

包裹液态氟碳的脂质纳米粒的制备及术中评估 射频消融边界的实验研究

纪莉 杨丽 张世玉 谢明星

摘要 目的 制备一种热敏型纳米粒——包裹液态全氟己烷(PFH)的脂质纳米粒,探讨其术中评估射频消融边界的可行性。方法 采用均质-乳匀法制备包裹 PFH 的纳米粒, Malvern 激光粒度分析仪检测纳米粒粒径范围。水囊实验观察纳米粒热相变情况;将 24 块大小相同的离体猪肝分为两组,分别给予单纯射频消融、射频消融联合纳米粒处理,术中观察气化区的形成,并测量气化区及大体病理的大小,分析其相关性。结果 制备的热敏型纳米粒平均粒径为(328.00±65.57)nm。体外加热实验显示,当温度达到 78 ℃时,二维超声观察纳米粒回声较加热前明显增强;离体猪肝消融实验显示,加入纳米粒后射频消融产生的气化区更明显,且与大体病理所示坏死范围呈高度相关($r=0.996, 0.949$)。结论 通过均质-乳匀法成功制备了纳米粒,其粒径小且均一,具有热敏相变潜能,有望成为术中实时监控、评估射频消融边界的新方法。

关键词 热敏;纳米粒;射频消融;离体猪肝

[中图分类号] R-33;R312

[文献标识码] A

Intraoperative assessment on radiofrequency ablation margins using lipid nanoparticles with liquid perfluorocarbons

Ji Li, YANG Li, ZHANG Shiyu, XIE Mingxing

Department of Ultrasound, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, China

ABSTRACT Objective To explore the feasibility of a new type of thermal-sensitive nanoparticles (Nps) was being prepared and used to assess radio-frequency ablation margins intra-operatively. **Methods** The nanoparticles surrounded with the liquid perfluorohexane (PFH) was prepared using homogenization/emulsion method. The range of Nps diameter was taken measured using Malvern laser particle size analyzer, and the characteristics of nanoparticles thermal phase transition was observed with water sac experiment. 24 pcs of fresh pork liver in vitro were ablated with radio-frequency ablation or combined with nanoparticles. The whole procedure of gasification zone formation was observed and the area of this zone was measured, and compared with the damaged area from the pathologic sample. **Results** The thermal-sensitive nanoparticles with a mean particle diameter (328.00±65.57)nm was successfully prepared. From the heating experiment in vitro, when the temperature rise up to 78 ℃, the echo of microsphere was higher than that of pre-heating period with two-dimensional ultrasonography. For in-vitro liver experiment, the gasification zone induced to radio-frequency ablation combined with nanoparticles was more obvious than using radio-frequency ablation only. Besides, that presented a high correlation with pathologic necrosis range. **Conclusion** The nanoparticles preparation by means of homogenization/emulsion technique is potential to be thermal-sensitive in phase transition, and to be a new technique used to assess radio-frequency ablation margins intra-operatively.

KEY WORDS Thermal-sensitive; Nanoparticles; Radio-frequency ablation; Vitro porcine liver

基金项目:国家自然科学基金重点项目(81530056)

作者单位:430000 武汉市,华中科技大学同济医学院附属协和医院超声影像科(纪莉、谢明星);南方医科大学南方医院药学部(杨丽、张世玉)

通信作者:谢明星, Email:xiemx64@126.com

射频消融是热消融的一种,利用热能使肿瘤组织发生凝固性坏死从而达到杀伤肿瘤的作用,目前已广泛运用于临床。射频消融的关键是完全损毁肿瘤组织的同时,尽可能减少对周围正常组织的损伤。因此,术中实时、准确评估消融边界是更好地掌控手术过程,减少复发率及并发症的前提^[1]。目前用于评估消融边界的影像学方法有很多,但多用于术后即刻及随访评估消融效果^[2],未能术中实时监控、评估消融边界。肿瘤组织发生彻底凝固性坏死的条件是局部温度达到 60~100℃并维持一定时间^[3],文献^[4]报道在此温度条件下包裹液态氟碳的纳米粒可发生液-气相转变,二维超声表现为强回声气化区。利用液态氟碳的热相变特性评估射频消融边界的研究鲜见报道。本实验旨在制备一种新型热敏型纳米粒——包裹液态氟碳的脂质纳米粒,利用其热敏特性术中实时监控、评估射频消融边界。

材料与方 法

一、实验材料

1.仪器:CP2225D 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);DK-S22 恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);IKAULTRA-TURRAX 剪切仪;Olympus BX51 光学显微镜;Malvern 激光粒度分析仪器;Multisizer III 库尔特粒度分析仪;ATS 高速分散均质机(AH-2010);RITA 射频治疗仪(美国,RITA 公司),设定功率 45 W、温度 100℃、单针消融时间 2 min,电极针 17 G×10 cm;Philips iU 22 彩色多普勒超声诊断仪,L12-5 线阵探头,频率 5.0~12.0 MHz。

2.试剂:二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC,Avant Polar Lipid)、二棕榈酰磷脂酸(DPPA,Avant Polar Lipid)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 5000(DPPE-PEG 5000,Avant Polar Lipid)、液态全氟己烷(PFH,Apolo 公司)、1,2-丙二醇、甘油、NaCl、琼脂粉末(北京百灵威化学试剂有限公司)及蒸馏水。

二、实验方法

1.热敏型纳米粒的制备:按摩尔比称取一定量的 DPPC、DPPE-PEG 5000 及 DPPA,加至丙二醇中使溶解,再加入一定量的甘油和 NaCl 水溶液,于 70℃水浴搅拌 15 min 至完全溶解,制成磷脂混悬。磷脂溶解过程中通入氮气以防止磷脂氧化。将上述磷脂混悬液加入 50 ml 聚丙烯管内,冷却后加入 PFH,剪切(频率 24 000 r/min、时间 3 min),制得包裹 PFH 的微球初乳,再将初乳置于高速分散均质机乳匀,设置均质压

力及次数,制得包裹 PFH 的纳米粒。剪切及均质过程中冰水浴以防止 PFH 气化。取上述普通纳米粒经适量双蒸水稀释后,Malvern 激光粒度分析仪检测粒径及电位。

2.热敏微球体外相变实验

(1)水囊加热实验:取上述制备好的 PFH 纳米粒 2 ml、双蒸水 120 ml 混匀稀释后备用。取 100 ml 稀释纳米粒、100 ml 脱气水分别装于两个特制小囊中并密封(即 PFH 纳米粒组、脱气水组),将两组置于不同温度水浴箱中,持续 1 min,同时行二维超声显像,采集动态图像并存储。

(2)琼脂模型射频消融实验:称取 6 g 琼脂粉溶于 400 ml 沸水并分装于两个容器中,待温度降至 40℃时,取 2 ml 稀释纳米粒及 2 ml 脱气水分别加入琼脂混悬液中(即 PFH 纳米粒组、单纯琼脂组),玻璃棒轻微搅拌至完全混匀,常温下静置 60 min 待其完全凝固。超声引导下分别对两组琼脂块行射频消融术,采用 RITA 射频治疗仪,设定功率 35 W,时间 1 min,额定温度 78℃,二维超声观察消融区回声改变。

3.热敏纳米粒术中评估射频消融边界:取离体猪肝若干只,切成 5 cm×5 cm×5 cm 的立方块,共 24 块,负压脱气后二维超声观察组织块回声情况。超声引导下将电极针插入组织块内,将上述 24 块猪肝随机分为两组:实验组,超声引导下在射频针周围多点注射上述方法制备的纳米粒后行射频消融;对照组,即单纯对组织块行射频消融术。设定消融功率 35 W,消融时间 2 min,温度 100℃。术中观察两组气化区的形成并存储图像,消融结束后即刻应用二维超声测量气化区大小;术后沿针道切开消融灶,大体病理测量实际坏死灶大小,分析二者的相关性。

三、统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较行独立样本 *t* 检验;组间相关性分析采用 Pearson 相关分析法。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、热敏型纳米粒的一般特性

制备的纳米粒为白色乳状液,静置后未见明显分层;Malvern 激光粒度分析仪器测得微球平均粒径为 $(328.00 \pm 65.57) \text{ nm}$ (图 1)。

二、体外热敏相变特性

1.水囊加热超声显影效果:加热前,二维超声可见 PFH 纳米粒组、脱气水组回声均极低,接近无回声,回

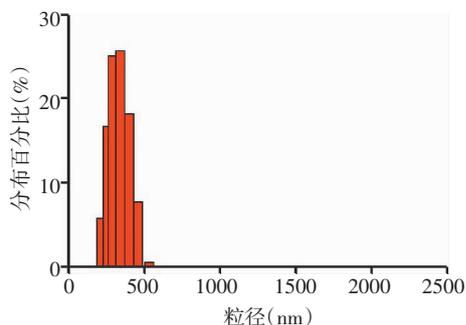


图 1 包裹液态氟碳纳米粒的粒径分布图

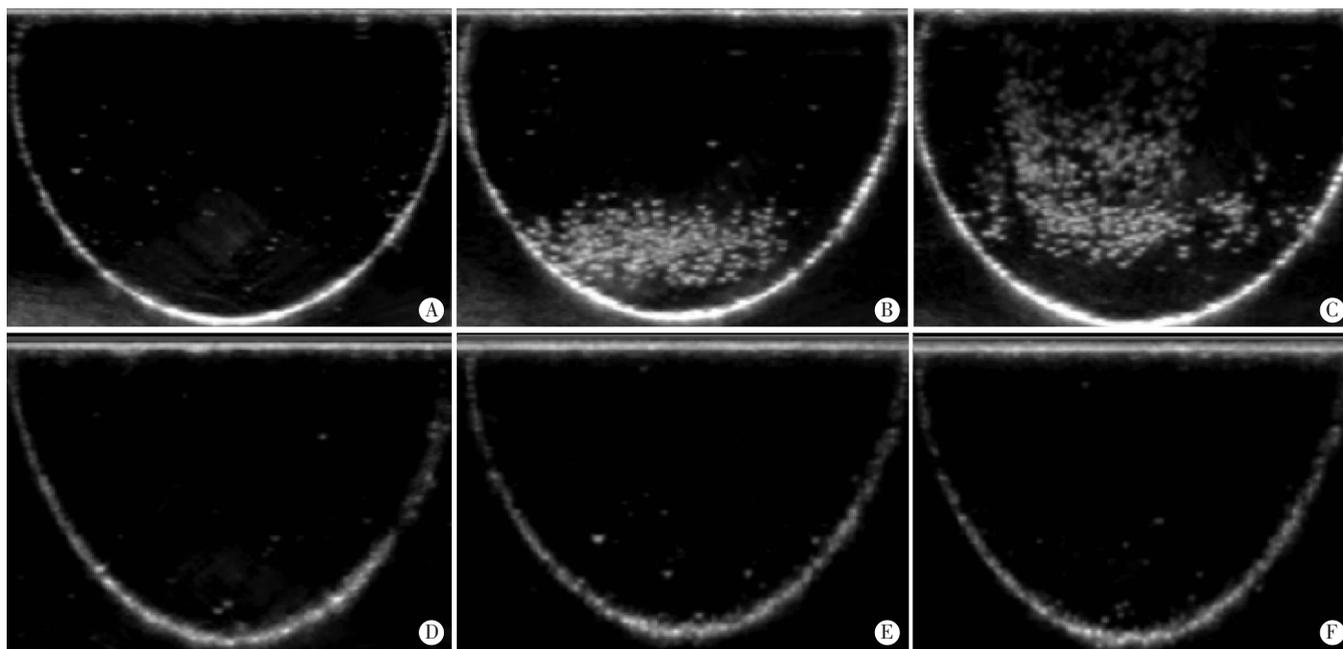
声强度分别为(0.18±0.04)dB、(0.23±0.09)dB;加热至78℃,持续1min时,PFH纳米粒组水囊内有较多气体回声产生,由底部向上运动,回声较加热前明显增强;

而脱气水组水囊内未见明显气体产生,回声较加热前无明显改变,回声强度分别为(26.49±0.71)dB、(0.25±0.05)dB。见图2。PFH纳米粒组加热前、后二维回声强度比较,差异有统计学意义($P<0.01$),脱气水组比较差异无统计学意义($P=0.46$)。

2.琼脂模型射频消融:消融前,PFH纳米粒组和单纯琼脂组均表现为无回声;启动消融后当射频针温度达到额定温度78℃时,PFH纳米粒组射频针周围可见较多片状高回声形成,而单纯琼脂组射频针周围仅见少许点状高回声散在分布。见图3。

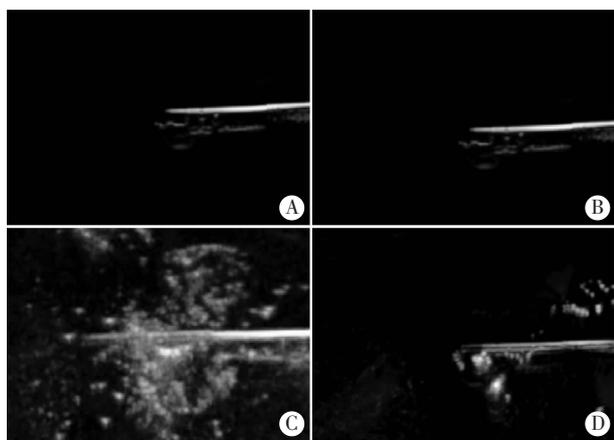
三、热敏纳米粒术中评估射频消融边界

24块猪肝共形成24个射频消融灶。消融术前,



A、B、C:PFH纳米粒组加热过程;D、E、F:脱气水组加热过程。

图2 PFH纳米粒组和脱气水组水囊加热前、后回声二维超声图

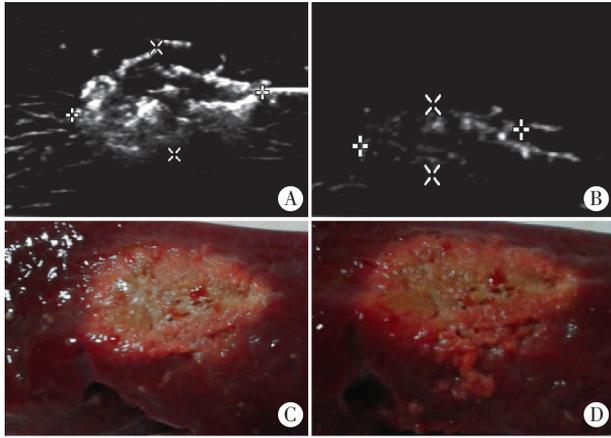


A、C:PFH纳米粒组;B、D:单纯琼脂组。

图3 PFH纳米粒组和单纯琼脂组射频消融前、后二维超声图

二维超声显示两组离体猪肝均呈中等回声,内可见条索样中等回声散在分布;消融术中及术后,两组射频针前端及周边均产生了强回声气化区,大体解剖显示两组形成的消融灶均呈椭圆形,灰白色,中央可见窄条状针道,边缘颜色逐渐变淡,肉眼可清楚区分消融灶及周边正常组织,可直接测量消融灶大小。见图4。实验组气化区明显大于对照组;两组强回声区长径、短径比较差异有统计学意义($P<0.05$),而两组实际坏死灶长径、短径比较差异无统计学意义。见表1。

实验组气化区长径、短径与实际坏死灶大小均有相关性($r=0.996、0.949$);对照组气化区长径与实际坏死灶大小有相关性($r=0.822$),而短径与实际坏死灶大小无相关性。见图5,6。



A, C: 实验组; B, D: 对照组。

图 4 实验组和对照组射频消融后二维超声所示气化区与病理所示凝固坏死区对照图

表 1 实验组与对照组消融灶强回声气化区大小与实际坏死灶比较($\bar{x}\pm s$)

组别	二维气化区		实际坏死灶	
	长径	短径	长径	短径
实验组(12)	1.54±0.65	0.94±0.75	1.61±0.52	1.13±0.67
对照组(12)	1.27±0.94	0.46±0.60	1.61±0.57	1.16±0.27
<i>t</i> 值	8.29	17.05	-0.037	-1.53
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05	0.97	0.15

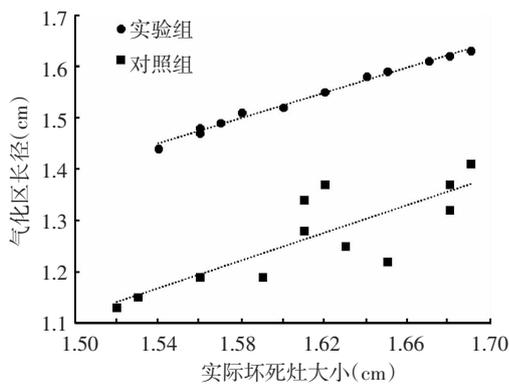


图 5 实验组和对照组气化区长径与实际坏死灶大小相关性散点图

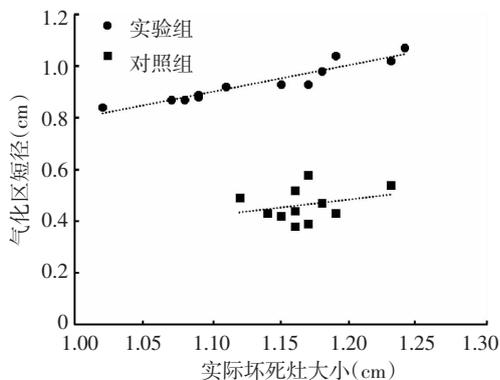


图 6 实验组和对照组气化区短径与实际坏死灶大小相关性散点图

讨 论

射频消融通过激发电极针周围组织中的离子剧烈震动、摩擦产热, 进而达到杀伤肿瘤组织的作用^[3]。其操作简单、可重复实施, 创伤性小, 目前已成功运用于肝、肾、肺及甲状腺等多个脏器的肿瘤治疗。射频消融成功的关键是在完全损毁肿瘤组织的同时, 尽可能减少对周围正常组织的损伤。因此, 术中实时、准确评估消融边界具有重要的临床意义。消融靶区因受热温度升高、组织气化而产生强回声气化区, 与周围未消融组织形成的回声强度有较大差异, 灰阶超声能清楚显示气化区形态及范围, 是术中实时评估消融边界的简易方法。然而, 消融术中气化区的形成受多种因素影响, 不宜在消融术中准确评估消融边界^[5]。有学者^[6]发现, 包裹液态氟碳的纳米粒具有液-气相变潜能, 当局部组织温度升高到一定阈值时纳米粒可转变为气态, 而超声二维图像对气体极为敏感。由此猜想只要控制所制备的纳米粒的相变阈值与组织发生坏死的阈值一致, 就可以通过观察气化区范围得知组织消融边界。

本实验以 DPPC、DPPE-PEG 5000 及 DPPA 为成膜材料, 以液态 PFH 为被包裹材料, 采用均质-乳匀法制备了浓度高、粒径均匀的脂质纳米粒混悬液。本实验中, 当局部水浴温度达到 78 ℃ 时, 二维超声观察 PFH 纳米粒组水囊回声明显增强, 而脱气水组回声无改变; 同时将均匀混有 PFH 纳米粒的琼脂模型进行射频消融时, 电极针周围产生了明显的气化区, 而单纯琼脂纳米粒组未见明显气化区形成。本实验分别通过水浴加热及射频加热方法证实了 PFH 纳米粒具有热相变潜能, 在高温刺激下发生了液-气相转变, 同时在二维超声上表现为强回声。

本实验通过体外猪肝消融实验表明, 射频消融过程中加入 PFH 纳米粒并未明显改变实际消融灶大小, 但在二维超声图像上 PFH 纳米粒组即实验组产生的强回声气化区较对照组显示更明显, 提示 PFH 纳米粒在热能作用下发生相变, 相变后的纳米粒增强了二维超声对气化区的显示。统计分析两组中强回声区与实际坏死灶大小的相关性后发现, 实验组气化区长径、短径, 以及对照组气化区长径与大体标本的实际消融灶大小均有相关性($r=0.996、0.949、0.822$), 但加入 PFH 纳米粒后其相关性明显优于对照组, 而对照组气化区短径与实际坏死灶大小无相关性, 提示射频消融过程中加入 PFH 纳米粒能更准确地反映实际消融边界。同时两组二维超声对气化区长径的显示明显优于短径, 这可能是由于气化区后方回声衰减影响了二维超声对气化区后方边界的判断。

本实验中, PFH 纳米粒在射频消融过程中相当于

一种温度指示剂,当组织局部温度达到其相变阈值(约 78 ℃)时即发生液-气相转变,相变后的微球在二维超声上表现为局部强回声,而肿瘤组织发生即刻彻底的凝固性坏死的条件是消融局部温度达到 60~100 ℃,因此可通过二维超声显示气化区范围来间接反映消融边界,这是实验中引入 PFH 纳米粒后其气化区与实际消融范围有良好相关性的理论基础。

综上所述,本实验成功制备了包裹 PFH 的热敏型纳米粒,该纳米粒性质稳定、粒径小且均匀、具有热相变潜能,有助于射频消融术中强回声气化区的显示,有望成为术中实时、准确评估消融边界的新方法。对于 PFH 纳米粒的动物体内循环特征、肿瘤组织局部蓄积效果,以及活体肿瘤射频消融边界的评估效果是下一实验开展的方向。

参考文献

[1] Huang J, Yan L, Cheng Z, et al. A randomized trial comparing

radiofrequency ablation and surgical resection for HCC conforming to the Milan criteria[J]. Ann Surg, 2010, 252(6):903-912.

[2] Correa-Gallego C, Karkar AM, Monette S, et al. Intraoperative ultrasound and tissue elastography measurements do not predict the size of hepatic microwave ablations[J]. Acad Radiol, 2014, 21(1):72-78.

[3] Goldberg SN, Gazelle GS, Mueller PR. Thermal ablation therapy for focal malignancy: a unified approach to underlying principles, techniques, and diagnostic imaging guidance[J]. Am J Roentgenol, 2000, 174(2):323-331.

[4] Rapoport NY, Efros AL, Christensen DA, et al. Microbubble generation in phase-shift nanoemulsions used as anticancer drug carriers[J]. Bubble Sci Eng Technol, 2009, 1(1-2):31-39.

[5] Nouse K, Shiraga K, Uematsu S, et al. Prediction of the ablated area by the spread of microbubbles during radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int, 2005, 25(5):967-972.

[6] Diaz-López R, Tsapis N, Fattal E. Liquid perfluorocarbons as contrast agents for ultrasonography and (19)F-MRI[J]. Pharm Res, 2010, 27(1):1-16.

(修回日期:2016-10-16)

· 病例报道 ·

Ultrasonic diagnosis of congenital atresia hymen: a case report 超声诊断先天性处女膜闭锁 1 例

张 婷 孙 莹 祝英乔 徐卫玲

[中图分类号] R711.1; R445.1

[文献标识码] B

患者女, 14 岁, 因无明显诱因突然出现排尿困难 2 d 来我院泌尿外科就诊。自诉无月经来潮。超声检查: 双肾、输尿管及膀胱声像图未见明显异常。于宫腔内见一大小 34 mm×23 mm 的无回声区, 其内混杂细密点状回声, 振动探头可见细密点状回声缓慢移动; 宫颈管至阴道另见一大小 120 mm×89 mm 的类似无回声区(图 1); CDFI 于无回声区内及边缘均未探及血流信号(图 2)。超声提示: 阴道、宫腔积液, 考虑处女膜闭锁。妇科检查: 外阴发育正常; 阴道口处见处女膜闭锁, 向外膨出, 表面呈紫蓝色, 明确诊断为处女膜闭锁。入院后行处女膜切开术及成形术。术中探查见: 外阴幼女型; 处女膜闭锁, 向外膨隆, 大小约为 30 mm×30 mm×30 mm, 表面张力较大, 呈紫蓝色; 处女膜表面做

“十”字切开, 可见大量陈旧性血性液体自切口处流出。

讨论: 处女膜形成于孕期第 9 周的副中肾管, 为泌尿生殖窦上皮及间叶组织构成的环状薄膜, 妊娠后半期, 处女膜向外开口阴道与体外相通。发育不良时, 泌尿生殖窦上皮不能贯穿前庭部导致处女膜闭锁^[1]。处女膜闭锁患者多表现为青春期少女出现逐渐加重的周期性下腹痛, 且无月经来潮。由于大量经血淤积于阴道及子宫腔内, 使其压力增高, 过度膨胀, 挤压直肠及膀胱, 可出现便秘、肛门坠胀, 以及尿频、尿急、尿潴留等。随着病情发展, 淤积的经血可以引起输卵管扩张, 并通过输卵管伞部逆流进入腹腔, 可将子宫内膜带到腹腔, 造成子宫内膜异位和腹腔粘连, 从而引起剧烈的腹痛。本病例为青春期少女且无月经来潮, 并出现了无明显诱因排尿困难, 临床表现高度怀疑本病。及早诊断和及时治疗对本病极为重要。超声是诊断本病的可靠影像学检查方法。

参考文献

[1] 王向云, 陈方红. 彩色多普勒超声在小儿妇科急症诊断中的应用[J]. 实用妇科杂志, 2005, 21(12):726-727.

(修回日期:2016-11-10)

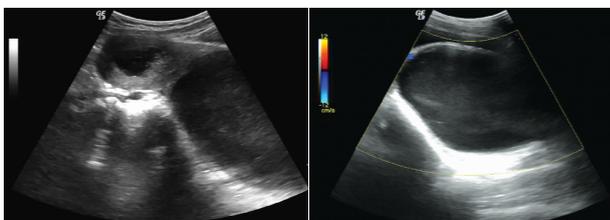


图 1 阴道及宫腔内积液声像图 图 2 CDFI 示液性无回声区内
部及周边均未探及血流信号