超声与放射

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000791

PHIFU辐照晶状体致凝固性坏死与空化关系的实验研究

刘　珊,伍　烽,周文英,耿　聪,陈　飞,邹建中

(重庆医科大学生物医学工程学院、部共建超声医学工程国家重点实验室培育基地、
重庆市生物医学工程学重点实验室,重庆　400016)

【摘　要】目的:研究相同剂量,不同辐照参数的脉冲高强度聚焦超声(pulsed high intensity focused ultrasound,PHIFU)辐照牛眼晶状体所致凝固性坏死的变化过程及其与空化效应的关系,探讨何种方式辐照效果最佳。**方法**:用不同声功率和占空比的PHIFU(A 组对照组:60 W-100%,B 组:120 W-50%,C 组:240 W-25%,D 组:500 W-12%)辐照牛眼晶状体,辐照过程中使用高速摄像系统实时拍摄凝固性坏死的变化,被动空化检测(passive cavitation detection,PCD)系统记录焦域处发出的声散射信息,分析辐照过程中两者之间的关系,并比较各参数辐照效果。**结果**:各组均发生凝固性坏死,C、D 2 组相应 RMS 幅值在辐照开始时就增高,其凝固性坏死出现平均时间分别为(2.63 ± 0.71) s、(2.45 ± 0.68) s。其中 D 组凝固性坏死出现所需时间最短,坏死体积最大,能效因子(energy efficiency factor,EEF)值最小,空化发生剧烈。**结论**:总剂量相同的 PHIFU 辐照下,声功率 500 W,占空比 12%的辐照效果最好。空化效应的发生要早于凝固性坏死的出现。

【关键词】脉冲高强度聚焦超声;占空比;空化效应;凝固性坏死

【中图分类号】R454.3　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2015-04-24

Relationship between coagulation necrosis and cavitation induced by PHIFU

Liu Shan, Wu Feng, Zhou Wenying, Geng Cong, Chen Fei, Zou Jianzhong

(*State Key Laboratory of Ultrasound Engineering in Medicine Co-Founded by Chongqing and the Ministry of Science and Technology, College of Biomedical Engineering, Chongqing Key Laboratory of Biomedical Engineering; Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the relationship between coagulation necrosis and cavitation in bovine lens induced by PHIFU with different parameters, and to explore the best way of irradiation. ***Methods***: Different sound power and duty cycle of PHIFU (group A, control groups: 60 W-100%, group B: 120 W-50%, group C: 240 W-25%, group D: 500 W-12%) was used to irradiate bovine lens; the real-time formation of coagulation necrosis was recorded using high-speed imaging device; the acoustic scattering at the focal region was recorded by PCD system, and then the relationship between the irradiation process and cavitation was analyzed, and the effects of irradiation parameters was compared. ***Results***: Coagulation necrosis was occurred in each group. At the beginning of irradiation, the root-mean-square (RMS) was increased in groups C and D, and the corresponding average time of appearing coagulation necrosis was (2.63 ± 0.71) s and (2.45 ± 0.68) s, respectively. In group D, the occurrence time of coagulation necrosis was the shortest, the volume was the maximum, the energy efficiency factor (EEF) was the minimum, and the cavitation occurred acutely. ***Conclusion***: Under the same total dose of radiation PHIFU, sound power=500 W, duty cycle=12% is the best. Cavitation occurs earlier than the appearance of coagulation necrosis.

【Key words】pulsed high intensity focused ultrasound; duty cycle; cavitation; coagulation necrosis

作者介绍:刘　珊,Email:liushan615@sina.cn,
研究方向:肿瘤微无创治疗。

通信作者:邹建中,Email:1109905304@qq.com。

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(编号:2011CB707900);重大仪器专项资助项目(编号:81127901);国家自然科学基金资助项目(编号:11274404)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20151022.2102.014.html (2015-10-22)

近年来，脉冲高强度聚焦超声（pulsed high intensity focused ultrasound，PHIFU）技术的研究已成为热点，由于其能达到与连续波辐照相同的治疗效果[1]、间歇时间能量扩散降低靶区温升[2]和易发生空化[3]等优势，受到国内外学者的关注，并将其应用于治疗肿瘤、白血病、血管溶栓、促药物传递及基因治疗等[4-9]方面。认识不同参数的 PHIFU 的生物学效应的特点是发挥其治疗效果的关键，而空化效应是其致组织破坏的主要作用机制之一。因此，本研究使用不同参数的 PHIFU 辐照离体牛眼晶状体这一透明材料，直观的观察凝固性坏死过程[10]，结合 PCD 系统，探讨空化效应在 PHIFU 消融中的作用，并分析何种方式辐照治疗效果最佳。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 牛眼晶状体 取自屠宰场的新鲜牛眼睛，共 80 个，浸泡于生理盐水中，实验时，剖开牛眼睛，剔除晶状体周围虹膜，获得晶状体，用生理盐水清洗待用。

1.1.2 实验设备 JC200 型治疗系统（重庆海扶医疗科技股份有限公司生产），治疗头为球面自聚焦压电换能器，频率 0.9 MHz，焦距 140 mm，开口直径 220 mm。HIFU 治疗设备的各种参数均经校正，确保声输出稳定。高速摄影系统（Fastcam SA4，Photron 公司，美国）：高速摄影机、可变焦镜头、设备支架、LED 光源、PVF 软件、PC 机及网线。PCD 系统：压电换能器（panametrics V301-SU，中心频率 5 MHz，美国泛美公司），高速数据采集卡（PXIe-5122，美国国家仪器公司）；Labview 软件开发平台（v10.0.1，美国国家仪器公司）；自制 PCD 探头支架，水浸数据线。自制顶面开孔玻璃缸和牛眼晶状体支架。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 将 80 个牛眼晶状体随机分为 A、B、C、D 4 组，每组 20 个，根据声功率和占空比设置各组辐照参数：A 组为对照组，采用声功率为 60 W 的连续波辐照，B 组：声功率 120 W，占空比 50%，C 组声功率 240 W，占空比 25%，D 组声功率 500 W，占空比 12%。实验各组辐照剂量均为 480 J，总辐照时间均为 8 s，脉冲重复频率为 4 Hz。

1.2.2 辐照过程 实验开始前采用辐射压力法对治疗头的声输出进行测量，确保有稳定声输出。设置水温为 20 ℃。搭建高速摄影系统，调节变焦镜头和 LED 光源，确保牛眼晶状体清晰的出现在拍摄视野中。设置摄像机分辨率为 1 024 × 1 024，拍摄帧率 500 帧。每次辐照前开启高速摄影设备和 PCD 系统，采集辐照过程的图像和焦域处发出的声散射信息。

1.3 实验结果的处理

1.3.1 凝固性坏死体积的增长趋势 在上述辐照参数下使用高速摄影机拍摄各组凝固性坏死的形成过程，每间隔 0.5 s 对凝固性坏死的大小进行测量。使用重庆海扶技术有限公司自主开发的 Jupiter 软件测量坏死体积的长（L）和宽（W），根据公式 $V=\pi \times L \times W^2/6$。计算体积，取每个时间点的凝固性坏死体积的平均值，绘制体积增长趋势图。

1.3.2 EEF 的计算 $EEF= Pt/V(J/mm^3)$

P：声功率（W），t：辐照总时间（s），V：生物学焦域的体积（mm^3）

1.3.3 空化信息的处理 将 PCD 探头采集到的空化信号通过 Labview 软件进行分析，得到的原始信号进行快速傅里叶变换，获得频谱图。根据频谱图选取瞬态空化的特征信号，滤除通带内的高次谐波，得到非谐波宽带噪声的频谱信息，对其进行幅度均方根值（root-mean-square，RMS）计算，得到 RMS 值随时间变化曲线，反映空化信号随时间的变化情况。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 19.0 统计软件，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。多样本均数比较用单因素方差分析，其两两比较用 Dunnett-t 法，检验水准 α=0.05。根据不同时间段凝固性坏死体积绘制体积增长趋势图，并对曲线进行一元线性回归分析。

2 结 果

2.1 凝固性坏死出现时间

观察高速摄影拍摄的图像，找出各组凝固性坏死出现时间并计算其平均值（表 1）。当低功率连续波辐照时，凝固性坏死出现所需的辐照时间最长，PHIFU 各组与对照组比较，凝固性坏死出现时间差异有统计学意义（P<0.05）。PHIFU 各组比较，差异无统计学意义（P>0.05）。

表 1 各组凝固性坏死出现时间

Tab.1 The occurrence time of coagulation necrosis in each group

组别	辐照功率（W）	占空比（%）	凝固性坏死出现平均时间（s）
A	60	100	3.65 ± 0.63
B	120	50	2.92 ± 0.45[a]
C	240	25	2.63 ± 0.71[ab]
D	500	12	2.45 ± 0.68[acd]

注：a. F=14.296，P=0.000，与 A 组比较 P=0.001；b.与 B 组比较 P=0.338；c.与 B 组比较 P=0.053；d.与 C 组比较 P=0.682

2.2 凝固性坏死的变化过程

从高速摄影机拍摄的图像中每间隔 0.5 s 取图，测算凝固性坏死的长、宽和体积，得出体积平均值，绘制体积增长趋势图（图 1）。图 1 可见各组凝固性坏死体积变化趋势近似线性增长，随着声功率的增加，线性拟合方程的斜率增大，凝固性坏死体积的增长速率增大。

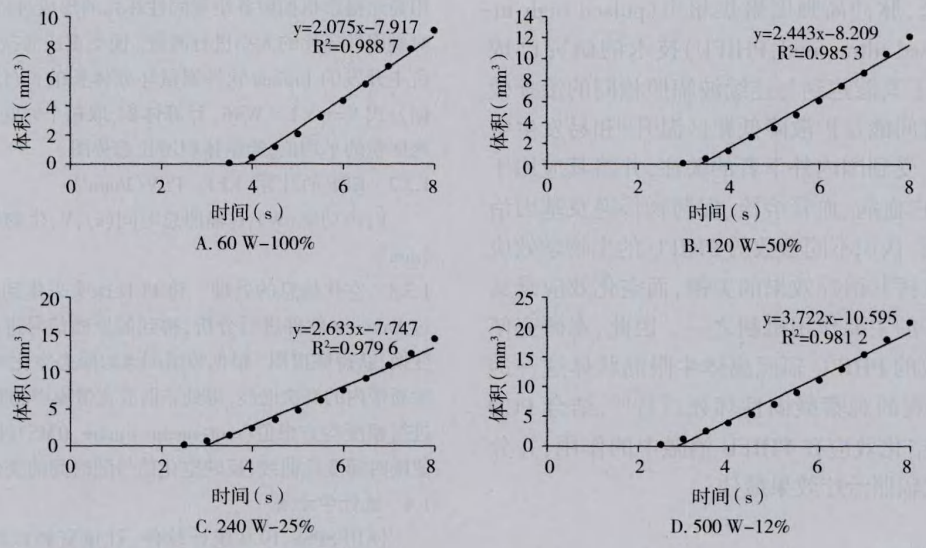
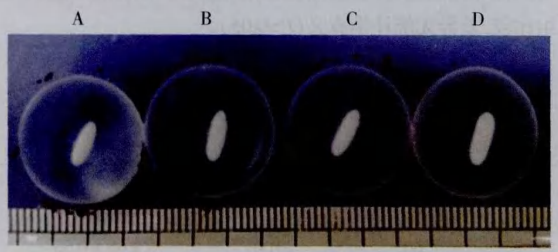


图 1 各组凝固性坏死体积的变化规律

Fig.1 Changes in the increase of coagulation necrosis volume in each group

2.3 辐照结束后凝固性坏死体积的比较

辐照结束后，得到牛眼晶状体中的凝固性坏死（图 2），可见不同辐照参数下其形成的凝固性坏死大小和形态略有差异，辐照功率 500 W、占空比 12%组其凝固性坏死形态明显较其他组宽、长。根据辐照结束后所得凝固性坏死体积的图像，测算最终凝固性坏死的体积（表 2），比较各组凝固性坏死体积，除 B、C 2 组互相比较无统计学意义，A、B、C、D 各组间比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。



A. 60 W-100%；B.120 W-50%；C. 240 W-25%；D. 500 W-12%

图 2 各组凝固性坏死的形态学特征

Fig.2 Macroscopical characteristics of coagulation necrosis in each group

2.4 辐照过程中焦域处的空化信息

图 3 为各参数辐照下的空化频谱信息，A 组辐照时，可检测到基波和二次谐波；B 组除了基波和谐波，还检测到了次谐波；声功率增加时，C、D 组出现更高次的谐波、次谐波和超次谐波，同时可检测到宽带噪声，且 500 W 辐照时，宽带噪声的强度更大，这一结果表明，随着辐照功率的增大，惯性空化强度增大。

表 2 各组凝固性坏死体积和 EEF 的比较（$\bar{x}\pm s$）

Tab.2 Changes of coagulation necrosis volume and EEF in each group（$\bar{x}\pm s$）

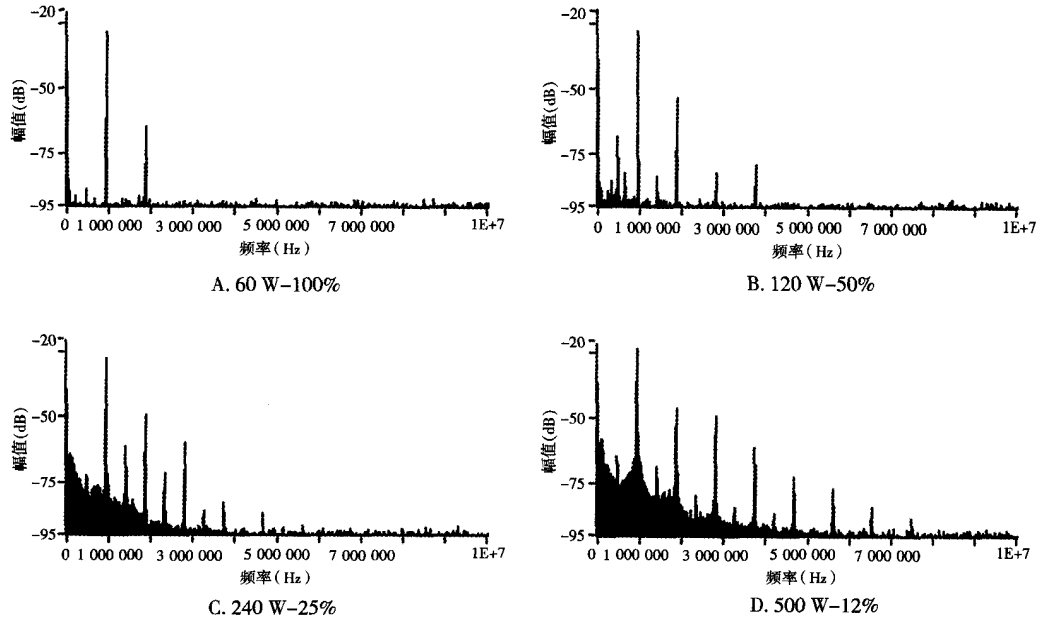
组别	V（mm³）	EEF
A	9.08 ± 1.19	53.98 ± 9.37
B	12.09 ± 2.48[a,e]	41.08 ± 7.21[e]
C	14.47 ± 4.55[b]	36.04 ± 9.27[f]
D	20.79 ± 4.31[b,d]	23.90 ± 4.26[b,d]
F 值	42.149	50.833
P 值	0.000	0.000

注：a.与 A 组比较 $P=0.019$；b.与 A 组比较 $P=0.000$；c.与 C 组比较 $P=0.080$；d.与 B、C 组比较 $P=0.000$；e.与 A 组比较 $P=0.000$；f. 与 B 组比较 $P=0.112$

3 讨 论

PHIFU 的生物学效应包括热效应、空化效应和机械效应。空化效应作为其主要作用机制之一，重要性不言而喻。实验使用 PHIFU 辐照透明的牛眼晶状体，动态观察凝固性坏死的变化过程及其与空化效应的关系。并在相同辐照剂量和时间下，调节声功率和占空比，选取最适宜治疗参数。

PHIFU 的空化效应主要取决于超声频率、声强、脉冲宽度、脉冲重复频率和组织特征等因素。实验中声功率为 60 W 时未见宽带噪声，即没有空化

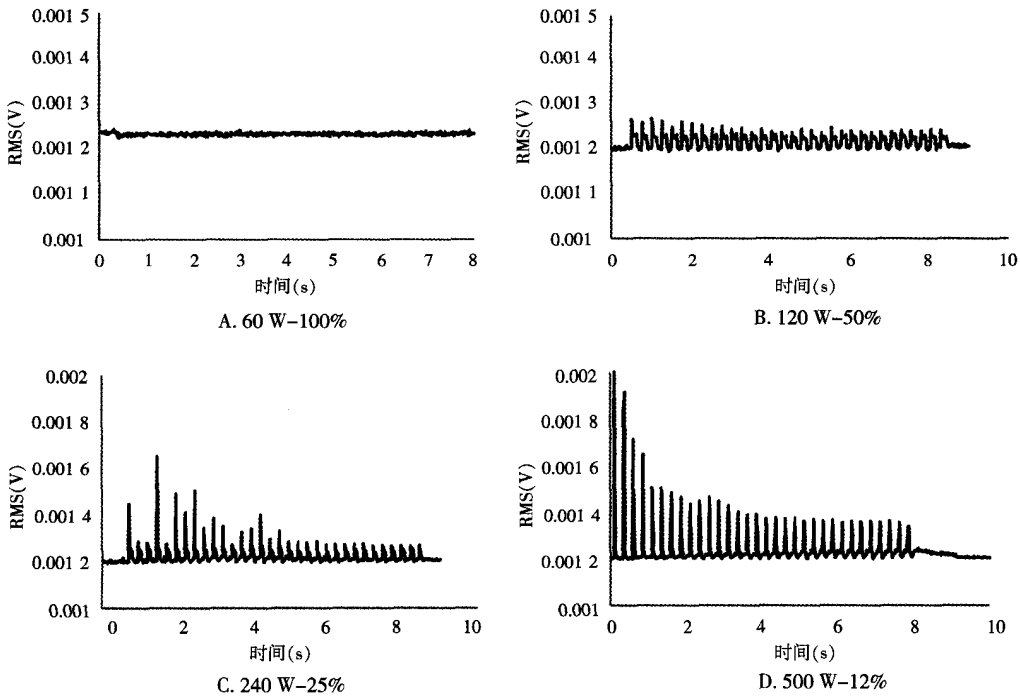


A. 60 W-100%　　B. 120 W-50%

C. 240 W-25%　　D. 500 W-12%

图 3　各组参数辐照下的空化频谱信息

Fig.3　Cavitation spectral information in each group



A. 60 W-100%　　B. 120 W-50%

C. 240 W-25%　　D. 500 W-12%

图 4　各组宽带噪声 RMS 值的变化

Fig.4　Changes of RMS level related to broadband noise in each group

发生，随着声功率的增大，各组相应 RMS 曲线幅值增加，表示其空化行为愈加剧烈（见图 4）。因此，声功率可影响空化效应的发生，声功率越大，空化越易发生。C、D 组辐照时，其 RMS 值在辐照开始时明显增高，即在辐照一开始有空化的发生，其相应凝固性坏死出现平均时间较空化发生所需时间长。可见空化效应发生早于凝固性坏死出现。4 组辐照参数下凝固性坏死开始出现的时间，60 W 所需时间

最长，120 W 次之，240 W 和 500 W 最短，表明空化的发生促进了凝固性坏死提前发生，这与空化效应增强热效应[11-12]有关。PHIFU 辐照时，D 组凝固性坏死出现所需时间最短，辐照结束后其凝固性坏死体积最大，EEF 最低。

实验结果表明：在相同剂量下，高功率低占空比的 PHIFU 辐照效果要优于低功率连续波辐照结果。尽管随着声功率增大，其辐照过程中靶区温升越快，可能会造成周围正常组织、声通道及皮肤灼伤等并发症[13-14]，但 PHIFU 间歇式给予能量的方式，可使热量扩散，降低温升。当占空比低时，有效辐照时间短，靶区温升低，也可避免并发症的发生。这为提高 PHIFU 治疗的安全性和有效性提供了可能。

由于受实验材料限制，辐照过程中温升的情况未加监测，无法研究其与空化效应的关联。为提高 PHIFU 治疗的安全有效性，需开展对 PHIFU 辐照过程中的温度监测的进一步研究。

参 考 文 献

[1] 焦 娇，伍 烽，邹建中，等.不同脉冲高强度聚焦超声辐照方式损伤离体灌注猪肝的实验研究[J].南方医科大学学报，2013，33(2)：230-234.

[2] 刘 芳，邹建中，艾慧坚，等.占空比对脉冲高强度聚焦超声辐照离体牛肝所致损伤的影响[J].中国超声医学杂志，2013，29(1)：75-78.

[3] 王智彪，李发琪，冯 诺.治疗超声原理与应用[M].南京：南京大学出版社，2008：236-237.

[4] Frenkel V，Etherington A，Greene M，et al.Delivery of liposomal doxorubicin(Doxil) in a breast cancer tumor model：investigation of potential enhancement by pulsed-high intensity focused ultrasound exposure[J].Academic Radiology，2006，13(4)：469-479.

[5] Min JP，Young-sun K，Jehoon Y，et al.Pulsed high-intensity focused ultrasound therapy enhances targeted delivery of cetuximab to colon cancer xenograft model in mice[J].Ultrasound in Medicine & Biology，2013，39(2)：292-299.

[6] Wang S，Shin IS，Hancock H，et al.Pulsed high intensity focused ultrasound increases penetration and therapeutic efficacy of monoclonal antibodies in murine xenograft tumors[J].Journal of Controlled Release Official Journal of the Controlled Release Society，2012，162(1)：218-224.

[7] Hwang JH，Zhou Y，Warren C，et al.Targeted venous occlusion using pulsed high-intensity focused ultrasound[J].IEEE Trans Biomed Eng，2010，57(1)：37-40.

[8] 刘春梅，陈锦云，柯 丹，等.脉冲高强度聚焦超声联合微泡非热损伤兔肝 VX2 移植瘤的病理观察[J].中国超声医学杂志，2007，23(11)：806-809.

[9] Huber PE，Mann MJ，Melo LG，et al. Focused ultrasound(HIFU) induces localized enhancement of reporter gene expression in rabbit carotid artery[J].Gene Therapy，2003，10(18)：1600-1607.

[10] Lafon C，Khokhlova VA，Kaczkowski PJ，et al.Use of a bovine eye lens for observation of HIFU-induced lesions in real-time[J].Ultrasound in Medicine & Biology，2006，32(11)：1731-1741.

[11] Melodelima D，Chapelon JY，Theillère Y，et al.Combination of thermal and cavitation effects to generate deep lesions with an endocavitary applicator using a plane transducer：ex vivo studies[J].Ultrasound in Medicine & Biology，2004，30(1)：103-111.

[12] 王 琦，王 静，李雅芬，等.HIFU 辐照离体牛眼晶状体致凝固性坏死出现时间与空化关系的定性研究[J].激光杂志，2013，34(2)：64-66.

[13] Burke CW，Klibanov AL，Sheehan JP，et al.Inhibition of glioma growth by microbubble activation in a subcutaneous model using low duty cycle ultrasound without significant heating[J].Journal of Neurosurgery，2011，114(6)：1654-1661.

[14] Yang FY，Chiu WH，Liu SH，et al.Functional changes in arteries induced by pulsed high-intensity focused ultrasound[J].Ultrasonics Ferroelectrics & Frequency Control IEEE Transactions on，2009，56(12)：2643-2649.

（责任编辑：冉明会）