

· 论著 ·

不同循环冷冻消融术对西藏小型猪肺部冷冻消融效果的比较

姚飞² 曾健滢² 陈继冰¹ 周亮² 吴炳辉²
方刚¹² 邓春娟¹² 陈志贤¹ 冷尹¹ 邓敏¹²
张波¹² 邓春梅¹² 李家亮² 何丽华¹² 牛立志²
左建生¹² 徐克成¹²

【摘要】 目的 比较肺部两循环冷冻-复温与三循环冷冻-复温消融术对肺组织冷冻消融效果的差异。**方法** 采用西藏小型猪5头,开胸后行右肺冷冻消融术,每头猪分别实施两循环冷冻-复温(10-5-10-5, min)消融和三循环冷冻-复温(5-5-5-5-10-5, min)消融,两组总冷冻时间相同。冷冻过程中分别测量冷冻中心点温度、冷冻形成冰球最大直径;术后7 d取肺组织解剖,测量冷冻引起的表面坏死区最大长径及内部坏死区最大长径,并观察冷冻区域病理变化情况。**结果** 三循环冷冻组形成冰球表面最大长径大于两循环组;7 d后两冷冻组局部肺组织冷冻后所形成表面和深度损伤区大小相近,两循环冷冻组与三循环组冷冻损伤区病理变化分区相同,但三循环冷冻组引起完全坏死区域更大,凋亡区域更小。**结论** 相同的冷冻时间内,三循环冷冻组对肺部冷冻消融效果更好。

【关键词】 冷冻消融术,肺; 冷冻,循环; 猪,小型,西藏

中图分类号: R563

文献标识码: A

Comparison of freeze protocols for pulmonary cryoablation in the Tibet pig model

YAO Fei², ZENG Jian-ying², CHEN Ji-bing¹, ZHOU Liang², WU Bin-hui², FANG Gang¹², DENG Chun-juan¹², CHEN Zhi-xian¹, LENG Yin¹, DENG Min¹², ZHANG Bo¹², DENG Chun-mei¹², LI Jia-liang², HE Li-hua¹², LIU Li-zhi², ZUO Jian-sheng¹², XU Ke-cheng¹² (¹The GIHB Affiliated Fuda Hospital, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, 510665, China; ²Jinan University Medical School Affiliated Guangzhou Fuda Cancer Hospital, Guangzhou, 510665, China)

Corresponding author: LI Jia-liang, E-mail: fey@mail@163.com

【Abstract】 Objective To compare a dual-freeze protocol with a triple-freeze protocol for pulmonary cryoablation in a porcine lung model. **Method** Cryoablation with a dual-freeze (10-5-10-5, min) protocol and triple-freeze (5-5-5-5-10-5, min) protocol in normal lung of 5 Tibet pigs were performed under exposed operation. Temperature changes of cryoprobes and diameter changes of iceballs were measured during the ablation, and then pathological changes of cryozones in lungs were reviewed 7 days after cryosurgery, and the surface and depth cryolesions were measured. **Result** After two or three freeze-thaw cycles, different diameters on iceball surface were formed, and seven days after cryosurgery, there were similar surface and depth cryolesions in dual-freeze protocol and triple-freeze protocol. Pathologically, the triple freezing protocol was associated with longer complete necrosis zone than the dual freezing protocol. **Conclusion** Therefore, with the same freezing time, the triple-freeze protocol may become a more powerful lung-ablation method in cryosurgical application.

【Key words】 Pulmonary cryoablation; Freeze protocols; Tibet pig model

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6902.2012.05.012

作者单位: ¹510665 广东广州,中国科学院广州生物院附属复大医院

²510665 广东广州,暨南大学医学院附属广州复大肿瘤医院

通讯作者: 李家亮, E-mail: fey@mail@163.com

冷冻消融治疗因具有冰球可视化,对大血管损伤轻微,手术创伤小,可激活免疫等许多优点而被应用于肿瘤临床治疗^[1-4]。但对于冷冻治疗来说,在不同组织中因局部微环境,如血流、组织的绝缘性能,电阻以及空气流量存在差异,导致消融程序和消融效果存在差异^[5]。由于肺组织的肺泡中存在大量空气流,在一个冷冻循环结束后,肺局部区域内热导率可增加20倍(空气:0.024 W/mK,水:0.58 W/mK,血液:0.49~0.5 W/mK),因此当肺部采用冷冻消融治疗时,冷冻-复温程序往往会对最终的消融效果产生重大影响^[6]。2010年,Hinshaw等^[7]及牛立志等^[8]通过对猪肺的冷冻研究显示,在术中可观察到三循环冷冻-复温程序较两循环冷冻-复温程序产生更大的冰球及损伤区域。但上述研究直至目前还没有术后长期病理变化的证据。为此,本研究以西藏小型猪为研究模型,分别用两重和三重冷冻-复温循环程序对其肺部实施冷冻消融,旨在评价即时的冷冻损伤及术后7 d的组织病理损伤变化,期望能为肺部肿瘤冷冻找到一个合适的消融程序。

材料与方法

一、实验动物

西藏小型猪5头,体质量27~32 kg,普通级,动物生产许可证号为[SCXC(粤)200620015],动物合格证号为[粤监证字0087238],由南方医科大学实验动物中心提供。常规喂养,实验前2周内接受常规检查,无饮食和行为异常。本研究获得复大医院伦理委员会的批准。

二、氩氦冷冻系统

冷冻设备采用氩氦冷冻系统(Endocare™,CA,USA),该系统是根据焦耳定律设计,其原理是高压气体经过狭窄的喷嘴进入探针尖端,压力突然下降,不同的气体在局部产生不同的温度变化。氩气引起温度降低(可达-150℃),氦气可使温度升高(可达60℃)。

三、实验方法

将西藏小型猪捆绑固定,右侧卧位,对术区进行消毒、备皮等。用速眠3 ml诱导麻醉,然后给予1.5%~2%浓度异氟醚维持全身麻醉,氧流量保持在1.5 L/min。开胸腔暴露肺脏,选择猪右肺上叶1点和下叶2点作为靶点,两靶点距离为5 cm,两支2.0 mm冷冻探针分别插入右肺上叶和下叶各靶点。①两循环冷冻组:以100%的氩气激活探针,使针尖温度达(-140±5)℃持续10 min,改输氦气复温至(25±5)℃,持续5 min,为第1个循环,重复上述冷冻-复温循环,共行2个循环;②三循环冷冻组:类似于两循环冷冻组,不同点是3个循环冷冻组冷冻-复温循环为:先行2次冷冻5 min、复温5 min的循环,第3循环为冷冻10 min、复温5 min。术中对猪进行心肺监护。冷冻完毕后拔针,用明胶海绵止血。术后肌注速尿20 mg、地塞米松5 mg和青霉素160 IU。游标卡尺测量并记录冰球表面最大直径,记录冷冻探针温度变化。

四、病理观察

所有实验猪于术后7 d分别静脉给予戊巴比妥注射液100 mg/kg处死(此处置方法获得复大医院伦理委员会批准)。沿针道解剖实验猪肺组织,取冷冻损伤区组织,10%福尔马林溶液固定,作常规病理切片,苏木精-伊红溶液染色后,在光镜下观察组织学改变。

五、统计分析

实验数据以Graphpad Prism 5(GraphPad)软件进行分析。实验数值均使用Mean±SD描述,用配对样本t检验对计量资料进行分析,以P<0.05为差异统计学意义,P<0.01和P<0.001为统计学有显著性差异。

结 果

一、不同冷冻组形成冰球大小差异

冷冻时肺部表面形成以探针为中心的界限清楚的白色圆形冰球区域(图1A),冰球边缘有充血现象,冰球周围组织形态颜色无异常。每次循环结束测量两个冷冻组形成冰球表面最大长径,两循环冷冻组:1.7±0.5 cm和2.46±0.06 cm。三循环冷冻组:1.5±0.4 cm,2.1±0.1 cm和3.1±

0.1 cm (图 1A)。冷冻结束后,三循环冷冻组冷冻形成冰球大于两循环形成冰球($P=0.011$)。两个冷冻程序肺部冷冻中心点温度都在 1 min 内降至 -120°C 以下,复温过程达到 $25\sim 35^{\circ}\text{C}$ 。

二、术后冷冻区域表面和内部损伤变化

7 d 后处死动物,解剖观察,冷冻中心区肉眼可见近圆形红褐色病灶,呈骨髓样,质地糜烂;病灶周边可见暗红色水肿圈,触摸质地柔软,与外周组织分界较明显(图 1B、C)。其他区域组织眼观无异常。两循环冷冻组与三循环冷冻组表面损伤区最大长径分别达到: $3.87\pm 0.64\text{ cm}$ 和 $3.95\pm 0.81\text{ cm}$ (图 1B)。两组冷冻损伤区冷冻中心点距离为 5cm,而冷冻形成冰球较大,内部损伤区存在重叠区。沿两冷冻中心点中间垂直切开,可见一椭圆形损伤区域。游标卡尺分别测量两循环冷冻组与三循环冷冻组冷冻损伤区深度为: $3.57\pm 0.4\text{ cm}$ 和 $3.8\pm 0.44\text{ cm}$ (图 1C、D)。7 d 后两循环冷冻组与三循环冷冻组冷冻引起损伤区表面最大长径和损伤深度差异不显著。

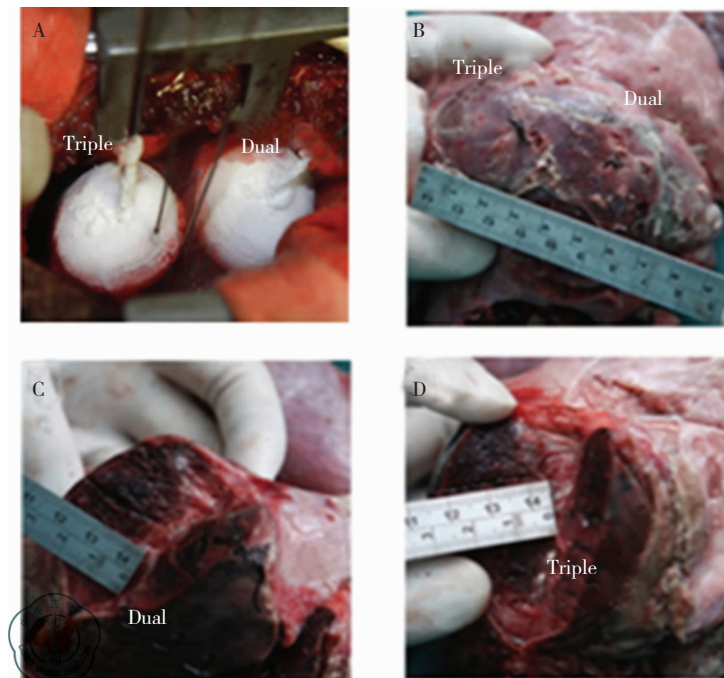


图 1 肺部冷冻表面与内部损伤

注:(A)肺部表面形成的冰球大小;(B)7 d 后肺部表面损伤;(B)7 d 后两循环冷冻造成的肺部损伤深度;(B)7 d 后三循环冷冻造成的肺部损伤深度(Dual:两循环冷冻, Triple:三循环冷冻)

三、冷冻损伤区病理变化

病理检查结果显示两循环冷冻组与三循环冷冻组存在相同的病理分区(图 2):①中心坏死区,可见较多坏死组织,呈红色;②炎症区,可见中性粒细胞和淋巴细胞浸润;③肉芽肿区,可见大量纤维细胞和毛细血管增生,还有少量中性粒细胞;④充血区,该区域内有肺泡纵膈增宽,大量红细胞渗出,细胞坏死;⑤凋亡区,正常肺泡组织,肺泡间隔清晰,可见纤维增生、淋巴细胞浸润及凋亡细胞。上述病例分区 1~4,构成冷冻损伤的完全坏死区,凋亡区仍可见正常组织及细胞。两循环冷冻与三循环冷冻组冷冻引起的完全坏死区域分别为: $1.84\pm 0.6\text{ cm}$ 和 $2.46\pm 0.5\text{ cm}$,二者差异有统计学意义(图 3, $P=0.031$)。而两循环冷冻组引起的细胞凋亡区域更大,但三循环组所引起坏死区域更大。

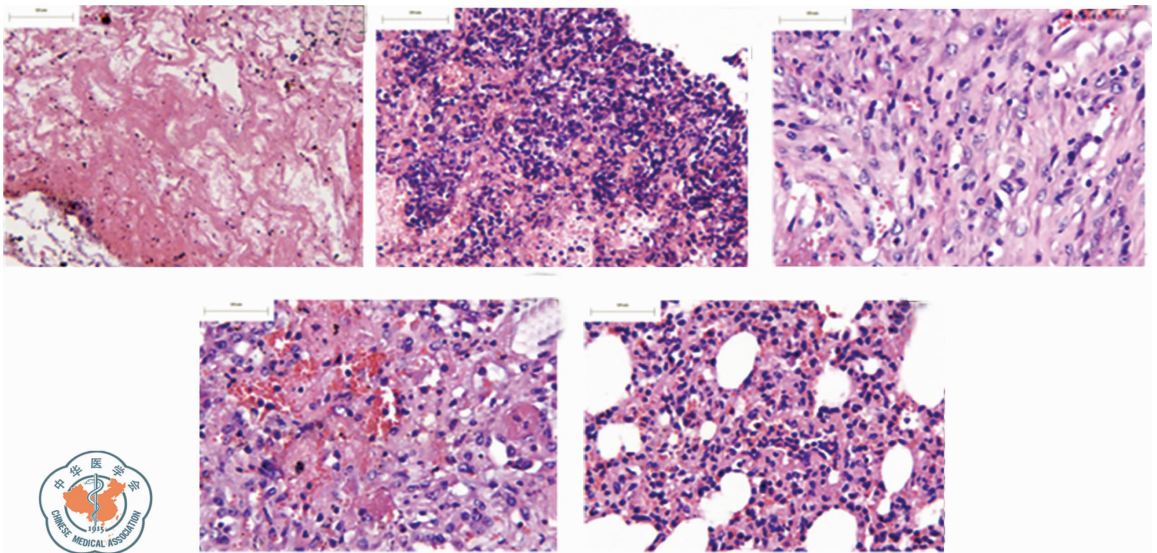


图2 冷冻损伤区7天后病理变化(HE染色,400倍)

注:两循环组与三循环组在冷冻7天病理观察显示有类似5个分区,分别为:(1)中心坏死区;(2)炎症区;(3)肉芽肿区;(4)充血区;(5)原生质球

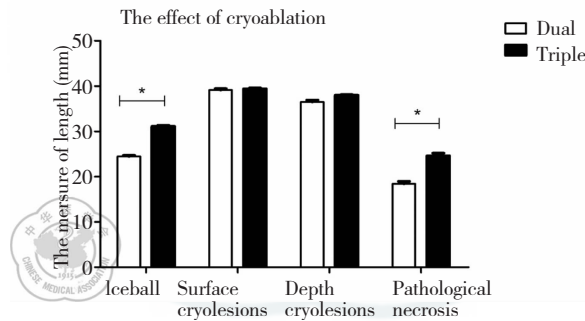


图3 冷冻消融效果比较

注:比较两循环组与三循环组冷形成的表面冰球、术后7 d表面损伤和深度损伤,同时比较7 d后病理完全坏死区的差异 (* : $P < 0.05$)

讨 论

近年来,肺部冷冻相关研究已取得一定进展。Izumi等^[9]以猪为动物模型,证实猪肺部冷冻手术的可行性,并指出两循环冷冻比单循环冷冻更能延长出血时间和降低肺部泄漏的空气。Littrup等^[10]建立人肝、肺冷冻程序,即冷冻采用双循环,冷冻10 min,复温5 min,该冷冻程序现已被广大外科医生接受。Gage等^[2]报道冷冻周期的设计取决于多种因素,包括冻结和解冻的持续时间、解冻率、组织温度、周期数和周期间隔等。Hinshaw等^[7]将10-5-10-5 min冷冻-复温修正为3-3-7-7-5-5 min冷冻-复温,并在对这两种不同冷冻程序进行比较时发现,在相同的冷冻-复温时间内,肺部三循环冷冻较两循环冷冻存在如下优势:影像下可更早形成消融区;更短冷冻时间和更大消融区域。本试验发现,猪肺部三循环冷冻组形成冰球长径较大,7 d后三循环冷冻组引起的病理上完全坏死区达到24.6 mm,也显著大于两循环冷冻组所引起18.4 mm完全坏死区(图3)。在相同的冷冻时间内三循环冷冻肺部消融效果更好。提示更为复杂的消融程序会造成更强细胞坏死效应。

Whittaker等^[11]指出,受解冻时间的影响,第二冷冻周期后细胞内形成较大规模冰晶。本研究显示冷冻过程中实际形成冰球直径大于冰球表面直径,冷冻形成的冰球区大于冷冻造成真实损伤区,因此在判断肺癌冷冻效果时不能简单只依靠冰球大小来判断,而应依据观察冷冻组织病理变化来做判断。在CT或B超监控下,冰球的形成呈现可视化,但细胞坏死往往距离冰球前沿还有

5~10 mm距离,因此术中在影像学下监控冰球的大小临床意义有限^[12]。病理学在评价消融效果时更为直观、准确,且在冷冻后不同时间点均可进行评估。本研究显示三循环组比两循环组将冷冻坏死等温线向外推6.4 mm,两循环组引起的坏死区域距离冷冻损伤区边缘约为2 mm,而三循环组引起的坏死区超出了坏死区边缘约4 mm。这表明三循环冷冻-复温程序与两循环冷冻-复温程序产生的冷冻损伤区域相似,但三循环产生的完全坏死区域更大。在临床上,准确地监控完全坏死区具有重要的意义,特别当消融靶区域比邻敏感组织,如食管、喉返神经和肺中央气管等。本次实验还发现,两组冷冻损伤区均可见大量坏死组织、中性粒细胞和淋巴细胞浸润及充血现象,而在损伤区边缘可见纤维增生、淋巴细胞浸润及凋亡细胞,但三循环冷冻组与两循环冷冻组相比,所引起组织坏死范围更广,凋亡区域较小。Sabel等^[13-15]报道冷冻促使机体免疫激活,炎性细胞浸润会促使机体发生二次细胞凋亡,部分凋亡细胞因冷冻造成局部缺氧而最终坏死,但也有部分活性细胞会在巨噬细胞的修复机制帮助下通过caspase-3途径恢复。因此在冷冻消融治疗肿瘤过程中,在相同条件下减小凋亡区,增大坏死区将会达到更好的消融效果。

综上所述,在肺部三循环冷冻-复温程序较两循环复温-冷冻程序更易引起类似冷冻损伤,但三循环冷冻-复温程序会引起更为广泛的组织坏死。三循环冷冻-复温程序更适合肺部肿瘤冷冻消融治疗。

参 考 文 献

- 1 周红桃,牛立志,周亮,等.冷消融联合放射性碘粒子植入治疗不可切除的肺癌[J].中国肺癌杂志,2008,11(6):780-783.
- 2 Gage AA, Baust JM, Baust JG. Experimental cryosurgery investigations in vivo[J]. Cryobiology, 2009, 59(3): 229-243.
- 3 张彩霞,程颖,马丽霞,等.氩氦刀治疗晚期非小细胞肺癌免疫增强作用的研究[J].肿瘤,2007,9(27):741-743.
- 4 徐克成,牛立志.肿瘤冷冻治疗学[M].上海:上海科技教育出版社,2007:9-99.
- 5 Gage AA, Baust J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery[J]. Cryobiology, 1998, 37(3): 171-186.
- 6 Yu TH, Liu J, Zhou YX. Selective freezing of target biological tissues after injection of solutions with specific thermal properties[J]. Cryobiology, 2005, 50(2): 174-182.
- 7 Hinshaw JL, Littrup PJ, Durick N, et al. Optimizing the protocol for pulmonary cryoablation; a comparison of a dual- and triple-freeze protocol[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2010, 33(6): 1180-1185.
- 8 牛立志,王静,邱大卫,等.经皮冷冻猪肺的影像学 and 病理学研究[J].中国肺癌杂志,2010,13(7):676-680.
- 9 Izumi Y, Oyama T, Ikeda E, et al. The acute effects of transthoracic cryoablation on normal lung evaluated in a porcine model[J]. Ann Thorac Surg, 2005, 79(1): 318-322.
- 10 Littrup PJ, Jallad B, Vorugu V, et al. Lethal isotherms of cryoablation in a phantom study: effects of heat load, probe size, and number[J]. J Vasc Interv Radiol, 2009, 20(10): 1343-1351.
- 11 Whittaker DK. Repeat freeze cycles in cryosurgery of oral tissues[J]. Br Dent J, 1975, 139(12): 459-465.
- 12 Littrup PJ, Ahmed A, Aoun HD, et al. CT-guided percutaneous cryotherapy of renal masses[J]. J Vasc Interv Radiol, 2007, 18(3): 383-392.
- 13 Sabel MS. Cryo-immunology: a review of the literature and proposed mechanisms for stimulatory versus suppressive immune responses[J]. Cryobiology, 2009, 58(1): 1-11.
- 14 Gazzaniga S, Bravo A, Goldszmid SR, et al. Inflammatory changes after cryosurgery-induced necrosis in human melanoma xenografted in nude mice[J]. J Invest Dermatol, 2001, 116(5): 664-671.
- 15 Schacht V, Becker K, Szeimies RM, et al. Apoptosis and leucocyte-endothelium interactions contribute to the delayed effects of cryotherapy on tumours in vivo[J]. Arch Dermatol Res, 2002, 294(8): 341-348.

(收稿日期:2012-09-03)

(本文编辑:黄红稷)

姚飞,曾健莹,陈断冰,等.不同循环冷冻消融术对西藏小型猪肺部冷冻消融效果的比较[J/CD].中华肺部疾病杂志:电子版,2012,5(5):445-449.