

高强度聚焦超声联合脂质纳米氟碳液滴消融兔肝的实验研究

孙廷宇 王琦 叶合敏 曾超 李婧男 李发琪

摘要 目的 探讨脂质纳米氟碳液滴(L-PFP)增效高强度聚焦超声(HIFU)消融兔肝的空化活动及术后病理学变化。方法 采用薄膜水化法制备L-PFP,然后将24只正常新西兰大白兔随机分为对照组(单纯HIFU组)和联合组(L-PFP联合HIFU),每组各12只;于超声引导下HIFU定点消融兔肝,观察两组强回声区范围和灰度变化值情况;使用被动空化检测系统监控空化活动,观察辐照过程中两组宽带噪声(RMS)和累积瞬态空化剂量情况。分别于辐照前1d和辐照后即刻、1d、3d、7d检测兔肝功能指标谷丙转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST);对辐照后各时间点兔肝标本行HE染色,观察消融灶转归过程中的病理学变化。结果 成功制备L-PFP,粒径(278.33±26.06)nm,稳定性良好。HIFU辐照后联合组强回声区范围大于对照组,对照组和联合组灰度变化值分别为45.60±4.07和88.00±7.21,差异有统计学意义($P<0.05$)。空化检测结果显示,HIFU辐照过程中两组RMS均总体增强,且随时间波动,联合组RMS高于对照组($P<0.05$);联合组累积瞬态空化剂量0.69±0.07,显著高于对照组0.11±0.01,差异有统计学意义($P<0.05$)。肝功能检测结果显示,对照组与联合组辐照后即刻、1d、3d、7d ALT和AST均呈先增高后降低的趋势;联合组辐照后1d、3d、7d ALT和AST均高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。大体标本及病理结果显示,联合组组织损伤更严重,细胞变性更彻底,炎性反应更强烈;其中对照组辐照后7d消融灶恢复为正常组织,联合组辐照后7d消融区域边缘可见较多正常肝细胞,并伴有条带状纤维化及少量炎性细胞浸润。结论 L-PFP可通过增强空化效应有效提高HIFU消融效果,延长消融灶恢复所需时间。

关键词 聚焦超声,高强度;空化效应;氟碳液滴;增效;兔肝

[中图分类号]R445.1

[文献标识码]A

Experimental study on the ablation of rabbit liver by high intensity focused ultrasound combined with lipid-perfluorocarbon nanodroplets

SUN Tingyu, WANG Qi, YE Hemin, ZENG Chao, LI Jingnan, LI Faqi

State Key Laboratory of Ultrasound Medicine Engineering, College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

ABSTRACT Objective To explore the cavitation activity and postoperative pathological changes of rabbit liver by lipid-perfluorocarbon nanodroplets (L-PFP) synergistic high intensity focused ultrasound (HIFU) ablation. **Method** L-PFP was prepared by thin-film hydration. Then 24 normal New Zealand rabbits were randomly divided into control group (only HIFU group, $n=12$) and combined group (L-PFP combined with HIFU, $n=12$). HIFU was used to ablate rabbit liver under the guidance of ultrasound, the strong echo region and grey scale variation values in both groups were observed. The cavitation activity was monitored by passive cavitation detection system (PCD), the root mean square (RMS) and inertial cavitation dose during irradiation were observed. Rabbits' liver function indexes (ALT and AST) were detected at 1 d before and immediately, 1 d, 3 d, 7 d after ablation. The rabbit liver specimens were taken out for HE staining, the pathological changes during the ablation process

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(12004059)

作者单位:400016 重庆市,重庆医科大学生物医学工程学院

通讯作者:李发琪,Email:lifq@cqmu.edu.cn

was observed. **Results** The L-PFP with diameter of (278.33±26.06) nm and good stability were successfully prepared. The strong echo region of combined group was greater than that of control group after HIFU irradiation, the grey scale variation values of control and combined groups were 45.60±4.07 and 88.00±7.21, respectively, there was statistically significant difference ($P<0.05$). The cavitation detection results showed that RMS was generally enhanced in both groups during HIFU irradiation and fluctuated with time, and RMS of combined group was higher than that of control group ($P<0.05$), the inertial cavitation dose of control and combined groups were 0.11±0.01 and 0.69±0.07, respectively, there was statistically significant difference ($P<0.05$). The results of liver function tests showed that ALT and AST were increased and then decreased in both groups immediately after irradiation and at 1 d, 3 d, 7 d. ALT and AST of combined group were higher than those of control group at 1 d, 3 d, 7 d after irradiation, and the differences were statistically significant (all $P<0.05$). Gross specimens and pathological findings showed more severe tissue loss, more complete cellular degeneration and more intense inflammatory response in the combined group. The ablated regions were repaired to normal tissue 7 d after irradiation in the control group, while in the combined group, more normal hepatocytes were seen at the edges of the ablated regions 7 d after irradiation, with striated fibrosis and a small amount of inflammatory cell infiltration. **Conclusion** L-PFP can effectively improve the ablation effect of HIFU by enhancing the cavitation effect, and prolong the time required for the outcome of the ablation lesion.

KEY WORDS Focused ultrasound, high intensity; Cavitation effect; Fluorocarbon droplets; Synergy; Rabbit liver

高强度聚焦超声 (high intensity focused ultrasound, HIFU) 是一种靶向、无创的肿瘤消融方法, 但对于体积较大、血供丰富的肿瘤, 其治疗时间相对较长、有效率较低^[1]。研究^[2]表明, 氟碳液滴可以通过 HIFU 的热效应在体内相变为微泡, 改变组织的声学特性增强声散射, 以及增强能量在靶区的聚集, 从而提高 HIFU 的治疗有效率。HIFU 联合氟碳液滴增效机制的应用已有文献^[3]报道, 但其体内空化活动变化及术后组织再生的病理过程鲜有报道, 同时空化效应过度可能会造成不必要的损伤^[4]。基于此, 本实验对比分析单纯 HIFU 及其联合脂质纳米氟碳液滴 (lipid-perfluorocarbon nanodroplets, L-PFP) 消融兔肝的空化活动和病理变化, 旨在为氟碳液滴用于 HIFU 临床治疗肝肿瘤提供理论依据。

材料与方法

一、实验动物

新西兰大白兔 24 只 (由重庆医科大学动物实验中心提供), 雌雄不限, 体质量 2.5~3.2 kg; 本实验经重庆医科大学动物伦理委员会批准 (批准号: SCXK 2012-0001)。

二、主要实验仪器与试剂

1. 仪器: 透射电子显微镜 (JEM-1400PLUS, 日本电子株式会社); 马尔文激光粒径仪 (Zeta Sizer 3000HS, 英国马尔文仪器有限公司); 旋转蒸发器 (RE-52AA, 亚荣生化仪器厂); 超声处理器 (VCX150, 美国 Sonic 公司); 海扶刀® 聚焦超声肿瘤治疗系统 (JC

200, 重庆海扶医疗科技股份有限公司); 被动空化检测 (PCD) 系统配备的平面压电换能器 (panametrics V309-SU, 中心频率 5 MHz, 美国泛美公司), 超高速数据采集卡 (PXIe-5122, 美国国家仪器公司), LabVIEW 开发平台 (v2015, 美国国家仪器公司)。

2. 试剂: 棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)、磷脂 PEG 马来酰亚胺 (DSPE)、胆固醇均购自美国 Avanti 公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS) 购自美国 HyClone 公司; 全氟戊烷、氯仿均购自中国阿拉丁公司; 戊巴比妥购自北京化学试剂公司; 全氟戊烷 (PFP) 购自美国 Stream Chemical 公司。

三、实验方法

1. L-PFP 的制备: 将 6 mg DPPC、2 mg DSPE、2 mg 胆固醇及 5 ml 氯仿加入圆底烧瓶均匀混合, 然后使用旋转蒸发器加热蒸发, 直至底部生成均匀的脂质薄膜; 加入 5 ml PBS (pH 值 7.4) 收集脂质体。冰浴下将 200 μ l PFP 加入脂质体中, 使用超声处理器 (声功率 130 W, 处理时间 120 s, 超声频率 20 kHz, 占空比 45%) 对混合溶液进行乳化, 制得 L-PFP, 低温离心后置于 4℃ 冰箱中保存备用。

2. HIFU 消融: 实验前所有动物禁食 24 h, 随机分为对照组 (单纯 HIFU 组) 和联合组 (L-PFP 联合 HIFU), 每组各 12 只。联合组经耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥溶液用于麻醉兔 (1 ml/kg), 注射 L-PFP (0.8 ml/kg), 1 min 后应用超声确定其肝脏位置, 并使用聚焦超声肿瘤治疗系统以能量 900 J 的连续波进行 HIFU 辐照。对照组麻醉后仅以相同参数进行 HIFU 辐照。观察两组

强回声区范围,使用HIFU自带的GreyAnalyse软件勾画感兴趣区并计算灰度变化值。

3.空化检测:应用HIFU自带的超声成像系统对比分析辐照前后兔肝组织的回声变化;应用PCD系统检测空化特征信号,并根据空化信号的宽带噪声(root mean square, RMS)曲线规律计算累积瞬态空化剂量^[5]。

4.实验室及病理检查:两组兔均于辐照前1 d和辐照后即刻、1 d、3 d、7 d行心脏采血检测谷丙转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)。分别于HIFU辐照后即刻、1 d、3 d、7 d将消融的兔肝取出体外,观察大体标本。取消融区、交界区及周围区(距消融区边缘3 mm以外)组织,以4%甲醛固定、石蜡包埋、切片,HE染色后进行病理观察。

四、统计学处理

应用SPSS 22.0统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间两两比较行LSD-*t*检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、L-PFP物化表征

L-PFP溶液呈乳白色,静置过夜后分层,上层为透明液体,下层为乳白色沉淀。马尔文激光粒径仪测得L-PFP粒径为 (278.33 ± 26.06) nm,透射电子显微镜显示脂质体成功包载PFP(图1);制备的L-PFP 24 h内粒径无明显变化,稳定性良好。

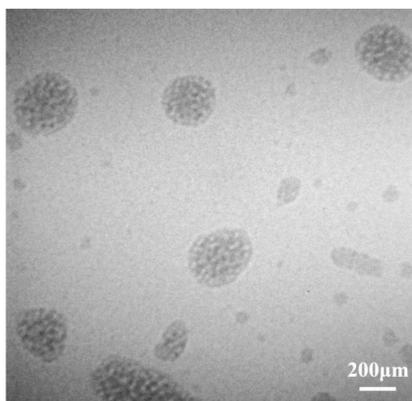


图1 L-PFP透射电镜图

二、HIFU消融情况

使用聚焦超声肿瘤治疗系统以900 J能量辐照后,对照组与联合组均出现强回声,辐照区域边界清晰,联合组强回声区范围大于对照组。对照组和联合组灰度变化值分别为 45.60 ± 4.07 和 88.00 ± 7.21 ,差异有统

计学意义($P<0.05$)。见图2。

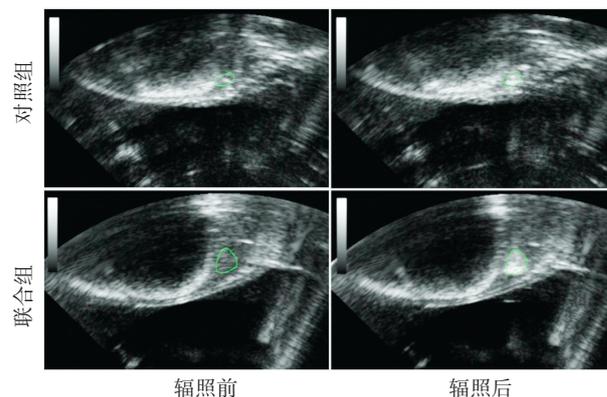


图2 对照组与联合组辐照前后超声图像

三、空化检测结果

HIFU辐照过程中两组RMS均总体增强,且随时间波动,联合组RMS高于对照组($P<0.05$)。联合组累积瞬态空化剂量为 0.69 ± 0.07 ,显著高于对照组 0.11 ± 0.01 ,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图3。

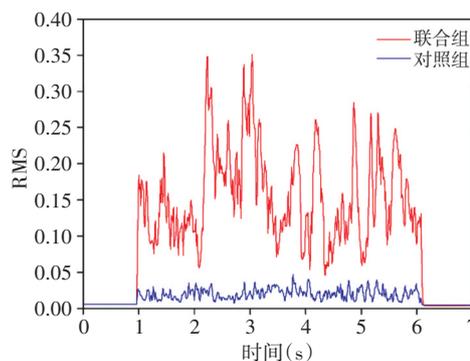


图3 两组HIFU辐照过程中RMS变化情况

四、大体标本变化情况

联合组与对照组病灶辐照后即刻呈现椭圆形,中心区域可见组织坏死,与正常肝组织分界清晰,交界处可见充血带,联合组消融灶显著大于对照组。辐照后1 d两组中心区域均呈凝固性坏死,对照组充血带消失,联合组充血带减小;辐照后3 d对照组表现为中心组织坏死,周围出现白色炎症反应带,联合组表现为中心组织坏死,充血带消失,未见炎症反应带出现;辐照后7 d对照组可见消融灶消失,联合组可见中心组织坏死,周围伴一层白色炎症反应带。见图4。

五、实验室检查结果

联合组与对照组辐照后即刻、1 d、3 d、7 d ALT和AST均呈先增高后降低的趋势,联合组辐照后1 d、3 d、7 d ALT和AST均高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。见表1。

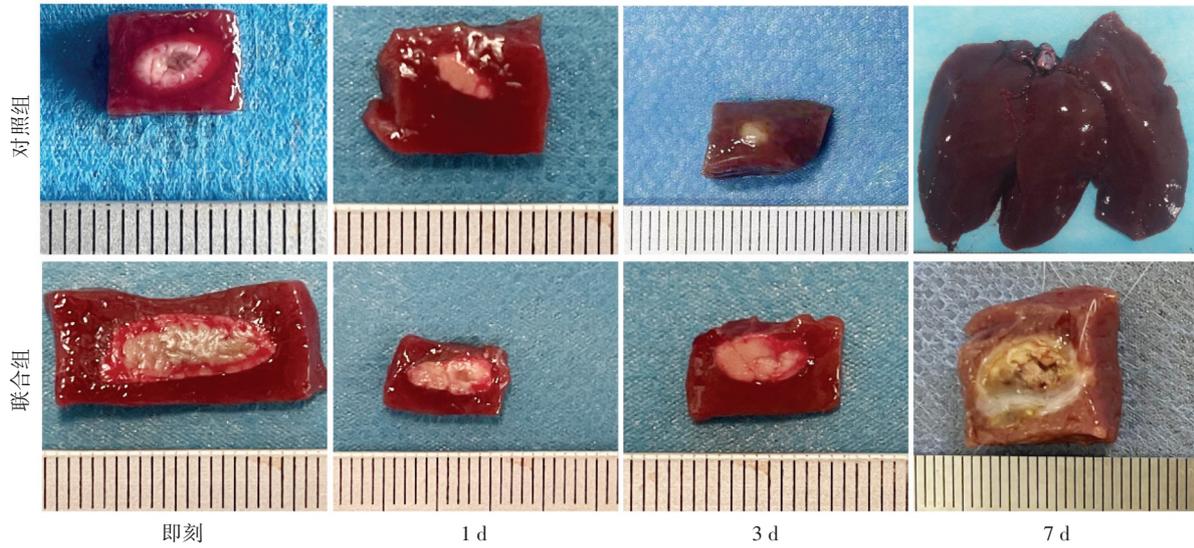


图4 对照组与联合组辐照后各时间点消融灶大体图

表1 HIFU 辐照前后兔肝功能指标变化情况($\bar{x}\pm s$) U/L

组别	ALT	AST
对照组		
辐照前	41.67±9.07	28.53±9.41
辐照后即刻	59.40±7.28	74.55±0.89
辐照后1 d	85.45±20.68	111.80±15.74
辐照后3 d	70.40±15.26	39.25±4.63
辐照后7 d	39.90±0.55	30.08±5.49
联合组		
辐照前	40.47±2.29	25.40±12.52
辐照后即刻	59.10±7.27	99.65±23.97
辐照后1 d	127.20±32.26*	267.20±2.00*
辐照后3 d	89.85±9.23*	140.70±5.57*
辐照后7 d	61.95±1.70*	43.25±6.11*

与对照组同一时间点比较, * $P<0.05$ 。ALT: 谷丙转氨酶; AST: 天冬氨酸转氨酶

六、病理检查结果

联合组辐照后即刻消融区域与正常组织边界清晰, 消融区域内肝组织明显破坏, 肝细胞完全消失, 被大量红染的蛋白质物质代替, 可见细胞碎裂; 辐照后1 d 消融区域边界周围伴有大量炎性细胞浸润, 消融区域与正常组织边界清晰; 辐照后3 d 消融区域边界出现条带状纤维化, 消融区域与正常组织边界清晰; 辐照后7 d 消融区域边缘可见较多正常肝细胞, 并伴有条带状纤维化及少量炎性细胞浸润。对照组辐照后即刻消融区域边界较模糊, 可见淤血和局部肿胀, 其内肝细胞破坏不彻底; 辐照后1 d 可见炎性细胞浸润, 边界较清晰; 辐照后3 d 消融区域边缘可见较多正常肝细胞, 同时伴有条带状纤维化及少量炎性细胞浸润; 辐照后7 d 消融灶消失, 恢复为正常肝组织。见图5。

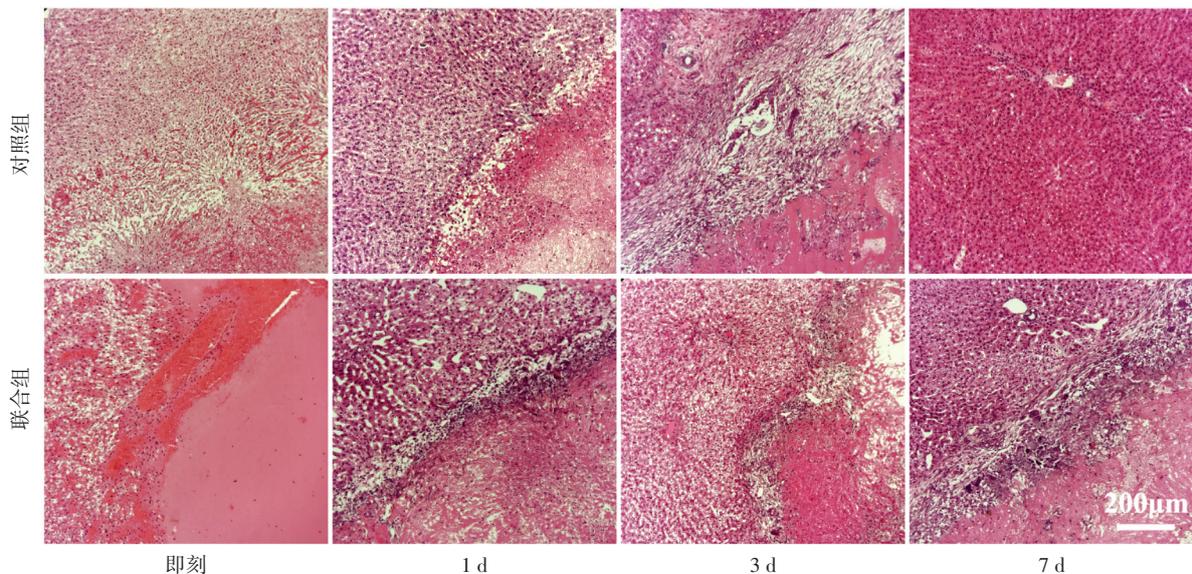


图5 对照组与联合组 HIFU 辐照后各时间点肝组织病理图(HE 染色, ×100)

讨 论

HIFU是一种安全、有效、无创的肝肿瘤消融疗法,其辐照过程中产生的超声高回声和RMS变化与其引起的空化效应密切相关^[6-7]。肝组织血供丰富,消融时产生的能量易被血流阻挡或随传播深度增加发生声衰减,以及因靶区密度不均匀而不易沉积等^[8],严重影响了HIFU的消融效果。因此,降低声阻抗,改善组织声环境,使超声能量有效沉积于靶区,是目前HIFU研究的热点。

氟碳液滴常温下为液态,当温度升高或超声辐照时在体内相变为微泡,可以改变组织的声学特性,增强能量沉积,从而增强HIFU的消融效果^[9]。He等^[10]采用载全氟己烷的富勒烯纳米球增效HIFU治疗离体牛肝时发现,与单纯HIFU组比较,纳米球组凝固性坏死体积增大了约1.2倍,差异有统计学意义($P<0.05$)。丁晓亚等^[11]将离体牛肝分为不同浓度包覆PFPE的介孔氧化硅微球组,使用HIFU辐照后发现随着微球浓度增高,凝固性坏死体积也随之增加。表明氟碳液滴对HIFU有增效作用,但并未进一步在动物体内进行验证并探讨其增效机制。

本实验采用薄膜水化法成功制备L-PFP,然后联合HIFU辐照兔肝。结果表明辐照后对照组和联合组灰度变化值分别为 45.60 ± 4.07 和 88.00 ± 7.21 ,累积瞬态空化剂量分别为 0.11 ± 0.01 和 0.69 ± 0.07 ,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。表明L-PFP联合HIFU可以引起更强烈的空化泡群,空化效应显著增强。两组辐照后1d ALT和AST均较术前显著增高且随时间降低,联合组辐照后1d、3d、7d ALT和AST均明显高于对照组(均 $P<0.05$),对照组辐照前与辐照后7d比较差异无统计学意义,说明对照组辐照后7d时消融灶损伤修复完全或损伤不明显,表明两组均产生肝组织损伤和修复,L-PFP提高了HIFU对肝组织的损伤效果。本研究大体标本及病理检查显示,联合组较对照组造成消融区域的肝细胞损伤和肝淤血现象更严重;随着时间推移,两组均出现充血水肿,并在消融灶周围形成肉芽组织,纤维组织增生,消融灶缩小。无论是解剖坏死范围还是损伤修复时间,联合组均明显大

于对照组,证明L-PFP在动物体内对HIFU消融肝组织有增效作用。

综上所述,L-PFP联合HIFU消融时,空化效应显著增强,对肝脏的消融效果明显提高,消融灶修复时间延长,为探讨氟碳液滴增效HIFU在临床上的应用提供了实验依据。但本实验仅探讨了氟碳液滴对HIFU消融正常兔肝的空化活动及病理变化,其对热效应及肝肿瘤模型的影响仍需今后进一步研究。

参考文献

- [1] Wang Y, Wang Z, Xu Y. Efficacy, efficiency, and safety of magnetic resonance-guided high-intensity focused ultrasound for ablation of uterine fibroids: comparison with ultrasound-guided method [J]. Korean J Radiol, 2018, 19(4): 724-732.
- [2] 鲁仁财, 赵卫. 超声微泡对比剂增强高强度聚焦超声治疗作用研究进展[J]. 介入放射学杂志, 2016, 25(12): 1114-1118.
- [3] 余倩, 高乙惠, 许萍萍, 等. 高强度聚焦超声联合全氟戊烷液滴在乳腺癌治疗增效中的实验研究[J]. 声学技术, 2020, 39(2): 195-199.
- [4] Fan P, Jie Y, Yang X, et al. Impact of cavitation on lesion formation induced by high intensity focused ultrasound [J]. Chin Phys B, 2017, 26(5): 239-246.
- [5] 易良波. 不同增效剂增强HIFU在蛋清体模中的损伤及其机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.
- [6] 许欢. 基于信号处理的声空化监控及组织异常信号检测[D]. 南京: 南京大学, 2018.
- [7] 陈楚怡, 于洁, 陈功, 等. B模式实时成像定量监控超声空化时空行为的研究[J]. 声学学报, 2015, 40(4): 563-568.
- [8] Izadifar Z, Izadifar Z, Chapman D, et al. An introduction to high intensity focused ultrasound: systematic review on principles, devices, and clinical applications [J]. J Clin Med, 2020, 9(2): 460.
- [9] Qian X, Han X, Chen Y. Insights into the unique functionality of inorganic micro/nanoparticles for versatile ultrasound theranostics [J]. Biomaterials, 2017, 142(10): 13-30.
- [10] He K, Ran H, Su Z, et al. Perfluorohexane-encapsulated fullerene nanospheres for dual-modality US/CT imaging and synergistic high-intensity focused ultrasound ablation [J]. Int J Nanomedicine, 2019, 11(1): 519-529.
- [11] 丁晓亚, 邹建中, 王琦, 等. 包覆全氟戊烷的介孔氧化硅微球增效高强度聚焦超声表面消融离体牛肝[J]. 中国介入影像与治疗学, 2017, 14(7): 439-443.

(收稿日期: 2021-11-20)