

- [J]. *Vet Parasitol*, 2011, 183(1-2): 166-170.
- [39] Qian W, Wang H, Su C, *et al.* Isolation and characterization of *Toxoplasma gondii* strains from stray cats revealed a single genotype in Beijing, China [J]. *Vet Parasitol*, 2012, 187 (3-4): 408-413.
- [40] Wang L, Chen H, Liu DH, *et al.* Genotypes and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* isolates from animals and humans in China [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53483.
- [41] Lindstrom I, Sundar N, Lindh J, *et al.* Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from Ugandan chickens reveals frequent multiple infections[J]. *Parasitology*, 2008, 135(Pt 1): 39-45.
- [42] Velmurugan GV, Dubey JP, Su C. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe[J]. *Vet Parasitol*, 2008, 155(3-4): 314-318.
- [43] Al-Kappany YM, Rajendran C, Abu-Elwafa SA, *et al.* Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates in Egyptian feral cats reveals new genotypes[J]. *J Parasitol*, 2010, 96(6): 1112-1114.
- [44] Mercier A, Devillard S, Ngoubangoye B, *et al.* Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 4(11): e876.
- [45] Jensen KD, Wang Y, Wojno ED, *et al.* *Toxoplasma* polymorphic effectors determine macrophage polarization and intestinal inflammation[J]. *Cell Host Microbe*, 2011, 9(6): 472-483.
- [46] Yamamoto M, Standley DM, Takashima S, *et al.* A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3[J]. *J Exp Med*, 2009, 206(12): 2747-2760.
- [47] Rosowski EE, Lu D, Julien L, *et al.* Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein[J]. *J Exp Med*, 2011, 208(1): 195-212.
- [48] Khaminets A, Hunn JP, Konen-Waisman S, *et al.* Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole[J]. *Cell Microbiol*, 2010, 12(7): 939-961.
- [49] 郑斌, 陆绍红. 刚地弓形虫免疫逃避相关分子的研究进展[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2012, 30(5): 396-400.
- [50] Su C, Khan A, Zhou P, *et al.* Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(15): 5844-5849.

(收稿日期: 2012-12-26 编辑: 杨频)

文章编号: 1000-7423(2013)-04-0324-03

【研究简报】

## 高吸水性树脂联合超声造影剂对 HIFU 杀伤棘球蚴原头节的增效作用

蔡辉<sup>1,2</sup>, 陈露露<sup>3</sup>, 叶彬<sup>1,2\*</sup>, 赵海龙<sup>4</sup>, 刘爱波<sup>1,2</sup>, 张静<sup>1,2</sup>, 赵毅峰<sup>5</sup>

**【摘要】** 为探索高吸水性树脂 (superabsorbent polymer, SAP) 与超声造影剂 (ultrasound contrast agent, UCA) 协同增强高强度聚焦超声 (high intensity focused ultrasound, HIFU) 杀伤棘球蚴原头节的效果, 将 30 管棘球蚴原头节悬液 (各含约 6 000~7 500 个原头节) 分为 5 组, 分别为 A 组 (对照组, 仅给予无功率 HIFU 普通超声辐照)、B 组 (单纯 HIFU 辐照, 50 W)、C 组 (HIFU 辐照+10  $\mu$ l UCA)、D 组 (HIFU 辐照+0.01 g SAP) 和 E 组 (HIFU 辐照+10  $\mu$ l UCA+0.01 g SAP)。结果显示, B 组超声图像灰度变化明显, 悬液温度和原头节死亡率 (26.0  $\pm$  0.2  $^{\circ}$ C、30.4%) 均比 A 组的 (18.0  $\pm$  0.1  $^{\circ}$ C、1.9%) 高 ( $P < 0.01$ )。C、D 组的超声图像灰度变化比 B 组更为明显, 悬液温度 (27.0  $\pm$  0.2  $^{\circ}$ C、28.2  $\pm$  0.2  $^{\circ}$ C) 和原头节死亡率 (49.96%、53.69%) 也比 B 组的高 ( $P < 0.01$ )。E 组悬液温度 (28.4  $\pm$  0.3  $^{\circ}$ C) 与 C、D 组的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但原头节死亡率 (69.7%) 远高于 C、D 组 ( $P < 0.01$ ), 且死亡的原头节结构破坏较其余 3 组更为严重, 内部结构消失。

**【关键词】** 高吸水性树脂; 超声造影剂; 高强度聚焦超声; 棘球蚴; 原头节

中图分类号: R532.32

文献标识码: B

### Enhancement of *in Vitro* Protoscolicidal Effects of High-intensity Focused Ultrasound by a Superabsorbent Polymer and Ultrasound Contrast Agent

CAI Hui<sup>1,2</sup>, CHEN Lu-lu<sup>3</sup>, YE Bin<sup>1,2\*</sup>, ZHAO Hai-long<sup>4</sup>, LIU Ai-bo<sup>1,2</sup>, ZHANG Jing<sup>1,2</sup>, ZHAO Yi-feng<sup>5</sup>

(1 Department of Pathogenic Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2 Research Center for Molecular Medicine and Tumor, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3 Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 4 Department of pathogenic biology, Medical College, Qinghai University, Xining 810001, China; 5 Department of Interventional Radiology, the Hospital Affiliated to Qinghai University, Xining 810001, China)

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30972567)

作者单位: 1 重庆医科大学病原生物学教研室, 重庆 400016; 2 重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016; 3 重庆医科大学药理学教研室, 重庆 400016; 4 青海大学医学院病原生物学教研室, 西宁 810001; 5 青海大学附属医院介入科, 西宁 810001

\* 通讯作者, E-mail: yebina@sohu.com

**【Abstract】** This study evaluated whether or not a superabsorbent polymer(SAP) combined with ultrasound contrast agent (UCA) could enhance damage efficacy of high intensity focused ultrasound (HIFU) on *Echinococcus granulosus* protoscolices *in vitro*. Thirty test tubes each with 6 000-7 500 protoscolices were divided into 5 groups: group A (blank control) without HIFU treatment, group B treated with HIFU (50 W) only, group C treated with 10  $\mu$ l UCA and HIFU, group D treated with 0.01 g SAP and HIFU, group E treated with 10  $\mu$ l UCA, 0.01g SAP, and HIFU. In group B, echo enhancement of ultrasound image, suspension temperature(26.0  $^{\circ}$ C $\pm$ 0.2  $^{\circ}$ C) and protoscolices mortality(30.4%) were higher than that of group A(18.0  $^{\circ}$ C $\pm$ 0.1 $^{\circ}$ C, 1.9%)( $P$ <0.01). Compared with group B, the echo enhancement of ultrasound image, suspension temperature (27.0  $^{\circ}$ C $\pm$ 0.2  $^{\circ}$ C, 28.2  $^{\circ}$ C $\pm$ 0.2  $^{\circ}$ C) and protoscolices mortality (50.0%, 53.7%) of groups C and D increased significantly ( $P$ <0.01). In group E, more protoscolices were stained in red and their internal structures were indistinct. By chi-square test, the protoscolices mortality of group E(69.7%) was higher than that of groups C and D ( $P$ <0.01). There was no significant difference in suspension temperature among the 3 groups.

**【Key words】** Superabsorbent polymer; Ultrasound contrast agent; High intensity focused ultrasound (HIFU); Hydatid; Protoscolex

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30972567)

\* Corresponding author, E-mail: yebina@sohu.com

棘球蚴病是细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*) 的幼虫寄生人体所致的一种严重的人兽共患病<sup>[1]</sup>。手术是目前治疗该病的最主要方法,术中泄漏和术后残留的原头节易引起棘球蚴病的复发。

高强度聚焦超声 (high intensity focused ultrasound, HIFU) 已用于实质性肿瘤的临床治疗<sup>[2]</sup>。该法具有非侵入性和微创性的特点,将其用于治疗棘球蚴病能解决手术治疗引起的一系列并发症。HIFU 对离体原头节有一定的杀伤作用<sup>[3]</sup>。孔璟等<sup>[4]</sup>发现加入超声造影剂 (ultrasound contrast agent, UCA) 能增强 HIFU 对离体原头节的杀伤效应,且 UCA 的用量与悬液的比例存在一定的关系。为解决超声波无法在囊液内聚焦的问题,将高吸水性树脂 (superabsorbent polymer, SAP) 加入原头节悬液之后,可通过增强 HIFU 的热效应提高 HIFU 对离体原头节的杀伤力<sup>[5,6]</sup>。因此,本研究将 UCA 与 SAP 联合应用,观察其对 HIFU 辐照杀伤离体原头节是否具有增效作用。

## 1 材料与方 法

**1.1 棘球蚴来源** 感染棘球蚴的羊肝采自青海省西宁市某屠宰场。

**1.2 主要试剂和仪器** 超声造影剂由重庆医科大学附属第二医院超声影像学研究所提供,参照文献[4]的方法,用 5 ml 生理盐水将其溶解成微泡浓度约为  $1 \times 10^9$  个/ml 的 UCA 悬液。高吸水性树脂由本室制备<sup>[6]</sup>。JC 型高强度聚焦超声肿瘤治疗系统由青海大学附属医院提供。

**1.3 实验分组** 参照文献[5]的方法,从棘球蚴中无菌抽取囊液和原头节,置于 10 ml 玻璃离心管中,待原头节自然沉积 5 min 后弃上清,用清亮的囊液漂洗 3 次,0.1%伊红染色观察其活力。将其密度调整为 4 000~5 000 个/ml,置于特制的透声无菌聚丙烯试管中 (试管底部覆盖透声膜,容量约 8 ml),每管 1.5 ml。将 30 管原头节悬液分为 5 组,分别为 A 组 (对照组),仅给予无功率 HIFU (普通超声) 辐照; B 组 (单纯 HIFU 辐照); C 组 (HIFU 辐照+10  $\mu$ l UCA); D 组 (HIFU 辐照+0.01 g SAP); E 组 (HIFU 辐照+10  $\mu$ l UCA+0.01 g SAP)。

**1.4 HIFU 参数** 参照文献[4,5],将盛有原头节悬液的试管固定于试管夹上,其底部浸入水囊约 1 cm。利用超声监控进行定位扫描。辐照方式为点扫描,将超声波聚焦于悬液的中间,HIFU 声功率为 50 W,频率为 1.0 MHz。每次辐照 5 s,冷却 2 s,共辐照 3 次。为观察原头节悬液的温度变化,本实验的水囊水温和室温均为 18.0  $^{\circ}$ C。

**1.5 相关指标的测定** 辐照过程观察原头节悬液的回声变化,辐照结束后立即测量悬液温度,以每组 6 管的温度平均值作为效应指标。将悬液混匀,用 0.1%伊红染色涂片,低倍镜随机视野观察原头节形态变化,每张涂片至少观察 100 个原头节,统计原头节死亡率。

**1.6 统计学分析** 采用 PASW 18.0 软件进行统计学分析。温度采用单因素方差分析,死亡率采用卡方检验。

## 2 结 果

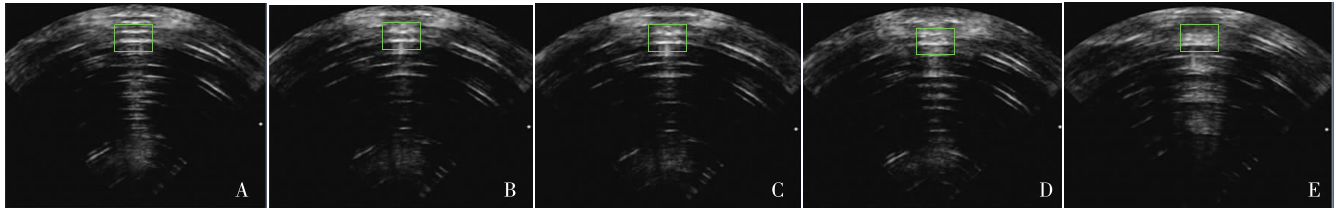
**2.1 超声监控图像** 超声监控显示, A 组原头节悬液上下液面显示强回声,内部存在一均匀液性暗区。B 组超声图像灰度变化明显,原头节悬液内部出现少量点状回声增强。C 组悬液内部出现点状回声增强,且回声增强。D 组悬液内部回声增强,稍弱于上下液面的回声, C、D 组超声图像灰度变化比 B 组更为明显。而 E 组悬液内部回声增强,与上下液面回声接近 (图 1)。

**2.2 原头节悬液温度** B 组原头节悬液温度(26.0  $^{\circ}$ C $\pm$ 0.2  $^{\circ}$ C) 高于 A 组 (18.0  $^{\circ}$ C $\pm$ 0.1  $^{\circ}$ C) ( $P$ <0.01)。C 组 (27.0  $^{\circ}$ C $\pm$ 0.2  $^{\circ}$ C)、D 组 (28.2  $^{\circ}$ C $\pm$ 0.2  $^{\circ}$ C) 明显高于 B 组 (均  $P$ <0.01), E 组 (28.4  $^{\circ}$ C $\pm$ 0.3  $^{\circ}$ C) 和 C、D 组相比,差异无统计学意义 ( $P$ >0.05)。

**2.3 原头节死亡率** B 组原头节死亡率 (30.4%) 高于 A 组 (1.9%) ( $\chi^2=362.437$ ,  $P$ <0.01)。C 组 (50.0%)、D 组 (53.7%) 明显高于 B 组 ( $\chi^2=94.728$ ,  $\chi^2=30.735$ , 均  $P$ <0.01), C 组与 D 组的原头节死亡率差异无统计学意义 ( $\chi^2=3.455$ ,  $P$ >0.05)。与 B 组、C 组和 D 组相比, E 组 (69.7%) 的原头节死亡率最高 ( $\chi^2=368.185$ ,  $\chi^2=101.681$ ,  $\chi^2=67.008$ ,  $P$  均 <0.01)。

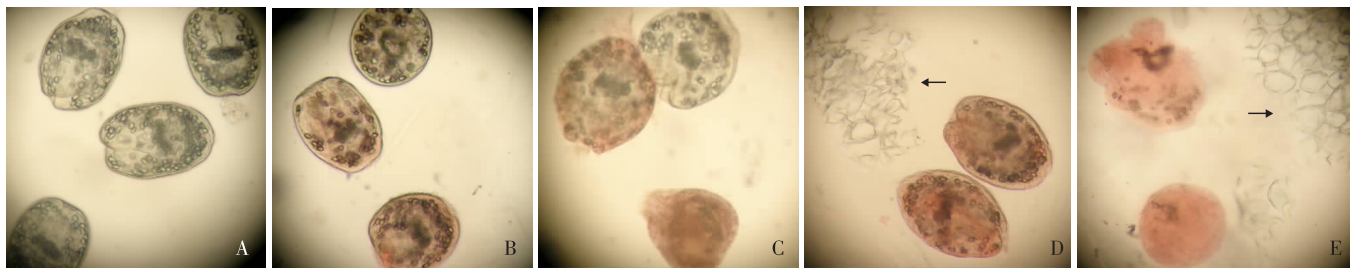
2.4 原头节形态变化 A 组原头节未被染色, 呈透明状, 内部结构如头钩、钙颗粒等清晰可见 (图 2A)。B 组部分原头节被伊红染成红色 (图 2B)。C 组近半数原头节被染成红色, 其中部分深染, 内部结构不清 (图 2C)。D 组近半数原头节深

染, 内部结构隐约可见, 镜下可观察到 SAP 颗粒 (图 2D)。E 组大多数原头节深染, 无法观察到内部结构, 可见 SAP 颗粒 (图 2E)。



A~E: 分别为 A~E 组。绿色框内为原头节悬液。

图 1 原头节悬液超声图像变化



A~E: 分别为 A~E 组。箭头所指部分为 SAP 颗粒。

图 2 不同 HIFU 处理后原头节形态变化

### 3 讨论

HIFU 利用超声波的可聚焦性和软组织的穿透性等物理特性, 将超声波穿过皮肤汇聚于治疗靶区, 在不伤害病灶周围正常组织的情况下使靶区组织产生凝固性坏死, 从而达到治疗作用。因此, HIFU 消融的两个主要作用机制为热效应和空化效应<sup>[7]</sup>。HIFU 对离体原头节和棘球蚴均有一定的杀伤作用<sup>[3,8,9]</sup>。由于包裹内部充满囊液, HIFU 超声波不能较好地液体内聚焦, 导致一定功率的 HIFU 并不能完全杀灭原头节, 而残留的原头节可引起棘球蚴病的复发<sup>[10]</sup>。虽然提高 HIFU 的治疗剂量, 如增加 HIFU 功率或者延长治疗时间, 可完全杀灭原头节, 但此时也会增加发生 HIFU 治疗并发症的概率。因此, 有必要使用 HIFU 增效剂。

超声监控能显示治疗有效的特征性表现, 通过观察超声图像的灰度值变化, 可对制定治疗剂量和判断治疗效果起到间接的指导作用<sup>[11]</sup>。本试验超声图像的变化表明, UCA 与 SAP 单独或联用均可增强 HIFU 对离体原头节的杀伤力, 在 UCA 与 SAP 联用时, 对 HIFU 的增效作用最佳。UCA 可同时增强 HIFU 的空化效应和热效应, 前者为主要增效机制。SAP 改变了囊液性质, 使超声波能更好聚焦, 通过提升 HIFU 的热效应来增强其对离体原头节的杀伤作用。SAP 改变悬液性质后, 悬液中的原头节不易移动, 亦可提高 HIFU 的杀伤作用。当 UCA 和 SAP 联用时, 上述几点可同时发挥作用。但尚需进行动物试验, 以探索此法在临床应用的可能性。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Moro P, Schantz PM. Echinococcosis: a review[J]. Int J Infect Dis, 2009, 13(2): 125-133.
- [ 2 ] Al-Bataineh O, Jenne J, Huber P. Clinical and future applications of high intensity focused ultrasound in cancer [J]. Cancer Treat Rev, 2012, 38(5): 346-353.
- [ 3 ] 王俊安, 邹晓毅, 叶彬, 等. 高强度聚焦超声辐照后细粒棘球蚴囊壁的病理变化 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 25(6): 462-465.
- [ 4 ] 孔璟, 叶彬, 张静, 等. 高强度聚焦超声结合微泡造影剂杀伤原头蚴的效果[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(8): 687-691.
- [ 5 ] Zhang J, Ye B, Kong J, et al. In vitro protoscolicidal effects of high-intensity focused ultrasound enhanced by a superabsorbent polymer[J]. Parasitol Res, 2013, 112(1): 385-391.
- [ 6 ] 张静, 孔璟, 叶彬, 等. 自制高吸水性树脂对棘球蚴囊液吸水性能的测试[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 27(12): 1090-1093.
- [ 7 ] Kennedy J, Ter Haar G, Cranston D. High intensity focused ultrasound: surgery of the future?[J]. Brit J Radiol, 2003, 76(909): 590-599.
- [ 8 ] 邹晓毅, 叶彬, 王俊安, 等. 高强度聚焦超声波的两种辐照模式对棘球蚴杀伤效果的比较研究 [J]. 中国超声医学杂志, 2007, 23(8): 574-577.
- [ 9 ] Zou XY, Wang JA, Zhao HL, et al. Echinococcus granulosus: Protoscolicidal effect of high intensity focused ultrasound[J]. Exp Parasitol, 2009, 121(4): 312-316.
- [ 10 ] 王怀禄, 孙厚坦, 赵夏夏, 等. 肝包虫病术后复发因素的探讨 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1997, 15(1): 61.
- [ 11 ] Li CX, Xu GL, Jiang ZY, et al. Analysis of clinical effect of high-intensity focused ultrasound on liver cancer [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(15): 2201-2204.

(收稿日期: 2012-12-07 编辑: 衣凤芸)