

高强度聚焦超声增效及超声显像技术研究

何坤燕,郝兰,冉海涛,王志刚,郑元义

(重庆医科大学 超声影像学研究所,重庆医科大学附属第二医院超声科,重庆 400010)

摘要:首先采用超声乳化离心法制备载液态氟碳全氟己烷(PFH)富勒烯纳米球(PFH-C₆₀),然后应用高强度聚焦超声(HIFU)对各组样品进行辐照后行体外超声显像,再另取新鲜离体牛肝,分别局部注射生理盐水、C₆₀溶液及 PFH-C₆₀溶液后,给予相同参数的 HIFU 辐照,观察各组辐照区域视频灰度变化及肿瘤凝固性坏死情况。实验结果发现,PFH-C₆₀可增强 HIFU 消融效果及体外超声显像;PFH-C₆₀ 体外超声显像呈无回声,行一定参数 HIFU 辐照后超声信号明显增强;牛肝注射 PFH-C₆₀ 后行 HIFU 辐照,较 NS 组及 C₆₀ 组辐照区灰度变化面积和变化值有显著差异(误差概率 $P < 0.01$),且凝固性坏死体积明显增大($P < 0.01$)。实验研究表明,载液态氟碳富勒烯纳米球具备超声成像与增效 HIFU 的功能。

关键词:高强度聚焦超声(HIFU);增效;显像;液态氟碳全氟己烷(PFH);富勒烯

中图分类号: R454.3 **文献标识码:** A

Study on High Intensity Focused Ultrasound Synergism and Ultrasound Imaging Technology in Vitro

HE Kunyan, HAO Lan, RAN Haitao, WANG Zhigang, ZHENG Yuanyu

(Institute of Ultrasound Imaging, Ultrasonic Department of the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: The fullerene nanocapsules of liquid perfluorocarbon (PFH-C₆₀) were prepared by using the phacoemulsification extraction method first. Then each group of sample was observed the ultrasound imaging after ablation of high intensity focused ultrasound in vitro. In addition, the degassed bovine liver in vitro was directly injected into normal saline, C₆₀ solution or PFH-C₆₀ separately before HIFU ablation. After HIFU ablation of same parameters, the gray changes of irradiation areas and coagulation necrosis in liver were observed. The results of experiment found that PFH-C₆₀ can enhance HIFU ablation and ultrasound imaging in vitro, and the PFH-C₆₀ ultrasound imaging in vitro was echoless, but after irradiated by HIFU (certain scope of parameters), it got an echo enhancement. After proceeding HIFU ablation, compared with group NS and C₆₀, group PFH-C₆₀ showed significant differences in gray change values and squares ($P < 0.01$), also whose volume of coagulation necrosis became larger ($P < 0.01$). The research indicates that the prepared PFH-C₆₀ nanocapsules have the functions of ultrasound imaging and HIFU synergism in vitro.

Key words: high intensity focused ultrasound(HIFU); synergism; imaging; PFH; fullerene

0 引言

高强度聚焦超声(HIFU)是近年快速发展的非侵入性局部消融肿瘤的新技术,其采用高能聚焦装置,将体外超声能量聚焦于体内肿瘤组织^[1]。它是通过热效应、空化效应和机械作用使焦点处产生瞬间高温^[2],导致蛋白质变性,使肿瘤组织发生不可逆凝固性坏死,并被逐步吸收或瘢痕化,目前已成功

用于多种良性、恶性实性肿瘤的治疗^[3]。然而,超声波在组织传播过程中,尤其在深部组织治疗中容易发生能量衰减,影响 HIFU 的治疗效果^[4]。大量研究发现,引入 HIFU 增效剂可增加靶区组织的能量沉积。因此,本文结合液态氟碳全氟己烷(PFH)及富勒烯,自制了一种增效 HIFU 的新型纳米球材料,并于体外实验中初步探究了其增效 HIFU 及超

收稿日期:2013-04-09

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81130025, No. 81071157)

作者简介:何坤燕(1987-),女,重庆梁平人,硕士生,主要从事超声分子影像学超声造影和治疗的研究。E-mail:kyxb99@163.com。通信作者:郝兰(1964-),女,甘肃兰州人,副教授,博士后,主要从事功能成像剂研究。E-mail:lanhao5@163.com。

声显像效果。

1 材料与方 法

1.1 载液态氟碳富勒烯纳米球的制备

1.1.1 材料与仪器

材料为羟基富勒烯粉末、25%乙醇、液态氟碳全氟己烷(PFH,分子式:F14C6,沸点为58~60℃)主要仪器为电子天平(FA1004N,上海)、超声波处理器(VCY-500C,上海)、高速离心机(TG18,平凡仪器)。

1.1.2 制备方法

采用超声乳化离心法,取羟基修饰的富勒烯褐色粉末100 mg溶解于10 mL质量分数为25%的乙醇中,然后加入4 mL液态氟碳PFH,用超声振荡仪功率50 W声振40 s,得到无聚集悬浮液,密封后低温放置12~24 h;将上述悬浮液高速离心,转速10 000 r/min,离心5 min,经双蒸水洗涤、离心、收集3次,得到褐黑色纳米球固体,收集下层纳米球,放置4℃冰箱备用。

1.1.3 PFH-C₆₀的粒径电位检测

纳米粒度及Zeta电位分析仪(Zetasizer Nano ZS90, Malvern)检测其粒径大小、分布及表面电位。

1.2 超声体外显像

将一系列不同浓度的PFH-C₆₀溶液及C₆₀溶液(生理盐水为溶剂)置入透明EP管内,以生理盐水作为空白对照。采用JC200型HIFU仪器,调整焦距,将EP管置入HIFU探头聚焦位置,应用不同声功率(200 W和400 W)分别单次辐照0、3 s和9 s,采集HIFU辐照前后的超声显像图。

1.3 HIFU热效应的监测

将生理盐水置入透明离心(EP)管内,采用JC200型HIFU仪器,调整焦距,将EP管置入HIFU探头聚焦位置,应用不同声功率(100 W、150 W、200 W和300 W)分别单次辐照0、3 s、6 s、9 s和18 s,HIFU辐照结束即刻将温度敏针置入生理盐水中,读出温度值。

1.4 PFH-C₆₀产生自由基反应的监测

将不同浓度的PFH-C₆₀溶液(C₆₀浓度分别为4.8 mg/mL和9.0 mg/mL)及C₆₀溶液(C₆₀浓度为9.0 mg/mL)置入透明EP管内(内有苯酚溶液),以生理盐水作为空白对照。采用JC200型HIFU仪器,调整焦距,将EP管置入HIFU探头聚焦位置,应用不同声功率(200 W和400 W)分别单次辐照3 s和9 s,采集HIFU辐照前后的EP管显像图。

1.5 体外增效HIFU实验

将新鲜离体牛肝置于0.9%、37℃生理盐水中复温脱气30 min后,实验过程采用JC200型聚焦超声肿瘤治疗系统(重庆海扶技术有限公司)。实验牛肝(12 cm×8 cm×6 cm)置于甲基丙烯酸甲酯透声容器中,脱气水覆盖全部肝体,1 mL PFH-C₆₀(C₆₀浓度为9.0 mg/mL)直接注入脱气牛肝中。注射局部以HIFU超声显像实时监控,注射后即以HIFU辐照,并以相同方法与生理盐水、C₆₀组对照,且采用相同的辐照条件(250 W/10 s)。辐照结束后观察辐照前后视频强度的变化,由有经验的技术员手动描记视频强度变化区,仪器自动计算灰度变化面积和灰度变化值,比较各组辐照前后灰度变化的情况,并取出牛肝,片状切开至损伤点最大层面,测量并计算靶区凝固性坏死面积及体积V,且 $V = \pi(\text{长} \times \text{宽} \times \text{厚})/6$ 。

1.6 统计学方法

采用SPSS17.0统计软件进行统计分析,各计量资料以均数±标准差表示,多组均数间比较采用单因素方差分析,误差概率 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PFH-C₆₀纳米球的物理特性

以生理盐水溶解后,PFH-C₆₀溶液外观呈无聚集的黑色颗粒悬浮液,较明显分层,Malvern激光粒径仪检测出PFH-C₆₀纳米球平均直径为 \bar{D} (653.7±107.9) nm,粒径分布集中,Zeta电位为(-10.6±12.9) mV,如图1所示。

平均径/nm:653.7	峰1: 705.8	强度/% 94.0	宽度/nm 258.9
分布指数:0.300	峰2: 162.7	4.2	31.23
截距:0.920	峰3: 5.407	1.8	304.6

检测结果质量: 好

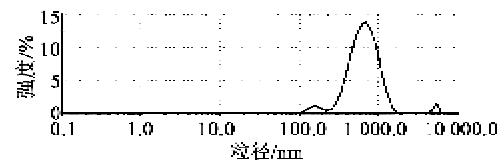


图1 PFH-C₆₀纳米球粒径分布图

2.2 超声体外显像效果

图2、3为体外显像结果。HIFU辐照前,C₆₀组、各PFH-C₆₀组及生理盐水组NS均成低回声;HIFU辐照后,回声均增强,PFH-C₆₀组较C₆₀及生理盐水组增强更明显,且随C₆₀浓度增大,HIFU功率增高、辐照时间增加而增强。

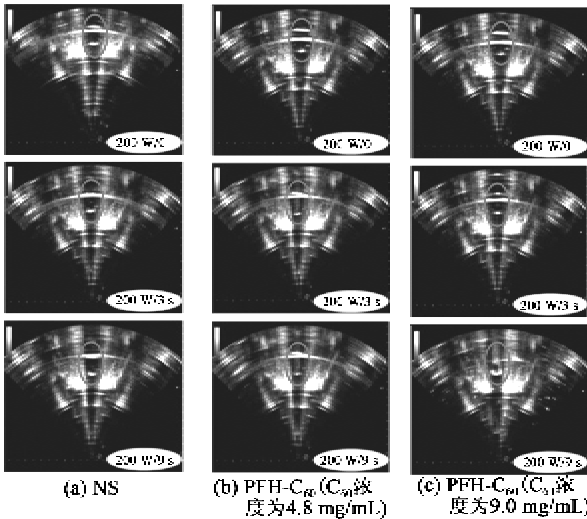


图 2 不同 C₆₀ 浓度的 PFH-C₆₀ 及生理盐水超声显像图

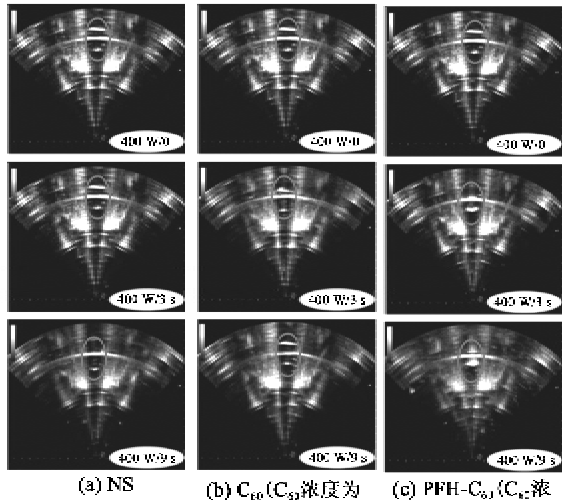


图 3 相同 C₆₀ 浓度的 PFH-C₆₀、C₆₀ 及生理盐水超声显像图

2.3 HIFU 热效应的监测

图 4 为 HIFU 热效应的温度测试。由图可知,生理盐水溶液经 HIFU 辐照后,其温度随着辐照强度和时间的增加而升高。辐照参数为 200 W/9 s 时,生理盐水温度为 57 ℃;300 W/9 s 时为 63 ℃,由此可推算体外增效 HIFU 实验中所用 HIFU 辐照参数 250 W/10 s,所产生的热效应能量能达到 PFH 的沸点。

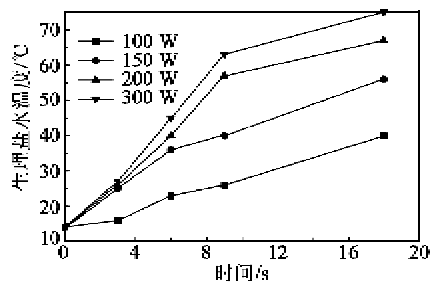


图 4 HIFU 热效应的温度测试

2.4 PFH-C₆₀ 产生自由基的定性检测

HIFU 辐照前,各组 EP 管内溶液均呈无色。HIFU 辐照后,生理盐水组与 C₃₀ 组溶液较辐照前无明显变化,然而 2 组不同浓度 PFH-C₆₀ 溶液均产生活性氧,使苯酚快速氧化为苯醌类物质而呈红色,具有潜在的声动力学效应。且浓度较大组比浓度较小组更明显。HIFU 辐照后,观察到两组 PFH-C₆₀ 溶液颜色变化的条件为:200 W/9 s;400 W/3 s;400 W/9 s。因此推断,250 W/10 s 的 HIFU 辐照 PFH-C₆₀ 溶液也可产生声动力学效应。

2.5 体外增效 HIFU 效果

HIFU 消融后,凝固性坏死区呈灰白色,与周围组织分界清楚。图 5 为 HIFU 消融即刻各组声像图。图中,辐照参数为 250 W/10 s,线条勾勒出辐照后灰度变化范围,并计算灰度变化值。PFH-C₃₀ 组的灰度变化范围明显大于其他两组。图 6 为 HIFU 辐照后各组凝固性坏死体积。由图 5、6 可知,在探头频率辐照声功率时间相同的条件下,各组在 HIFU 辐照后牛肝消融范围及程度不同。

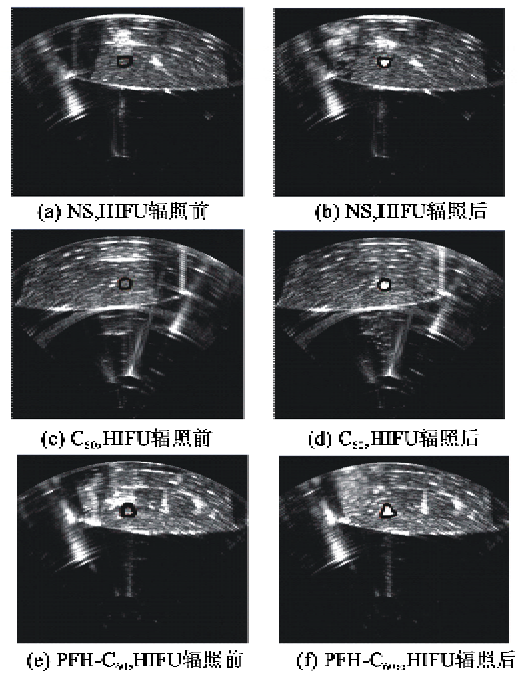
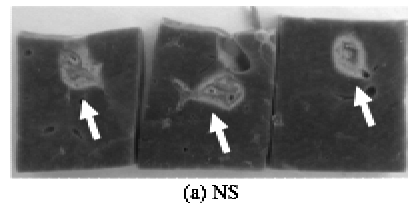


图 5 HIFU 消融即刻各组声像图



(a) NS

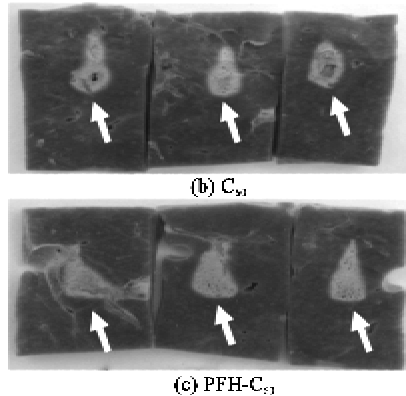


图6 HIFU辐照后各组凝固性坏死体积(箭头所示为凝固性坏死区)

表1为各组辐照后灰度变化及凝固性坏死体积。由表可看出,PFH-C₆₀组凝固性坏死体较生理盐水组、C₆₀组明显增加(误差概率 $P < 0.01$),而C₆₀组与生理盐水组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 各组辐照后灰度变化及凝固性坏死体积(实验样本数 $n=12$)

分组	灰度变化面积/mm ²	灰度变化值	凝固性坏死体积/mm ³
NS	89±7.79	44.33±5.91	374.91±19.78
C ₆₀	110±11.43	82.67±11.15	451.11±28.47
PFH-C ₆₀	169±10.23	113.67±3.09	602.83±29.95

注:与NS组比较,PFH-C₆₀组HIFU辐照后灰度变化面积、灰度变化值及凝固性坏死体积明显较大, $P < 0.01$;C₆₀组与NS组比较, $P > 0.05$ 。

3 讨论

PFH是液态氟碳大家族化合物中的一种,其沸点为58~60℃^[5],研究证实液态氟碳化合物经超声激发、加热可触发其由液态向气态转变^[6]。且超声作用被认为是促进液态氟碳相变的最有效因素^[7]。而实验过程中选择250W/10s的HIFU参数,主要是由于在HIFU热效应的检测中得出此能量可达到PFH沸点至相变的缘故。在超声显像中,由于声束在介质中传播遇到不同声阻抗的临近界面时,在该界面上就产生反射(回声),PFH-C₆₀溶液经HIFU辐照后,回声信号明显较其他组增强,这可能与HIFU辐照达到甚至超过PFH的相变阈值,导致PFH-C₆₀纳米球转变成气泡密切相关,因而PFH-C₆₀纳米球可通过改变组织声环境以增强靶区的能量沉积达到HIFU增效的目的。目前公认增效效果较显著的是超声微泡,它能通过热效应和空

化作用等提高聚焦超声治疗效果^[8],然而微泡直径较大,其空化作用的发生及空化范围难以控制,并可能造成治疗区域的移位,导致正常组织损伤,因此,微泡作为HIFU增效剂在临床应用中受限^[9]。鉴于此,考虑引入某种物质,直接到达靶区细胞周围,在HIFU作用下产生气泡,起到与微泡类同的增效作用,使其成为理想的HIFU增效剂^[10]。本文目的为探索自制的载液态氟碳富勒烯纳米球能否有望成为一种新型的HIFU增效剂。一方面,PFH-C₆₀发生自由基反应,对靶区具有较强的声动力学效应^[11];另一方面,当HIFU辐照靶区时,PFH-C₆₀发生液气相变,将纳米球转化为微泡,微泡的震荡增加了热量沉积,进而增效HIFU,并且降低惯性空化阈值,增强聚焦超声的空化效应^[12]。此外,前人研究发现HIFU损伤组织形成的凝固坏死形态是多样的,要整个肿瘤块完全凝固性坏死,必须通过单个椭圆形→“束”状→“片”状→“块”状凝固性坏死^[13]。HIFU辐照时间一定时,随着声强的增加,可形成三角形生物学焦域,而通过本文实验组PFH-C₆₀与生理盐水组及C₆₀组对比发现,在相同辐照时间及声强下,先形成了三角形凝固坏死区,故可佐证PFH-C₆₀具有明显增效HIFU的作用。本文实验材料C₆₀稳定性高及可发生多种生物学效应,具有广泛的应用前景^[14],因此,将其与液态氟碳PFH结合,有望制备一种较理想的新型HIFU增效剂。

4 结束语

本文采用超声乳化离心法所制的PFH-C₆₀纳米球既能应用于超声显像技术中,同时又初步证实了其对HIFU治疗具有良好的增效作用,为下一步实验研究提供了理论依据,并为HIFU治疗技术增效剂的进一步研制奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] 孙阳,王志刚,郑元义,等.多功能超声造影剂体外超声-磁共振双模态显像及增效高强度聚焦超声的实验研究[J].中华超声影像学杂志,2012,21(7):625-628. SUN Yang, WANG Zhigang, ZHENG Yuanyi, et al. Multi-functional ultrasound contrast agents for in vitro ultrasound/MR dual-mode imaging and high-intensity focused ultrasound synergism[J]. Chinese Journal of Ultrasonography, 2012, 21(7): 625-628.
- [2] 张跃力,吴作辉,姜立新,等.高强度聚焦超声对兔活体心肌组织选择性消融的实验研究[J].临床超声医学

- 杂志,2013,15(2):77-79.
- ZHANG Yueli, WU Zuohui, JIANG Lixin, et al. Experimental study of myocardial ablation with high intensity focused ultrasound in vivo[J]. Journal of Ultrasound In Clinical Medicine, 2013, 15(2): 77-79.
- [3] ORSI F, ARNONE P, CHEN Wenzhi, et al. High intensity focused ultrasound ablation: a new therapeutic option for solid tumors[J]. Journal of Cancer Research and Therapeutics, 2010, 6(4): 414-420.
- [4] 李发琪,白晋,王智彪,等. HIFU在牛肝组织中的传播衰减研究[J]. 生物医学工程学杂志,2003,20(4): 675-678.
- LI Faqi, BAI Jin, WANG Zhibiao, et al. Study of ultrasound attenuation during HIFU propagation in ox liver[J]. Journal of Biomedical Engineering, 2003, 20(4): 675-678.
- [5] 沈红霞,郑元义,王志刚,等. 包裹液态氟碳的高分子微球增强高强度聚焦超声消融兔肝的实验研究[J]. 中华超声影像学杂志,2012,21(2):167-170.
- SHEN Hongxia, ZHENG Yuanyi, WANG Zhigang, et al. Experimental study of polymeric microcapsules with liquid perfluorocarbon enhancing high intensity focused ultrasound ablation of normal liver[J]. Chinese Journal of Ultrasonography, 2012, 21(2): 167-170.
- [6] RAPOPOR N Y, EFROS A L, CHRISTENSEN D A, et al. Microbubble generation in phase-shift nanoemulsions used as anticancer drug carriers[J]. Bubble Sci Eng Technol, 2009, 1(1/2): 31-39.
- [7] ZDERIC V, FOLEY J, LUO Wenbo, et al. Prevention of post-focal thermal damage by formation of bubbles at the focus during high intensity focused ultrasound therapy[J]. Medical Physics, 2008, 35(10): 4292-4299.
- [8] 付丽媛,李发琪,陈首名,等. 不同剂量微泡造影剂在 高强度聚焦超声消融活体羊肝组织中的增效效应[J]. 中华超声影像学杂志,2009,18(4):343-345.
- FU Liyuan, LI Faqi, CHEN Shouming, et al. Enhancing effects of microbubble contrast agent of different dosage on high-intensity focused ultrasound ablation in goat liver in vivo[J]. Chinese Journal of Ultrasonography, 2009, 18(4): 343-345.
- [9] 周洋,郑元义,沈红霞,等. 经静脉注射脂质包裹液 态氟碳纳米粒增效高强度聚焦超声治疗肿瘤的初步研究[J]. 中国超声医学杂志,2012,28(3):193-196.
- ZHOU Yang, ZHENG Yuanyi, SHEN Hongxia, et al. Preliminary study of increased efficacy of high intensity focused ultrasound treating tumors using lipids encapsulated liquid fluorocarbon nanoparticles by intravenous injection[J]. Chinese Journal of Ultrasound in Medicine, 2012, 28(3): 193-196.
- [10] ZHANG Peng, PORTER T. An in vitro study of a phase-shift nanoemulsion: a potential nucleation agent for bubble-enhanced HIFU tumor ablation[J]. Ultrasound in Medicine & Biology, 2010, 36(11): 1856-1866.
- [11] 叶光明,吴秋业,姜云云,等. 富勒烯在医药领域中的研究进展[J]. 药学实践杂志,2004,22(2):73-76.
- YE Guangming, WU Qiuye, JIANG Yunyun, et al. Research progress for fullerene in the domain of medicine[J]. The Journal of Pharmaceutical Practice, 2004, 22(2): 73-76.
- [12] 周洋,王志刚. 液态氟碳相变的研究进展[J]. 临床超声医学杂志,2012,14(6):402-405.
- ZHOU Yang, WANG Zhigang. Progress of phase-transition for liquid perfluorocarbon[J]. Journal of Ultrasound in Clinical Medicine, 2012, 14(6): 402-405.
- [13] 王智彪,李发琪,冯若. 治疗超声原理与应用[M]. 南京:南京大学出版社,2008:198-199.
- [14] 孙涛,巢骏,周冬香,等. C₆₀及其衍生物生物活性研究进展[J]. 安徽农业科学,2009,37(11):4846-4847.
- SUN Tao, CHAO Jun, ZHOU Dongxiang, et al. Research progress on biological activity of C₆₀ and its derivatives[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(11): 4846-4847.