

· 实验研究 ·

聚焦超声增强聚桂醇消融正常兔肝的实验研究

杨 君 丁彦军 乔 伟 刘 政 李泞珊

摘 要 **目的** 探讨聚焦超声同步辐照对聚桂醇消融正常兔肝的增效作用。**方法** 将健康新西兰大白兔26只随机分为聚焦超声组(6只)、聚桂醇组(10只)及聚焦超声+聚桂醇组(10只),分别给予聚焦超声辐照、聚桂醇及聚桂醇联合聚焦超声同步辐照处理。聚焦超声焦点的平均声强 30.0 W/cm^2 ,工作占空比50%。48 h后观察处理区形态学及超声造影表现,测量血流灌注缺损区最大径。采用量筒法测定消融体积;消融灶HE染色后镜下观察病理改变。比较聚桂醇组与聚焦超声+聚桂醇组肝脏灌注缺损区最大径及消融体积。**结果** 聚焦超声组实验兔肝处理区未产生消融灶,消融体积为零。聚桂醇组与聚焦超声+聚桂醇组可见相似的黄白色消融灶,两组实验兔肝超声造影灌注缺损区平均最大径分别为 $(0.73\pm 0.15)\text{ mm}$ 、 $(0.91\pm 0.16)\text{ mm}$,差异有统计学意义($Z=-2.077, P=0.038$);两组平均消融体积分别为 $(0.19\pm 0.06)\text{ ml}$ 、 $(0.47\pm 0.20)\text{ ml}$,差异有统计学意义($Z=-3.182, P=0.001$),聚焦超声+聚桂醇组平均消融体积约为聚桂醇组的2.5倍。两组消融灶HE染色均表现为典型的肝细胞坏死性改变。**结论** 聚焦超声同步辐照可增强聚桂醇对正常兔肝的消融作用。

关键词 聚焦超声;聚桂醇;消融;肝脏;兔

[中图分类号]R454.3;R-332

[文献标识码]A

Synergistic effects of focused ultrasound enhanced lauromacrogol in ablation of rabbit liver: an experimental study

YANG Jun, DING Yanjun, QIAO Wei, LIU Zheng, LI Ningshan

Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China

ABSTRACT **Objective** To investigate the synergistic effects of focused ultrasound (FUS) on normal rabbit liver ablation with lauromacrogol (LAU). **Methods** Twenty-six healthy New Zealand rabbits were randomized into 3 groups: FUS group ($n=6$), LAU group ($n=10$), FUS+LAU group ($n=10$), which were given FUS exposure, lauromacrogol injection and lauromacrogol injection combined with synchronous FUS exposure, respectively. The spatial peak time average intensity of FUS focus was 30.0 W/cm^2 , with a duty cycle of 50%. After 48 h, the morphology and contrast-enhanced ultrasound were observed and the maximum diameter of the perfusion defect was measured. The volume of ablation was measured by the cylinder method, while the pathologic changes were observed through HE staining. The difference of the maximum diameter as well as ablation volume were compared between LAU group and FUS+LAU group. **Results** Liver ablation was not found in FUS group, while that was found in both LAU group and FUS+LAU group with similar performance. The average maximum diameter in LAU group and FUS+LAU group were $(0.73\pm 0.15)\text{ mm}$ and $(0.91\pm 0.16)\text{ mm}$, respectively, which showed significant difference ($Z=-2.077, P=0.038$). The average ablation volume were $(0.19\pm 0.06)\text{ ml}$ and $(0.47\pm 0.20)\text{ ml}$, respectively, which showed significant difference ($Z=-3.182, P=0.001$). The average ablation volume of FUS+LAU group was about 2.5 times that of LAU group. Hepatocyte necrosis was typical in both groups. **Conclusion** Synchronous application of focused ultrasound and lauromacrogol can enhanced the ablation effect on rabbit liver.

KEY WORDS Focused ultrasound; Lauromacrogol; Ablation; Liver; Rabbit

超声引导下无水乙醇注射消融治疗肝癌在临床应用广泛。然而无水乙醇消融易引起肝区剧烈疼痛,

注射量过多还可能造成肾功能异常等不良反应。研究^[1-3]发现,医用聚桂醇对肝癌具有一定的消融能力,

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFC0107300)

作者单位:400037 重庆市,陆军军医大学第二附属医院超声科(杨君、乔伟、刘政、李泞珊);宁夏回族自治区人民医院超声科(丁彦军)

通讯作者:李泞珊, Email: lins33@yeah.net

有明显杀伤肝癌细胞的作用,能抑制肝癌细胞增殖及迁移,消融效果明确,且疼痛等不良反应较少,耐受性较高。聚焦超声辐照能显著增强无水乙醇对肝癌的消融效果^[4],产生协同作用;聚焦超声对聚桂醇消融是否也具有类似的增强作用,尚缺乏相关研究报道。本实验采用聚焦超声联合聚桂醇同步实时注射的方法消融正常兔肝,旨在探索聚焦超声辐照对聚桂醇消融肝脏有无增效作用,为促进聚桂醇在肝脏肿瘤消融治疗中的应用提供依据。

材料与方法

一、实验动物

选取健康新西兰大白兔 26 只,体质量 2.2~2.9 kg,平均 (2.5 ± 0.3) kg,由陆军军医大学第二附属医院实验动物中心提供。实验动物喂养、处死方法均通过我院实验动物伦理审查委员会审核批准。

二、仪器与试剂

聚焦超声辐照使用华西 CZ180A 聚焦超声治疗仪,换能器采用导声罩方式聚焦,工作频率标称值为 1.7 MHz,实测值与标称值偏差不超过 $\pm 15\%$;仪器超声输出功率:低档 $6.5\text{ W}\pm 20\%$,高档 $12.5\text{ W}\pm 20\%$,对应的空间峰值时间平均声强为低档 $13.0\text{ W}/\text{cm}^2\pm 20\%$,高档 $30.0\text{ W}/\text{cm}^2\pm 20\%$;占空比为 50%。超声检查使用飞依诺 Vinno 70 彩色多普勒超声诊断仪, X9L 线阵探头,频率 5~9 MHz;配有能量多普勒及超声造影模式。造影剂使用“脂氟显”脂质微泡(陆军军医大学第二附属医院超声科自制),核心气体为全氟丙烷,平均粒径 $2\text{ }\mu\text{m}$,其中 98% $< 8\text{ }\mu\text{m}$,微泡浓度约 $(6\sim 9)\times 10^9/\text{ml}$ 。聚桂醇注射液(10 ml:100 mg,陕西天宇制药公司)。

三、实验分组及方法

将 26 只健康大白兔随机分成 3 组:聚焦超声组(6 只)、聚桂醇组(10 只)及聚焦超声+聚桂醇组(10 只)。给予各组实验兔速眠新 II 注射液 0.2 ml 臀部肌注,待肌肉松弛后,经耳缘静脉建立静脉通道,予 2% 戊巴比妥钠(0.2 ml/kg)静脉注射麻醉。将实验兔仰卧固定于实验台上,备皮消毒后手术开腹游离肝脏,轻柔牵引肝中叶及肝右叶至腹腔外,无菌生理盐水纱布包裹固定。选择实验兔肝中叶较厚处,经能量多普勒观察微血管较少的区域作为处理区。聚焦超声组仅给予时长 20 s 的聚焦超声辐照处理;聚桂醇组在超声引导下将 0.2 ml 聚桂醇注射液匀速注入处理区进行消融,注射时间为 20 s;聚焦超声+聚桂醇组首先在超声引导下将注射器针尖穿刺至处理区,然后在匀速推注聚桂醇注

射液进行消融的同时给予高档位聚焦超声($30.0\text{ W}/\text{cm}^2$)辐照,推注及辐照时间均为 20 s。实验过程中应确保聚焦超声治疗仪探头经耦合剂与肝脏表面充分贴合但不压迫。操作结束后,将实验兔肝脏还纳入腹腔,逐层缝合腹壁,肌内注射青霉素 40 万 U 预防感染。

四、超声造影检查

实验兔送回动物中心继续喂养,48 h 后行超声造影检查,具体方法:麻醉实验兔,仰卧固定,沿手术切口拆线,牵引出肝中叶及右叶,无菌生理盐水纱布包裹固定;经耳缘静脉团注入“脂氟显”造影剂 0.1 ml,随后推注 2.0 ml 生理盐水冲管,超声造影观察肝脏处理区表现,测量造影灌注缺损区最大径。

五、病理检查

造影结束后,于耳缘静脉注入过量 2% 戊巴比妥钠处死实验兔,切取肝中叶,肉眼观察各组处理区的形态学变化。每组分别取 1 只实验兔肝脏处理区,经甲醛固定后制作石蜡切片,行 HE 染色,光学显微镜观察处理区病理改变。其余实验兔肝脏取出后,剔除消融灶以外的正常肝实质,单独分离出消融灶组织,采用量筒排液法测定消融体积。

六、统计学处理

应用 SPSS 24.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,聚桂醇组与聚焦超声+聚桂醇组实验兔肝超声造影灌注缺损区最大径及消融体积比较行 Wilcoxon 秩和检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、各组实验兔肝脏形态学及超声造影表现

聚焦超声组肝脏形态学观察未发现明确消融灶,其超声造影各期均未出现异常低灌注;聚桂醇组和聚焦超声+聚桂醇组肝脏形态学观察均可在处理区见到相似的黄白色消融灶,形态基本规则,与周边正常肝组织分界清楚,部分处理区可见散在的卫星灶;超声造影后消融灶内持续无造影剂进入,表现为边界清晰的血流灌注缺损区。见图 1。

二、各组实验兔肝超声造影灌注缺损区最大径及消融体积比较

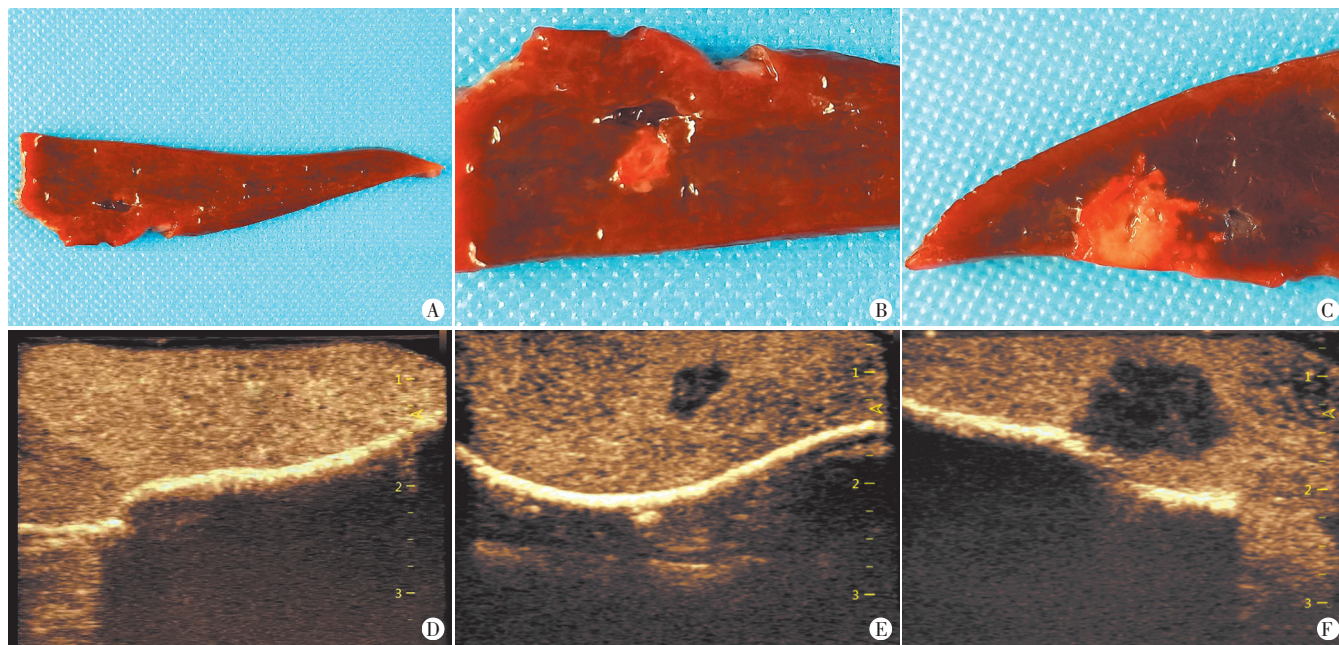
聚焦超声组实验兔肝处理区未形成消融灶,超声造影无灌注缺损,故灌注缺损最大径和消融体积均为零。聚桂醇组与聚焦超声+聚桂醇组实验兔肝超声造影灌注缺损区平均最大径分别为 $(0.73\pm 0.15)\text{ mm}$ 、 $(0.91\pm 0.16)\text{ mm}$;平均消融体积分别为 $(0.19\pm 0.06)\text{ ml}$ 、 $(0.47\pm 0.20)\text{ ml}$,两组比较差异均有统计学意义

($Z=-2.077, 3.182, P=0.038, 0.001$)。聚焦超声+聚桂醇组平均消融体积约为聚桂醇组的2.5倍。

三、病理检查结果

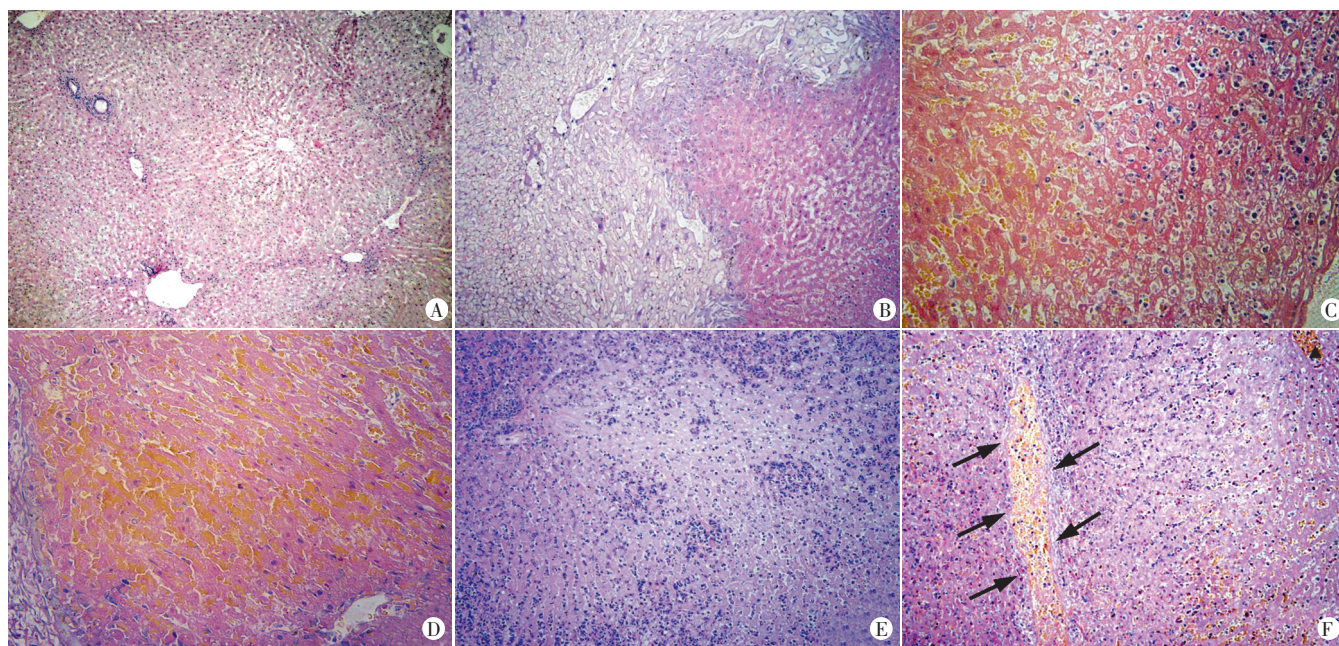
光镜下观察,聚焦超声组实验兔肝处理区 HE 染色未出现典型细胞坏死改变,肝小叶结构完整,小叶中央静脉、肝血窦及汇管区未见异常改变(图 2A)。聚

桂醇组及聚焦超声+聚桂醇组实验兔肝病理改变相似,消融区与正常肝组织分界清楚,肝小叶结构破坏,肝细胞呈凝固性坏死,细胞结构消失,细胞核溶解,细胞质呈嗜酸性改变,局部可见大量炎性细胞浸润,肝血窦、中央静脉及小叶间静脉内大量红细胞堆积、坏死(图 2B~F)。



A、D:聚焦超声组实验兔肝形态学及超声造影对照图,未发现明显消融灶,消融体积为零;B、E:聚桂醇组实验兔肝形态学及超声造影对照图,平均消融体积(0.19 ± 0.06)ml,平均最大径(0.73 ± 0.15)mm;C、F:聚焦超声+聚桂醇组实验兔肝形态学改变及超声造影对照图,平均消融体积(0.47 ± 0.20)ml,平均最大径(0.91 ± 0.16)mm

图1 三组实验兔肝同一部位各处理区内肉眼观与超声造影图



A:聚焦超声组肝小叶结构完整,中央静脉、肝血窦及汇管区形态结构正常($\times 50$);B:聚桂醇组消融区肝小叶结构破坏,与正常肝组织分界清晰($\times 100$);C、D:聚桂醇组及聚焦超声+聚桂醇组消融区内肝细胞呈凝固性坏死,肝血窦内大量红细胞堆积($\times 200$);E:聚焦超声+聚桂醇组消融区大量炎性细胞浸润($\times 100$);F:聚焦超声+聚桂醇组中央静脉和门管区小叶间静脉内大量红细胞堆积、坏死($\times 100$)

图2 三组实验兔肝脏处理区组织病理图(HE染色)

讨 论

聚桂醇被广泛应用于静脉曲张、单纯性囊肿等的硬化治疗^[5-6],以及部分实体肿瘤的消融治疗^[7-8],其疗效确切,较无水乙醇更安全,疼痛等不良反应更少,耐受性更高。聚桂醇在体外对肝癌细胞有杀伤作用,能够抑制肝癌细胞增殖及迁移,并影响血管内皮生长因子表达调控。尹明等^[9]在超声引导下对肝癌裸鼠模型瘤体内分别注入聚桂醇和无水乙醇进行消融,结果表明聚桂醇与无水乙醇有相似的杀伤肝癌细胞、抑制肝癌生长的作用,证明聚桂醇具有治疗肝癌的潜力。有研究^[10]对聚桂醇消融兔肝组织进行了初步探索发现,聚桂醇可使肝细胞变性、坏死、空泡样变,肝窦及血管内红细胞聚集,以及坏死灶边缘大量炎细胞浸润,与本实验中兔肝病理改变基本一致。相较于无水乙醇,聚桂醇黏度更高,组织间隙弥散程度低,故需要更大剂量才能达到同等消融效果。

本课题组前期研究^[11-12]发现,脉冲式聚焦超声同步激励无水乙醇作用于兔肝,其产生的坏死灶较单独使用无水乙醇作用范围更大,这是因为聚焦超声激励产生的空化效应和热效应使乙醇汽化成微气泡,成为有效的空化核,进而又发生超声空化效应,从而倍增了乙醇对肝脏的消融体积。聚焦超声与无水乙醇同时作用于肝癌细胞时,表现为肝组织温度升高,消融灶增大,肝癌细胞存活率降低^[4]。在另一项研究^[13]中,聚焦超声联合瘤内注射无水乙醇可缩短治疗时间,减少乙醇消融剂量,由此说明聚焦超声与化学消融剂存在协同作用。但以往研究^[4,13]更多地关注在聚焦超声与无水乙醇的协同效应方面,聚焦超声对聚桂醇的协同增效作用鲜见报道。在本实验中,聚焦超声+聚桂醇组实验兔肝形成的消融坏死灶,从形态学、超声造影表现及病理改变上比较,与单用聚桂醇消融非常相似,但前者的消融范围明显大于后者,平均消融体积约为后者的 2.5 倍。已有研究^[14]证实聚焦超声能对肝脏产生物理消融作用;但本实验中聚焦超声组处理区未形成消融灶,排除了聚焦超声与聚桂醇共同作用时物理消融的影响,表明消融灶主要是聚桂醇化学消融的结果,聚焦超声在此过程中可能仅为协同增效作用。由此推测,产生这种协同效应的机制类似无水乙醇,聚焦超声的空化效应和热效应使聚桂醇汽化成微气泡,在聚焦超声作用下再次发生空化效应,产生增效消融的作用。同时还认为,聚焦超声同步辐照产生的空化效应和机械效应可能促进了聚桂醇在局部肝组织的弥散渗透,从而扩大了消融范围,增强了化学消融效果。

在本实验中,聚焦超声同步辐照虽然对聚桂醇产生

了消融增效,但肝脏消融体积仅增大了 2.5 倍,未达到使用无水乙醇时消融体积明显倍增的效应(约 4~5 倍)。分析原因可能与聚桂醇的化学性质有关,液体的黏度越高,超声空化发生的阈值也会增高,因此聚焦超声激励聚桂醇的空化强度可能不及无水乙醇强烈,局部汽化聚集、空化渗透弥散等效应也可能不如无水乙醇。

综上所述,聚焦超声对聚桂醇消融正常兔肝存在协同增强作用,但本实验超声参数较单一,且消融增强效果尚不能满足临床需要;今后将进一步探索聚焦超声增强聚桂醇消融的适宜功率、声压、频率、占空比、时间等相关参数,以加大增效作用,促进聚桂醇在肝癌消融临床治疗中的应用。

参考文献

- [1] 刘青,李昭辉,巴亚斯,等.聚桂醇在体外对肝癌细胞的杀伤作用[J].中华实验外科杂志,2011,28(10):1652.
- [2] 胡中倩,张炽敏,李嘉,等.聚桂醇对人肝癌 HepG2 细胞增殖及迁移影响的体外研究[J].安徽医科大学学报,2013,48(7):772-775.
- [3] 宋丽秀,尚国臣,陈卫刚.聚桂醇注射液与无水乙醇超声引导下治疗肝血管瘤疗效比较[J].介入放射学杂志,2017,26(10):886-888.
- [4] Hoang NH, Murad HY, Ratnayaka SH, et al. Synergistic ablation of liver tissue and liver cancer cells with high-intensity focused ultrasound and ethanol [J]. Ultrasound Med Biol, 2014, 40(8): 1869-1881.
- [5] Xue J, Geng X. Curative effect of lauromacrogol and absolute ethyl alcohol injection guided by ultrasound on simplex hepatic cyst [J]. Pak J Pharm Sci, 2015, 28(2 Suppl): 697-700.
- [6] 贾琪,吴丹明,王成刚,等.彩超引导下聚桂醇泡沫硬化剂注射治疗下肢静脉曲张[J].中国微创外科杂志,2016,16(3):276-278.
- [7] Qin S, Liu Y, Ning H, et al. EUS-guided lauromacrogol ablation of insulinomas: a novel treatment [J]. Scand J Gastroenterol, 2018, 53(5): 616-620.
- [8] Liang B, Xie YG, Xu XP, et al. Diagnosis and treatment of submucous myoma of the uterus with interventional ultrasound [J]. Oncol Lett, 2018, 15(5): 6189-6194.
- [9] 尹明,王中阳,肖蔚.超声引导肝癌裸鼠模型瘤体内注入聚桂醇实验研究[J].介入放射学杂志,2016,25(6):530-533.
- [10] 徐瑞芳.聚桂醇对家兔胆囊壁及肝脏组织作用初步探索[D].天津:南开大学,2013.
- [11] Liu Q, Zhao H, Wu S, et al. Impact of microbubble-enhanced ultrasound on liver ethanol ablation [J]. Ultrasound Med Biol, 2013, 39(6): 1039-1046.
- [12] 益磋,王亚辉,陈重,等.超声空化促进乙醇消融兔肝脏的实验研究[J].中华医学超声杂志(电子版),2017,14(12):948-954.
- [13] Yang Z, Zhang Y, Zhang R, et al. A case-control study of high-intensity focused ultrasound combined with sonographically guided intratumoral ethanol injection in the treatment of uterine fibroids [J]. J Ultrasound Med, 2014, 33(4): 657-665.
- [14] 税莲,何敏,刘映江,等.高强度聚焦超声消融兔腹主动脉旁肝肿瘤的安全性和有效性[J].中国肿瘤临床,2014,41(23):1517-1520.

(收稿日期:2019-05-05)