维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)01－0030－04

HL－1 改变兔肝脏组织声学环境的实验研究(Ⅱ)

肖雁冰，肖子文，刘丽萍，王智彪，李发琪

(重庆医科大学医学超声工程研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 HL－1 改变兔肝脏组织声学环境的可行性及机制。方法:实验组用 HL－1 静脉输入 20min,约 1h 后解剖,取小块肝脏组织送病理,然后即行肝脏 FU 定点损伤及靶区组织温度测量,辐照时间为 3s、6s、9s、12s、15s,功率 3.04W、频率 11MHz,脉冲 1000Hz,实验后每只兔肝取 2～3 块未损伤组织测量其密度;对照组以 Saline 代替 HL－1,其余步骤同实验组。结果:两组温度变化趋势基本相同,但实验组各个辐照时间温度上升值均大于对照组($P<0.05$)。大体观实验组兔肝脏外观呈粉红色,可见类似脂肪肝似的脂质沉着,病理检查肝细胞和肝血窦内均见大量脂质体沉积,肝血窦腔隙及中央静脉缩小,切面有"实变"感;肝组织密度测量实验组和对照组分别为 $1.1217\pm0.0281 g.cm^{-3}$ 和 $1.0547\pm0.0388 g.cm^{-3}$($P<0.01$)。结论:HL－1 静脉输入可以导致肝脏组织结构发生相应的改变、加速超声能量在靶区组织处的沉积、提高组织的温升效果,因而改变了肝脏组织的 AET。

【关键词】HL－1;肝脏;组织声学环境;聚焦超声;温升;密度

【中国图书分类法分类号】R318.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－06－18

Experimental study on acoustic environment change in normal rabbit liver tissue with HL－1(Ⅱ)

XIAO Yanbing, et al

(*Department of Ultrasonic Engineering in Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the feasibility and mechanism on changing acoustic environment in tissue (AET) of rabbit liver by HL－1 intravenous injection. *Methods*: 10 New Zealand rabbits were randomly divided into two groups, treatment and control group with 5 rabbits respectively. Before rabbit livers were ablated in vitro by using focused ultrasound(FU)(3.04W, 11MHz), HL－1 was injected intravenously via rabbit ear marginal vine for 20 minutes. Rabbits were sacrificed by excessive anesthesia after 1 hour, and small pieces of liver tissue were cut for pathological exammation. Rabbits liver were ablated with FU in the manners of dot scan in different preplanned liver areas with various treatment time of 3s, 6s, 9s, 12s and 15s, and its temperature in each dot was measured immediately after ablation. 2 to 3 pieces of non－damaged tissues in each liver were chosen to measure its density after trial. All processes were the same as those of experiment group except replacing HL－1 with saline in control group. *Results*: Similar time－temperature curve showed in two groups except the temperature was higher in every dot in treatment group than that of control group($P<0.05$). Pink, tumidity and lipid deposition were seen in the liver of treatment group. Pathological exammation showed augmentation, swelling and disorders of hepatocytes in treatment group; hepatic sinusoids and central vein of liver shrunk evidently. "Consolidation configuration" appearance was found in tissue section. Abundant liposome deposited in hepatocytes and sinusoids and accumulated in sinusoids in treatment group. The densities of liver tissues were $1.1217\pm0.0281\ g.cm^{-3}$ and $1.0547\pm0.0388 g.cm^{-3}$($P<0.01$) in treatment and control group respectively. *Conclusion*: HL－1 can accumulate massively in rabbit liver and change its AET by intravenous injection, which can enhance the deposition of ultrasonic energy in target tissue and speed up temperature rising.

【Key words】HL－1; Rabbit liver; Acoustic environment in tissue (AET); Focused ultrasound (FU); Temperature rising; Density

在聚焦超声(focused ultrasound, FU)治疗学上,组织声学环境(acoustic environment in tissue, AET)或组织声学性质(acoustic character in tissue, ACT)可以理解为在 FU 治疗时组织特有的结构、密度、血液供应及功能状态所表现出来的超声性质[1,2],即

作者介绍:肖雁冰(1967－),男,副主任医师,博士,主要研究方向:肿瘤 HIFU 治疗。

基金项目:本研究获重庆医科大学优秀博士论文基金资助。国家杰出青年基金资助(NO.30325027)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

影响 FU 能量沉积的媒质(组织)因素;而改变组织声学环境则可理解为用某种或某些方法改变组织的结构、密度、血液供应和功能状态,从而改变组织固有的声学性质,以达到加速组织超声能量沉积的目的。自 Cheng SQ 等[3]将碘化油用于改变猪肝脏 AET 的研究以来,已有作者把超声微泡造影剂应用于类似的研究[4],并取得了一定的效果。但用脂质成份改变肝脏声学性质以增强 FU 能量沉积的研究尚未见报道。本研究拟利用脂质体易于在肝脏聚积的特点,通过经兔耳缘静脉输入 HL-1,观察其是否有改变兔肝脏 AET 的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 新西兰大白兔 10 只(由重庆医科大学动物实验中心提供),雄雌不限,月龄 3 个月左右。随机平分成实验组(HL-1 组)与对照组(Saline 组),兔体重分别为 2.14±0.11kg 和 2.20±0.16kg($P>0.5$)。

1.1.2 药物及试剂 ①HL-1:HIFU liposomes-1(HL-1,一种脂质体);②生理盐水(Saline);③速眠新(846 合剂)Ⅱ注射液(长春军需大学兽医研究所试制)。

1.1.3 实验仪器 CZF-1 型妇科聚焦超声治疗仪,由重庆海扶(Haifu)技术有限公司研制生产,该设备由功率源、治疗头和循环水三部分组成。本实验设置参数为:功率 3.04W,频率 1MHz,脉冲 1000Hz;TES 测温仪(TES1310 TYPE-K THERMOMETER),台湾 TES 公司生产;测量天平;20ml 玻璃量筒。



图 1 兔肝 FU 定点辐照点设计及损伤图

1.2 实验方法

1.2.1 新西兰大白兔禁食 12h,实验时以速眠新 0.02ml/kg 肌肉注射麻醉大白兔后,经兔耳缘静脉输入 HL-1(50~60 滴/min,20mm)。输液毕约 1h 静脉注射空气处死,解剖完整取出兔肝脏,照相并取小块组织送病理检查。对照组以 Saline 代替 HL-1,其余步骤同实验组。

1.2.2 FU 定点损伤实验及温度测量 将兔肝平整置于平台上,根据肝脏大小及分叶情况,设计好尽可能多的损伤点(点间距≥1cm),一般 1 只兔肝每个辐照时间设计损伤 3~6 个点(1~3 点/叶,图 1)。设计好损伤点后即按辐照时间顺次进行点损伤实验。测温参照热电偶探针法[5]并行相应改变,即每损伤完一个点,迅速将热电偶探针插入靶区中央(深度均为 4mm),记录测温仪上温度上升的最大值。

1.2.3 肝组织密度测量 FU 点损伤实验毕,每只兔肝取未损伤部位组织 2~3 块,以天平和量筒测量其重量(g)和体积(cm^3),以组织重量除以体积表示组织密度($g\cdot cm^{-3}$)。

1.2.4 病理检查 所取肝组织用 10%福尔马林液固定、苏丹Ⅲ染色(Sudan Ⅲ stain,SS),光镜检查。

1.3 数据分析

数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 统计软件包,独立样本 t 检验,$P<0.05$ 为统计有意义。

2 结 果

2.1 温度上升值及变化趋势

实验测得对照组每个辐照时间损伤点各 19 个,共计 95(19×5)个点的温度值;测得实验组每个辐照时间损伤点各 22 个,共计 110(22×5)个点的温度值(基础温度值为 26℃)。两组在 3s 时均出现一个小高峰,6s 时出现第二个高峰,以后稍有下降并趋于平稳(表 1,图 2)。

2.2 肝组织密度值

两组各取得肝组织 12 块,根据其重量和体积计算出密度值(P),结果显示实验组平均组织密度大于对照组(表 2)。

2.3 兔肝大体及病理观

对照组兔肝外观呈暗红色,无肿胀感;实验组兔肝脏外观呈粉红色,有轻度肿胀感,可见类似脂肪肝似的脂质沉着(图 3a、b)。病理检查结果:对照组肝细胞大小形态正常,肝索、肝血窦腔隙正常,切面似"网状"结构,高倍镜下可见肝细胞内散在脂肪颗粒;实验组肝细胞增大、肿胀、肝索排列紊乱,肝血窦腔隙及中央静脉明显缩小,肝细胞及肝血窦内均见大量脂质体沉积,位于血窦的脂质体有聚积现象,切面呈"实变"样改变,(图 4a、b)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1　两组不同辐照时间温度值比较

分组	点数	辐照时间(s)				
Saline	19	26.00±0.00	73.44±3.85	76.42±4.54	73.00±4.12	69.94±3.04	70.44±4.31
HL-1	22	26.00±0.00	76.40±5.00	83.32±4.46	79.82±4.12	77.79±6.16	78.11±4.16
P			<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 2　两组肝脏组织样本平均密度值比较

分组	n	$P(\bar{x}\pm s)$
Saline	12	1.0547±0.0388
HL-1	12	1.1217±0.0281
P		<0.01

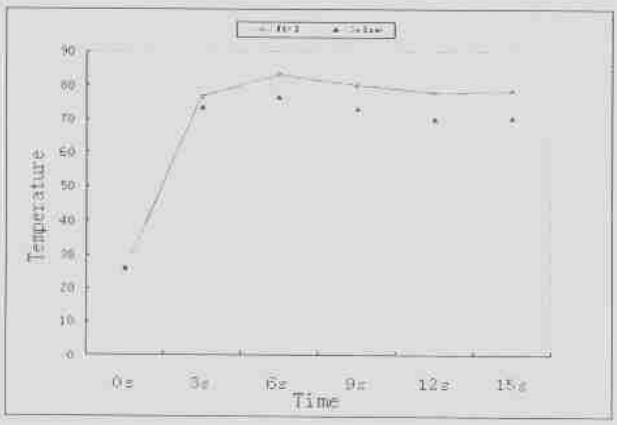


图 2　两组兔肝辐照温度—时间曲线



图 3a　对照组兔肝脏外观

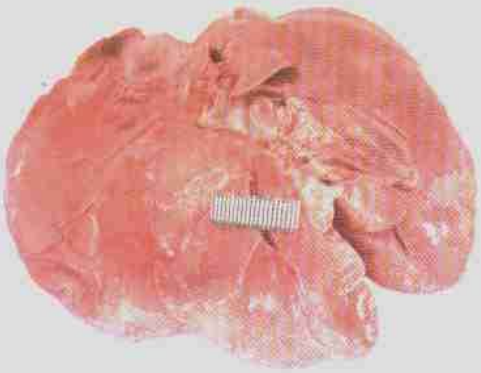


图 3b　实验组兔肝脏外观

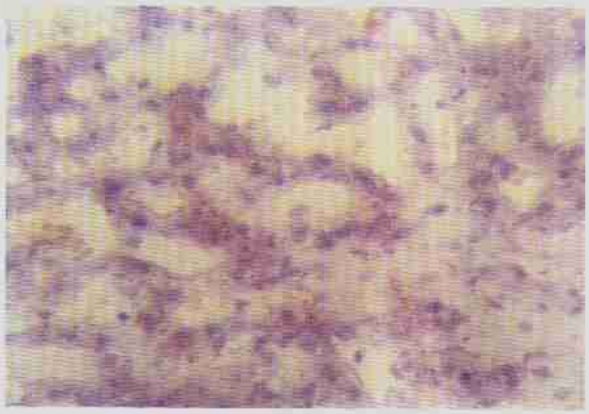


图 4a　对照组兔肝脏病理(SS×200)

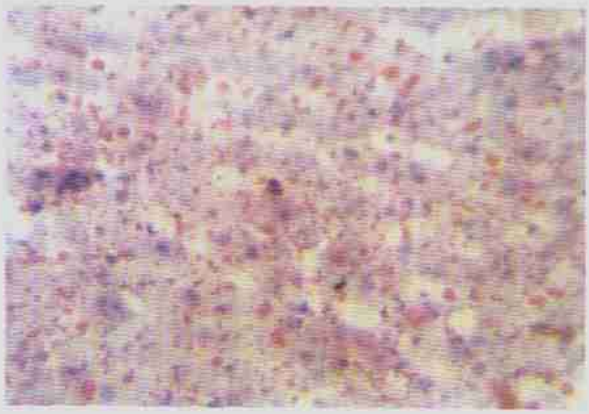


图 4b　实验组兔肝脏病理(SS×200)

3　讨　论

研究结果表明，经兔耳缘静脉输入 HL-1 可以使脂质体在肝脏内大量聚积，并使肝脏组织结构和密度发生相应的变化，表现为肝细胞及肝血窦内大量脂质体沉积，肝细胞增大、肿胀，中央静脉和肝血窦腔隙缩小，肝脏呈"实变"样改变，组织密度增大($P<0.01$)，FU 定点损伤测温实验表明，这种改变可以提高靶区组织的温升效果($P<0.05$)，表现为各辐照时间点温度值实验组均大于对照组($P<0.05$)，说明 HL-1 有加速超声能量沉积的作用。

研究结果显示，两组温度变化都呈现相似的规律性，即在 3s 和 6s 各有一高峰值，然后稍有下降并趋于平稳，与李发琪等[6]关于离体牛肝温升效应的研究结果基本相似，不一致之处为在他们的研究中，

维普资讯 http://www.cqvip.com

当声强一定时,组织温度将随辐照时间的延长而增大,分析原因主要是实验方法的不同导致了这种差异。本实验所使用的超声治疗仪聚焦深度仅 4mm,实验中观察到,在较短的辐照时间内,损伤的焦域形态多规则并局限于肝组织内,呈一纵椭圆形白色坏死区,随着辐照时间延长,焦域形态发生变化,呈三角形向声源方向延伸,并最终穿透组织。产生这种现象的原因在于焦点处的凝固性坏死组织会形成"声障",阻碍声能量在焦点以远和加速声能量在焦点以近的组织沉积,导致凝固性坏区逐渐向声源方向形成并穿透组织。因此,在本实验的特定条件下,组织的温升效应可能受到如下两个方面因素的影响:一是相对较长时间的辐照所导致的组织穿透使热量扩散到组织外,致较长时间的辐照并未引起相应的组织温度升高;二是聚焦超声定点损伤的"过度辐照"现象,即超过了造成组织热凝固性坏死的阈值辐照时间后,多余的超声能量将以热能的形式向四周扩散,致靶区组织温度并不表现出随辐照时间的延长而升高,本实验中,两组温度—时间曲线在 6s 后不升反降正是这两种因素共同作用的结果。相关的研究也证明[6],在相同声强下,辐照时间越长,超过辐照阈值时间后,焦点温度增高并不明显,这是因为热传导开始起显著散热作用。因此,即使没有组织穿透现象的存在,靶区组织温度也不可能随辐照时间的增加而无限升高。

尽管本研究所采用的测温法可有效避免探针附近组织的粘性发热和热电偶丝对超声波散射作用的影响[5,7],使所测温度能更准确地反应组织的实际温度(这种影响在 11MHz 的高频超声下是不能被忽视的)。但由于本实验所用超声治疗仪的聚焦深度仅 4mm,因此,即使在最短的辐照时间(3s)下也可能存在过度辐照和组织穿透现象对温度的影响,使温度-时间曲线不成完全准确地反应出两组间组织温升效应的实际差异,尤其是对于实验组,因其声能量沉积的速度快而使其在与对照组相同的辐照时间下更易出现过度辐照和组织穿透现象,使热能的丢失偏大而温度值较实际偏低更为明显。因此,从本实验所设置的实验参数分析,两组间温度差异的测量值可能要比实际偏低,使 HL-1 的温升效应受到一定程度的掩盖,在这种情况下要想得出 HL-1 联合 FU 致肝脏组织损伤的"阈值时间"是很困难的。

对实验组肝脏组织密度较对照组增大($P<0.01$)这一现象,显然不能用脂质填充或置换的概念加以解释,否则,由于 HL-1 是一种低密度的物质,实验组肝组密度应该减低才符合逻辑。鉴此,我们认为,实验组肝组织密度增大的原因在于脂质浸润导致肝脏组织发生了某些急性的病理生理改变,肝脏组织病理切片证明了这一点,如肝细胞增大、肿胀,中央静脉和肝血窦腔隙缩小,肝脏呈"实变"样改变等。这个过程很可能有蛋白质的参与,因为蛋白质相对于脂肪具有较高的密度值,同时,生物组织的超声能量吸收决定于其蛋白质的结构和含量[8],我们将在后续研究中重点关注这个问题。

HL-1 是一种纳米级脂质体,在本研究 11MHz ($\lambda\approx0.14$mm)的治疗超声下,其颗粒是一种作用微弱的散射体(粒径远小于声波 $\lambda/2$),因此,其增加声能量沉积的作用显然不能用类似微泡造影剂的谐波及散射原理加以解释。基于实验结果,我们认为,由于脂质成份对肝脏有天然靶向和富集作用[9],能使脂质体在肝脏内大量聚集,这些聚集的脂质体可能从如下方面改变肝脏声学性质:一是脂质浸润导致肝组织结构发生改变,肝脏大体观和病理结果均证明了这一点,如肝脏肿胀,脂质沉积以及肝细胞增大、肿胀,肝索排列紊乱等现象。二是脂质浸润所引起的病理生理变化改变了肝脏的质地或密度,病理检查发现肝血窦腔隙及肝中央静脉均明显缩小,切面有"实变"感;肝组织密度值增大等。熊树华等的研究也证明了组织声能量沉积与其病理变化的密切关系[2]。三是在肝血窦内集聚的脂质体,这种集聚所导致的脂质体体积增大能否增加声波散射的能力尚不清楚。此外,从理论上讲,由于肝中央静脉缩小和肝血窦内脂质体大量沉积所导致的肝内血流缓慢、瘀滞,均有可能改变组织的血流状态,由于系离体实验,没有血流因素的影响,此种效应无法观察,在体实验时,如存在这种作用,则脂肪浸润增加声能量沉积的效果会更加显著,此点值得进一步研究。

虽然生物组织中的脂肪是一种低声衰减物质,在 1MHz 时其值为 0.044~0.090Np.cm^{-1}[8],但相关的基础声学研究已经证明,组织的生理或病理状态变化将会通过脂肪含量的变化改变组织的超声性质,而且脂质在生物体内存在的部位以及方式的不同均可导致其声学特性的变化[10]。我们的研究结果也提示,当脂质这种传统的低声衰物质进入体内与肝脏相互作用后,其整体所表现出的声学特性并不是二者简单的线性相加,而应该是这种(些)物质能否引起组织发生相应的病理生理变 (下转第 59 页)

维普资讯 http://www.cqvip.co

反应蛋白的浓度可提示颈动脉粥样硬化的程度。血尿酸与C反应蛋白正相关。血尿酸可能是通过炎症作用而导致动脉粥样硬化。降血尿酸治疗能否减轻动脉粥样硬化及对心脑血管事件发生率的影响有待进一步的深入研究。

参 考 文 献

[1] Culleton BF, Larson MG, Kannel WB, et al. Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: The Framingham Heart study[J]. Ann Intern Med, 1999; 131:7 - 13.

[2] Huntley JC, Brock DB, Ostfeld HM. Uric acid a risk factor for coronary heartdisease[J]. JAMA, 1993;270:379.

[3] Freedman DS, Williamson DF, Gunler EW, et al. Relation of serum uric acid to mortality and ischemic heart disease. The NHANESI Epidemiologic follow up study[J]. Am J Epidemiol, 1995;141:637.

[4] Vigna GB, Bolzan M, Romagnoni F, et al. Lipids and other risk factors selected by discriminant analysis in syptomatic patients with supra - aortic and peripheral atherosclerosis[J]. Circulation, 1992;85:2205.

[5] Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, et al. Relation of C - reactive protein and coronary heat disease in the MRFIT nested case - control study[J]. Am J Epidemiol, 1996;144:537.

[6] Paul M Ridker, May Cushman, Mei J, et al. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men[J]. N Engl J Med, 1997;336:973.

[7] Marrow DA, Rifai N, Antman EM, et al. C - reactive protein as a potent predictor of mortality indepently of and in combination with troponin T in acute coronary syndromes: a TIMI Ⅱ A subst dy[J]. J Am Coll Cardiol, 1998;31:1460.

[8] Jeffrey MH. Evaluating coronary heart disease risk files in the mosaic[J]. JAMA, 1997;277:1387.

[9] North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial(NASCET) Steering Committee. North American Symptomatic Carotid EndarterectomyTrial; methods, patient characteristics, and progress. Stroke, 1991;22:711 - 720.

(上接第 33 页)化及其程度,以及这些变化能否加速超声能量的沉积。HL - 1 能导致肝脏组织发生相应的病理改变、并能提高组织的温升效果,是继其改变肝脏组织声像学表现的实验后[11],改变肝脏组织声学环境的又一证据,这种改变可以用于体内增强肝脏超声能量沉积的探索性研究。

参 考 文 献

[1] Wang Z, Li F, Bai J, et al. A study of Acoustic Environment in Tissue of High Intensity Focused Ultrasound. 3rd International Symposium on Therapeutic Ultrasound [C]. Lyon, France, 2003;68.

[2] 熊树华,王智彪,陈文直,等.高强度聚焦超声增效作用的实验研究[J].中国超声医学杂志,2003;19(12):881 - 884.

[3] Cheng SQ, Zhou XD, Tang ZY, et al. Iodized oil enhances the thermal effect of high intensity focused ultrasound on ablating experimental liver cancer[J]. J Cancer Res Clin Oneol, 1997;123:639 - 644.

[4] Tinghe Yu, Guoyun Wang, Kai Hu, et al. A microbubble agent improves the therapeutic efficiency of highintensity focused ultrasound: a rabbit kidney study[J]. Urol Res, 2004;32:14 - 19.

[5] Clarke RL, ter Haar GR. Temperature rise recorded during lesion formation by high - intensit focused ultrasound[J]. Ultrasound in Medicine and Biology, 1997;23(2):299 - 306.

[6] 李发琪,张 檣,杜永洪,等.高强度聚焦超声治疗剂量对组织温升影响的研究[J].生物医学工程学杂志,2003;20(3):466 - 471.

[7] Hynynen K, Darkazanli A, Damianou CA, et al. Tissue thermometry during ultrasound exposure[J]. Eur Urol 1993;23(suppl 1):12 - 16.

[8] 冯 若,主编.超声诊断设备原理与设计[M].中国医药科技出版社,1993;(1):105 - 156.

[9] Banerjee R. Liposomes: applications in medicine[J]. J Biomater Appl, 2001;16(1):3 - 21.

[10] 周永昌,郭万学,主编.超声医学[M].北京:科学技术文献出版社,2002;4(上册):49 - 55.

[11] 肖雁冰,刘丽萍,肖子文,等.HL - 1 改变兔肝脏组织声学环境的实验研究(Ⅰ)[J].临床超声医学杂志,2004;5:264 - 267.