

## ❖ 实验研究

## Analysis on mechanism of outcome of residual uterine fibroid tissue after high intensity focused ultrasound ablation

QIN Juan<sup>1</sup>, CHEN Jin-yun<sup>1</sup>, WANG Qi<sup>1</sup>, PENG Song<sup>2</sup>,  
HU Liang<sup>1</sup>, LIU Zheng<sup>1</sup>, WANG Zhi-biao<sup>1\*</sup>

(1. College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;  
2. National Engineering Research Center of Ultrasound Medicine, Chongqing 400016, China)

**[Abstract]** **Objective** To analyze the mechanism of outcome of residual uterine fibroid tissue after high intensity focused ultrasound (HIFU) ablation by detecting the expression of estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) as well as P450 aromatase on different sites of uterine fibroid tissue outside the ablated areas. **Methods** MR-guided HIFU ablation was performed on 8 uterine fibroid samples under the acoustic power of 400 W for 60 s. During ablation, temperature elevation was monitored by MR system. The experimental fibroid tissue was taken at 0.5 (A), 1.0 (B), 1.5 cm (C) outside necrotic tissue after ablation respectively, and the controls were selected from the uterine fibroids before ablation. Immunohistochemistry was applied to detect the expression of ER, PR and P450 aromatase, and Western-blot was applied for semi-quantitative detection of P450 aromatase protein. **Results** Different degrees of temperature elevation outside ablated area were shown on temperature maps. The expression of ER and PR at point A, B and C were similar to the control group. The level of P450 aromatase protein at point A, B was significantly lower than that of control group ( $P < 0.05$ ) proved by immunohistochemical detection and Western-blot. **Conclusion** The mechanism on inhibition of residual uterine fibroids within certain range after ultrasound ablation may be related to the expression of P450 aromatase protein affected by temperature.

**[Key words]** Ablation techniques; Ultrasonics; Uterine neoplasms; Aromatase; Estrogen receptor; Progesterone receptor

## 探讨高强度聚焦超声消融后 残余子宫肌瘤组织转归的机制

秦娟<sup>1</sup>, 陈锦云<sup>1</sup>, 王琦<sup>1</sup>, 彭松<sup>2</sup>, 胡亮<sup>1</sup>, 刘政<sup>1</sup>, 王智彪<sup>1\*</sup>

(1. 重庆医科大学生物医学工程学院, 重庆 400016; 2. 超声医疗国家工程研究中心, 重庆 400016)

**[摘要]** **目的** 分析超声消融对靶区外不同位点子宫肌瘤组织雌、孕激素受体以及芳香化酶的表达情况, 探讨残余子宫肌瘤的转归的可能机制。 **方法** 采用 MR 引导下高强度聚焦超声 (HIFU) 肿瘤治疗系统消融 8 个子宫肌瘤, 声功率 400 W, 辐照时间 60 s, 以 MR 检测靶区外子宫肌瘤组织的升温情况。治疗前取 1 cm × 1 cm 子宫肌瘤组织为对照组。辐照完毕后取靶区外 0.5 cm、1.0 cm、1.5 cm 处子宫肌瘤组织。以免疫组化法检测超声消融靶区边缘雌、孕激素受体及芳香化酶 (P450 酶) 的表达, 以 Western-blot 半定量检测 P450 酶蛋白表达水平。 **结果** 靶区周围肌瘤组织温度也有不同程度升高, 并且靶区外位点的温度逐渐降低。与对照组比较, 靶区外肌瘤组织雌、孕激素受体表达均无明显改变。免疫组化及 Western-blot 半定量结果显示 P450 酶蛋白在靶区外 0.5 cm、1.0 cm 的表达明显低于对照组 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 超声

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2011CB707902)。

**[作者简介]** 秦娟 (1980—), 女, 贵州贵阳人, 博士, 主治医师。研究方向: 妇科肿瘤治疗。现工作于贵阳市妇幼保健院。

E-mail: ant000999@163.com

**[通讯作者]** 王智彪, 重庆医科大学生物医学工程学院, 400016。E-mail: wangzb@cqmu.edu.cn

**[收稿日期]** 2012-02-10 **[修回日期]** 2012-04-10

消融部分子宫肌瘤后,在一定范围内的残余子宫肌瘤的生长会被抑制,其机制与温度影响 P450 酶的蛋白表达有关。

**[关键词]** 消融技术;超声学;子宫肿瘤;芳香酶;雌激素受体;孕激素受体

**[中图分类号]** R714.21; R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2012)08-1454-06

子宫肌瘤的病因及机制尚不清楚,目前认为原位合成雌激素在子宫肌瘤发病中起着重要作用<sup>[1-2]</sup>。雌激素必须与其受体结合方能发挥生物学效应,因此,近年来围绕雌激素形成后的各个环节,包括雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR),雌激素形成的始动环节以及局部雌激素的作用等进行了深入研究<sup>[3]</sup>。

高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)消融子宫肌瘤通过聚焦能量使靶点温度升高,导致靶区肌瘤组织发生凝固性坏死。目前认为消融部分子宫肌瘤组织可以缓解症状,降低损伤周围组织的风险<sup>[4]</sup>;同时部分患者超声消融术后残余肌瘤可自行缩小,其消融瘤组织往往体积较大<sup>[4]</sup>,尤其是消融率达 90%以上者,术后随访残余瘤组织甚至可以完全吸收。本实验通过 HIFU 消融离体子宫肌瘤,围绕与雌激素合成相关的酶及受体检测超声消融对靶区外残余瘤组织相关因子表达的影响,初步探讨子宫肌瘤未消融部分转归的可能机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 2010 年 4—11 月 8 例子子宫肌瘤患者于我院接受子宫次全切除术或子宫全切除术,年龄 35~47 岁,平均(40.2±3.9)岁。术前 MRI 示子宫肌瘤 T2WI 均呈均匀低信号,体积 37.1~65.0 cm<sup>3</sup>,平均(48.35±12.02)cm<sup>3</sup>,最大直径 4.2~5.1 cm,平均(4.38±0.33)cm。术后均经病理证实为子宫肌瘤。经重庆医科大学伦理委员会批准及患者同意后,取其新鲜离体子宫标本。

**1.2 主要试剂** 兔抗人芳香化酶细胞色素 P450(P450arom,北京博奥森生物技术有限公司)、鼠抗人 ER、PR 抗体(武汉博士德生物工程有限公司);二抗、SABC 免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);TTC 染色试剂盒(Sigma)、SDS-PAGE 电泳试剂盒、裂解液、化学发光试剂盒(碧云天生物技术研究所以)。

**1.3 HIFU 辐照方法与温度监测过程** 采用 MR 引导下 HIFU 肿瘤治疗系统(JM 2.5C;重庆海扶公司),超声治疗头位 18 cm,焦距 15 cm,工作频率 0.7~1.2 MHz,焦域大小为 5 mm×2 mm。机内 MR 监测系统为 Siemens Symphony 1.5T MR。将离体标本置

于透声膜袋,浸没于脱气水中,并固定在容器内。治疗探头水囊也浸于脱气水中。照射前通过 MR 预扫确定辐照层面。消融肌瘤组织的中间部分,辐照参数:400 W,辐照间隔时间为 2:3,总辐照时间 60 s。实验过程中室内温度及水囊内温度均调控在 20~25℃。辐照前组织整体无温度改变,辐照中 MR 监测温度达到 60℃以上为凝固性坏死。

**1.4 标本处理** 消融治疗前取 1 cm×1 cm 子宫肌瘤组织为对照组。消融部分子宫肌瘤组织后,行 TTC 染色,辐照完毕采用 TTC 进一步明确消融范围。坏死组织不着色,正常组织染成红色。取坏死组织区外 0.5、1.0、1.5 cm 处子宫肌瘤组织为实验组,于每点各取 5 处组织制成石蜡块,每块切成 6 张厚 4 μm 的组织片备用,其中 2 张行 HE 染色,2 张备免疫组化用。

**1.5 免疫组化检测 P450arom、ER、PR 的判断标准** 染色阳性:光镜下观察,细胞质内或细胞核出现棕黄色颗粒为染色阳性。①定量比分:估计阳性细胞所占比例,分 5 级。0 级,阳性细胞<10%;1 级,阳性细胞≥10%且<30%;2 级,阳性细胞≥30%且<50%;3 级,阳性细胞≥50%且<70%;4 级,阳性细胞≥70%。②强度比分:估计阳性细胞平均染色强度,分 4 级。0 级,不着色;1 级,弱阳性;2 级,中等强度着色;3 级,强阳性。最后比分为定量比分+强度比分,每张切片取 6 个视野,每个视野均按上述评分。

**1.6 Western-blot 检测 P450arom** 建立标准蛋白浓度曲线,根据标准曲线计算待测样品的蛋白浓度,确保每个蛋白样品的上样量一致。SDS-PAGE 电泳后转硝酸纤维素膜。将硝酸纤维素膜放入 1:100 一抗(兔抗人 P450arom 多克隆抗体)孵育,与羊抗兔 HRP 标记的二抗免疫反应后,采用 ECL 化学发光、显影并半定量。

**1.7 统计学方法** 采用 SPSS 18.0 统计软件,计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示。选择单因素方差分析进行方差齐性检验,采用 Student-Newman-Keuls 法进行多组均数间两两比较,若方差不齐,则采用秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 辐照前、后病理结果** 辐照前肉眼观察子宫呈肉色,质地柔软。辐照后子宫肌瘤靶区内组织呈灰黄色,

质地较硬,靶区外子宫肌瘤组织无明显改变;TTC 染色显示靶区无着色,边界清晰,靶区外区域均匀红染(图 1A、B)。光镜下可见未着色区呈片状红染,无正常结构,其间可散在固缩、碎裂的细胞核,而周围组织结构清晰(图 1C~F)。

2.2 辐照前、后组织靶区及靶区温度改变 图 2 显示离体子宫肌瘤超声消融的 MR 监测图像,T2WI 中红色散点处为治疗区域(图 2B);MR 温度图示超声热量沉积状态(图 2C)。靶区温度升高至 60℃ 以上(红色),靶区周围肌瘤组织温度也有不同程度的升高,且

靶区外位点的温度逐渐降低。

2.3 子宫肌瘤靶区外 ER、PR 及 P450arom 的表达 图 3 为免疫组化结果,显示靶区外 0.5 cm(图 3A~C)、1.0 cm(图 3D~F)、1.5 cm(图 3G~I)及对照组(图 3J~L)的免疫组化结果。子宫肌瘤组织细胞核 ER、PR 在实验组与对照组的表达均为阳性,呈棕褐色,细胞浆 P450arom 表达阳性,呈棕色。ER、PR 在靶区外 0.5 cm、1.0 cm、1.5 cm 及对照组间表达差异无统计学意义,P450arom 的表达强度与距离靶区距离有关,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,表 1)。

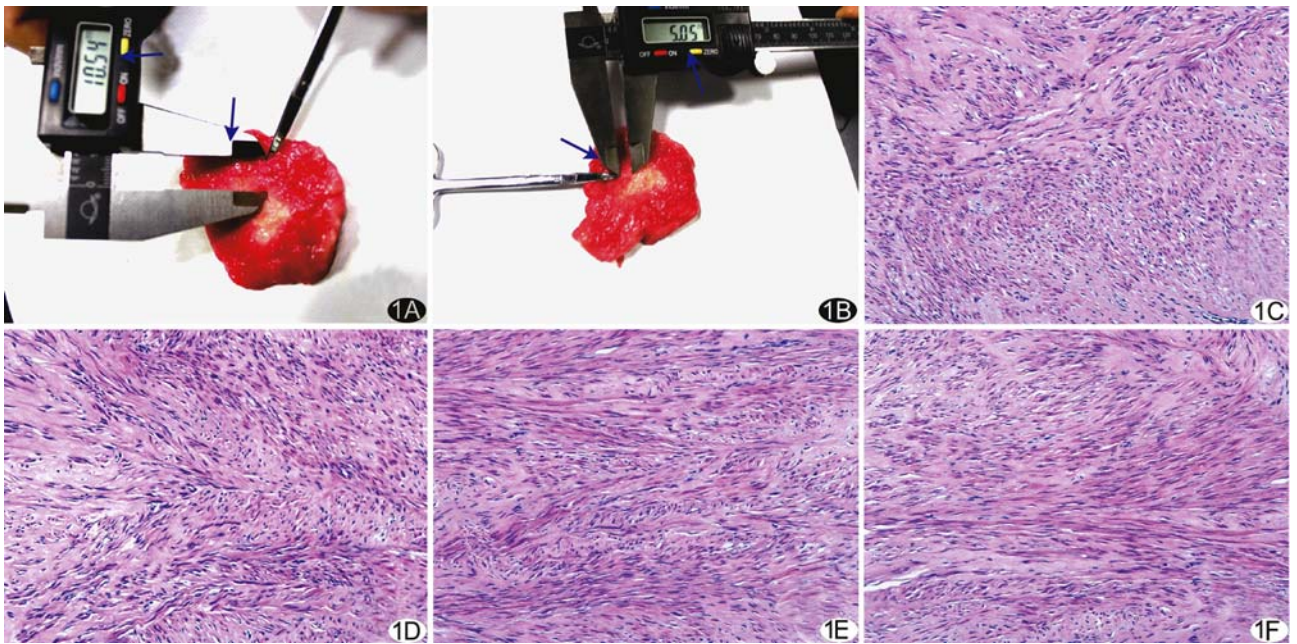


图 1 TTC 染色及 HE 染色 A. TTC 染色显示靶区未着色,取靶区外 0.5 cm 处组织为 A 点; B. TTC 染色显示靶区未着色,取靶区外 1.0 cm 处组织为 A 点; C~F. 靶区外子宫肌瘤组织(HE, ×200)



图 2 辐照前后组织靶区及靶区温度改变 A. 辐照前子宫肌瘤组织; B. T2WI, 红色散点区为治疗区域; C. MR 温度图示超声热量沉积状态 (红色:  $\geq 60^\circ\text{C}$  以上; 橙色:  $\geq 55^\circ\text{C}$  且  $< 60^\circ\text{C}$ ; 绿色:  $\geq 50^\circ\text{C}$  且  $< 55^\circ\text{C}$ ; 蓝色:  $\geq 45^\circ\text{C}$  且  $< 50^\circ\text{C}$ )

表 1 靶区外不同位点子宫肌瘤组织 ER、PR 及 P450arom 的表达(分)

组别	ER	PR	P450arom
实验组			
靶区外 0.5 cm 处子宫肌瘤组织	3.96±1.01	2.72±0.94	1.48±0.59*
靶区外 1.0 cm 处子宫肌瘤组织	3.96±0.89	3.04±0.84	2.68±0.85*
靶区外 1.5 cm 处子宫肌瘤组织	4.24±1.09	3.16±0.90	4.12±1.05
对照组	4.40±0.86	3.32±1.18	4.48±1.08

注：\*：与对照组比较， $P < 0.05$

2.4 子宫肌瘤靶区外 P450arom 的蛋白表达

取靶区组外 0.5 cm、1.0 cm、1.5 cm 处及对照组子宫肌瘤组织为样本，采用 Western-blot 进行半定量分析。与对照组相比较，靶区外 0.5 cm、1.0 cm 点 P450arom 蛋白表达水平明显降低 ( $P <$

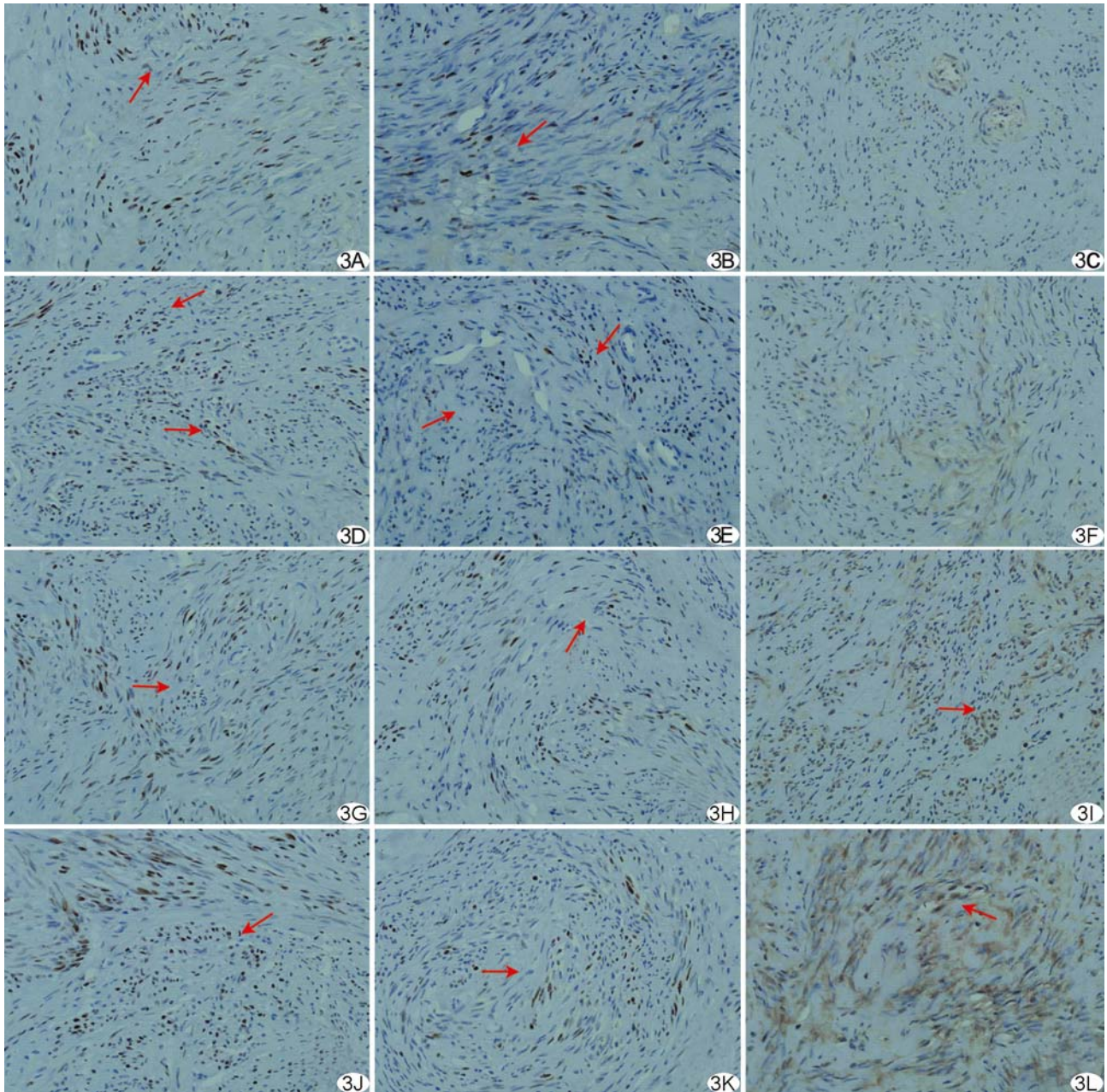


图 3 靶区外不同位点子宫肌瘤组织 ER、PR 及 P450arom 的免疫组化表达 A~C. 靶区外 0.5 cm 处子宫肌瘤组织细胞核 ER、PR 表达阳性，呈棕褐色，细胞浆 P450arom 表达弱阳性，呈棕色；D~F. 靶区外 1.0 cm 处子宫肌瘤组织细胞核 ER、PR 表达阳性，呈棕褐色，细胞浆 P450arom 表达阳性呈中等强度，呈棕色；G~I. 靶区外 1.5 cm 处子宫肌瘤组织细胞核 ER、PR 表达阳性，呈棕褐色，细胞浆 P450arom 表达强阳性，呈棕褐色；J~L. 对照组子宫肌瘤组织细胞核 ER、PR 表达阳性，呈棕褐色，细胞浆 P450arom 表达强阳性，呈棕褐色 (A~K: ×200; L: ×400; 箭示阳性表达处)

0.05, 表 2, 图 4)。

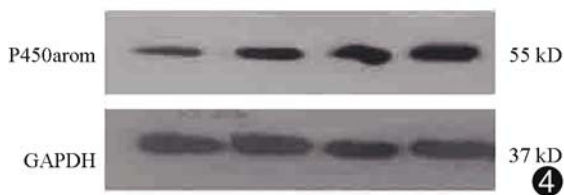


图 4 超声消融治疗对靶区外子宫肌瘤组织 P450arom 表达的影响 从左至右依次为:靶区外 0.5 cm 处子宫肌瘤组织;靶区外 1.0 cm 处子宫肌瘤组织;靶区外 1.5 cm 处子宫肌瘤组织;对照组子宫肌瘤组织 (GAPDH:内参抗体, 37 kD)

表 2 超声消融治疗对靶区外子宫肌瘤组织 P450arom 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	P450arom
实验组	
靶区外 0.5 cm 处子宫肌瘤组织	0.35 ± 0.03 *
靶区外 1.0 cm 处子宫肌瘤组织	0.55 ± 0.04 *
靶区外 1.5 cm 处子宫肌瘤组织	0.75 ± 0.08
对照组	0.85 ± 0.50

注: \* :与对照组比较, P < 0.05

### 3 讨论

HIFU 治疗子宫肌瘤的主要原理是通过热效应使靶区中心温度达到 60~100℃, 靶区组织瞬间发生凝固性坏死。由于聚焦超声热效应可以通过组织传导, 致周围组织的温度发生改变。利用 MRI 可以进行温度监控。有作者<sup>[5]</sup>通过射频消融治疗子宫肌瘤, 发现消融后周边组织有不同程度的继发性改变; 而超声消融子宫肌瘤对周围正常肌层以及子宫内膜均无明显影响<sup>[6]</sup>, 原因一方面在于超声能量是由点-面-体给予, 可控性高, 另一方面则在于超声消融范围精确, 凝固性坏死区与非靶区之间可仅仅间隔 6~8 个细胞<sup>[7]</sup>。本研究表明, 在靶点治疗温度升高的同时, 靶点外未治疗区肿瘤组织也会有不同程度的升温, 距离靶区距离越远, 温度升高的程度越小; 虽然 HE 染色发现靶区呈粉染, 已出现凝固性坏死, 但靶区外子宫肌瘤细胞未见明显异常。

目前一致认为子宫肌瘤组织中原位合成雌激素以及局部组织内的雌激素异常增高在子宫肌瘤发病中起重要作用<sup>[3]</sup>, 可能是子宫肌瘤发病的重要原因。研究<sup>[8-9]</sup>表明, 在雌激素合成的最后一步中, P450arom (又名 CYP19) 在肌瘤细胞中的过度表达可使组织局部出现高雌激素水平, 进而刺激肌瘤的发生、发展。P450 的表达受多方面因素的影响, 包括类固醇激素、

促性腺激素及温度等外部因子。高温与雄激素的作用类似, 可以抑制 P450 的表达<sup>[10]</sup>。已有研究<sup>[11-12]</sup>表明, 芳香化酶与模型动物的性取向有紧密关联, 较高的温度可以抑制 P450 的表达和活性, 使动物雄性化, 提示 P450 的表达易受温度调节。本实验结果提示距离靶区不同位点的 P450arom 表达存在差异, 而靶区外不同位点的升温程度不同, 这可能是导致 P450arom 表达差异的原因。

本研究残余离体组织, 其中无血液循环带走热量, 不能完全模拟临床治疗, 所得结果难免有偏倚; 但由此可以推测, 如果消融治疗的靶肌瘤组织血流不丰富, 在消融部分肌瘤的同时, 可使未治疗区部分子宫肌瘤组织局部 P450arom 酶表达在一定程度上有所减少, 对于减少子宫肌瘤术后复发可能有重要意义。同时, 本研究发现靶区外不同位点的 ER 及 PR 的表达与对照组无明显差异, 提示消融治疗 60 s 所致残余肌瘤组织温度升高对靶区外 ER、PR 的表达无明显影响。

总之, HIFU 消融离体子宫肌瘤时, 肌瘤组织温度升高的差异可能是导致 P450arom 酶表达差异的原因, 提示超声消融部分子宫肌瘤后, 残余子宫肌瘤的生长会在一定范围内被抑制, 其机制与温度影响 P450arom 酶的蛋白表达有关。

### [参考文献]

- [1] 马丽, 谢淑武, 朱焰, 等. 子宫肌瘤相关研究进展. 生殖与避孕, 2007, 27(10): 679-683, 687.
- [2] Takashi T, Masuhara K, Kamiura S, et al. Successful management of a leiomyomatosis peritonealis disseminata with an aromatase inhibitor. Obstet Gynecol, 2008, 112(2): 491-493.
- [3] Shozu M, Sumitani H, Segawa T, et al. Inhibition of in situ expression of aromatase P450 in leiomyoma of the uterus by leuprorelin acetate. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(11): 5405-5411.
- [4] Stewart EA, Gostout B, Rabinovici J, et al. Sustained relief of leiomyoma symptoms by using focused ultrasound surgery. Obstet Gynecol, 2007, 110(6): 279-287.
- [5] 罗新, 宋雯霞, 吴秀枝, 等. 射频消融技术对子宫肌瘤组织中 ER、PR 表达影响的临床试验研究. 现代妇产科进展, 2003, 12(3): 204-206.
- [6] 熊正爱. 高强度聚焦超声体外照射猴子子宫近远期影响研究. 中国超声医学杂志, 2002, 18(10): 20-22.
- [7] 贺雪梅, 熊欣, 陈菲, 等. 超声消融子宫肌瘤后靶区边缘雌孕激素受体表达研究. 重庆医科大学学报, 2011, 36(1): 5-7.
- [8] Sumitani H, Shozu M, Segawa T, et al. In situ estrogen synthesized by aromatase P450 in uterine leiomyoma cell promotes cell growth probably via an autocrine/intracrine mechanism. Endocri-

nology, 2000, 141(10):3852-3861.

- [9] 徐行丽, 贾庆兰, 崔秀娟, 等. 子宫肌瘤组织中性激素含量和 P450arom 的表达及其与发病的关系. 第二军医大学学报, 2005, 26(5):585-586.
- [10] Carreau P, Mercedes B. Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish Physiol Biochem*, 2005, 31(2-3):215-226.
- [11] Uchida D, Yamashita M, Kitano T, et al. An aromatase inhibitor or high water temperature induces oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp Biochem Physiol*, 2004, 137(1):11-20.
- [12] Duffy T, Picha M, Won, et al. Ontogenesis of gonadal aromatase gene expression in Atlantic silverside (*Menidia menidia*) populations with genetic and temperature-dependent sex determination. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*, 2010, 313(7):421-431.

## 《超声心动图诊断思维解析》已出版

刘延玲教授主编的《超声心动图诊断思维解析》已由科学出版社于 2010 年 11 月出版, 本书是作者在阜外心血管病医院多年工作中的经验体会的总结, 从临床实际出发, 将超声心动图学与心血管病基础、临床心脏病学紧密结合, 有助于年轻医师建立良好的思维方式, 掌握正确的诊断思路, 提高诊断准确率。本书按疾病分为 36 章, 共 3300 余幅图片, 其中包括彩色图片 1200 余幅, 通过对 250 余例少见或复杂病例的超声心动图诊断思维解析, 教给读者在检查过程中如何进行思维、如何进行鉴别诊断, 并对思维要点做了提示。适合从事临床超声、医学影像以及内、外、儿、妇等相关科室的医生、研究生阅读。

当当网、卓越网、新华书店及医学书店有销售。定价 398.00 元。

联系人 温晓萍

电话 010-64034601, 64015165

地址 北京市东黄城根北街 16 号 科学出版社医学中心

邮编 100717

(请在汇款附言注明您购书的书名、册数、联系电话、是否要发票)

