

## · 基础研究 ·

# 高强度超声对宫颈癌小鼠再次接种同种肿瘤的抑制作用

孔凡斌 宁燕 王智彪 伍烽 白晋 赵颉 丰有吉

**【摘要】目的** 探讨高强度超声(HIU)治疗对宫颈癌小鼠再次接种同种肿瘤的抑制作用。方法 72只接种成功的U14宫颈癌小鼠随机分为HIU组、手术组和对照组,每组24只,于接种肿瘤后第7天分别接受HIU治疗、手术治疗及HIU假治疗;于接种肿瘤后第17天,每组小鼠再随机分为3组,分别再次接种 $2 \times 10^6$ (n=8), $2 \times 10^7$ (n=8)或0(n=8)个U14肿瘤细胞,记录各组小鼠的无癌存活数。结果 HIU组、手术组和对照组再次接种 $2 \times 10^6$ 个U14肿瘤细胞,其无癌存活率分别为100.0%,75.0%和0.0%,3组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );接种 $2 \times 10^7$ 个U14肿瘤细胞时,无癌存活率分别为87.5%,25.0%和0.0%,3组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );未行第2次肿瘤接种的小鼠无癌存活率,HIU组(100%)、手术组(100%)均较对照组(0%)差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 HIU治疗小鼠宫颈癌是有效的,HIU较手术治愈的小鼠对同种肿瘤有更强的抑癌作用,这可能是由于HIU杀死的肿瘤细胞起到了“HIU原位固化瘤疫苗”作用。

**【关键词】** 高强度超声; 宫颈癌; 局部治疗; 鼠

**The inhibitive effects of high intensity ultrasound on the second inoculation of the same tumor cells strain in mice with U14 cervical cancer** KONG Fan-bin\*, NING Yan, WANG Zhi-biao, WU Feng, BAI Jin, ZHAO Jie, FENG You-ji. \* Gynecology & Obstetrics Hospital of Fudan University, Shanghai 200011, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the inhibitive effects of high intensity ultrasound (HIU) on the second inoculation of the same strain tumor cells in mice with U14 cervical cancer. **Methods** Seventy-two mice with U14 cervical cancer were divided into three groups: a HIU group (group A, n = 24), an operation group (group B, n = 24) and a sham-HIU group (group C, n = 24), and treated with HIU ( $50 \text{ Watt}/\text{cm}^2$ ), operation and HIU ( $0 \text{ Watt}/\text{cm}^2$ ) 7 d after inoculation, respectively. The mice in each group were divided into three sub-groups (n = 8) and re-inoculated with  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^7$  or 0 U14 cancer cells at 17 d after first inoculation, and then the rate of survival mice without tumor (RSWT) in every group was recorded at 150 d after second inoculation. **Results** RSWTs in group A, group B and group C were 100.0%, 75.0% and 0.0% after re-inoculation of  $2 \times 10^6$  U14 cancer cell, 87.5%, 25.0% and 0.0% after re-inoculation of  $2 \times 10^7$  cells, and 100%, 100% and 0% without re-inoculation, respectively. **Conclusion** It was effective for HIU to treat cervical cancer in mice, furthermore the effects of HIU, playing a role as "HIU solidified tumor vaccine", on the second inoculation in mice with U14 cervical cancer might be more valuable than those of operation.

**【Key words】** High intensity ultrasound; Cervical cancer; Local treatment; Rat

高强度超声(high intensity ultrasound, HIU)是一种肿瘤局部治疗新技术,它主要是利用超声波良好的组织穿透性和方向性,通过其瞬态高温效应和空化效应等破坏肿瘤细胞,HIU对前列腺癌、肝癌、乳腺癌等多种实体肿瘤有较好的治疗作用<sup>[1-3]</sup>。一些研究提示,HIU可能增强荷瘤机体的免疫功能<sup>[4-6]</sup>。宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一,其治疗后的复发及转移率相当高,患者的免疫功能低下是其复发转移率高的重要原因<sup>[7]</sup>。本研究目的在于观察HIU治疗小鼠宫颈

癌对再次接种同种肿瘤的抑制作用。

## 材料与方法

### 一、HIU治疗仪

重庆产动物实验专用型,由功率发生源、治疗探头、循环水降温系统三部分组成。治疗探头发出的声波为高强度超声波,平均声强 $50 \text{ W}/\text{cm}^2$ ,探头直径为5 mm,频率5.0 MHz。医务人员手持探头对靶区进行治疗。治疗所使用的超声声强已经过检测<sup>[7]</sup>。

### 二、小鼠U14宫颈癌皮下移植模型的制作

实验动物为重庆医科大学实验动物中心提供的72只雌性BALB/c小鼠,6~8周龄,体重18~22 g。U14肿瘤细胞株(由四川抗生素研究所引进)为宫颈

基金项目:国家重点科技项目计划资助(No. 96-905-02-01)

作者单位:200011 上海市,复旦大学上海医学院妇产科学系、附属妇产科医院(孔凡斌、宁燕、丰有吉);重庆医科大学医学超声工程研究所(王智彪、伍烽、白晋、赵颉)

未分化鳞状癌细胞<sup>[8]</sup>。实验时,无菌操作,抽取腹腔内接种 U14 宫颈癌 1 周的 BALB/c 小鼠的腹水,显微镜下计数 U14 细胞数,经台盼蓝染色法检测癌细胞成活率大于 95%,用无菌生理盐水调整细胞浓度为  $1 \times 10^8$  个/ml,常规消毒后,于每只小鼠右侧背部皮下接种 U14 宫颈癌细胞  $2 \times 10^6$  个(0.02 ml),种植后 7 d,局部可形成一直径 0.7~1.0 cm 的肿块,72 只 BALB/c 小鼠全部接种成功。

### 三、实验分组与设计

将接种成功的 72 只荷瘤 BALB/c 小鼠随机分为 3 组,每组 24 只。

HIU 组:于接种肿瘤后 7 d,接受 1 次 HIU 治疗,HIU 治疗后 10 d,再随机分为 3 组(HIU 组 1,HIU 组 2 和 HIU 组 3),HIU 组 1 于其左侧背部接种 U14 宫颈癌细胞  $2 \times 10^6$  个/只( $n=8$ ),HIU 组 2 于其左侧背部接种 U14  $2 \times 10^7$  个/只( $n=8$ ),HIU 组 3 接种同等量生理盐水( $n=8$ )。

手术组:于接种肿瘤后 7 d,手术切除肿瘤,其切除范围同 HIU 组,手术治疗后 10 d,再随机分为 3 组(手术组 1,手术组 2 和手术组 3),手术组 1 于其左侧背部接种 U14 宫颈癌细胞  $2 \times 10^6$  个/只( $n=8$ ),手术组 2 于其左侧背部接种 U14  $2 \times 10^7$  个/只( $n=8$ ),手术组 3 接种同等量生理盐水( $n=8$ )。

对照组:按 HIU 组方法行 1 次 HIU 假治疗,HIU 治疗机处关闭状态。假治疗后 10 d,再随机分为 3 组(对照组 1,对照组 2 和对照组 3),对照组 1 于其左侧背部接种宫颈癌细胞  $2 \times 10^6$  个/只,对照组 2 于其左侧背部接种 U14 宫颈癌细胞  $2 \times 10^7$  个/只,对照组 3 接种同等量生理盐水( $n=8$ )。

### 四、HIU 及手术治疗

剪除肿瘤部位表面及其周围的毛发,腹腔内注射 3% 戊巴比妥钠 0.08 ml,将鼠俯卧固定于手术台上,常规消毒、铺巾,切开皮肤,直视下,手持超声治疗探头直接辐射肿瘤及其周围 2 mm 组织。每次辐射 10 s,间隔 100 s,相邻两次辐射重叠 1/5。在 HIU 辐射治疗过程中,于预辐射肿瘤对侧插入热敏探针,周边正常组织插入对照热敏探针,插入深度 1 mm。热敏探针测得的温度变化,经电脑显示并记录,每次辐射 10 s,可控制靶区最高温度为 60~70℃,间隔 100 s,靶区温度降至基础体温。治疗完毕,将 HIU 治疗的肿瘤原位埋植于皮下,每只小鼠平均治疗时间为 100 s。手术治疗及 HIU 假治疗,其术前及术后处理同 HIU 组,手术切除肿瘤及其周围 2 mm 组织;HIU 假治疗时,整个过程不开功率源。

### 五、资料收集

对每只死亡的小鼠皆行尸检,查明死亡原因;存活超过 150 d 者,处死并尸检,切下靶区组织及双肺,置

于 10% 甲醛中固定,常规石蜡包埋、切片,HE 染色,作光镜检查。尸检未发现肿瘤者定为无癌生存,记录各组无癌生存数。

每天观测 1 次 HIU 组、手术组及对照组小鼠再接种癌灶的生长情况,记录各组小鼠的发癌数(肿瘤直径达 5 mm 定为发癌)。

### 六、统计学分析

应用四格表精确概率计算法进行统计学分析, $P < 0.05$  示差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、接种于 BALB/c 小鼠的 U14 宫颈鳞癌生长情况

接种 U14 宫颈鳞癌后的第 7 天,92 只小鼠右侧背部皆生长出直径约 0.7~1.0 cm 之瘤块,成瘤率为 100%,肿瘤生长曲线如图 1 示。对照组留作观察的 8 只小鼠从第 30 天开始死亡,最长存活时间为 60 d,中间存活时间为 42 d。

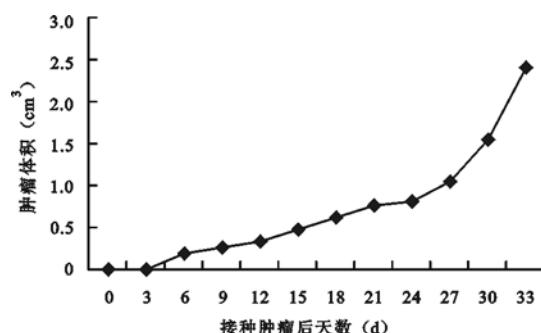


图 1 肿瘤生长曲线

### 二、再接种肿瘤后各组发癌率及无癌生存率

HIU 组 1,HIU 组 2 皆有 3 只发癌鼠的肿瘤灶于二次接种 2 周后肿瘤缩小、结痂、脱落;手术组 1 有 1 只发癌小鼠的肿瘤灶于二次接种 2 周后结痂、脱落。各组小鼠发癌率及无癌率见表 1,2。

表 1 再接种肿瘤后 7 d 各组小鼠发癌情况

组 别	接种 $2 \times 10^6$ 个肿瘤细胞			接种 $2 \times 10^7$ 个肿瘤细胞		
	只数	发癌数	发癌率(%)	只数	发癌数	发癌率(%)
HIU 组	8	3	37.5 *	8	4	50.0
手术组	8	3	37.5 *	8	6	75.0
对照组	8	8	100.0	8	8	100.0

注:与对照组比较,\*  $P < 0.05$

表 2 再接种肿瘤后各 17 d 组小鼠无癌生存情况

组 别	接种 $2 \times 10^6$ 个肿瘤细胞			接种 $2 \times 10^7$ 个肿瘤细胞		
	只数	无癌存活数	无癌存活率(%)	只数	无癌存活数	无癌存活率(%)
HIU 组	8	8	100.0 *	8	7	87.5 *
手术组	8	6	75.0 *	8	2	25.0
对照组	8	0	0.0	8	0	0.0

注:与对照组比较,\*  $P < 0.05$

### 三、治愈率分析

HIU 组、手术组及对照组中,未进行二次肿瘤细胞接种的小鼠的治愈率分别是 100% (8/8), 100% (8/8) 和 0% (0/8), HIU 组、手术组治愈率较对照组明显增高 ( $P < 0.001$ )。

## 讨 论

U14 宫颈癌是由甲基胆蒽穿线埋植于皮下而诱发的异位子宫颈癌,为未分化鳞状细胞癌,该瘤株生物学性状稳定,血管合并淋巴管转移率高,完全符合自发转移瘤模型。目前已广泛用于抗肿瘤药物筛选、肿瘤免疫等领域的研究<sup>[9]</sup>。

对于 U14 宫颈癌治愈的标准尚未见报道,参照相关研究<sup>[10,11]</sup>,我们认为荷 U14 宫颈癌小鼠存活超过 150 d,且病理学证实无肿瘤复发及转移者即为治愈。

作为一种新的局部治疗手段,HIU 可使移植瘤靶区内的肿瘤完全坏死,达到治疗的目的。Prat 等<sup>[12]</sup>发现高强度聚焦超声 (high intensity focused ultrasound, HIFU) 可使兔肝 VX2 肿瘤不可逆性坏死且无毒副作用,对肿瘤细胞的分裂增殖有明显的抑制作用。HIFU 已被应用于前列腺癌、青光眼等病的治疗,重庆医科大学应用 HIFU 治疗肝癌、乳腺癌、骨肉瘤、肾癌等实体肿瘤,取得了较好的治疗效果。本研究发现,HIU 治疗 BALB/c 小鼠 U14 宫颈癌是有效的,接种肿瘤 7 d 的 U14 宫颈癌小鼠,经 HIU 治疗后,可完全治愈,与手术治疗具有相同的治疗效果。

HIU 与荷瘤机体免疫功能的关系是超声治疗学中亟待阐明的问题,Chen 等<sup>[4]</sup>发现用 HIFU 治疗兔体表 Broun-Pierce 瘤后,随原发灶愈合,转移灶也自行消退,提示超声治疗肿瘤中可能有抗癌免疫参与作用。文献报道<sup>[13]</sup>固化瘤疫苗制备的优选最佳热剂量是 65°C × 5 min,参照这一参数,本实验设计使靶区升温至 65°C ~ 70°C,以此高温的热生物效应改变癌细胞的抗原性,促进和提高宿主免疫。

HIU 和手术切除对癌细胞再接种均有一定程度的抑制作用,这提示二者皆有可能促进机体恢复正常抗肿瘤免疫能力。其原因可能是由于二者皆达到了消除肿瘤的目的,现代肿瘤免疫学研究认为,在机体内持续增殖的肿瘤,绝大多数都能产生抑制机体免疫系统的物质,肿瘤切除后,消除了免疫抑制物质的来源,使机体免疫功能在一定程度上得以恢复<sup>[14]</sup>。研究发现 HIU 组及手术组皆有再接种成瘤后又逐渐消退的现象,这可能是由于首次接种肿瘤后,刺激机体的免疫系统,产生记忆性 T、B 细胞,随着肿瘤被消除,机体免疫功能恢复,可对再次接种的肿瘤细胞进行免疫攻击,杀伤肿瘤细胞。从二次接种  $2 \times 10^7$  个/只的结果看,HIU

抑癌再生长作用比手术切除明显增强,在我们的实验过程中,HIU 组及手术组都经历了手术切开皮肤的过程,二者的不同处在于 HIU 杀死的肿瘤细胞又原位埋植于小鼠皮下。为此,我们认为: HIU 固化的瘤细胞留置于体内,有可能作为一种抗原物质通过某种机制激发机体免疫反应起到抑制肿瘤再生长的作用。在 HIFU 治疗乳癌的临床应用中,我们发现 HIFU 不会将乳癌内所有的抗原物质破坏,有的抗原可继续在靶区存在(资料未列出);另外我们还发现高强度超声治疗能增加宫颈癌 U14 小鼠的脾淋巴细胞增殖活性及其细胞毒性<sup>[15]</sup>。但对于 HIU 治疗促进机体免疫功能的机制是什么以及如何提高 HIU 治疗的免疫调节作用,尚有待进一步探讨。

U14 宫颈癌是由化学物质诱发的异位肿瘤,其与人宫颈癌有部分相同的抗原决定簇<sup>[11]</sup>,应用 HIU 制备人宫颈癌“HIU 原位固化瘤疫苗”,以防止宫颈癌的复发、转移,将是一项很有意义的工作。

## 参 考 文 献

- 1 Wu F, Wang ZB, Chen WZ, et al. Extracorporeal high intensity focused ultrasound ablation in the treatment of patients with large hepatocellular carcinoma. Ann Surg Oncol, 2004, 11:1061-1069.
- 2 Kennedy JE, ter Haar GR, Wu F, et al. Contrast-enhanced ultrasound assessment of tissue response to high-intensity focused ultrasound. Ultrasound Med Biol, 2004, 30:851-854.
- 3 Uchida T, Sanghvi NT, Gardner TA, et al. Transrectal high-intensity focused ultrasound for treatment of patients with stage T1b-2N0M0 localized prostate cancer: a preliminary report. Urology, 2002, 59:394-399.
- 4 Chen L, Rivens I, ter Haar G, et al. Histological changes in rat liver tumours treated with high-intensity focused ultrasound. Ultrasound Med Biol, 1993, 19:67-74.
- 5 Rosberger DF, Coleman DJ, Silverman R, et al. Immunomodulation in choroidal melanoma: reversal of inverted CD4/CD8 ratios following treatment with ultrasonic hyperthermia. Biotechnol Ther, 1994, 5:59-68.
- 6 Wu F, Wang ZB, Lu P, et al. Activated anti-tumor immunity in cancer patients after high intensity focused ultrasound ablation. Ultrasound Med Biol, 2004, 30:1217-1222.
- 7 王智彪,王芷龙,张哲,等. 高强度聚焦超声致香猪胚胎急性不可逆损伤的电生理和形态学研究. 重庆医科大学学报校庆特刊, 1996, 21:59-62.
- 8 薛克勋,高岩,高进. 小鼠宫颈癌 U14 移植到近交系小鼠后生长特性和转移规律的研究. 中华病理学杂志, 1987, 16:140.
- 9 陶光实,邹红卫,胡锦跃. 共刺激分子 B7 基因诱导小鼠抗宫颈癌主动免疫的研究. 中华妇产科杂志, 2001, 36:111-114.
- 10 Chapelon JY, Margonari J, Vernier F, et al. In vivo effects of high intensity ultrasound on prostatic adenocarcinoma Dunning R3327. Cancer Res, 1992, 52:6353-6357.
- 11 孔凡斌,伍峰,白晋,等. 高强度超声治疗早期兔肝脏肿瘤. 中华实验外科杂志, 2001, 18:45-46.
- 12 Prat F, Centarti C, Sibille A, et al. Extracorporeal high-intensity fo-

- cused ultrasound for VX2 liver tumors in the rabbit. Hepatology, 1995, 21:832-836.
- 13 黄皎琳, 许明贵, 黄海, 等. 自体癌固化瘤苗的研究. 中华肿瘤杂志, 1994, 16:337.
- 14 Morton DL. Changing concepts of cancer surgery: surgery as immunotherapy. Am J Surg, 1978, 135:367-371.
- 15 孔凡斌, 宁燕, 王智彪, 等. 高强度超声治疗对宫颈癌 U14 小鼠的脾淋巴细胞增殖及细胞毒性的影响. 中国超声医学杂志, 2005, 21: 17-21.

(修回日期: 2005-07-27)

(本文编辑: 熊芝兰)

## · 短篇论著 ·

### 屈指肌腱损伤修复后的系统康复治疗

侯燕 俞瑾 张兰 陆廷仁

屈指肌腱损伤是手外科常见损伤, 经过肌腱修复手术之后常因肌腱粘连而致手功能障碍, 影响患者的正常生活。于术后早期行系统、个性化的康复治疗是患者手功能恢复的关键。为此, 我们于 1999 年 11 月至 2003 年 5 月间, 对 58 例屈指肌腱损伤修复术后患者进行系统的康复治疗, 取得了满意效果, 现报道如下。

#### 一、资料与方法

##### (一) 一般资料

58 例患者均采用改良的 Kessler 法缝合屈指肌腱, 其中男 37 例, 女 21 例; 年龄 15~58 岁, 平均  $(30.5 \pm 16.7)$  岁; 右手损伤 39 例, 左手损伤 19 例; 单指损伤 21 例, 损伤 2 指以上 37 例; 致伤原因为电锯伤 14 例, 切割伤 38 例, 挤压伤 6 例; 肌腱损伤部位位于 I 区 4 例, II 区 15 例, III 区 11 例, IV 区 16 例, V 区 12 例; 合并正中神经损伤 6 例, 尺神经损伤 4 例, 指神经损伤 11 例。康复介入时间平均为术后 3d, 康复治疗由同一组治疗师完成, 疗效评定由康复医师和治疗师共同完成。

##### (二) 康复治疗方法

1. 术后 1~3 周:(1)佩戴动力型夹板——用低温热塑板材制作背侧夹板, 全天佩戴, 保持腕屈曲 30~45°、掌指关节 (metacarpophalangeal joint, MP) 屈曲 50~70°, 指间关节 (interphalangeal joint, IP) 允许伸直。弹力橡皮条一端固定于患指指甲, 另一端通过掌心的滑车固定于前臂屈侧的敷料上, 调节橡皮条的张力, 以 IP 完全屈曲而主动伸指不费力为准。(2)早期控制性活动——手腕固定于屈曲位置, 橡皮条的弹性回缩力可使手指处于被动屈曲位置, 术后第 2 天患指可在一定活动范围内主动伸展, 每日训练 4~5 次。(3)冷疗——应用德国产 Cryo-5 型冷空气治疗仪, 局部施以冷疗, 喷嘴直径为 15 mm, 喷嘴和皮肤之间相距 10 cm, 当待机状态指示灯停止闪烁后, 将风口对准患手进行治疗, 温度为 -30°C, 每日治疗 1~2 次, 每次 6 min, 10 d 为 1 个疗程。(4)短波治疗——应用比利时产 FYSIOMED 短波治疗仪, 波长为 11 m, 频率为 27.12 MHz, 脉冲模式, 输出功率为 20~30 W。板状电容电极 2 个, 大小为 12 cm × 18 cm, 间隙 2~3 cm, 于患手对置, 无热量。每日治疗 1 次, 每次 10 min, 10 次为 1 个疗程, 共 2~3 个疗程。

2. 术后第 4 周:(1)调整夹板——逐渐减小夹板的限制, 保

持腕关节 0°位, 全天佩戴。(2)关节活动范围练习——被动屈曲 MP、近端指间关节 (proximal interphalangeal joint, PIP) 和远端指间关节 (distant interphalangeal joint, DIP), 手指轻柔地行主动屈伸活动。每日 4~5 次, 共 7 d。

3. 术后第 5 周:(1)去除夹板。(2)主动运动——可进行单个手指及屈指深、浅肌腱的滑动练习<sup>[1]</sup>, 钩指、握拳等运动。腕关节可缓慢活动, 在屈指位伸腕, 屈腕位伸指, 注意伸腕、伸指不能同时进行。(3)超声波治疗——应用 FRK-II 型多功能超声治疗机, 最大输出功率为 20 W, 液体石蜡乳为耦合剂, 用接触移动法, 功率密度为 0.75~1.50 W/cm<sup>2</sup>, 每日治疗 1~2 次, 每次 5~10 min, 10 次为 1 个疗程。(4)蜡疗——用蜡饼法, 蜡温 50°C 左右, 每日治疗 1~2 次, 每次 30 min, 10 次为 1 个疗程。

4. 术后第 6 周:(1)主、被动活动——手指和手腕充分进行主动和被动活动, 每日 4~5 次。(2)日常生活活动训练和作业治疗——训练患者脱/穿衣服、进食、如厕、梳洗、家务劳动等基本日常生活活动; 做各种与职业有关系的手指精细动作训练, 如书写、打字、下棋、装配小零件、工艺编织等。(3)佩戴动力型伸指/伸腕支具——可逐渐调节腕关节角度及牵拉力量, 每次佩戴时间尽量保持 20 min, 每日佩戴 4~5 次, 10 d 为 1 个疗程。

5. 术后第 7 周:(1)主、被动活动——继续手指及手腕的主动和被动活动, 增大腕、手关节的活动度。(2)渐进式抗阻练习——应用塑胶泥、握力圈、弹力网、哑铃、墙壁拉力器等不同强度的器械, 逐渐加强手部肌力, 加大肌腱的滑动力度。

6. 术后第 8~11 周: 强化抗阻练习, 增强肌力、耐力。

7. 术后第 12 周: 手、腕活动不受限制。

合并神经、血管损伤的患者要避免牵伸神经缝接部位, 术后以夹板维持腕关节屈曲 45°, MP 屈曲 40°, IP 伸直位, 腕关节屈曲 90°。术后第 6 周去除夹板, 充分活动, 第 8 周进行感觉再训练。

##### (三) 疗效评定方法

采用手部肌腱修复后总主动活动度 (total active movement, TAM) 系统评定方法<sup>[2]</sup> 来评定伤指的运动功能,  $TAM = (MP + PIP + DIP) - (MP + PIP + DIP)$ , 即各关节屈曲度之和与各关节伸直受限度之和的差值。各关节伸直以 0° 为准, 过伸部分不计。优: 活动范围正常; 良: 患侧 TAM 大于健侧的 75%; 可: 患侧 TAM 大于健侧的 50%; 差: 患侧 TAM 小于健侧的 50%。患者手运动功能达到医患双方均满意即可停止康复治疗, 同时进行疗效评定。