破坏主要表现为细胞膜的完整性受损,核膜消失,细胞器散乱、难以辨认(图 8,9)。

3 讨 论

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 8 胶质细胞破坏 ×6000 右侧(作用时间为 10s)



图 9 胶质细胞损伤 ×6000 左侧(作用时间为 5s)

本实验选取了新西兰兔耐受较好的作用剂量作为研究对象。在实验中，通过采用不同时间点取材了解损伤后的病理转归过程及趋势，为更好地比较各个时期损伤灶的大小，取材时用 4% 多聚甲醛心脏灌注，取出脑组织后用 10% 甲醛继续固定 24h，将病灶定形，因此在大体观察时的测量结果准确、可靠。电镜标本需新鲜组织制备，灌注之后不能使用，为了不影响对大体标本的观察，只对即刻的标本进行电镜取材。

3.1 HIFU 损伤后的急性期表现(1~3 天)

本研究中，在使用不同辐照剂量作用后，大体和光镜下表现基本一致，中心均为凝固性坏死，边缘有出血带和水肿带。在电镜下，发现 10s 作用区，细胞及血管破裂，结构完整性遭破坏，而 5s 作用区，可见细胞内结构显示不清，但膜仍完整，由此可见二者超微结构的损伤程度不同。目前国际上关于 HIFU 脑损伤急性期的研究较多[1-5]，所得结果与本实验结果基本相符。但多数研究只进行了急性期的观察，且使用的照射剂量较大，许多学者认为 HIFU 造成的脑组织损伤是不可逆的。本实验结果显示，在超声治疗仪的功率为 5W 时，照射 10s 后造成细胞超微结构完整性破坏，无疑将形成不可逆的组织损伤，但在照射 5s 后细胞仍具有完整性，所形成的损伤灶将可能修复。

3.2 HIFU 损伤后的亚急性期表现(3~14 天)

在这个时期中，大体标本显示在 5s 区和 10s 区损伤灶大小的差异变大，而镜下表现则无明显差别，主要是坏死区边界趋于明显，出现炎细胞浸润和周边组织胶质细胞增生。对这个时期 HIFU 损伤灶的变化，未见文献报道。根据图 2 显示在 7 天之后 5s 侧的损伤灶已开始缩小，而 10s 侧的损伤灶还在继续增大，预示着在不同的 HIFU 剂量作用后，转归的结局将有所不同。

3.3 HIFU 损伤后的慢性期表现(14~60 天)

此时，在大体标本和光镜下的观察中，5s 侧和 10s 侧均表现出明显不同，但两侧的损伤灶都趋于修复，最终 10s 侧转归为胶质瘢痕，5s 侧则完全修复，未见损伤痕迹。结果说明在本实验设定的条件下，脑组织在 HIFU 作用 5s 后所造成的损伤在修复后与正常组织无明显差异。实验还发现，第 28 天时，10s 侧在镜下出现的肿胀胶质细胞与耐受性实验中观察到的情况类似，文献中未见相关报道，具体原因有待进一步研究分析。

3.4 HIFU 对脑血管的作用

脑组织血供丰富，血管分布密集，因此脑血管在 HIFU 损伤后的病理变化也是与转归密切相关的。本研究发现，实验中所采用的两个作用剂量均造成了损伤灶出血，但出血被局限于损伤灶及周边组织，未形成血肿。就这一现象，Poliachik 等[6]认为是 HIFU 因空化作用造成血管损伤的同时，又能诱导血小板迅速聚集、粘附于血管破裂处，从而快速止血使出血局限。Mesiwala 等[7]认为 HIFU 能选择性的开放血脑屏障，使脑血管的通透性增加。Hynynen 等[8]的研究表明，在适宜剂量的聚焦声能作用下，血脑屏障的损伤可以定位，而且所造成的损伤是可逆的，这为 HIFU 的临床应用提供了新的途径。

4 小 结

（下转第 520 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

大多数病毒已被清除) 所测的气道反应性明显高于对照组，说明单独 RSV 感染可以使气道反应性增高，这与 Jafri 等[3]的研究结果相一致。

呼吸道上皮细胞是 RSV 的主要感染细胞，除病毒本身对气道上皮的直接损伤免疫反应也在 RSV 感染后炎症中扮演重要作用[4]。Toll 样受体是固有免疫防御系统的重要成分，目前已发现 TLR1~TLR10，它们可表达于各类免疫细胞，其中 TLR4 在正常呼吸道上皮细胞有低水平表达。已知 TLR4 是细菌脂多糖(LPS)的配体，其信号传递能够活化炎症转录因子 NF-κB，使炎症性细胞因子表达上调[5]。本研究中 RSV 感染使小鼠肺组织 TLR4 表达水平明显升高，后者可能在 RSV 感染后炎症发生发展中起到重要作用。

TLR4 表达与气道反应性的相关性分析表明 TLR4 表达与吸入 3.2g/L 乙酰甲胆碱时的气道反应性呈正相关，提示 TLR4 在 RSV 感染导致的气道反应性增高中可能发挥一定作用。其机制可能为 RSV 感染通过上调 TLR4 的表达增强了气道局部的免疫性炎症，进而加重了气道上皮的损伤。Haeberle 等[6]发现 RSV 感染对炎症性转录因子 NF-κB 的早期活化是依赖于 TLR4 的，这为上述机制的推测提供了一定的依据。总之，TLR4 在 RSV 感染后气道炎症、气道高反应性的形成中可能起到一定作用，有待进行更深入的研究。

参 考 文 献

[1] Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, et al. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7[J].Am J respir Crit Care Med,2000;161(5):1501-1507.

[2] Stein RT,Sherrill D,Morgan WJ, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years[J].Lancet,1999;354(9178):541-545.

[3] Jafri SH, Chavez-Bueno S, Mejias A, et al. Respiratory syncytial virus induces pneumonia,cytokine response,airway obstruction,and chronic inflammatory infiltrates associated with long-term airway hyperresponsiveness in mice[J].J Infect Dis,2004;189:1856-1865.

[4] Sheeran P,Jafri H,Carubelli C, et al. Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease[J]. Pediatr Infect Dis J,1999;18:115-122.

[5] Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors[J]. Crit Care Med,2002;30(1):s1-s11.

[6] Haeberle HA, Takizawa R, Casola A, et al. Respiratory syncytial virus-induced activation of nuclear factor-kappaB in the lung involves alveolar macrophages and toll-like receptor 4-dependent pathways [J]. J Infect Dis, 2002;186(9):1199-1206.

(上接第 497 页)

本实验通过多个时段的取材，了解采用 CZF-II 型超声治疗仪，在 5W×5s 和 5W×10s 的 HIFU 剂量作用下所造成脑组织损伤灶的病理变化过程。在此过程中，早期大体和光镜下观察未见明显不同，而电镜下两者差异明显；晚期则分别表现为胶质瘢痕形成和损伤完全修复。因此，用适当 HIFU 剂量治疗脑肿瘤是安全和可行的。这为将来应用 HIFU 临床治疗脑肿瘤提供了实验依据。

参 考 文 献

[1] Connor CW, Hynynen K. Patterns of thermal deposition in the skull during transcranial focused ultrasound surgery [J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2004;51(10):1693-1706.

[2] Hynynen K, Clement GT, McDannold N, et al. 500-element ultrasound phased array system for noninvasive focal surgery of the brain: a preliminary rabbit study with ex vivo human skulls [J]. Magn Reson Med, 2004;52(1):100-107.

[3] McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz FA, et al. MRI investigation of the threshold for thermally induced blood-brain barrier disruption and brain tissue damage in the rabbit brain[J]. Magn Reson Med, 2004;51(5):913-923.

[4] McDannold N, King RL, Hynynen K. MRI monitoring of heating produced by ultrasound absorption in the skull: in vivo study in pigs [J]. Magn Reson Med, 2004;51(5):1061-1065.

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

[6] Poliachik SL, Chandler WL, Ollos RJ,et al. The relation between cavitation and platelet aggregation during exposure to high-intensity focused ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol, 2004;30(2):261-269.

[7] Mesiwala AH, Farrell L, Wenzel HJ,et al. High-intensity focused ultrasound selectively disrupts the blood-brain barrier in vivo [J]. Ultrasound Med Biol, 2002;28(3):389-400.

[8] Hynynen K, McDannold N, Sheikov NA,et al. Local and reversible blood-brain barrier disruption by noninvasive focused ultrasound at frequencies suitable for trans-skull sonications[J]. Neuroimage, 2005;24(1):12-20.