维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)06－0685－03

高强度聚焦超声治疗兔移植性乳腺肿瘤的安全性评价

吴传新[1], 刘长安[1], 伍　烽[2], 白　晋[2], 陈文直[2], 邹建中[2], 乔天愚[1], 王智彪[2]

(1.重庆医科大学第二临床学院外科,重庆　400010;2.重庆医科大学医学超声工程研究所,重庆　400016)

【摘　要】目的:评价高强度聚焦超声(High Intensity Focused Ultrasound,HIFU)治疗兔乳腺移植性肿瘤的安全性。方法:40 只兔乳腺移植性肿瘤于肿瘤移植后 11 天随机分为治疗组 20 只,手术组 10 只,对照组 10 只。治疗组接受 HIFU 覆盖治疗,手术组接受常规手术切除局部肿瘤,对照组接受假照治疗。采集辐照前后声像图进行对比性观察,于 HIFU 辐照后即刻切取肿瘤作肉眼观察,观察肿瘤的转移情况。HIFU 辐照前后查肝功、生化及肾功,观察其变化。结果:HIFU 辐照前肿瘤声像图呈低回声团块,辐照后肿瘤声像图呈明显强回声。HIFU 辐照前肿瘤切面呈粉红色,辐照后肿瘤呈白色凝固性损伤灶;治疗组和手术组的肿瘤转移率分别为 20% 和 30%,无显著性差异($P>0.05$),均明显低于对照组(100%,$P<0.05$)。HIFU 辐照后治疗组动物的肝功、血生化及肾功与辐照前相比,以及手术组和对照组比较,差异无显著性($P>0.05$)。结论:在 B 超实时监控下,HIFU 准确有效地杀灭乳腺肿瘤,不增加肿瘤转移的危险性,对动物的肝功、血生化及肾功无影响。因此,HIFU 治疗系统治疗是安全的。

【关键词】高强度聚焦超声 High;乳腺癌;VX_2 肿瘤;治疗;手术

【中国图书分类法分类号】R737.9　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－04－14

The safety evaluation of high intensity focused ultrasound for the treatment of implanted rabbit breast tumor

WU Chuanxin, et al

(*Depament of Surgery, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To evaluate the safety of high intensity focused ultrasound(HIFU) for the treatment of implanted rabbit breast tumor. *Methods*: Forty New England rabbits were randomly divided into the following groups: HIFU treatment group(20), surgery group(10) and control group(10). HIFU ablation was performed at focal peak intensity 11500W/cm with a frequency of 1.6MHz in HIFU group. In surgery group all animals underwent lumpectomy. The animals in control group underwent pseudo－irradiation. The sonograms of target tumor were assessed before and immediately after HIFU ablation. The treated tumor was removed immediately after HIFU, and the lesion was measured by gross examination. Routine serum chemistry examination including hepatic, renal function tests, and serum electrolytes in all animals were performed before and at 1st, 3rd, 5th and 7th days after treatment. Also tumor metastases were observed after treatment. *Results*: The gray－scale of target tumors on ultrasound image was low before HIFU and increased immediately after HIFU irradiation. The hyperechoic location was the same as the lesion observed by gross observation. The necrotic lesion completely covered the tumor. No significant differences were observed in hepatic, renal function tests, and serum electrolytes before and after therapy in HIFU group. And these indices were not significantly different in HIFU treatment group, surgery group and control group, respectively. The metastatic rates of HIFU treatment group and surgery group were 20% and 30% respectively. They were significantly different from that of control group(100%, $P<0.05$). *Conclusion*: HIFU could precisely and effectively destroy the implanted rabbit breast tumor with guidance of ultrasound imaging. Because it does not increase the metastatic rate of tumor and affect the function of liver and kidney of animals, HIFU is safe for the treatment of breast carcinoma.

【Key words】 High intensity focused ultrasound(HIFU); Breast tumor; VX_2 carcinoma; Treatment; Surgery

高强度聚焦超声(High intensity focused ultrasound,HIFU)是近年来发展起来的非侵入性局部治疗肿瘤的新技术,已证明 HIFU 能有效地治疗兔移

基金项目:本课题由国家"九五"重点科技攻关项目(96－905－02－01)资助。

作者介绍:吴传新(1969－　),男,主治医师,硕士,主要研究方向:肿瘤的治疗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

植性乳腺肿瘤，延长动物生存时间，降低肿瘤复发和转移率[1,2]。本实验应用 HIFU 治疗系统治疗兔移植性乳腺肿瘤，以评价 HIFU 治疗兔移植性乳腺肿瘤的安全性。

1 材料与方法

1.1 兔移植性乳腺肿瘤模型的复制及分组

健康纯种雌性新西兰白兔 40 只，体重 2.5～3.0kg，将 1mm³ 大小的 VX_2 肿瘤块移植于乳腺组织内，每兔移植 1 个乳腺[3]，11 天后于乳腺内形成直径约 8mm 大小的结节。随机分为 HIFU 治疗组 20 只，手术组 10 只，对照组 10 只。

1.2 HIFU 治疗系统及治疗方法

HIFU 治疗系统样机由重庆医科大学医学超声工程研究所设计研制。治疗探头工作频率 1.6MHz，治疗声强 11500W/cm。兔固定于治疗床，启动 HIFU 治疗系统，调整焦点使其定位于肿瘤组织内，连续靶点扫描治疗，作用 2s，间隔 2s，通过 B 超诊断仪监测治疗结果，平均辐照时间 146.75±36.25s[2]。对照组除未启动治疗功率源外，其余步骤与治疗组相同。

1.3 手术治疗

10 只手术组采用常规手术切除局部肿瘤，切除范围包括肿瘤及其周围约 5mm 宽的正常组织。

1.4 观察指标

10 只 HIFU 治疗组于治疗前采集肿瘤声像图，并测量其长、宽、高，作为对照，治毕，采集辐照后声像图，测量其长、宽、高，与治疗前进行对比性观察，通过其回声强度的变化确定 HIFU 辐照的范围和有效性。辐照后即刻手术切开肿瘤，观察肿瘤损伤的程度和范围，用直尺测量损伤区的长、宽、高。声像图和损伤区的大小用公式[4]：体积 = π/6 长 × 宽 × 高计算体积。另 10 只 HIFU 治疗组与手术组和对照组于 HIFU 辐照前及辐照后 1、3、5、7 天抽取静脉血查肝功、生化及肾功，观察其变化。HIFU 辐照后观察 8 个月，观察各组动物的肿瘤腋淋巴结转移情况；兔死亡时及 8 月后处死存活动物，常规尸解观察肿瘤内脏转移情况。

1.5 统计学处理

t 检验和 χ^2 检验，$P<0.05$ 为差异有显著性。

表 1 HIFU 辐照前后治疗组动物的肝功结果

	TP(g/l)	ALB(g/l)	ALT(u/l)	ALP(u/l)	AST(u/l)	GGT(u/l)	TB(μmol/l)	DB(μmol/l)
HIFU 辐照前	62.3±5.3	37.4±1.6	47.1±14.9	87.2±38.1	26.1±11.7	5.07±2.9	2.7±1.1	2.0±1.2
HIFU 辐照后 1d	63.3±7.9	36.6±2.1	50.6±14.7	79.1±32.0	25.1±7.8	5.4±2.7	1.9±0.7	1.2±0.4
HIFU 辐照后 3d	65.0±7.9	35.4±1.1	49.4±8.3	85.7±40.8	23.4±8.4	5.57±2.0	2.4±0.9	1.5±0.7
HIFU 辐照后 5d	62.5±6.1	34.5±2.2	54.9±15.6	71.7±30.1	25.3±10.0	4.6±1.9	2.0±1.3	1.26±1.2
HIFU 辐照后 7d	63.9±4.6	33.1±3.0	46.0±15.1	76.9±32.0	22.1±10.6	4.75±2.7	2.29±1.6	1.4±1.0

表 2 HIFU 辐照前后治疗组动物的血生化及肾功能结果(mmol/l)

	K^+	Na^+	Cl^-	CO_2-CP	肌酐	尿素
HIFU 辐照前	4.5±0.6	142.5±5.1	102.5±3.7	15.8±3.7	131.2±22.5	7.3±2.8
HIFU 辐照后 1d	4.6±0.7	139.3±6.8	96.5±6.5	14.9±3.1	114.3±24.7	7.4±4.4
HIFU 辐照后 3d	4.9±1.0	136.4±8.7	96.9±6.6	15.2±3.21	113.1±22.6	6.4±0.9
HIFU 辐照后 5d	4.5±0.2	138.0±2.4	97.9±5.2	14.7±3.3	97.2±20.3	7.6±1.6
HIFU 辐照后 7d	4.6±0.2	137.6±4.8	98.0±5.8	14.6±1.5	103.2±25.2	7.4±1.1

表 3 HIFU 辐照后 1 天各组动物的肝功结果

	TP(g/l)	ALB(g/l)	ALT(u/l)	ALP(u/l)	AST(u/l)	GGT(u/l)	TB(μmol/l)	DB(μmol/l)
HIFU 治疗组	63.3±7.9	36.6±2.1	50.6±14.7	79.1±32.0	25.1±7.8	5.44±2.74	1.85±0.65	1.22±0.39
手术组	65.5±4.0	37.1±1.8	56.7±17.2	75.6±27.7	24.7±11.0	6.08±2.14	2.00±1.97	1.10±0.70
对照组	64.0±4.2	37.3±1.8	47.5±10.6	85.3±32.2	30.9±11.7	6.75±2.18	1.99±0.95	1.06±0.62

表 4 HIFU 辐照后 1 天各组动物的血生化及肾功结果(mmol/l)

	K^+	Na^+	Cl^-	CO_2-CP	肌酐	尿素
HIFU 治疗组	4.6±0.7	139.3±6.8	96.5±6.5	14.9±24.7	114.3±24.7	7.4±4.4
手术组	4.8±0.7	139.2±7.0	99.3±5.3	15.6±5.3	110.8±21.9	6.5±1.4
对照组	4.5±0.6	135.5±9.4	96.6±7.9	15.6±3.2	104.4±19.4	5.7±1.3

2 结 果

2.1 HIFU 辐照前后声像图表现

HIFU 辐照前兔移植性乳腺肿瘤的声像图呈均匀团状低回声，截面呈椭圆形，边界清楚，周围有强回

维普资讯 http://www.cqvip.com

声环(图 1－A),其平均体积为 458.64 ± 133.02mm^3。辐照后,声像图显示肿瘤回声明显增强,呈团状强回声(图 1－B),平均体积为 621.90 ± 108.70mm^3。与治疗前声像图比较,差异有非常显著性($P<0.01$)。

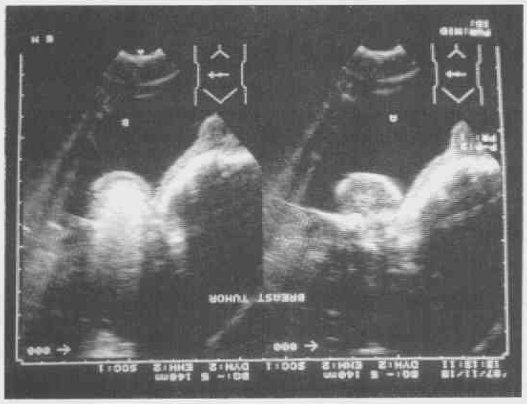


图 1　HIFU 辐照前后声像图

A:HIFU 辐照前　B:HIFU 辐照后

2.2　肉眼观察

兔移植性乳腺肿瘤位于乳腺组织内,与周围组织分界清楚,最大直径平均约 10.00 ± 0.94mm;切面呈浅粉红色鱼肉状;HIFU 辐照后肿瘤呈白色凝固性损伤灶,椭球形,边界清,损伤区已完全覆盖肿瘤,平均体积为 651.80 ± 168.72mm^3,正常组织与受损病灶之间界限清晰,可见明显的充血出血带。

2.3　肿瘤的转移情况

HIFU 辐照后 2 周,2 只(2/10)治疗组出现局部肿瘤复发,瘤体不断增大并出现腋淋巴结、肺等部位的转移,兔最后因肿瘤转移而死亡;另 8 只(8/10)肿瘤完全坏死脱落,局部无肿瘤,腋淋巴结、肺及其他部位无肿瘤转移。10 只手术组 3 只(3/10)出现局部肿瘤复发伴腋淋巴结转移和肺转移,兔最后死于肿瘤转移。10 只对照组肿瘤继续生长伴腋淋巴结转移,到兔死亡时解剖见双肺、肾及腹腔淋巴结广泛转移。HIFU 治疗组、手术组肿瘤转移率分别为 20%、30%,差异无显著性($P>0.05$),明显低于对照组(100%,$P<0.05$)。

2.4　血液学检查结果

HIFU 辐照后治疗组动物的肝功、血生化及肾功与辐照前相比,无明显变化($P>0.05$),与手术组和对照组比较,差异无显著性($P>0.05$)(表 1～4)。

3　讨　论

本实验应用 HIFU 治疗兔移植性乳腺肿瘤,通过观察辐照前后肿瘤声像图的改变、肿瘤损伤程度和范围来判断治疗的准确性和安全性,结果表明,HIFU 辐照前后肿瘤声像图有明显改变,辐照后整个肿瘤呈强回声区域;肉眼观察见损伤区完全覆盖肿瘤,损伤范围比辐照前肿瘤体积大,治疗后声像图呈强回声团块的肿瘤组织,经肉眼观察已呈凝固性损伤。这提示 B 超能准确地引导 HIFU 破坏肿瘤,同时还能实时监测辐照前后肿瘤回声的变化,准确测量损伤的范围及判断损伤的程度。因此,在 B 超实时监控下 HIFU 能安全准确地治疗兔移植性乳腺肿瘤。

HIFU 辐照前后检查动物的肝功、血生化及肾功,结果表明,HIFU 辐照前后治疗组动物的肝功、血生化及肾功无明显变化,与手术组和对照组比较,无显著性差别,说明 HIFU 治疗对动物的肝功、血生化及肾功无影响。因此,HIFU 辐照治疗是安全的。

在实验中,将动物分为 HIFU 治疗组,手术组和对照组,观察各组动物的肿瘤转移情况,结果表明,HIFU 辐照治疗后治疗组的肿瘤转移率为 20%,与手术组的肿瘤转移率 30% 比较,两者无显著性差别,与对照组的肿瘤转移率 100% 比较,有显著性差别,说明 HIFU 并不增加肿瘤转移的危险性。Vosterhof 等应用 HIFU 治疗高转移的 AT－6 Dunning R_{3327}大鼠前列腺癌的实验结果表明,HIFU 治疗组的肿瘤转移率为 23%,与对照组(25%)差异无显著性。Chapelon 等应用 HIFU 治疗 DunningAT－2 腺癌时发现 HIFU 治疗组的动物有 16% 发生转移,而对照组为 28%,其他学者也观察到类似的结果[4,7～9]。表明 HIFU 并不增加肿瘤转移的危险性。

综上所述,B 超能准确地引导 HIFU 破坏肿瘤,实时监测辐照前后肿瘤回声的变化,准确测量损伤的范围及判断损伤的程度。同时,HIFU 并不增加肿瘤转移的危险性,对动物的肝功、血生化及肾功无影响。因此,HIFU 治疗系统治疗是安全的。

参　考　文　献

[1]　刘长安,吴传新,白　晋,等.高强度聚焦超声对兔乳腺肿瘤急性损伤的研究[J].中华超声影像学杂志,2000;9(2):120－122.

[2]　吴传新,刘长安,伍　烽,等.高强度聚焦超声治疗兔乳腺移植性肿瘤的病理学观察[J].中国超声医学杂志,2001;17(7):481－483.

(下转第 700 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

热诱导 rBCG 及对照的 BCG 菌没出现相应蛋白条带(图 4),说明 HSP70 启动子通过热诱导的调控启动了外源基因在 BCG 中的大量表达,而非热诱导的 rBCG 菌由于融合蛋白表达量少,不能通过 SDS-PAGE 检测出来。

pJEM11 是巴斯德研究所开发的一种用于研究结核分枝杆菌基因组中某一段基因是否是具有启动子、信号肽等序列的完整基因,具有大肠杆菌-分枝杆菌复制子和卡拉霉素抗性基因。在 pJEM 11 MCS 的下游有碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, PhoA)的编码序列(Coding sequence, CDS),但是缺乏启动子和信号肽。将待分析的基因片段插入其 MCS 后,如果这段基因有启动子、信号肽及 CDS,则可以编码其蛋白与 PhoA 融合表达并分泌到胞外,通过筛选培养基中的对硝基苯磷酸盐底物的作用而呈现出有色菌落。本研究将质粒 pJEM11 的 XbaI 与 ApaI 位点之间的 MCS、phoA 基因切除,由 HSP 启动子及重新分布的 MCS 替代。经过序列分析,在起始密码 ATG 的上游 -12 ~ -18 核苷酸处可见 SD 顺序 GGAGG,在 ATG 上游 -45 处可见与 E. coli -10 区 TATAAT 同源的序列 ATCATA,在 -64 和 -116 两处可见与 E. coli -35 位高度同源的序列 TTGAG,在 -10 区两侧存在着反向重复序列 TGCACT,与程继忠等报道一致[6]。由于存在这些表达必须的调控元件以及位于 MCS 下游的转录终止序列,lhp-esat6 融合基因在 BCG 中成功的表达了相应蛋白。本穿梭表达质粒的成功构建,为开发 BCG 为多价疫苗提供了一个可供选择的工具载体。

参 考 文 献

[1] Gheorghiu M, Lagranderie MR, Gicquel BM, et al. Mycobacterium bovis BCG priming induces a strong potentiation of the antibody response induced by recombinant BCG expressing a foreign antigen[J]. Infect Immun, 1994;62(10):4287-4295.

[2] Fujimoto T, O' Donnell MA, Szilvasi A, et al. Bacillus Calmette-Guerin plus interleukin-2 and/or granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor enhances immunocompetent cell production of interferon-gamma, which inhibits B16F10 melanoma cell growth in vitro[J]. Cancer Immunol Immunother, 1996;42(5):280-284.

[3] 程继忠,皇甫永穆,冯作化,等.人结核杆菌热休克蛋白 70 启动子对外源基因在分枝杆菌中表达的影响[J].中华微生物学和免疫学杂志,1997;17(6):410-415.

[4] Stover CK, Bansal GP, Hanson MS, et al. Protective immunity elicited by recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG) expressing outer surface protein A(OspA) lipoprotein: a candidate Lyme disease vaccine[J]. J Exp Med, 1993;178(1):197-209.

[5] Aldovini A, Yong RA. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines[J]. Nature, 1991 Jun 6;351(6326):479-482.

[6] 程继忠,梁驹卿,肖 红,等.人结核杆菌热休克蛋白 70 和卡介苗 α 抗原基因启动子序列测定[J].同济医科大学学报,1997;26(5):331-335.

(上接第 687 页)

[3] 吴传新,刘长安,乔天愚,等.兔乳腺移植性鳞癌模型的建立及其生物学特征的观察[J].重庆医科大学学报,1999;24(2):137-140.

[4] Hart TG, Rivens I, Chen L, et al. High intensity focused ultrasoud for the treatment of rat tumors[J]. Phys Med Biol, 1991;36(10):1459-1462.

[5] Prat F, Centarti M, Sibille A, et al. Extracorporeal high intensity focused ultrasound for VX_2 liver tumors in the rabbit [J]. Hepatology, 1995;21(3):823-826.

[6] Sibille A, Prat F, Chapelon JR, et al. Characterization of extracorporeal ablation of normal and tumor-bearing liver tissue by high intensity focused ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol, 1993;19(9):803-813.

[7] Oosterhof GOX; Cornel EB, Smits GAV, et al. Influence of high intensity focused ultrasound on the development of metastases[J]. EurUrol, 1997;32(1):91-95.

[8] Chapelon JY, Margonari J, Vernier F, et al. In vivo effects of high intensity focused ultrasound on prostatic adenocarcinoma Dunning R_{3327}[J]. Cancer Res, 1992;52(22):6353-6357.

[9] Bataille N, Vallancien G, Chopin D. Antitumoral local effect and metastatic risk of extracorporeal on Dunning R_{3327} tumors[J]. Eur Urol, 1996;29(1):72-77.