

· 基础研究 ·

高强度聚焦超声治疗大鼠骨肉瘤的疗效观察*

李 艳¹ 向理科² 罗 娟³ 王智彪⁴

摘要 目的:从病理学角度和血清生化水平观察高强度聚焦超声(HIFU)治疗 SD 大鼠骨肉瘤的效果。**方法:**将 25 只移植成功模型鼠随机分为 5 组,分别于治疗前、治疗后(即刻、第 2d、第 5d、第 15d)取原位肿瘤、肺组织做光镜和电镜检查,同时采血清测碱性磷酸酶(ALP)水平。HIFU 单点单次治疗时间为 10s,总共治疗时间均为 250s。**结果:**HIFU 治疗后靶区肿瘤呈凝固性坏死,坏死区胞核碎裂、溶解消失,嗜酸染色增强。残存骨小梁中骨母细胞坏死消失,骨小梁结构尚保持。HIFU 后 15d,可见坏死区与正常交界边缘有肉芽组织形成,髓腔边缘可见间叶细胞增生并向软骨细胞分化,残存骨小梁中有细胞增生。HIFU 治疗后模型鼠 ALP 水平比治疗前有明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),并且随时间推移逐渐呈下降趋势,但治疗后 ALP 仍高于正常水平($P<0.01$)。**结论:**HIFU 治疗骨肿瘤效果显著。

关键词 骨肉瘤;高强度聚焦超声;碱性磷酸酶

中图分类号:R738.1,R454.3,R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-10-0874-03

Pathological research on therapy effect with high intensity focused ultrasound treating rat osteosarcoma/LI Yan, XIANG Like, LUO Juan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006,21(10):874—876

Abstract Objective:To observe the effect of high intensity focused ultrasound (HIFU) on treating SD rat osteosarcoma through pathological ways and biochemical indicator of blood.**Method:**Twenty five model rats were distributed into five groups, the tumor in situ and lung preparation in each group was obtained to be checked with light microscope and electron microscope before and after HIFU therapy (immediate, 2nd day, 5th day, 15th day). At the same time, serum alkaline phosphatase(ALP) was detected. The treatment time of HIFU groups were 250s, and their once treatment time was 10s.**Result:**The tumor of target area revealed coagulation necrosis after HIFU therapy. Karyorrhexis and karyolysis could be seen in the necrosis area and eosinostaining enhanced. The osteoblast was necrotic and disappeared in the remnant of bone trabecula. Granulation tissue began to repair at the boundary between necrotic area and normal area on the 15th day after HIFU therapy. Hyperplasia of lobus intermedius cells could be seen at the boundary of medullary cavity and it began to differentiate to cartilage cells. Cell hyperplasia could be seen in the remnant of bone trabecula. Compared with the untreated group, the ALP level was obviously decreased after HIFU therapy ($P<0.05$ or $P<0.01$), and gradually decreased in accordance with time. But the ALP level after HIFU therapy was still higher than normal level ($P<0.01$).**Conclusion:**The effect of treating osteosarcoma by HIFU is very notable.

Author's address Dept. of Pathology, Affiliated Hospital of Children of Chongqing University of Medical Science, Chongqing, 400014

Key words osteosarcoma;high intensity focused ultrasound; alkaline phosphatase

高强度聚焦超声 (high intensity focused ultrasound, HIFU) 是无创治疗肿瘤的一种新方法。主要利用超声声束的可汇聚性、穿透性等物理特点,将体外低能量超声聚焦于体内肿瘤靶区,产生瞬态高温(65—100℃),使焦域处肿瘤靶组织发生凝固性坏死,而周围组织极少或不受损伤,达到无创“切除”肿瘤的目的^[1],其治疗肿瘤的机制是利用 HIFU 的热效应、机械效应和空化效应(主要是热效应)^[2],目前众多学者都已采用 HIFU 成功治疗各种实体肿瘤^[3-5]。本实验旨在观察 HIFU 治疗骨肉瘤的有效性,为临床治疗的开展提供相应的动物实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物和细胞株:SD 大鼠,3 周,50—60g,雌性,30 只(购自重庆市第三军医大学大坪三院实验动物中心)。BALB/cA Nu/Nu 裸鼠,3 周,雌性,2 只(购自中科院上海实验动物中心)。SD 大鼠 UMR106

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30171060)

1 重庆医科大学附属儿童医院病理科,400014

2 重庆医科大学病理学教研室

3 浙江省肿瘤医院

4 重庆医科大学生物医学工程系

作者简介:李艳,女,医师,硕士研究生

收稿日期:2006-01-18

骨肉瘤细胞株 (购自北京大学医学部生物化学系), 培养于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中。

1.1.2 HIFU 治疗样机:重庆医科大学医学超声工程研究所自行研制, 组成部分为功率发生源、探头、循环脱气水降温系统。

1.2 实验方法

1.2.1 建立大鼠骨肉瘤模型:取对数生长期 UMR106 细胞以 $1 \times 10^6/0.2\text{ml}$ 细胞数接种于裸鼠臀部皮下, 2 周成瘤约 $2.0\text{cm} \times 1.5\text{cm} \times 1.2\text{cm}$, 无菌剥离肿瘤, 将其剪成 0.5mm^3 大小的瘤块, 置于无血清 1640 中备用。取正常大鼠 25 只, 麻醉后用硫化钠将右下肢脱毛 (上至膝关节, 下至胫骨下段), 仰卧位固定于手术台上, 常规消毒右下肢, 在右胫骨断端作内侧切口, 分离皮下组织暴露好骨面后, 用直径 1mm 克氏针轻钻入骨髓腔 (有明显落空感), 然后用 12 号输血针头沿此孔斜钻入髓腔, 挖取其中骨髓, 形成一倾斜通道, 取瘤块 20 余个置入骨髓腔中, 骨蜡封口, 依次缝合肌膜、皮肤, 常规消毒切口。移植 3 周后通过 X 线片证实移植成功, 将其随机分为 5 组, 分别于治疗前、治疗后 (即刻、2d、5d、15d) 行各项检查。

1.2.2 HIFU 治疗:将 20 只模型鼠右下肢胫骨上端治疗处局部脱毛、酒精脱脂, 以减少治疗中超声波反射, 麻醉后固定于手术台上, 治疗部位涂上一层均匀的耦合剂, 用 HIFU 治疗样机进行治疗, 频率 9.75MHz, 焦距 6mm, 治疗方式为点点组合扫描, 治疗范围为肿瘤及周围 0.5cm 内组织。每只模型鼠单点单次治疗时间为 10s, 总共治疗时间为 250s。

1.2.3 病理检查:取治疗前后大鼠原位肿瘤、肺组织, 经 10% 中性福尔马林固定, 石蜡切片, HE 染色, 观察肿瘤细胞治疗前后形态变化及有无转移发生。

1.2.4 电镜观察:取治疗前后原位瘤块, 切成直径为 0.2mm 大小, 用 3% 戊二醛固定 2h, 0.1mol/L PBS 液清洗, 1% 锇酸固定 1h, 0.1mol/L PBS 液清洗, 50%—100% 乙醇梯度脱水置换, 真空干燥, 离子度膜, 电镜扫描, 观察肿瘤细胞的形态。

1.2.5 血清碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 水平的检测:大鼠摘眼球取血后孵育血清, 按一次用量分装至 EP 管中, 送至重医附属一院检验科检测 ALP 水平。同时取剩余 5 只正常大鼠检测 ALP。

1.3 统计学分析

数据采用均数 $\pm$ 标准差表示。HIFU 各组与未治疗组间采用方差分析, 与正常组间采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 大体观察

HIFU 治疗前肿瘤呈梭形或球形膨大, 瘤区表皮下小血管扩张迂曲, 色暗红, 皮温稍高。治疗后即刻可见瘤区皮肤呈灰黄色、煮熟状, 与周围正常皮肤交界处可见一明显红肿充血带, 右下肢稍水肿。治疗后 2d 肿瘤形态尚保持完整, 但瘤区变成暗紫色, 右下肢水肿明显。治疗后 3d 肿瘤坏死脱落, 瘤区可见一大的缺损, 与正常皮肤交界处红肿充血带已明显消退, 下肢水肿仍很明显。治疗后 5d 坏死区已开始组织修复, 瘤区边缘坏死处有结痂, 下肢水肿稍有消退。治疗后 11d 坏死脱落的缺损慢慢缩小, 表面仍有坏死组织, 与周围正常组织界限明显, 水肿明显消退。治疗后 15d 缺损仍在修复缩小, 水肿已消退。

2.2 光镜

HIFU 治疗后即刻肿瘤表现为凝固性坏死, 大片坏死区域瘤细胞核碎裂、溶解消失, 嗜酸染色增强 (图 1, 见前置彩色插页 8), 有的肿瘤细胞尚保持完整形态, 但呈固缩核表现。HIFU 后 2d、5d 肿瘤大片坏死, 病灶周围有大量淋巴细胞浸润, 残存骨小梁中骨母细胞坏死或消失, 骨小梁结构尚保持。HIFU 后 15d, 可见坏死区与正常交界边缘有肉芽组织形成, 髓腔边缘间叶细胞增生并向软骨细胞分化 (图 2, 见前置彩色插页 8), 可见软骨内成骨现象, 残存骨小梁中有细胞增生。

2.3 电镜

HIFU 治疗前肿瘤细胞大小不一, 核膜不规则, 可见大量异形核, 核膜增厚, 异染色质边集, 核浆比增大, 核分裂活跃 (图 3, 见前置彩色插页 8)。肿瘤细胞周围有一定数量的胶原纤维, 可见到巨噬细胞浸润, 但未看到骨样组织产生。HIFU 治疗后 5d 肿瘤细胞细胞器破坏, 核固缩, 核膜不完整, 核破裂或溶解消失 (图 4, 见前置彩色插页 8)。

2.4 血清 ALP

与未治疗组相比, 经过 HIFU 治疗后的模型鼠 ALP 水平有明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并且随时间推移呈逐渐下降趋势。但 HIFU 治疗后 ALP 仍高于正常水平 ($P < 0.01$) (见表 1)。

3 讨论

高强度聚焦超声是近年发展起来的一种无创治疗肿瘤的新技术, 众多研究者已采用 HIFU 成功治疗乳腺癌、肝癌等实体肿瘤。由于骨骼对超声波的强反射和衰减, 曾有人认为骨肿瘤是 HIFU 治疗的禁区^[6], 后来伍烽等^[4]进行了 HIFU 治疗兔 VX₂ 骨肿瘤的实验研究, 发现当发生骨质破坏时, 声衰减变小, 声束易通过, 超声声像图上病骨内回声增强, 病理组

表1 各组血清ALP含量

(U/L, $\bar{x} \pm s$)

	正常组	骨肉瘤组	HIFU组			
			即刻	2d	5d	15d
ALP	133.00±18.97	403.67±116.95	316.50±81.49 ^{①③}	291.80±29.85 ^{②③}	237.75±7.82 ^{②③}	179.40±24.40 ^{②③}

与骨肉瘤组比较① $P<0.05$,② $P<0.01$;③与正常组比较 $P<0.01$

织学可见骨内肿瘤组织凝固性坏死,坏死区边界清楚,与周围有明显充血出血带。由此可见,肿瘤骨质破坏是HIFU治疗的病理基础。由于兔VX₂骨肿瘤模型中肿瘤成骨不明显,与人的恶性骨肿瘤还有一定差异,本实验中我们采用骨肉瘤细胞株UMR106成功建立大鼠骨肉瘤模型,观察HIFU治疗后的效果及病变恢复情况。实验中发现用HIFU治疗大鼠骨肉瘤后,即刻肿瘤发生大片凝固性坏死,镜下瘤细胞发生核碎裂、核溶解,部分瘤细胞虽然还保持完整的轮廓,但已经发生了核固缩,说明HIFU在覆盖到的范围内可以完全杀死肿瘤细胞。治疗后期出现肉芽组织修复,残存骨小梁中有细胞再生,间叶细胞再生并转化为软骨细胞,治疗后大鼠肺部未发现任何转移灶并一直健存至实验结束(而未治疗大鼠于移植后4周有肺转移),说明HIFU治疗安全有效。

众所周知,骨肉瘤患者血中ALP水平是异常升高的,是由于组织癌变时控制ALP合成的基因表达异常,产生和分泌肿瘤相关的ALP。陈文直等^[7]用HIFU治疗骨肉瘤患者后2周ALP水平明显低于治疗前;张俊平^[8]研究发现用HIFU治疗骨肉瘤后骨源性的碱性磷酸酶水平显著降低。本研究发现HIFU治疗后大鼠血清ALP水平立即下降,并随时间延长不断下降,治疗后15d时ALP水平最低,但仍高于同龄鼠正常水平,说明HIFU治疗后尚不能马上完全恢复到正常水平,可能是由于血清ALP的半衰期为3—7d,肿瘤性ALP在体内的清除有一个过程,随着时间延长ALP水平可能会继续降低,甚至接近正常水平。骨肉瘤治疗前后ALP水平与预后是否有一定的关系,目前仍存在争议。有学者做了相关的调查研究,认为骨肉瘤治疗前后ALP水平高者术后复发

率和肺转移率增高、5年生存率降低;ALP水平接近正常者预后较好^[9-10]。故认为HIFU治疗骨肉瘤后ALP水平降低有利于患者的预后。

通过病理学和血清ALP检测,我们可以初步判定HIFU治疗大鼠骨肉瘤的疗效,为临床治疗提供了相应的实验依据,临床可以结合其他的检测手段更完整精确评估其治疗效果。

参考文献

- [1] ter Haar G. High intensity ultrasound [J]. Semin Laparosc Surg, 2001,8(1):77—89.
- [2] 顾惠琼,向理科,王智彪.高强度聚焦超声治疗兔胫骨移植性鳞状细胞癌中的空化现象[J].天津医药,2005,33(6):363—365.
- [3] 陈文直,伍烽,朱辉,等.高强度聚焦超声治疗恶性骨肿瘤的实验研究[J].中华超声影像学杂志,2001,10(5):313—315.
- [4] 伍烽,陈文直,白晋,等.高强度聚焦超声体外治疗人恶性实体肿瘤的病理变化[J].中华实验外科杂志,2001,18(2):142—143.
- [5] Van Leenders GJ, Beerlage HP, Ruijter ET, et al. Histopathological changes associated with high intensity focused ultrasound treatment for localized adenocarcinoma of the prostate[J]. J Clin Pathol, 2000, 53(5):391—394.
- [6] 程树群,周信达.高功率聚焦超声在肿瘤治疗中的应用[J].国外医学·肿瘤分册,1994,12:74—77.
- [7] 陈文直,伍烽,朱辉,等.高强度聚焦超声治疗骨肿瘤的初步临床观察[J].中国肿瘤临床,2001,28(7):489—491.
- [8] 张俊平.骨肉瘤HIFU治疗前后外周血骨型ALP同工酶的变化[D].重庆医科大学硕士学位论文.2000.
- [9] 付勤,周福高,王海义. ALP监测对判定骨肉瘤辅助化疗预后的意义[J].中国矫形外科杂志,1996,3(3):174—175.
- [10] Bacci G, Picci P, Ferrari S, et al. Prognostic significance of serum alkaline phosphatase measurements in patients with osteosarcoma treated with adjuvant or neoadjuvant chemotherapy [J]. Cancer, 1993,71(4):1224—1230.