

❖ 实验研究

Microbubble-enhanced non focused ultrasound for treatment of hepatic trauma in rabbits

TIAN Meng, ZHAO Dawei, YANG Jianzheng, DU Peng, WANG Xiaojun, LI Tao*

(Department of Ultrasound, Daping Hospital & Institute of Surgery Research,
Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective** To explore the value of microbubble-enhanced non focused ultrasound for hepatic trauma in rabbits. **Methods** All of 25 hepatic trauma rabbit models which had hepatic injury were included and randomly divided into ultrasound (US) group, microbubble (MB) group and ultrasound and microbubble (USMB) group. Based on different acoustic intensity, 15 rabbits in the USMB group were randomly divided into three subgroups: USMB1 (0.11 W), USMB2 (0.55 W) and USMB3 (1.10 W), each subgroup contained five rabbits. The blood bleeding pre-and post-treatment and visual score post-treatment were evaluated. The contrast-enhanced ultrasound was used to analyze the level of blood perfusion of treatment area. The liver specimens were stained using HE to analyze area ratio variation of hepatic plate/hepatic sinusoid. **Results** The bleeding weigh and visual scores after treatment of the USMB group were significantly lower than that of the US group (all $P < 0.05$). Initial peak intensity (PI) ratio after treatment of three USMB subgroup was significantly lower than that of the US group (all $P < 0.05$). Hepatic cell in the USMB group became edema and compress the hepatic sinus, blood vessels in the portal area and the central vein, hepatic plate/hepatic sinusoid area ratio were 48.75 ± 9.91 and 35.66 ± 8.43 in the USMB1 and USMB2 subgroups, respectively, significantly higher than that in the US group (1.98 ± 0.07 , $P < 0.05$). **Conclusion** The microbubbles-enhanced non focused ultrasound can be used to make rapid hemostasis on hepatic trauma and does not affect the blood perfusion of normal liver in rabbits.

[Key words] Microbubble; Hepatic trauma; Cavitation; Hemostasis; Ultrasound therapy

DOI:10.13929/j.1003-3289.2016.03.002

微泡增强非聚焦超声治疗兔肝创伤

田 猛, 赵大威, 阳建政, 杜 鹏, 王孝君, 李 陶*

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所超声科, 重庆 400042)

[摘 要] **目的** 探讨微泡增强的非聚焦超声治疗肝脏创伤的价值。**方法** 用 25 只健康新西兰大白兔建立肝脏创伤出血模型, 并随机分为超声(US)组、微泡(MB)组和超声微泡(USMB)组, 根据不同的声功率, 将 USMB 组分为 3 个亚组: USMB1(0.11 W)、USMB2(0.55 W)和 USMB3(1.10 W); 每组 5 只实验动物。评价治疗前出血量、治疗后渗血量以及视觉评分, 并进行 CEUS 分析治疗区域的血流灌注水平, 最后取肝脏标本行组织学 HE 染色、分析肝板和肝窦面积比例变化。**结果** USMB 组治疗后渗血量和视觉评分均显著低于 US 组(P 均 < 0.05); 3 个 USMB 亚组治疗后即刻的 CEUS 峰值声学密度值(PI)均明显低于 US 组(P 均 < 0.05); USMB 组肝细胞明显水肿并压迫肝窦、汇管区血管和中央静脉, USMB1、USMB2 亚组肝板/肝窦面积比率分别为 48.75 ± 9.91 、 35.66 ± 8.43 , 明显高于 US 组的 1.98 ± 0.07 (P 均 < 0.05)。**结论** 微泡增强的非聚焦超声可以对肝脏创伤进行快速止血且不影响正常肝脏的血流灌注。

[基金项目] 国家自然科学基金(81271586)、重庆市自然科学基金(cstc2012jjB10034)。

[第一作者] 田猛(1986—), 男, 云南建水人, 在读硕士。研究方向: 治疗超声用于肝脏止血的研究。E-mail: cike_tm@163.com

[通信作者] 李陶, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所超声科, 400042。E-mail: taoli39@163.com

[收稿日期] 2015-06-02 **[修回日期]** 2015-12-01

[关键词] 微泡;肝创伤;空化效应;止血;超声治疗

[中图分类号] R445.1; R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2016)03-0328-05

肝创伤是常见的腹腔脏器损伤,占腹部创伤的 22.0%~24.4%^[1-2],仅次于脾脏损伤(40.6%),占第 2 位^[1]。肝创伤病理类型中单纯性和多发性肝裂伤分别占 45.45%和 17.71%,其中 AAST 分级以 II~III 级为主、占 56.6%~71.8%^[3]。肝创伤所致的活动性出血是导致患者死亡的重要原因,统计资料显示腹腔内积血量>1 000 ml 的比例达 59.1%,而失血性休克占腹腔积血患者的 92.5%^[1]。严重肝创伤往往还会累及其他脏器,合并伤的存在使患者死亡率急剧上升。研究^[4]报道,肝创伤后 1 h 内死亡的最常见原因是合并创伤性颅脑损伤和腹腔内大出血。

近年来,随着微创外科的发展,肝周填塞术、选择性肝动脉栓塞术、CT 或者超声引导下介入术等损伤控制手术以及非手术管理逐渐成为救治血流动力学稳定的肝创伤的主要方法^[5-6]、占 50%~85%^[7]。另外,高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)^[8]和微泡增强的 HIFU^[9]、微波^[10]或射频热凝固止血^[11]等用于治疗肝脏出血也有相关的基础研究报告。近年来研究^[12]表明,微泡增强的超声空化效应有影响肝脏血管通透性,暂时阻断正常肝血流等作用,并有学者^[13]应用脂质微泡增强的超声空化效应进行肝创伤止血的初步研究。本研究旨在对不同参数的治疗超声联合脂质微泡对肝创伤治疗效果、肝脏血流再灌注及肝脏结构的影响进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 健康新西兰大白兔 25 只,雌雄不限,体质量约 1.8~2.5 kg,平均 (2.15 ± 0.03) kg (第三军医大学大坪医院实验动物中心提供),随机分为:超声(ultrasound, US)组、微泡(microbubbles, MB)组、超声微泡(ultrasound and microbubbles, USMB)组。根据不同的声功率,将 USMB 组分为 3 个亚组:USMB1(0.11 W)、USMB2(0.55 W)和 USMB3(1.10 W)。每组 5 只实验动物。

1.2 定制非聚焦超声治疗仪 实验所用的非聚焦超声治疗仪由重庆医科大学超声影像学研究所研制,频率 1.00~1.10 MHz,单路晶片输出声功率可调,档位为 1~20 档(0.11~3.50 W),脉冲占空比为 50%,脉冲输出频率为 1 KHz。

1.3 肝创伤模型 术前 12 h 内对实验动物禁饲不禁饮,经兔耳缘静脉缓慢推注 2.5%戊巴比妥钠 30 mg/kg

实施麻醉,同时建立耳缘静脉通道。然后将实验动物仰卧位定于解剖台上,上腹部备皮,碘伏消毒皮肤,肋缘下斜切口,逐层切开并分离皮肤、筋膜、腹肌及腹膜至腹腔,暴露肝脏后轻轻将肝左叶牵出腹腔,以无菌生理盐水纱布固定。用手术刀直接在兔肝左叶实质较厚处切割肝脏,制备肝创伤切口(长约 15 mm、深约 3 mm)。

1.4 治疗前出血量和治疗后渗血量测定 创伤模型建立后即刻,用滤纸收集出血量 10 s;治疗完成后用滤纸收集治疗后 5 min 渗血总量。

1.5 超声治疗 对 USMB 组动物术后予以第二代“脂氟显”脂质微泡(第三军医大学新桥医院超声诊断科提供,核心气体主要为全氟丙烷,粒径平均为 2 μ m,浓度约 $4 \times 10^9 \sim 9 \times 10^9$ /ml),剂量 0.1 ml/kg 体质量,再用生理盐水稀释至 1 ml,经兔耳缘静脉缓慢注射并用 2 ml 生理盐水冲管。同时用治疗超声垂直肝脏创面辐照 5 min,治疗过程中予以生理盐水充分耦合,超声治疗头与肝脏表面仅轻微接触、避免压迫;US 组用等剂量的生理盐水替代超声微泡;MB 组仅用超声治疗探头假照肝脏创面 5 min。

1.6 超声影像分析 创伤模型建立前,先用常规二维超声及彩色多普勒血流显像(Pillips IU22,内置声学密度分析软件 QLAB)扫描肝脏,了解肝叶形态、厚度及血流情况。对 USMB 组、US 组、MB 组实验兔经耳缘静脉团注“脂氟显”微泡 0.01 ml/kg 体质量进行肝脏 CEUS,观察肝创伤模型治疗前和治疗后 1 h 内血流灌注情况,记录峰值声学密度值(peak intensity, PI)并计算每个时间点肝脏治疗区与正常区的 PI 比值。US 组为避免造影检查后残留于体循环的超声微泡在治疗超声辐照时产生空化效应而影响实验结果,因此不进行创伤模型建立前 CEUS 检查。

1.7 出血视觉评分 治疗前及治疗完成后即刻对创口出血情况进行评分,根据下列等级标准判断:0 分,完全止血;1 分,仅有缓慢渗血;2 分,缓慢渗出和轻微的活动性出血;3 分,明显的活动性出血;4 分,显著的大量出血。

1.8 组织学分析 实验动物肝脏治疗靶区标本,用 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,行常规 HE 染色,于光镜下观察其组织学改变。用 Image J 软件(NIH Image)将 RGB 颜色图像转变成灰度图像,设定阈值或进行二值化处理,测量肝血窦和肝板面积,计算肝血

窦和肝板面积所占整个图像的百分比及二者的比率。

1.9 统计学分析 采用 Graphpad Prism 6.0 软件进行统计分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,治疗后渗血量和肝板/肝窦面积比率组间比较采用单因素方差分析并进行 Dunnett's 多重比较检验,视觉评分组间比较采用双因素方差分析并进行 Sidak's 多重比较检验,组内治疗前后比较用配对双尾 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 出、渗血量 各组治疗前肝脏创口均有明显出血,组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。予以微泡增强的超声治疗后,不同能量的 USMB 组在治疗后的渗血量均明显低于 US 组和 MB 组(图 1),USMB1 组和 USMB2 组的 5 min 渗血量与 US 组差异有统计学意义(P 均 < 0.05 ,图 2)。

2.2 治疗前后出血视觉评分 各实验组治疗前肝脏创口均见明显出血,视觉评分组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。USMB 的 3 个亚组治疗后视觉评分均降低,显著低于 US 组(P 均 < 0.05);而 US 组和

MB 组的差异无统计学意义($P > 0.05$)。USMB1 组、USMB2 组和 USMB3 组治疗后的出血视觉评分均显著低于治疗前(P 均 < 0.05),见图 3。

2.3 肝脏造影结果 各实验组治疗前肝脏 CEUS 结果无明显差异。为了避免治疗前 CEUS 对后续单纯 US 治疗造成影响,对 US 组未行治疗前 CEUS 检查。US 组与 MB 组治疗后的 CEUS 图像显示肝脏血流灌注无明显差异;USMB 组治疗后,靶区肝脏有明显无增强区,且 USMB1 组最为明显,治疗后 10 min 肉眼见靶区肝脏血流灌注开始恢复(图 4)。

各实验组治疗前 PI 比值组间比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。3 个 USMB 亚组治疗后即刻 PI 比值有不同程度的下降,均显著低于 US 组(P 均 < 0.05),治疗后 10 min 随即恢复至接近 1 的水平,并保持在一个相对稳定的水平,但整个过程中的 PI 比值始终低于 1,且低于 US 组和 MB 组;而 US 组和 MB 组的 PI 比值始终在 1 附近波动,见图 5。

2.4 病理学检查 光镜下观察发现,US 组和 MB 组肝组织的镜下结构显示清晰,肝细胞、肝窦及肝内血管形态均无明显异常改变。而 3 个

USMB 亚组治疗后,治疗区肝细胞体积增大,且有明显水样变性,以小静脉周围的肝细胞为显著,HE 染色呈现大片的泛白区域;肿大的肝细胞挤压肝窦、Disse 间隙、汇管区血管以及中央静脉,使之显著变窄,USMB1 组和 USMB2 组最为明显。USMB 组可见血管内凝血存在,见图 6。

US 组和 MB 组的肝板和肝窦面积所占比例分别为 66.41% vs 33.59% 和 66.04% vs 33.96%;而 USMB1、USMB2 和 USMB3 各亚组的肝板和肝窦面积所占比例分别为 97.38% vs 2.62%、96.34% vs 3.66% 和 88.27% vs 11.73%。US 组和 MB 组的肝板/肝窦面积比值分别为 1.98 ± 0.07 和 1.97 ± 0.16 ,二者差异无统计学意义($P > 0.05$);USMB1、USMB2 和 USMB3 各亚组分别为 48.75 ± 9.91 、 35.66 ± 8.43 和 7.92 ± 0.66 ,其中仅 USMB1、USMB2 组与 US

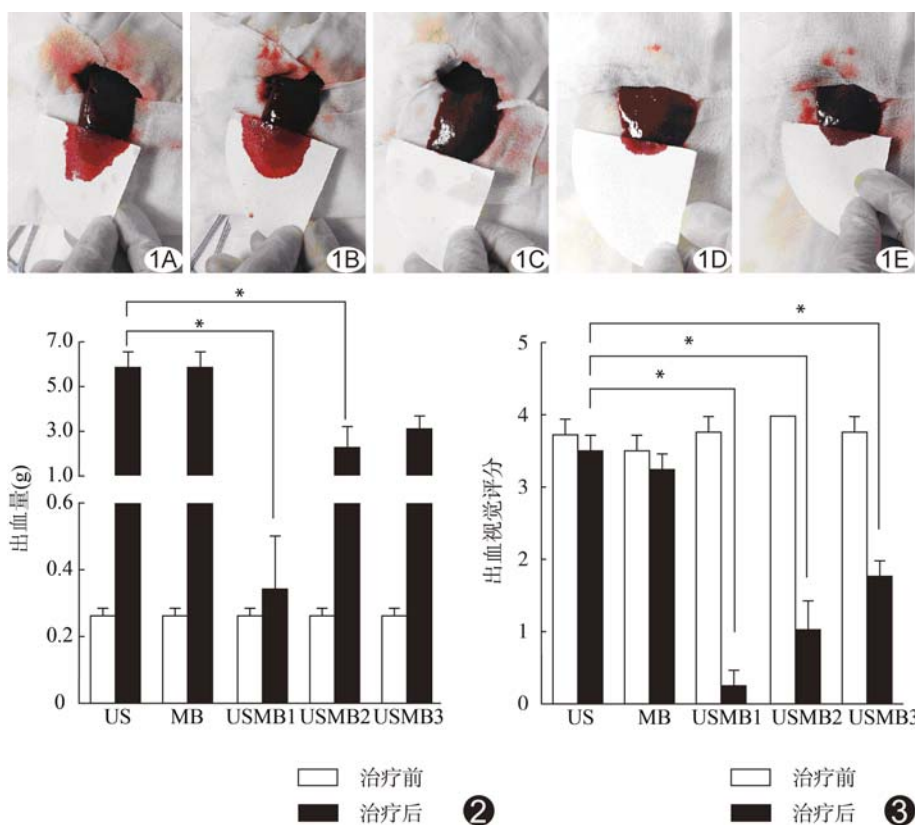


图 1 治疗后渗血量 A. US 组; B. MB 组; C. USMB1 组; D. USMB2 组; E. USMB3 组 图 2 治疗前 10 s 出血量和治疗后 5 min 渗血量比较 (* : $P < 0.05$) 图 3 治疗前后出血视觉评分比较 (* : $P < 0.05$)

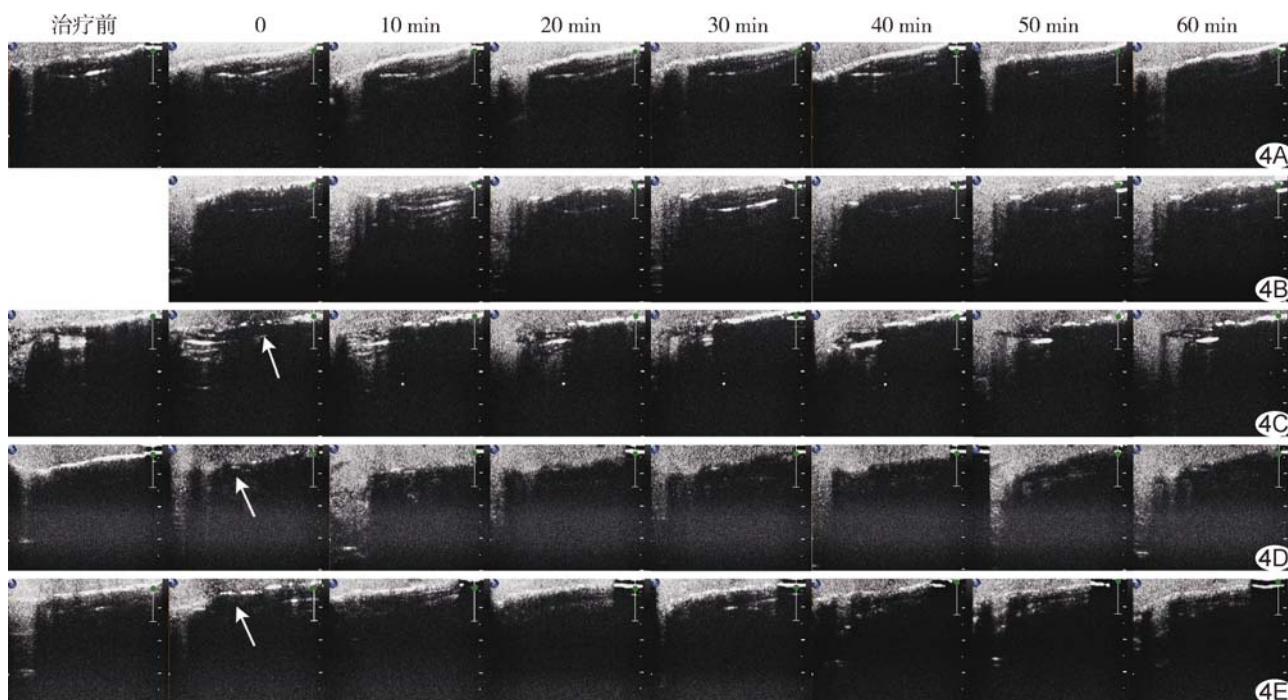


图 4 各实验组治疗前与治疗后各时间点肝脏 CEUS 图像 A. MB 组; B. US 组; C. USMB1 组; D. USMB2 组; E. USMB3 组 (箭示治疗区明显的无增强区)

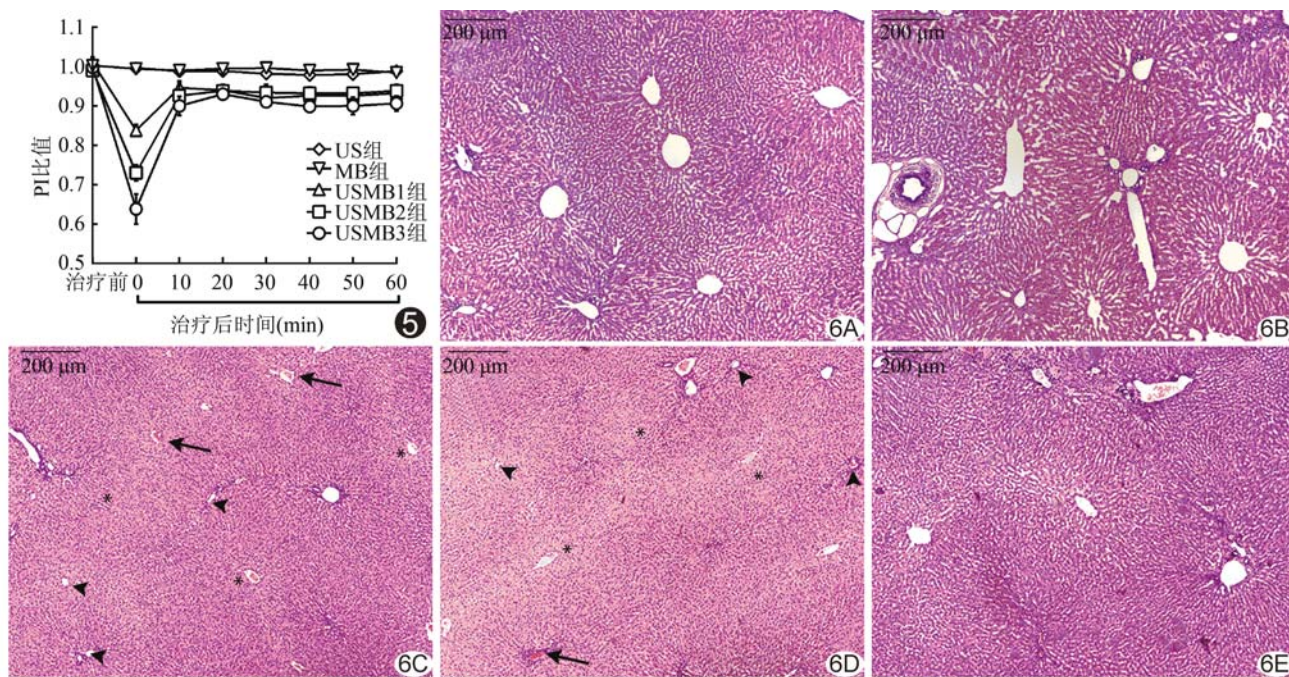


图 5 各实验组治疗前后 PI 比值-时间曲线 图 6 各实验组治疗后病理图(HE, ×40) A. US 组; B. MB 组; C. USMB1 组; D. USMB2 组; E. USMB3 组 (箭:血管中的凝血块;箭头:被压迫变小的血管;*:染色变浅区域)

组的差异有统计学意义(P 均 <0.05)。

3 讨论

近 30 年来,非手术管理和损伤控制手术已成为血

流动力学稳定肝脾损伤患者的治疗原则^[3-7],治疗的成功率已经增加到 90% 以上。近年来,探索更加方便、快捷、创伤小的治疗方法已成为肝创伤治疗的前沿。

HIFU^[8]、微波^[10]或射频热凝固止血^[11]等国内外均有相关的研究报道。这些方法虽然在止血方面取得了较好效果,但也存在有创、治疗设备要求较高、热效应损伤正常组织等缺点。微泡可以增强超声空化效应对血管内皮的损伤和增加其通透性,增强 HIFU 对肝脏的损伤作用^[12],并阻断正常肝血流灌注、达到止血目的^[14]。

本研究通过微泡增强非聚焦超声空化效应暂时阻断肝血流灌注达到肝创伤止血,治疗后的 10 min 实验组血流灌注即恢复接近至正常水平,并未再次出现出血。Feng 等^[13]报道的血流灌注观察时间跨度较大,未对治疗后的血流再灌注进行时间点比较密集的观察。本研究通过测定 CEUS 时治疗区域与正常区域的 PI 比值,明确看到治疗区域的血流灌注较正常区域变差,表明微泡增强的非聚焦超声使治疗区组织产生相应的变化。通过病理切片发现微泡增强的超声空化效应使肝细胞水肿,HE 染色切片上显示大片的泛白区域,即由于肝细胞水肿使得 HE 染色呈现淡染。肿大的肝细胞使肝窦、汇管区血管和中央静脉受压变窄,甚至消失。USMB1、USMB2 亚组肝板/肝窦面积比率分别为 48.75 ± 9.91 、 35.66 ± 8.43 ,明显高于 US 组的 1.98 ± 0.07 。考虑肝血流再灌注不能恢复至与正常对照相同水平,可能主要是由于超声空化产生的声孔效应使肝细胞通透性增高而导致细胞水肿,进而压迫肝窦和窦周间隙阻碍肝脏微循环,甚至形成微血栓所致。

本研究对不同功率的超声联合微泡对肝创伤的治疗效果进行了探讨,结果显示在固定的超声频率、占空比、超声发射模式下,治疗效果并不随治疗超声的功率增加而增强,反而是功率增加,效果变差。这是由于随声压增大,在超声正压相的声波对空化泡的拉伸作用增强,空化泡的半径增加幅度变大,其运动加剧;当声压继续增大,空化泡的半径在正压相增加到一定程度后,随后的负压相不能把空化泡压缩至较小的半径,从而导致空化效应减弱^[15]。

综上所述,本研究显示微泡增强的非聚焦超声空化效应可以使实验兔治疗区域的肝脏组织发生水肿、血管内凝血等组织学变化,从而压迫肝窦、汇管区血管和中央静脉,进而达到对肝脏创伤进行快速止血的目的,治疗区域可在短时间内恢复绝大部分的肝血流灌注,不会对正常肝脏组织造成明显的缺血损伤。然而,其止血和再通机制以及远期效应还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 麻晓林,杨志焕,王正国,等. 209 例肝脏损伤的流行病学特征及临床分析. 创伤外科杂志, 2002, 4(2): 87-90.
- [2] Sikhondze WL, Madiba TE, Naidoo NM, et al. Predictors of outcome in patients requiring surgery for liver trauma. *Injury*, 2007, 38(1): 65-70.
- [3] Prichayudh S, Sirinawin C, Sriussadaporn S, et al. Management of liver injuries: Predictors for the need of operation and damage control surgery. *Injury*, 2014, 45(9): 1373-1377.
- [4] Eberle BM, Schnüriger B, Inaba K, et al. Thromboembolic prophylaxis with low-molecular-weight heparin in patients with blunt solid abdominal organ injuries undergoing nonoperative management: Current practice and outcomes. *J Trauma*, 2011, 70(1): 141-146; discussion 147.
- [5] Leppäniemi AK, Mentula PJ, Streng MH, et al. Severe hepatic trauma: Nonoperative management, definitive repair, or damage control surgery? *World J Surg*, 2011, 35(12): 2643-2649.
- [6] Lv F, Tang J, Luo Y, et al. Percutaneous treatment of blunt hepatic and splenic trauma under contrast-enhanced ultrasound guidance. *Clin Imaging*, 2012, 36(3): 191-198.
- [7] Lin BC, Fang JF, Chen RJ, et al. Surgical management and outcome of blunt major liver injuries: Experience of damage control laparotomy with perihepatic packing in one trauma centre. *Injury*, 2014, 45(1): 122-127.
- [8] Vaezy S, Noble ML, Keshavarzi A, et al. Liver hemostasis with high-intensity ultrasound: Repair and healing. *J Ultrasound Med*, 2004, 23(2): 217-225.
- [9] Chung DJ, Cho SH, Lee JM, et al. Effect of microbubble contrast agent during high intensity focused ultrasound ablation on rabbit liver in vivo. *Eur J Radiol*, 2012, 81(4): E519-E523.
- [10] Tang J, Wang Y, Mei X, et al. Contrast-enhanced ultrasound-guided microwave tissue coagulation therapy for hepatic trauma: An experimental study. *J Trauma*, 2008, 64(4): 1079-1084.
- [11] Maroulis I, Spyropoulos C, Kalogeropoulou C, et al. Use of radiofrequency ablation for controlling liver hemorrhage in the emergency setting; report of two cases and review of the literature. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 2013, 19(2): 167-172.
- [12] 刘青,吴盛正,皋月娟,等. 超声空化阻断对兔肝血流灌注的影响. 中国医学影像技术, 2012, 28(8): 1440-1444.
- [13] Feng G, Liu J, Zhao X, et al. Hemostatic effects of microbubble-enhanced low-intensity ultrasound in a liver avulsion injury model. *PLoS One*, 2014, 9(5): e95589.
- [14] Gao Y, Gao S, Zhao B, et al. Vascular effects of microbubble-enhanced, pulsed, focused ultrasound on liver blood perfusion. *Ultrasound Med Biol*, 2012, 38(1): 91-98.
- [15] 崔方玲,纪威. 超声空化气泡动力学仿真及其影响因素分析. 农业工程学报, 2013, 29(17): 24-29.