

神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000106

聚焦超声对斑马鱼神经胶质瘤模型的治疗研究

潘珠玛¹, 邢扬帆², 李发琪², 黄慧哲³

(1. 重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学生物医学工程学院,

省部共建超声医学工程国家重点实验室, 超声医学工程重庆市市级重点实验室, 重庆 400016;

3. 重庆医科大学基础医学院发育生物学研究室, 重庆 400016)

【摘要】目的:通过研究聚焦超声对斑马鱼神经胶质瘤模型治疗后肿瘤组织和肿瘤血管的变化,探讨其对神经胶质瘤及肿瘤血管的影响。**方法:**将 72 只转基因斑马鱼(*fli*:GFP)随机分为 3 组,每组 24 只,分别是对照组(Fli 组)、肿瘤组(U87 组)、治疗组(U87+HIFU 组)。在受精 2 d 后,对肿瘤组和治疗组注射神经胶质瘤细胞(U87-RFP),注射 1 d 后对治疗组进行聚焦超声治疗。在治疗后连续 2 d 用荧光显微镜观察 3 组斑马鱼的肿瘤大小及肿瘤血管增生情况,qPCR 法检测血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) Aa 和血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)2 的 mRNA 的表达情况。**结果:**U87 组斑马鱼卵黄内有大量神经胶质瘤细胞且肿瘤血管明显增生,VEGF Aa 和 VEGFR2 的 mRNA 表达升高(VEGF Aa:Fli: 1.01 ± 0.13 vs. U87: 1.45 ± 0.10 , $P=0.002$; VEGFR2:Fli: 1.01 ± 0.12 vs. U87: 1.41 ± 0.07 , $P=0.001$);经聚焦超声治疗后,斑马鱼卵黄内的神经胶质瘤细胞显著减少,血管增生不明显,VEGF Aa 和 VEGFR2 的 mRNA 表达也较 U87 组降低(VEGF Aa:U87+HIFU: 1.14 ± 0.05 vs. U87: 1.45 ± 0.10 , $P=0.009$; VEGFR2:U87+HIFU: 1.16 ± 0.06 vs. U87: 1.41 ± 0.07 , $P=0.012$)。**结论:**聚焦超声能有效杀灭神经胶质瘤细胞,并且能减少肿瘤血管的生成,对治疗神经胶质瘤具有积极作用。

【关键词】聚焦超声;高强度聚焦超声;神经胶质瘤;斑马鱼;血管内皮生长因子;血管内皮生长因子受体

【中图分类号】R730.59

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-12-17

Effect of focused ultrasound on neuroglioma model of zebrafish

Pan Zhuma¹, Xing Yangfan², Li Faqi², Huang Huizhe³

(1. Teaching and Research Section of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University; 2. State Key Laboratory of Ultrasound Engineering in Medicine Co-founded by Chongqing and the Ministry of Science Technology, Chongqing Key Laboratory of Ultrasound in Medicine and Engineering, College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University; 3. Teaching and Research Section of Developmental Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the treatment effect of focused ultrasound on neuroglioma model of zebrafish. **Methods:** Transgenic zebrafishes(*fli*:GFP) were randomly divided into control group, U87 group and U87+HIFU group. Neuroglioma cells(U87-RFP) were injected into U87 group and U87+HIFU group after 2 d fertilization and focused ultrasound treatment was performed in U87+HIFU group after 24 h. The tumor size and the vessels were observed using fluorescence microscopy on the 1st d and the 2nd d after the treatment. The mRNA expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) Aa and vascular endothelial growth factor receptor 2 VEGFR2 were evaluated by qPCR. **Results:** In U87 group, a large number of neuroglioma cells and the newly formed vessels induced by neuroglioma were easily observed in zebrafish's yolk ball, while after focused ultrasound treatment, neuroglioma cells and the vessels were significantly decreased. qPCR suggested that the mRNA of VEGF Aa and VEGFR2 were highly expressed in U87 group (VEGF Aa:Fli: 1.01 ± 0.13 vs. U87: 1.45 ± 0.10 , $P=0.002$; VEGFR2:Fli: 1.01 ± 0.12 vs. U87: 1.41 ± 0.07 , $P=0.001$), but after focused ultrasound treatment, the expression of VEGF Aa and VEGFR2 were inhibited(VEGF Aa:U87+HIFU: 1.14 ± 0.05 vs. U87: 1.45 ± 0.10 , $P=0.009$; VEGFR2:U87+HIFU: 1.16 ± 0.06 vs. U87: 1.41 ± 0.07 , $P=0.012$). **Conclusion:** Focused ultrasound treatment can effectively kill the neuroglioma cells and decrease the tumor angiogenesis, which shows a positive treat effect on neuroglioma.

【Key words】focused ultrasound; high intensity focused ultrasound; neuroglioma; zebrafish; vascular endothelial growth factor; vascular endothelial growth factor receptor

作者介绍: 潘珠玛, Email: 2580349@qq.com,

研究方向: 高强度聚焦超声。

通信作者: 黄慧哲, Email: devbiology@cqmu.edu.cn。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150127.1530.026.html>

(2014-04-01)

神经胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤,手术结合放化疗的治疗效果仍不理想。高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)是近年来兴起的一种非侵蚀性的肿瘤治疗技术^[1],该技术主要是通过靶区升温的热效应杀灭肿瘤细胞。现目前, HIFU 已经在乳腺癌、前列腺癌和肝癌的治疗上取得了良好的治疗效果^[2-4],理论上讲, HIFU 对所有实体肿瘤都有效,完全可以通过去骨瓣减压窗对神经胶质瘤进行治疗。斑马鱼作为一种模式生物,因为其通体透明、易于遗传修饰、生长发育周期短等优势,近年来广泛运用于肿瘤的治疗研究中^[5-6]。在斑马鱼体内,肿瘤能诱导血管生成^[7],血管在肿瘤的发展中起着至关重要的作用,肿瘤的发展及转移依赖于新血管生成。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) Aa 是存在于组织中的一种促血管生成的因子,它与血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 2 结合通过多条信号通路促进内皮细胞分裂与增殖及新血管的生成^[8],从而促进肿瘤的发展。本实验建立 U87 斑马鱼神经胶质瘤模型,对其进行聚焦超声治疗,观察肿瘤大小及肿瘤血管增生情况,并检测 VEGF Aa 及其受体 VEGFR2 的 mRNA 的表达情况,旨在探究聚焦超声对斑马鱼神经胶质瘤模型的肿瘤和肿瘤血管的影响。

1 材料与方法

1.1 动物的饲养和处理

野生型斑马鱼(AB 系)和转基因斑马鱼(*fli:GFP*)的饲养方法均按照 Westerfield 的方法进行喂养。14 h 光照和 10 h 黑暗交替,雌雄分开饲养,每天定时喂以丰年虫(*Artemien*, *Salina*)3 次,成鱼每 7 d 可以产卵 1 次。产卵时把同品系的鱼一雄一雌放在装有产卵箱的水族箱内,中间放隔板将雌雄鱼隔开,次日清晨 8~9 h 拿掉隔板进行产卵,收集鱼卵于 Holtferatter 培养液放入 28 ℃ 培养箱进行培养。12 h 之后将鱼卵换入加有 0.004% 苯硫脲(*N*-phenylthiourea, PTU)的 Holtferatter 培养液中,在培养箱中培养到实验所需发育阶段。

1.2 斑马鱼胚胎最佳孵化温度测定

将新生斑马鱼(AB 系)随机分成 5 组放入盛有 Holtferatter

培养液的培养皿中,分别放入 28 ℃、31 ℃、33 ℃、35 ℃、37 ℃ 的培养箱进行培养,连续 7 d 计数成活的斑马鱼数量。

1.3 显微注射

稳定表达红色荧光的人类神经胶质瘤细胞(U87-RFP)(第三军医大学癌症中心惠赠)用胰酶消化离心之后用 PBS 重悬备用。将受精后 2 d 的斑马鱼胚胎去除卵膜,移至加有麻醉剂(MS-222, Sigma-Aldrich, USA)的培养液中 5~10 min,用吸管将胚胎转移至注射槽内,借助荧光显微镜(Discovery V20, ZEISS, Germany)和显微注射装置(NARISHIGE, Japan)将 100 个左右数量的 U87-RFP 细胞注射到斑马鱼的卵黄囊内。注射完成后将胚胎转入盛有 Holtferatter 培养液的培养皿中,再将培养皿放入实验所需温度的培养箱中。

1.4 聚焦超声

超声治疗仪为重庆医科大学超声研究所研制的海极星妇科治疗仪(CZF-II 型)。将斑马鱼(*fli:GFP*)胚胎分为对照组(Fli 组)、肿瘤组(U87 组)、治疗组(U87+HIFU 组)3 组,每组 24 只,分别饲养在 3 个 24 孔板中。对受精后 2 d 的肿瘤组和治疗组斑马鱼进行显微注射移植 U87-RFP 细胞,次日对治疗组进行聚焦超声治疗。将斑马鱼麻醉后放入注射槽,借助显微镜将治疗头对准肿瘤块进行超声治疗,治疗头参数设置为:频率 9.45 MHz,脉冲 1 000 Hz,功率 0.1 W,时间为 1 s,治疗后将斑马鱼吸回 24 孔板中继续饲养。

1.5 总 RNA 的提取、逆转录

将超声治疗后第 1 天、第 2 天的 3 组斑马鱼(AB 系),每组 100 只,利用总 RNA 提取试剂盒(Bioteke Corporation, China)提取总 RNA,作为逆转录的模板,再利用逆转录试剂盒(TaKaRa, Japan)通过 2 步法逆转录出 cDNA。第 1 步,在 RNase free 的 0.65 ml EP 管中加入 2 μl 5 × gDNA eraser buffer, 1 μl gDNA eraser, 1 μg total RNA 最后加入 RNase free dH₂O 定容到 10 μl,混匀后放入 RT-PCR 仪中(Eppendorf, Hamburg, Germany)。反应条件设置为 42 ℃, 2 min。该步骤主要目的是为了消除基因组 DNA。第二步,在第一步得到的 10 μl 混合液中加入 4 μl 5 × PrimeScript buffer, 1 μl Prime-Script RT enzyme mix, 1 μl RT Prime mix, 4 μl RNase free dH₂O,混匀后放入 RT-PCR 仪中设置反应条件 37 ℃ 15 min, 85 ℃ 5 s,得到的 cDNA 放置 -20 ℃ 备用。

1.6 Real-time PCR

Real-time PCR 是利用 SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa, Japan)在 ABI 7300 qPCR 仪(Applied Biosystems, USA)通过两阶段完成。第一阶段, 95 ℃ 30 s, 为使其变性。接下来第二阶段设置 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 31 s, 共 40 个循环。相关基因的表达结果用 T 检验的方法进行计算。引物通过英潍捷基公司(上海, 中国)合成,引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物序列

Tab.1 Primers sequences for real-time PCR

	正向引物	反向引物
VEGF Aα	5' -TGCTCCTGCAAATTCACACAA-3'	5' -ATCTTGGCTTTTCACATCTGCAA-3'
VEGFR2	5' -TGGAGTTCCAGCACCCCTTTA-3'	5' -CGTCCTTCTTCACCCCTTTCA-3'
β-actin	5' -CGTGACATCAAGGAGAAGCT-3'	5' -TCGTGGATACCGCAAGATTC-3'

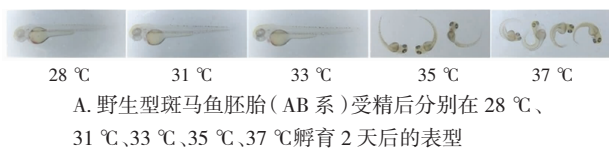
1.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 先行单因素方差分析, 两两比较再采用 LSD-*t* 进行检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

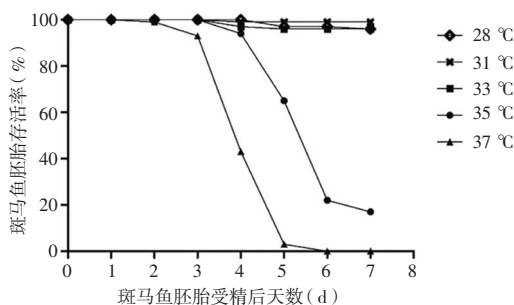
2 结果

2.1 斑马鱼胚胎和神经胶质细胞的最佳孵化温度

虽然斑马鱼肿瘤模型用于肿瘤研究已经多次被报道^[9-10], 但是斑马鱼和神经胶质瘤细胞的最适生长温度却是不一样的, 斑马鱼胚胎的最适温度为 28℃, 而神经胶质细胞的最适生长温度为 37℃。据已有文献报道斑马鱼胚胎和移植的肿瘤细胞一起的孵育温度包括 28℃、31℃、33℃、35℃甚至 37℃^[9-10], 所以本课题组为了进一步研究聚焦超声对斑马鱼神经胶质瘤模型的治疗作用, 必须先找到一个斑马鱼胚胎和移植的神经胶质细胞的共同最适温度。图 1 中, 斑马鱼胚胎可以在 28℃、31℃和 33℃的环境下保持正常的表型且受精后 7 d 的存活率达到 96%左右。然而在 35℃和 37℃的环境下, 斑马鱼胚胎表现出躯体弯曲或组织坏死, 在受精后 7 d 的存活率分别降到 17%和 0%。因此综合神经胶质瘤细胞的最适生长温度, 本课题组在接下来的实验中将斑马鱼胚胎放在 33℃的环境中进行孵育。



A. 野生型斑马鱼胚胎 (AB 系) 受精后分别在 28℃、31℃、33℃、35℃、37℃孵育 2 天后的表型



B. 野生型斑马鱼胚胎 (AB 系) 受精后分别在 28℃、31℃、33℃、35℃、37℃孵育 7 d 的存活率统计, 受精后 7 d 的存活率分别是 96%、99%、96%、17%和 0%

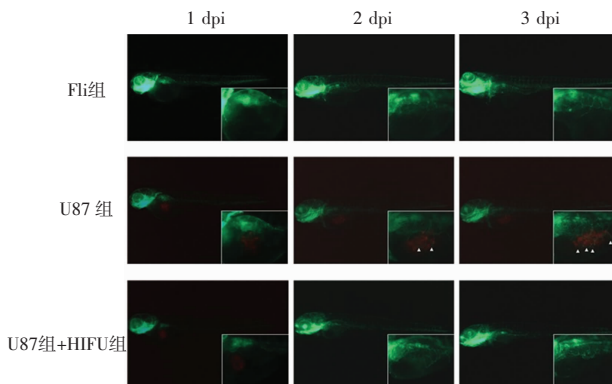
图 1 温度对斑马鱼胚胎表型和存活率的影响

Fig.1 Effect of temperature on the phenotypes and survival rate of zebrafish embryos

2.2 聚焦超声治疗后肿瘤细胞和肿瘤血管的变化情况

带有绿色荧光的转基因斑马鱼 (*fli*:GFP) 注射了带有红色荧光的 U87-RFP 细胞后, 在注射后第 1 天 (1 day post-injection, 1 dpi)、注射后第 2 天 (2 day post-injection, 2 dpi)、注射后第 3 天 (3 day post-injection, 3 dpi) 用荧光显微镜下观察 3 组斑马鱼的肿瘤组织和肿瘤血管的变化情况。结果显示, 在对照组 (Fli 组) 中, 未注射 U87-RFP 细胞的斑马鱼卵黄内

未观察到红色荧光的 U87-RFP 细胞, 也未发现血管增生。而在肿瘤组 (U87 组) 中, 注射 U87-RFP 细胞后 3 d 均能在斑马鱼卵黄内观察到 U87-RFP 细胞且细胞数量保持稳定。另外, 注射后第 2 天卵黄上出现增生的肿瘤血管, 注射后第 3 天肿瘤血管增生更明显且分支增多。治疗组 (U87+HIFU 组) 在注射了肿瘤细胞后第 1 天也同样能观察到红色荧光的 U87-RFP 细胞, 在对其进行聚焦超声治疗后的第 2 天和第 3 天, 带有红色荧光的 U87-RFP 细胞明显减少或消失, 且卵黄上的肿瘤血管增生不明显 (图 2)。



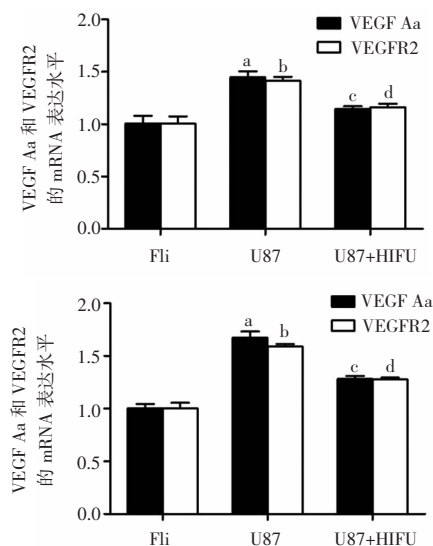
图片分别代表 U87-RFP 细胞注射后第 1 天 (1 dpi)、注射后第 2 天 (2 dpi)、注射后第 3 天 (3 dpi), 正常组 (Fli 组)、肿瘤组 (U87 组)、治疗组 (U87+HIFU 组) 斑马鱼卵黄囊中的肿瘤细胞及卵黄囊上血管增生情况。图中右下角图片为高倍镜下的斑马鱼卵黄囊。图中红色荧光为 U87-RFP 细胞, 绿色荧光为斑马鱼血管, 白色箭头所指为增生的肿瘤血管

图 2 聚焦超声治疗对肿瘤细胞和肿瘤血管增生的影响

Fig.2 Effect of focused ultrasound on glioma U87-RFP cells and angiogenesis of zebrafish

2.3 聚焦超声治疗后 VEGF Aa 和 VEGFR2 的 mRNA 表达情况

考虑到转基因斑马鱼 (*fli*:GFP) 可能会对 VEGF Aa 和 VEGFR2 的 mRNA 表达产生影响, 因此选用野生型斑马鱼 (AB 系) 做 qPCR。聚焦超声治疗后第 1 天和第 2 天, 分别收集 3 组斑马鱼胚胎, 提取总 RNA 并逆转录, 进行 qPCR 检测 VEGF Aa 和 VEGFR2 的 mRNA 表达情况。结果显示聚焦超声治疗后第 1 天, U87 组较对照组 VEGF Aa 和 VEGFR2 的 mRNA 表达上升 (VEGF Aa; Fli: 1.01 ± 0.13 vs. U87: 1.45 ± 0.10 , $P=0.002$; VEGFR2; Fli: 1.01 ± 0.12 vs. U87: 1.41 ± 0.07 , $P=0.001$), 而 U87+HIFU 组较 U87 组 VEGF Aa 和 VEGFR2 的表达降低 (VEGF Aa; U87+HIFU: 1.14 ± 0.05 vs. U87: 1.45 ± 0.10 , $P=0.009$; VEGFR2; U87+HIFU: 1.16 ± 0.06 vs. U87: 1.41 ± 0.07 , $P=0.012$)。HIFU 治疗后第 2 天, U87 组较对照组 VEGF Aa 和 VEGFR2 的 mRNA 表达升高得更明显 (VEGF Aa; Fli: 1.00 ± 0.07 vs. U87: 1.67 ± 0.11 , $P=0.001$; VEGFR2; Fli: 1.00 ± 0.09 vs. U87: 1.59 ± 0.04 , $P=0.001$), 而 U87+HIFU 组 VEGF Aa 和 VEGFR2 的表达与治疗后第 1 天相比无明显变化 (VEGF Aa; U87+HIFU: 1.28 ± 0.05 vs. U87: 1.67 ± 0.11 , $P=0.001$; VEGFR2; U87+HIFU: 1.28 ± 0.03 vs. U87: 1.59 ± 0.04 , $P=0.001$) (图 3, 表 2)。



real-time PCR 检测 VEGF Aa 和 VEGFR2 的 mRNA 表达,运用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算其相对表达量,内参基因为 β -actin。A. HIFU 治疗后第 1 天 3 组斑马鱼 VEGF Aa 和 VEGFR2 的 mRNA 表达水平。a. $P<0.01$ vs. Fli 组 VEGF Aa; c. $P<0.01$ vs. U87 组 VEGF Aa。b. $P<0.001$ vs. Fli 组 VEGFR2, $n=3$; d. $P<0.012$ vs. U87 组 VEGFR2。B. HIFU 治疗后第 2 天 3 组斑马鱼 VEGF Aa 和 VEGFR2 的 mRNA 表达水平。a. $P<0.001$ vs. Fli 组 VEGF Aa; c. $P<0.001$ vs. U87 组 VEGF Aa; b. $P<0.001$ vs. Fli 组 VEGFR2; d. $P<0.001$ vs. U87 组 VEGFR2

图 3 Real-time PCR 检测 VEGF Aa 和 VEGFR2 的 mRNA 表达
Fig.3 Expression of VEGF Aa and VEGFR2 detected by real-time PCR

表 2 VEGF Aa 和 VEGFR2 的 mRNA 表达水平及方差分析

Tab.2 Expression level of VEGF Aa and VEGFR2 mRNA and the analysis of variance

分组	VEGF Aa		VEGFR2	
	HIFU 治疗后第 1 天	HIFU 治疗后第 2 天	HIFU 治疗后第 1 天	HIFU 治疗后第 2 天
Fli 组	1.01 ± 0.13	1.00 ± 0.07	1.01 ± 0.12	1.00 ± 0.09
U87 组	1.45 ± 0.10	1.67 ± 0.11	1.41 ± 0.07	1.59 ± 0.04
U87+HIFU 组	1.14 ± 0.05	1.28 ± 0.05	1.16 ± 0.06	1.28 ± 0.03
F 值	15.791	53.874	17.213	70.867
P 值	0.004	0.000	0.003	0.000

3 讨论

神经胶质瘤是源于神经外胚层的肿瘤,病理类型多且呈浸润性生长,目前常用的手术治疗方法难以将肿瘤完全切除,联合化疗和放疗的效果仍然不理想,复发率极高,已经严重影响人类的生命健康,所以迫切需要找到一种新的治疗神经胶质瘤的方法。HIFU 是利用超声波作为能源,发射到身体内产生聚焦,将声波转化成热能使靶区内的肿瘤组织发生凝固性坏死,具有操作简单、无创伤、治疗安全、对正常组织无放射性损伤、治疗后恢复快等优点。从

理论上讲,HIFU 治疗方法对所有实体肿瘤都有效,在临床上具有广阔的应用前景。

斑马鱼作为一种与人类基因相似度达到 87% 的脊椎动物,因为其便于饲养、产卵量高、胚胎透明、易于遗传修饰等优点,已广泛运用于发育生物学、遗传学等科学研究中。近年来通过化学诱变、基因突变和异体移植等方法建立了斑马鱼的各种肿瘤模型,与人类肿瘤疾病比较发现不仅在组织学、遗传性上非常相似,而且它们的癌基因和抑癌基因都具有保守性。所以斑马鱼是一种非常理想的脊椎动物肿瘤模型。本研究为了观察血管的变化情况,选用转基因斑马鱼 (*fli*:GFP) 作为动物模型,通过异体移植的方法建立了肿瘤模型用于治疗研究,与以往常用的小鼠和大鼠神经胶质瘤模型相比,这是首次将斑马鱼模型运用于聚焦超声治疗研究,是本文的一大亮点和创新。

自从 HIFU 技术发明以来,对其进行的实验和临床研究已十分广泛,霍刚等^[11]运用 CZF-Ⅱ 型超声治疗仪治疗人离体恶性神经胶质瘤,在频率 9.7 MHz,声强 2 500 W/cm² 时,辐射治疗 20 s 能有效杀死胶质瘤,并对未辐射的瘤组织无影响。肖文峰等^[12]同样运用 CZF-Ⅱ 型超声治疗仪对裸鼠皮下神经胶质瘤进行治疗,在频率 9.7 MHz,声强 2500 W/cm²,辐射时间 20 s 的剂量下能有效地杀灭辐射区的胶质瘤细胞。本实验是首次运用 CZF-Ⅱ 型超声治疗仪对移植了带有红色荧光的神经胶质瘤细胞的斑马鱼神经胶质瘤进行超声治疗,由于斑马鱼神经胶质瘤模型的瘤体较小,斑马鱼的抵抗力较小鼠要弱,所以我们选用的治疗头频率为 9.45 MHz,脉冲 1 000 Hz,功率 0.1 W,对肿瘤组织辐射 1 s,超声治疗后在荧光显微镜下观察发现红色荧光的 U87-RFP 细胞明显减少或消失。虽然本研究辐射剂量较之前报道的剂量相比较少,但是也同样能准确、有效地杀灭辐射区内的神经胶质瘤细胞,达到治疗肿瘤的目的。

肿瘤的增殖和转移依赖于肿瘤组织内的新生血管的形成,肿瘤组织内新生血管的密度是肿瘤预后的重要指标,阻断新生血管的形成是治疗肿瘤的一种有效方法。肿瘤新生血管的形成涉及多种促血管生成因子,其中 VEGF Aa 的促血管生成作用最强。同时 VEGFR2 也在血管新生过程中起着重要的作用,研究报道所有血管新生都依赖于有活性的 VEGFR2 的存在^[13],所以 VEGF Aa 和其受体 VEGFR2 已成为临床上抑制肿瘤新生血管的重要作用靶标。

Li 等^[14]运用异体移植法向斑马鱼卵黄中注射 U87 细胞成功建立了斑马鱼神经胶质瘤模型,通过

荧光显微镜观察到新生血管的形成,并通过 qPCR 检测到 VEGF Aa 和 VEGFR2 的表达升高。本研究也运用相同的方法建立了斑马鱼神经胶质瘤模型,同样观察到新生血管的形成和 VEGF Aa、VEGFR2 的 mRNA 表达升高,表明在斑马鱼模型中,U87 细胞能够在基因水平上调控 VEGF Aa、VEGFR2 的表达,对肿瘤的发生及发展起到重要的作用。

本研究对斑马鱼神经胶质瘤模型进行聚焦超声治疗后,通过 qPCR 检测 VEGF Aa 和 VEGFR2 的 mRNA 的表达情况,发现通过治疗后的斑马鱼 VEGF Aa 和 VEGFR2 的 mRNA 表达较未治疗组明显降低,表明聚焦超声能减少神经胶质瘤模型斑马鱼的 VEGF Aa 和 VEGFR2 的表达,达到减少或阻断新生血管的形成,减缓肿瘤的发展过程,从而提高聚焦超声治疗神经胶质瘤的效果。关利铭等^[15]运用数字减影血管造影和病理检查的方法,观察 HIFU 对兔 VX2 肝脏肿瘤营养血管的影响,造影显示 HIFU 治疗后肝脏肿瘤营养血管影减少或消失,病理检查发现肿瘤营养血管和肿瘤组织凝固性坏死,表明 HIFU 能完全破坏肿瘤的营养血管,使肿瘤继发缺血坏死,加强 HIFU 对肿瘤的直接作用。史南等^[16]对 35 例胰腺癌患者进行 HIFU 治疗,比较治疗前、后患者血清 VEGF 水平,发现 HIFU 治疗后的血清 VEGF 表达下调。Chen 等^[17]对兔 VX2 肝癌模型进行 HIFU 治疗后,用免疫组织化学法同样检测到 HIFU 治疗组的 VEGF 表达水平较未治疗组低。Zhou 等^[18]对 15 例癌症病人进行 HIFU 治疗后,用 ELISA 法检查病人血清中 VEGF 的表达情况,发现治疗后患者血清中 VEGF 表达明显下调。综上所述,HIFU 技术的治疗面广,治疗效果好,对不同组织或器官肿瘤的治疗均有显著的效果。

本实验证实聚焦超声能有效杀灭斑马鱼神经胶质瘤模型内的神经胶质瘤细胞,并且能降低 VEGF Aa 和 VEGFR2 的表达,阻断新生血管的形成,加强了聚焦超声对神经胶质瘤的直接杀伤作用,表明聚焦超声对神经胶质瘤模型有确切的治疗作用。现阶段将聚焦超声运用于临床最大的难题是聚焦超声穿过颅骨后焦点会发生改变,不能准确地对肿瘤组织进行超声治疗。考虑到恶性神经胶质瘤常伴有脑水肿和颅内高压,常常会采取去除骨瓣的方法进行减压,所以聚焦超声完全可以通过去骨瓣减压窗对神经胶质瘤进行治疗。Connor 和 Hynynen^[19]通过修正 HIFU 的方向,穿过颅骨在颅内形成有效的靶点,可以预见,通过技术的改进,完全可以运用 HIFU 穿透颅骨对神经胶质瘤进行无创治疗。

参 考 文 献

- [1] Wu F, Wang ZB, Chen WZ, et al. Extracorporeal high intensity focused ultrasound ablation in the treatment of 1038 patients with solid carcinomas in China: an overview[J]. *Ultrason Sonochem*, 2004, 11(3-4): 149-154.
- [2] Wu F, Wang ZB, Zhu H, et al. Extracorporeal high intensity focused ultrasound treatment for patients with breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2005, 92(1): 51-60.
- [3] Koch MO, Gardner T, Cheng L, et al. Phase I/II trial of high intensity focused ultrasound for the treatment of previously untreated localized prostate cancer[J]. *J Urol*, 2007, 178(6): 2366-2370.
- [4] 易江, 李 宁, 蒋力生, 等. 高强度聚焦超声在肝癌无创治疗中的临床应用研究[J]. *四川大学学报*, 2005, 36(3): 426-428.
- [5] Bailey JM, Creamer BA, Hollingsworth MA. What a fish can learn from a mouse: principles and strategies for modeling human cancer in mice[J]. *Zebrafish*, 2009, 6(4): 329-337.
- [6] Peterson SM, Freeman JL. Cancer cytogenetics in the zebrafish[J]. *Zebrafish*, 2009, 6(4): 355-360.
- [7] Yang XJ, Chen GL, Yu SC, et al. TGF- β 1 enhances tumor-induced angiogenesis via JNK pathway and macrophage infiltration in an improved zebrafish embryo/xenograft glioma model[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 15(2): 191-198.
- [8] McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis[J]. *Oncologist*, 2000, 5(S1): 3-10.
- [9] Marques IJ, Weiss FU, Vlecken DH, et al. Metastatic behaviour of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 128.
- [10] Zhao CJ, Wang XF, Zhao YW, et al. A novel xenograft model in zebrafish for high-resolution investigating dynamics of neovascularization in tumors[J]. *PLoS one*, 2011, 6(7): e21768.
- [11] 霍 刚, 李九州, 郑履平, 等. 高强度聚焦超声损伤离体恶性胶质瘤的研究[J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(11): 1229-1230.
- [12] 肖文峰, 霍 刚, 郑履平, 等. 高强度聚焦超声对裸鼠皮下人胶质瘤的治疗作用[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2008, 34(4): 208-211.
- [13] Habeck H, Odenthal J, Walderich B, et al. Analysis of a zebrafish VEGF receptor mutant reveals specific disruption of angiogenesis[J]. *Curr Biol*, 2002, 12(16): 1405-1412.
- [14] Li D, Li XP, Wang HX, et al. VEGF induces angiogenesis in a zebrafish embryo glioma model established by transplantation of human glioma cells[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(3): 937-942.
- [15] 关利铭, 伍 烽, 王智彪, 等. 高强度聚焦超声对兔肝肿瘤血管的破坏作用及数字减影血管造影变化[J]. *中华超声影像学杂志*, 2001, 10(2): 121-123.
- [16] 史 南, 欧善际, 彭晓晖. 高强度聚焦超声治疗对胰腺癌血管内皮生长因子的影响[J]. *海南医学院学报*, 2011, 17(8): 1066-1070.
- [17] Chen LP, Li N, Ye H. The effect of high intensity focused ultrasound on vascular endothelial growth factor and microvessel density in rabbit V-X2 hepatocellular carcinoma models[J]. *Hepatogastroenterology*, 2013, 60(121): 136-139.
- [18] Zhou Q, Zhu XQ, Zhang J, et al. Changes in circulating immunosuppressive cytokine levels of cancer patients after high intensity focused ultrasound treatment[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2008, 34(1): 81-87.
- [19] Connor CW, Hynynen K. Patterns of thermal deposition in the skull during transcranial focused ultrasound surgery[J]. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2004, 51(10): 1693-1706.

(责任编辑: 关蕴良)