

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.13.006

高强度聚焦超声阻断金地鼠颊囊白斑癌变的实验研究*

唐宇英^{1,2}, 邓 军^{1,3}, 陈方淳^{1,4△}

(1. 口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆 401147; 2. 重庆医科大学附属口腔医院
牙体牙髓科 400015; 3. 重庆医科大学附属口腔医院儿童牙病科 401147;
4. 重庆医科大学附属口腔医院口腔黏膜科 401147)

[摘要] **目的** 评价高强度聚焦超声(HIFU)治疗口腔白斑的有效性及其可行性。**方法** 将 30 只金地鼠分为两组, A 组($n=5$): 为空白对照组, 颊囊涂布生理盐水; B 组($n=25$) 两侧颊囊涂布 0.5% 二甲基苯并蒽(DMBA)丙酮液, 每周 3 次, 连续 5 周, 构建白斑动物模型。左侧为超声治疗侧, HIFU 剂量参数为功率 4 W, 时间 10 min, 右侧为模型对照侧, 不进行超声治疗, 均于超声治疗后 6 周时处死。取颊囊标本进行大体病理观察、光学显微镜下病理切片变化比较。**结果** 25 只金地鼠颊囊超声治疗侧(左侧)白斑、上皮异常增生和肿瘤发生率均低于模型对照侧(右侧), 高于空白对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** HIFU 治疗能有效降低金地鼠颊囊白斑的发生率并阻断其癌变。

[关键词] 高强度聚焦超声; 白斑; 金地鼠**[中图分类号]****[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)13-1744-03

Experimental study on high intensity focused ultrasound in blocking leukoplakia carcinogenesis of golden hamster cheek pouches*

Tang Yuying^{1,2}, Deng Jun^{1,3}, Chen Fangchun^{1,4△}

(1. Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing 401147, China;
2. Department of Operative Dentistry and Endodontics, Affiliated Stomatology Hospital,
Chongqing Medical University, Chongqing 400015, China; 3. Department of Pediatric Stomatology, Affiliated
Stomatology Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 401147, China; 4. Department of
Oral Medicine, Affiliated Stomatology Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 401147, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the effectiveness and feasibility of high intensity focused ultrasound(HIFU) in the treatment of oral leukoplakia. **Methods** Thirty golden hamsters were randomly divided into 2 groups. The group A($n=5$) as the blank control group was coated with saline at cheek pouch; the group B($n=25$) as the experimental group was coated with 0.5% dimethylbenzanthracene (DMBA) acetone solution at the cheek pouch, three times a week, for 5 consecutive weeks to set up the animal models of leukoplakia. The left side was treated with HIFU, with the dose parameter of 4 W and 10 min, and the right side was the model control side without ultrasonic treatment. All animals were sacrificed after 6-week ultrasonic treatment. The cheek pouch specimens were performed the gross pathological and microscopical comparison on the pathological sections. **Results** The occurrence rates of leukoplakia, epithelial dysplasia and tumor in the ultrasonic treated side (left side) of cheek pouches in 25 golden hamsters were significantly lower than those in the model control side (right side) and higher than those in the blank control group, the differences were statistically significant($P<0.05$). **Conclusion** The HIFU therapy can effectively reduce the occurrence rates of leukoplakia in golden hamster cheek pouches and block its carcinogenesis.

[Key words] high intensity focused ultrasound; leukoplakia; golden hamster

口腔黏膜白斑(oral leukoplakia, OLK)是“口腔黏膜上以白色为主的损害,不具有其他任何可定义的特征;一部分口腔白斑可转化为癌”。聚焦超声技术(focused ultrasound, FU)作为一种微创外科手术疗法,几十年来一直为国内外学者所推崇。1956年,有学者首次提出瞬时高强度超声比长时间低强度超声辐照治疗肿瘤效果更好^[1]。HIFU治疗外阴白斑的临床研究已有一定基础,并取得了一定的疗效^[2],口腔白斑同外阴白斑一样,均属于黏膜斑纹类慢性炎症性疾病,其主要病理变化在表层下的真皮层或黏膜固有层,表层病变是继发的。本研究拟在通过金黄色地鼠颊囊白斑模型的建立,探讨高强度聚焦超声(HIFU)治疗口腔白斑的可行性及有效性。

1 材料与方法

1.1 实验动物 纯种叙利亚雄性金地鼠 30 只(重庆医科大学实验动物中心), 4~8 周龄, 清洁级, 体质量 80~120 g, 常规条件下(温度 18~25℃, 湿度 50%~70%)分笼饲养, 每笼 5 只, 随意喂鼠食和水。

1.2 试剂 0.5% 二甲基苯丙蒽(DMBA, 美国, Sigma)丙酮溶液、生理盐水、HE 染色试剂盒(中国, 碧云天)。

1.3 方法

1.3.1 分组 将 30 只金地鼠分为两组, A 组($n=5$)为空白对照组, 颊囊涂布生理盐水; B 组($n=25$) 两侧颊囊涂布 0.5%

* 基金项目:重庆市科委应用基础研究项目(CSTC, 2010BB5364), 2013 年重庆高校创新团队建设计划资助项目。 作者简介:唐宇英(1978—), 硕士, 讲师/主治医师, 主要从事牙体牙周黏膜病的治疗研究。 △ 通讯作者, E-mail: fangchun_chen@sina.com。

DMBA 丙酮液,建立口腔白斑模型,左侧为超声治疗侧,右侧为模型对照侧,不进行超声治疗。

1.3.2 动物模型的建立 A组:乙醚麻醉金地鼠,无齿肠镊撑开颊囊口,用1号油画笔蘸取少量生理盐水,在颊囊做中央直径约2cm圆周式涂布10次,其后禁水禁食2h,每周3次,连续5周。B组:乙醚麻醉金地鼠,无齿肠镊撑开颊囊口,用1号油画笔蘸取少量0.5%DMBA丙酮液,在颊囊中央直径约2cm做圆周式涂布10次,其后禁水禁食2h,每周3次,连续5周。

1.3.3 HIFU 治疗 海极星 Seapostar CZF 型超声波治疗仪,调节 HIFU 剂量参数,输出功率 4 W,时间 10 min,对 B 组 25 只金地鼠颊囊左侧进行超声治疗,右侧为模型对照侧,不进行超声治疗。

1.4 检测指标

1.4.1 大体病理观察 对各组标本于 HIFU 治疗后 6 周内肉眼观察颊囊黏膜变化,记录黏膜病变类型(如:白斑与肿瘤),以及发生率。

1.4.2 光学显微镜下病理切片 对各组标本进行固定、石蜡包埋、切片、HE 染色,光学显微镜下观察病理变化。按世界卫生组织(1978)上皮异常增生 12 项标准,将标本分为正常、单纯增生、上皮异常增生和癌 4 级,分别以 1、2、3、4 表示。

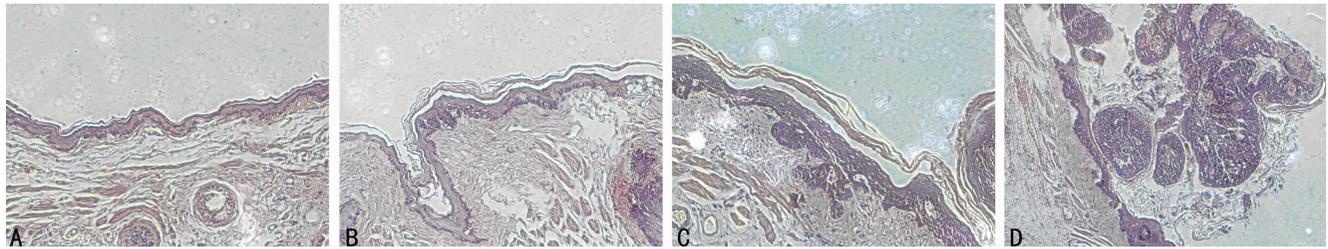
1.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,对发生率采用 χ^2 检验、非参数统计采用秩和检验进行统计。

2 结果

2.1 大体病理观察 5 只空白对照组两侧白斑与癌的发生率为 0,25 只金地鼠颊囊超声治疗侧(左侧)白斑与癌的发生率分别为 48%与 8%,模型对照侧(右侧)相应发生率则为 76%与 20%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 光学显微镜下病理切片

2.2.1 光学显微镜下病理切片 见图 1。标本分为正常、单纯增生、上皮异常增生和癌 4 级,分别以 1、2、3、4 表示。病理检查结果见表 1。超声治疗侧上皮异常增生分级低于模型对照侧,高于空白对照组($P < 0.05$)。



A: 正常; B: 单纯增生; C: 上皮异常增生; D: 癌。

图 1 光学显微镜下 HE 染色切片 (×40)

表 1 光学显微镜下病理切片检查结果 (n=60)

结果	空白对照	模型对照	HIFU 治疗	合计	秩次范围	平均秩次
1 级	10	1	11	22	1~22	11.5
2 级	0	7	5	12	23~34	28.5
3 级	0	12	7	19	35~53	44.0
4 级	0	5	2	7	54~60	57.0

3 讨论

口腔白斑一种常见而又难治的口腔黏膜斑纹类慢性炎症性疾病,世界卫生组织认定其是口腔内最常见的癌前病变,国内 1980 年普查结果口腔白斑患病率为 10.47%^[3](包括烟斑),癌变率约 5%~10%。另有研究报道,90% 的口腔癌由癌前病变转化而来。还有学者指出:口腔鳞癌的人群中有 17%~35% 的病例由口腔白斑发展而来^[4],而口腔癌占世界恶性肿瘤发生的第 6 位,因此对口腔白斑的治疗研究一直是国内外学者关注的重点。

寻找一种理想的白斑治疗方法,既要达到良好的治疗效果,消除白斑病变,对病变周围正常组织无创伤,又能防止复发及癌变,是十分必要的^[5]。目前国内外对口腔白斑的治疗研究集中在维甲酸(retinoic acid, RA)及其他药物、物理冷冻治疗及外科手术等方面^[6]。药物治疗是最被认同和探讨最多的方法。其中 RA 及其衍生物被认为是最有应用前景的药物。RA 具有很强的抑制上皮角化的作用,体内核维甲酸受体(nuclear

retinoic acid receptor- β , RAR- β) 的表达水平下降与口腔癌的发生密切相关^[7]。但 RA 具有明显的剂量相关毒性,研究表明可能存在抑癌及促癌的双重作用,限制了其在临床上的广泛应用。物理治疗白斑存在争议,例如微波辐射阻断金黄地鼠颊囊癌变实验研究发现:输出频率(2450±50)MHz,功率 II 档,辐射时间 2~3 s 时,DMBA 诱发金地鼠白斑癌变率比对照组低 4 倍,当输出频率保持不变、输出功率过高或辐射时间延长至 5 s 时,白斑癌变率反而增高^[8],结果说明口腔白斑的理疗效果取决于正确有效地控制技术参数。手术方面,较为统一的观点是只有在病理证实有中重度异常增生或癌变时才行切除术。因为手术后仍有 20%~30% 的高复发率,新近认为,这种复发与患者口腔黏膜的区域癌化(field defects) 因素有关,区域癌化是指口腔黏膜某部位出现异常增生时,其整个上呼吸道黏膜都对致癌因素易感(如吸烟),从而导致多部位的黏膜患癌的危险性增加甚至发展为癌前损害。

HIFU 导致靶组织损伤是多种机制综合影响的结果,工作原理主要是依靠机械效应、热效应、空化效应^[9-10]。同时还具有以下作用,(1)破坏肿瘤滋养血管:Yang 等^[11]应用高强聚焦超声照射肝脏时发现直径小于 0.2 mm 的血管可被直接破坏,对大血管相对较安全。关利铭等^[12]通过建立鼠肝动物模型的实验研究发现直径小于 200 μ m 的肿瘤微血管立即被聚焦超声破坏(550 W/cm², 4 s)。(2)免疫功能:Yang 等^[8]研究发现治疗后肿瘤原发灶及远处转移灶均会消退,认为 HIFU 能提高机体对肿瘤的特异性和非特异性免疫能力。沙卫红等^[13]发

现 HIFU 治疗效果与 HIFU 工作频率、输出功率及作用时间呈密切正相关。对于浅表病损组织的治疗,高频治疗头消融的效率和质量均优于低频治疗头,口腔白斑的主要病理改变是上皮增生或异常增生,属于浅表性组织病变。综上所述,HIFU 可能作为一种理想的白斑治疗方法,达到良好的治疗效果,不损伤病变周围正常组织,又能防止复发及癌变。

近年来,随着诊断技术、成像定位等相关技术的迅速发展,聚焦超声技术亦迅猛发展,逐渐应用到多个学科领域,其中较为成熟的是对肿瘤的治疗,目前在临床应用 HIFU 治疗的肿瘤主要包括前列腺癌、子宫肌瘤、胰腺癌、肝癌、膀胱癌、肾癌、浅表软组织肿瘤等^[14]。Gelet 等^[15]对 102 例失去根治机会的老年前列腺癌患者进行 HIFU 治疗,平均随访 19 个月,总有效率 66%,治疗前后前列腺特异抗原(prostate specific antigen, PSA)的变化有统计学意义,且疗效优于放疗组;Vaezy 等^[16]首先将 HIFU 用于裸鼠子宫肌瘤模型的治疗,治疗后 1 个月肿瘤体积平均缩小 91%,与安慰治疗组比较差异有统计学意义;何中庚等^[17]总结了 HIFU 用于 869 例患者的治疗结果,其中包括乳腺癌、肝癌、软组织肿瘤、恶性骨肿瘤等 26 种肿瘤,结果显示对盆腹腔的恶性实体肿瘤、子宫肌瘤和前列腺疾病均具有明显的疗效。

外阴白斑同口腔白斑一样,均属于黏膜斑纹类慢性炎症性疾病,其主要病理变化在真皮层或固有层,表皮病变是继发的,而 HIFU 治疗外阴白斑的临床研究已有一定基础,并取得了一定的疗效。吴艺佳等^[18]采用 HIFU 治疗 194 例外阴白斑发现,不同病理类型患者聚焦超声治疗效果比较差异无统计学意义($P>0.05$),李成志等^[2]采用 HIFU 治疗外阴白斑,经临床和病理结果分析发现,患者的瘙痒症状基本缓解甚至完全消失,外阴的形态和色泽基本恢复正常,有效率达 95%;超声治疗后表皮及真皮层组织逐渐趋于正常。孟戈等^[19]观察高强度聚焦超声治疗 110 例外阴上皮内非瘤样病变的临床疗效,结果发现超声组随访 97 例,有效率为 96.9% (94/97),药物组随访 94 例,有效率为 62.8% (59/94)。作者认为:高强度聚焦超声能够在短时间内缓解瘙痒症状,疗效确切,安全,是治疗外阴上皮内非瘤样病变的首选方法。

HIFU 治疗作为一种新型治疗方法已经成功应用于肿瘤和非肿瘤治疗,并显示出其独特的优势:与手术相比,HIFU 具有无创性;与放疗相比,HIFU 在一次治疗中即可获得治疗效果,也可对残留病变或复发病灶进行重复治疗;同时 HIFU 的使用并不排斥传统的治疗方法,与放、化疗具有协同或增敏作用,而且 HIFU 治疗不依赖组织类型,那些不太可能治疗的顽固性疾病能够在 HIFU 高温声场中被灭活。本研究中金地鼠颊囊超声治疗侧白斑、上皮异常增生和肿瘤发生率均低于模型对照侧,高于空白对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),结果表明其具有阻断白斑癌变的效果。因此如能将 HIFU 技术用于口腔白斑的治疗,不仅能减轻患者痛苦,改善患者生活质量,还可能对口腔白斑的复发及癌变起到积极的防治作用。HIFU 治疗能有效降低金地鼠颊囊白斑的发生率并阻断其癌变。

参考文献

[1] Burov AK, Andreevskaya GD. Action of high intensity ultrasonic vibrations on malignant tumours in animals and

man[J]. Dokl Akad Nauk SSSR, 1995(106):239-241.

- [2] 李成志,王智彪,陈文直,等. 聚焦超声治疗外阴白色病变的研究[J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(6):373-377.
- [3] 方祥忠. 我国部分地区 134 492 人中口腔黏膜膜白斑病流行病学调查报告[J]. 临床口腔医学杂志, 1986, 2(1):1-5.
- [4] 王宇峰,尚书,周曾同. 口腔白斑癌变率与癌变时间及其影响因素的回顾分析[J]. 上海口腔医学, 2011, 20(1):55-61.
- [5] 陈谦明,李秉琦. 口腔白斑病诊断、分级与治疗中的新观点[J]. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(2):142-144.
- [6] Laskaris G. How to treat oral leucoplakia [J]. J Eur Acad Dermatol Venerol, 2000, 14(6):446-447.
- [7] Hong WK, Endicott J, Itri LM, et al. 13-cis-retinoic acid in the treatment of oral leukoplakia[J]. N Engl J Med, 1986, 315(24):1501-1505.
- [8] 周曾同,唐国瑶,张水龙,等. 微波辐射阻断金地鼠颊囊白斑癌变的实验研究[J]. 临床口腔医学杂志, 1998, 14(3):160-161.
- [9] 欧霞,邹建中. 高强度聚焦超声生物学效应的研究进展[J]. 中国医学影像技术, 2010, 26(5):974-976.
- [10] 刘丽燕,王理伟. 高强度聚焦超声治疗胰腺癌的研究现状[J]. 临床肿瘤学杂志, 2012, 17(4):370-374.
- [11] Yang R, Relly CR, Rescerra RJ, et al. Effect of high intensity focused ultrasound in the treatment of experimental neuroblastoma[J]. J Pediatr Surg, 1992, 27(2):246-250.
- [12] 关利铭,胡凯,李崇雁,等. 高强度超声对兔肝肿瘤营养血管损伤作用的染料灌注和病理观察[J]. 中国医学影像技术, 2000, 16(12):1102-1104.
- [13] 沙卫红,李瑜元,聂玉强,等. 高强度聚焦超声定位损伤离体牛肝的量效学研究[J]. 临床超声医学杂志, 2004, 6(1):1-3.
- [14] 熊六林. 高强度聚焦超声(HIFU)治疗肿瘤原理及临床应用现状[J]. 中国医疗器械信息, 2009, 15(3):17-21.
- [15] Gelet A, Chapelon JY, Bouvier R, et al. Transrectal high intensity focused ultrasound for the treatment of localized prostate cancer: factors influencing the outcome[J]. Eur Urol, 2001, 40(2):124-129.
- [16] Vaezy S, Fujimoto VY, Waiker C, et al. Treatment of uterine fibroid tumors in a nude mouse model using high-intensity focused ultrasound[J]. Am J Obstet Gynecol, 2000, 183(1):6-11.
- [17] 何中庚,熊六林,王国民,等. 高强度聚焦超声治疗 869 例腹腔、盆腔实性癌瘤和组织增生症临床初步报告[J]. 中国超声医学杂志, 2002, 18(3):23-26.
- [18] 吴艺佳,刘玉娟,袁小莉,等. 聚焦超声治疗外阴白色病变 194 例临床分析[J]. 重庆医学, 2008, 37(7):754-755.
- [19] 孟戈,刘芸,李长东,等. 高强度聚焦超声治疗外阴上皮内非瘤样病变 110 例临床疗效评价[J]. 中国微创外科杂志, 2009, 9(12):1079-1081.