

· 基础研究 ·

高强度超声对兔肝肿瘤微血管损伤作用的病理观察

关利铭 王智彪 伍烽 白晋 文爽 李崇雁 杜永洪

【摘要】目的 观察高强度超声(HIU)对肿瘤细胞和增生血管的破坏作用。**方法** 采用 HE 染色、内皮细胞生物素标记的荆豆凝集素 I(UEAI)免疫组织化学染色和电镜检查,观察 HIU 对兔 VX₂ 肝肿瘤营养血管破坏的情况。**结果** HE 染色显示,HIU 治疗后肿瘤营养血管和肿瘤组织发生凝固性坏死,靶组织 UEAI 染色为阴性,电镜观察肿瘤微血管结构完全破坏。**结论** HIU 能破坏肿瘤营养血管,防止血管再生,从而有可能抑制肿瘤的再生和转移。

【关键词】 高强度超声; 肿瘤; 微血管

The effect of high intensity ultrasound on micro-vessels in a tumor in a rabbit liver GUAN Li-ming, WANG Zhi-biao, WU Feng, BAI Jin, WEN Shuang, LI Chong-yan, DU Yong-hong. Chongqing Medical University Institute of Ultrasound Engineering in Medicine, Chongqing 400016, China

【Abstract】Objective To evaluate the damage caused by high intensity ultrasound (HIU) on tumor micro-vessels. **Methods** Rabbit models of the VX₂ tumor were set up. The target hepatic carcinomas were treated with HIU, and the results were observed using hematoxylin-eosin (HE) staining, vascular endothelial cell biotinylated-ulex europaeus agglutinin I (UEAI) immunohistochemical staining, tumor micro-vessel counts, and electron microscopy. **Results** Histological examination through HE staining indicated that HIU induced carcinoma vascularities with whole tumor tissue coagulative necrosis. The UEAI immunohistochemical staining of the target lesions treated by HIU was negative, and complete tumor micro-vessel ultrastructure damage was observed under the electron microscope. **Conclusion** HIU can damage tumor micro-vessels thoroughly, in such way that it may inhibit tumor growth and metastasis.

【Key words】 High intensity ultrasound; Tumors; Micro-vessels

大量研究报道了血管再生在肿瘤生长和发展中的作用。目前根据肿瘤血管增生的机制开发了多种抗血管再生制剂。然而这些制剂的临床前研究和临床试验却存在较大差异,这种差异导致对抗血管再生制剂效果的质疑。深入探索血管再生的复杂过程,对促进抗血管再生制剂的研制,尽早攻克肿瘤难题尤为必要^[1]。

血管再生和肿瘤再生相互依存,无序增殖,只有同时破坏肿瘤生长和增殖血管才有希望治愈肿瘤。为此人们已开展了许多探索性工作,但效果仍很不满意。本实验应用兔 VX₂ 肝肿瘤模型观察高强度超声(high intensity ultrasound, HIU)对肿瘤营养血管和肿瘤细胞的破坏情况。

材料与方法

一、实验动物模型的制作

选用新西兰大白兔 32 只,其中种兔 2 只,肿瘤模型兔 30 只,实验分 HIU 组 15 只(HIU 治疗后即刻手术切除肿瘤),对照组 15 只(单纯接种后 6 d 手术切除),兔龄 3~4 个月,质量 2~3 kg,雌雄不限。腹部用

8% Na₂S 脱毛,3% 戊巴比妥钠耳缘静脉麻醉。

肿瘤的肝脏接种:剥取荷瘤种兔腹部皮下瘤块,切成 1 mm³。动物备皮和麻醉后,取平卧位,固定四肢,消毒皮肤。剑下正中中线切口,暴露肝脏左中叶,在肝腹侧面用眼科剪剪一小口,用眼科镊将肿瘤块放入,1-0 号线缝合。术后 3 d 内,每只实验兔注射 80 万单位青霉素。

二、肝脏肿瘤的 HIU 治疗

接种后 6 d 进行 HIU 治疗。于上腹部种植肿瘤处的腹壁切口,依次切开皮肤、肌肉、腹膜,取出肿瘤种植肝叶,以生理盐水浸湿纱布固定。HIU 治疗样机由重庆医大医学超声工程研究所自行研制,由功率源、探头、循环脱气水系统三部分组成。经测定探头频率 7.5 MHz 时,焦点平均声强 50 W/cm²,焦点温度为 85℃,扫描方式为连续扫描,扫描时间与损伤体积参数为 50 s/cm³。治疗时以探头轻压肝肿瘤组织,每次交叉覆盖 1/5,至全部覆盖肿瘤,治疗范围超过肿瘤边界 1 cm。每次治疗持续时间 10 s,间隔 5 s,观察治疗效果。HIU 治疗有效标志为照射后新鲜肿瘤组织呈灰白色凝固坏死改变。HIU 组 15 只实验兔治疗平均时间为 (85 ± 23) s。

三、肿瘤血管的病理观察

HIU 治疗组和对照组分别取肿瘤组织行 HE 染色

基金项目:国家“95”重点科技攻关项目(No. 969050201)

作者单位:400016 重庆,重庆医科大学超声工程研究所

和内皮细胞免疫组化染色,并进行透射电镜观察。

肿瘤血管内皮的免疫组化染色:采用亲合素-生物素-过氧化酶复合物(ABC)法,组织切片脱蜡。0.1%胰蛋白酶抗原修复 30 min 后,生物素标记的荆豆凝集素 I(UEAI,工作浓度 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$,北京中山生物技术有限公司产)与内皮细胞岩藻糖结合,以链霉亲合素工作液结合生物素,显色剂显色。

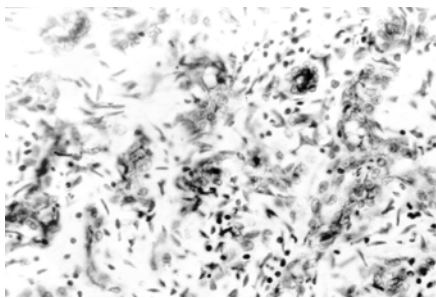
染色结果判定:UEAI 染色以单个内皮细胞或一簇内皮细胞作为一个微血管,不以红细胞和管腔的出现作为标准。有较厚肌层的血管和血管直径大于 8 个红细胞者不计入。先在 100 倍光镜下选择 5 处血管最多的肿瘤区域,然后在 400 倍光镜下进行微血管计数,并求其平均数。二组统计学比较采用 χ^2 检验。

结 果

一、对照组的病理检查

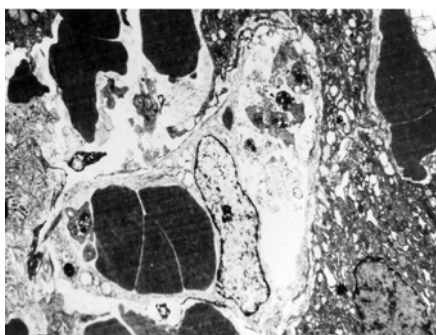
肿瘤接种后第 6 天,对照组 15 只实验兔的瘤块直径约 5 mm,瘤块切面为新鲜鱼肉样组织。经 HE 染色,可见肝内癌巢和癌巢内及周边的血管均完整。

正常肿瘤微血管内皮细胞 UEAI 染色呈黄色或棕黄色,在肿瘤组织中分布不均,高血管密度区称为“热点”(图 1);有的形成管腔,有的为单个内皮细胞或内皮细胞簇。对照组的 15 只兔在 400 倍光镜下,其平均血管密度计数为 52 根/ mm^2 (血管密度范围 46 ~ 63 根/ mm^2)。透射电镜下,可见血管超微结构完整(图 2)。



注:对照组微血管内皮细胞阳性表达呈黄色或棕黄色

图 1 内皮细胞光镜图(UEAI 染色 $\times 400$)

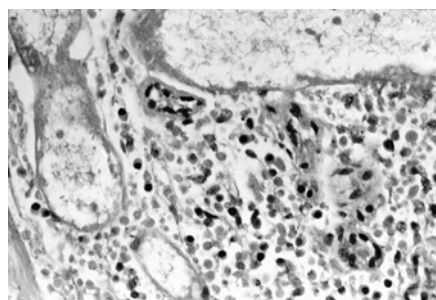


注:HIU 治疗前血管超微结构完整

图 2 兔 VX₂ 肿瘤血管透射电镜图($\times 4000$)

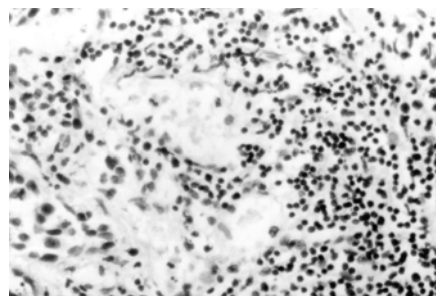
二、HIU 组的病理检查

HIU 治疗后,HIU 组 15 只实验兔的肿瘤组织即刻呈灰白色凝固坏死改变。经 HE 染色,癌细胞出现核固缩,细胞排列弥散,血管有血栓形成,管壁发生断裂、破坏等(图 3)。血管内皮 UEAI 染色阴性(图 4);HIU 组 15 只兔血管密度均为 0,校正 $\chi^2 = 26.1333$, $P = 0$,二组比较差异有统计学意义。透射电镜检查,仍可见血管轮廓,内皮细胞坏死,膜性结构破裂,基底膜不清,胞质呈均质状,无完整细胞器,核异染色质较多,呈团块状改变(图 5)。



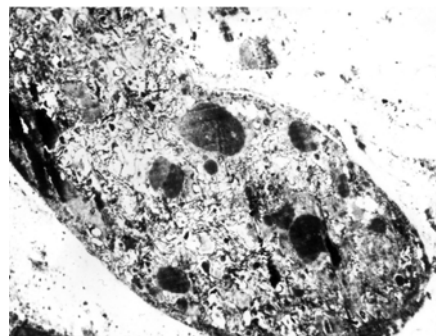
注:癌细胞出现核固缩,细胞排列弥散,血管有血栓形成

图 3 HIU 治疗后肝肿瘤光镜图(HE 染色 $\times 400$)



注:HIU 治疗后血管内皮细胞呈阴性表达

图 4 HIU 治疗组内皮细胞光镜图(UEAI 染色 $\times 400$)



注:HIU 治疗后即刻血管内皮细胞破坏,血管内血栓形成

图 5 兔 VX₂ 肿瘤血管透射电镜图(醋酸双氧铀和硝酸铅染色 $\times 4000$)

讨 论

一、肿瘤模型的选取

肝癌是最常见实体恶性肿瘤之一,肝转移是肿瘤患者最常见的死亡原因。尽管术后 5 年存活率只有 25%

~30%,目前外科手术切除仍是治疗的唯一希望。作为无创治疗的手段,HIU 为患者带来的益处引起了人们的极大兴趣。该方法的临床应用在中国不断增多,在英国牛津邱吉尔医院也正在开展临床试验^[2]。为此我们采取兔 VX₂ 肝脏肿瘤模型。VX₂ 瘤细胞株起源于 Shope 病毒诱发的兔乳头状瘤衍生鳞癌,可接种到兔肝脏、肾脏等部位,制成原位肿瘤动物模型。

二、外科治疗与抗血管再生药物协同应用

手术仍是目前治疗肝癌等实体肿瘤的主要方法。但由于许多血管增生因子激发释放,外科手术也是一个诱发血管增生的条件。由于肿瘤血管增生、手术损伤和组织缺氧引起的生理反应性血管再生并存,外科手术可能促进未控制的残存静止肿瘤细胞生长。随着抗肿瘤血管药物的出现,外科医生会在应用抗血管再生药物治疗的同时,对更多的原发和继发肿瘤患者实施肿瘤手术。但抗肿瘤血管再生药物自身也存在一些问题^[3,4]:①为稳定细胞而治疗,而不是细胞毒治疗,只能抑制肿瘤的生长和转移,不能达到消灭已有肿瘤细胞的目的;②对生理性血管形成产生干扰,对伤口的愈合、妊娠、月经等将产生较大的影响;③因血管抑制因子的合成和提取复杂,治疗费用高昂,一般人难以承受。

肿瘤血管再生和肿瘤再生相互依存,无限增殖、侵袭转移形成恶性循环。目前外科手术与抗肿瘤血管制剂联合还有许多矛盾未解决。

三、HIU 能完全破坏肿瘤组织及其滋生血管

从提出利用超声能量体外治疗肿瘤的想法距今已有 50 多年历史,起初 HIU 研究着眼于脑外科,但大量的临床观察来自于前列腺疾病的治疗。最近,HIU 作为无创外科极具潜力的手段,治疗范围日益扩大,包括肝脏、肾脏、乳腺、骨、子宫、胰腺的肿瘤以及心脏传导系统异常、外科止血^[2]。最近有人提出,HIU 消融术从理论到实践的发展可能意味着影像指导下的 HIU 治疗会替代传统外科手术^[5]。

运用 HIU 技术治疗肿瘤的关键首先是要在组织内形成单个的凝固性坏死区,即“生物学焦域”(biological focal region, BFR),再靠体外治疗头的适形扫描移动 BFR,达到完整切除瘤块。因此,BFR 是 HIU 切除肿瘤的基本单元^[6]。

重庆医科大学附属二院肿瘤中心与国内数家医院联合,从 1997 年 11 月至 2001 年 10 月,共对 1 038 例肝癌、骨肉瘤、乳腺癌等实体瘤患者进行 HIU 治疗。病理检查发现靶区组织和直径小于 2 mm 的血管完全破坏。随访诊断影像显示,经 HIU 治疗的肿瘤组织无血供或血供减少,无放射性同位素吸收。6~15 月随访显示肿瘤消退,4 年随访未发现严重并发症^[7]。

美国华盛顿大学 Vaezy 等^[8]发现,HIU 能有效终止

肝脏、脾脏和血管创伤出血。机制为:①热效应,围绕切口出现凝固性坏死团块,很少或不对周围组织血流产生影响;②空化效应,促进血小板激活、聚集和粘附在胶原覆盖的表面。他们对 20~25 mm 长,4~6 mm 深的肝脏切口,即刻进行 HIU 治疗,平均止血时间为(78±44)s,在 HIU 治疗后的 1,3,7,14,28 和 60 d 进行组织学观察,未发现治疗后反复出血,60 d 后组织学检查发现疤痕组织和肝组织再生,HIU 能使肝脏持久止血。

本研究采用 HE 染色、内皮细胞免疫组化染色和电镜观察相结合的方法观察 HIU 对肝肿瘤血管破坏情况。经 HIU 治疗后,HE 染色可见肿瘤组织凝固性坏死,肿瘤血管内有血栓形成,管壁断裂、破坏等。UEAI 染色微血管定量是目前观察肿瘤血管再生情况的常用方法,HIU 治疗后 UEAI 染色阴性,说明处于增生状态的血管内皮细胞破坏完全。电镜的超微结构变化进一步证实了这一点。

血管再生和肿瘤再生相互依存,形成无序增殖生长的恶性循环,HIU 治疗可无创杀灭肿瘤细胞和增殖血管,打破了肿瘤细胞及其滋生血管的这种恶性循环,从而使防止肿瘤再生和转移、治愈肿瘤成为可能。

HIU 杀灭肿瘤细胞及其增殖血管,并不影响伤口愈合等生理过程,解决了抗血管再生制剂与外科手术联合应用影响术后伤口愈合,对妊娠、月经等生理性血管形成产生干扰的治疗矛盾。

而 HIU 对血管其它成分如血管再生因子和平滑肌细胞等的破坏作用;HIU 抗肿瘤血管再生与提高机体免疫力之间的关系等问题需进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 McCarty MF, Liu W, Fan F, et al. Promises and pitfalls of anti-angiogenic therapy in clinical trials. *Trends Mol Med*, 2003,9:53-58.
- 2 Kennedy JE, Ter Haar GR, Cranston D. High intensity focused ultrasound: surgery of the future? *Br J Radiol*, 2003,76:590-599.
- 3 van der Bilt JD, Borel Rinkes IH. Surgery and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2004,1654:95-104.
- 4 谭先杰,潘凌亚. 妇科肿瘤的血管形成和抗血管形成治疗研究进展. *基础医学与临床*, 2004,24:252-257.
- 5 Halpern EJ. Science to practice: high-intensity focused ultrasound ablation; will image-guided therapy replace conventional surgery? *Radiology*, 2005,235:345-346.
- 6 Wang ZB, Bai J, Li F, et al. Study of a "biological focal region" of high-intensity focused ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, 2003,29:749-754.
- 7 Wu F, Wang ZB, Chen WZ, et al. Extracorporeal high intensity focused ultrasound ablation in the treatment of 1038 patients with solid carcinomas in China: an overview. *Ultrason Sonochem*, 2004,11:149-154.
- 8 Vaezy S, Noble ML, Keshavarzi A, et al. Liver hemostasis with high-intensity ultrasound: repair and healing. *J Ultrasound Med*, 2004,23:217-225.

(修回日期:2006-05-17)

(本文编辑:熊芝兰)