

• 实验研究 •

不同循环冷冻消融术对西藏小型猪 肝部冷冻消融效果的比较

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

【摘要】 目的 以西藏小型猪为模型,比较肝部双循环冷冻-复温与三循环冷冻-复温消融效果的差异。方法 西藏小型猪 9 头,开腹后行肝冷冻消融术。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 取肝组织解剖、测量冷冻引起的表面损伤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 三循环冷冻组形成的冰球表面最大长径大于两循环组;7 d 后两冷冻组冷冻后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分区相同,但三循环冷冻组引起完全坏死区域更大。结论 相同的冷冻时间内,三循环冷冻组对肝脏的冷冻消融效果更好。

【关键词】 肝脏; 冷冻消融; 西藏小型猪

A comparison of dual- and triple-freeze protocols for liver cryoablation in a Tibet pig YAO Fei, ZENG Jian-ying, CHEN Ji-bing, ZHOU Liang, LIU Wei-qun, WU Bing-hui, FANG Gang, DENG Chun-juan, CHEN Zhi-xian, LENG Yin, DENG Min, ZHANG Bo, DENG Chun-mei, LI Jia-liang, HE Li-hua, NIU Li-zhi, ZUO Jian-sheng, XU Ke-cheng. Central Laboratory, Affiliated Guangzhou Fuda Cancer Hospital, Medicine College of Jinan University, Guangzhou 510665, P. R. China

Corresponding author: LI Jia-liang, Email: feyemail@163.com

【Abstract】 Objective This study compares a dual-freeze protocol with a triple-freeze protocol for hepatic cryoablation in the Tibetan pig model. **Method** Cryoablation with a dual- (10-5-10-5 min) and triple-freeze (5-5-5-5-10-5 min) protocol for the normal livers of 9 Tibet pigs was performed under exposed operation. Temperature changes of cryoprobes and diameter changes of iceballs were measured during the ablation, and seven days later the pathological changes of cryozones were reviewed and the surface and depth cryolesions were measured. **Results** Compared with cryoablation with two freeze-thaw cycles, there was a greater iceball diameter for cryoablation by three freeze-thaw cycles. Also, seven days after cryosurgery, there were similar surface and deep cryolesions in dual- and triple-freeze protocols. Pathologically, the triple freezing protocol was associated with a longer zone of complete necrosis. **Conclusions** With the same freezing time (20 min), the triple-freeze protocol may become a more powerful liver-ablation method in cryosurgical application.

【Key words】 Liver; Cryoablation; Tibet pig model

冷冻消融因具有手术创伤小,对大血管损伤轻微,可在 CT 监视下精确消融以及可激活抗肿瘤免疫等优点而被应用于肿瘤治疗^[1-4]。肝癌特别是不能手术切除肝癌的冷冻消融,已在临床逐渐应用并取得令人鼓舞的效果^[5-6]。广州复大肿瘤医院徐克成等在 2001 年 3 月至 2005 年 3 月对 152 例肝癌单独作了经皮冷冻治疗,并进行 4 年随访。结果

显示,冷冻消融后 1、2、3 和 4 年生存率分别达到 86.4%、72.9%、51.6% 和 45.4%^[7]。冷冻治疗在不同组织中因局部微环境,如血流、组织的绝缘性等存在差异,消融程序和消融效果存在差异^[8]。肺的冷冻研究已证实,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。肝脏血供丰富,组织局部微环境差异较大,冷冻消融程序也可能对消融效果影响^[8-9]。为此,本研究对双重和三重冷冻-复温循环程序对西藏小豬肝部冷冻消融后局部组织的变化进行了比较,期望能为肝部肿瘤冷冻找到一个合适的消融程序。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2012.11.016

作者单位:510665 广州,暨南大学医学院附属广州复大肿瘤医院中心实验室

通信作者:李家亮,电子信箱:feyemail@163.com

材料与方法

1. 实验动物: 西藏小型猪 9 头, 体重 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。

2. 氩氮冷冻系统: 冷冻设备采用氩氮冷冻系统 (Endorcare™, CA, USA)。该系统根据焦耳定律设计。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°C), 氮气可使温度升高 (可达 60°C)。

3. 实验方法: 西藏小型猪捆绑固定, 右侧卧位, 术区消毒、备皮。速眠 3 ml 诱导后用 1.5% ~ 2% 浓度异氟醚维持全身麻醉。氧流量保持在 1.5 L/min。开腹暴露肝脏, 选择肝脏右叶作为靶区, 选择两个距离为 5 cm 靶点。两支 2.0 mm 冷冻探针分别插入两靶点。两循环冷冻组: 以 100% 的氩气激活探针, 使针尖温度达 $(-140 \pm 5)^{\circ}\text{C}$ 持续 10 min, 改输氮气复温至 $(25 \pm 5)^{\circ}\text{C}$, 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。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 个冷冻 5 min、复温 5 min 的循环, 第 3 循环为冷冻 10 min、复温 5 min。术中对猪进行心电监护。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。

4. 病理观察: 所有实验猪均于术后 7 d 经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)。沿针道解剖实验猪肝组织, 10% 甲醛固定, 取冷冻损伤区组织, 厚度为 5 mm。苏木精-伊红溶液染色后, 在光镜下观察组织学改变。

5. 统计学处理: 实验数据以 Graphpad Prism 5 (GraphPad) 软件进行分析。实验数值均使用 Mean \pm SD 描述。用配对样本 *t* 检验对计量资料进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同冷冻组形成冰球大小差异: 冷冻时肝脏

表面形成以探针为中心的界限清楚的白色圆形冰球区域。冰球边缘有充血现象, 冰球周围组织形态颜色无异常 (图 1A)。每次循环结束后测量两个冷冻组形成冰球表面最大直径形, 两循环冷冻组: $(2.1 \pm 0.4)\text{cm}$ 和 $(2.5 \pm 0.3)\text{cm}$; 三循环冷冻组: $(1.8 \pm 0.3)\text{cm}$, $(2.0 \pm 0.2)\text{cm}$ 和 $(2.8 \pm 0.2)\text{cm}$ 。冷冻结束后, 三循环组冷冻形成的冰球大于两循环形成的冰球 (图 1B, $P = 0.035$)。两个冷冻程序肝脏冷冻中心点温度均于 1 min 内降至 -120°C 以下, 复温过程达到 $25 \sim 35^{\circ}\text{C}$ 。

2. 术后 7 d 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。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为 $(3.4 \pm 0.6)\text{cm}$ 和 $(3.5 \pm 0.4)\text{cm}$ 。两组冷冻损伤区冷冻中心点距离均为 5 cm, 冷冻形成的冰球较大, 内部损伤区存在重叠区。沿两冷冻中心点中间垂直切开, 可见半椭圆形损伤区域。游标卡尺测量两循环冷冻组与三循环冷冻组冷冻损伤区深度均为: $(3.0 \pm 0.3)\text{cm}$ 。7 d 后两循环冷冻组与三循环冷冻组冷冻所致损伤区表面最大长径和损伤深度无明显差异。

3. 冷冻损伤区病理观察: 以肝脏冷冻插针点为中心, 沿冷冻损伤区最大半径取组织, 做病理切片光镜观察。病理检查结果显示两循环冷冻组与三循环冷冻组存在类似病理分区 (图 2): (1) 中心坏死区, 可见较多肝细胞坏死碎片, 坏死区内可见大量均一红染物质和少量浆细胞浸润。(2) 炎症区, 其中可见大量细胞碎片, 较多浆细胞浸润和淋巴细胞浸润。(3) 充血区, 可见成纤维细胞增生, 少量毛细血管充血, 局部可见钙化灶, 少量淋巴细胞浸润。(4) 肉芽肿区, 局部大量成纤维细胞和胶原增生, 少量淋巴细胞和浆细胞浸润, 局部可见钙化灶, 少量凋亡细胞形成。(5) 凋亡区, 肝细胞索排列较整齐, 肝窦内可见较多淋巴细胞浸润, 肝索内较多凋亡细胞出现。上述病理分区 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 $(1.42 \pm 0.7)\text{cm}$ 和 $(1.93 \pm 0.6)\text{cm}$, 差异有统计学意义 (图 3, $P = 0.035$)。

讨 论

我国是原发性肝癌高发国家, 肝癌病死率占恶

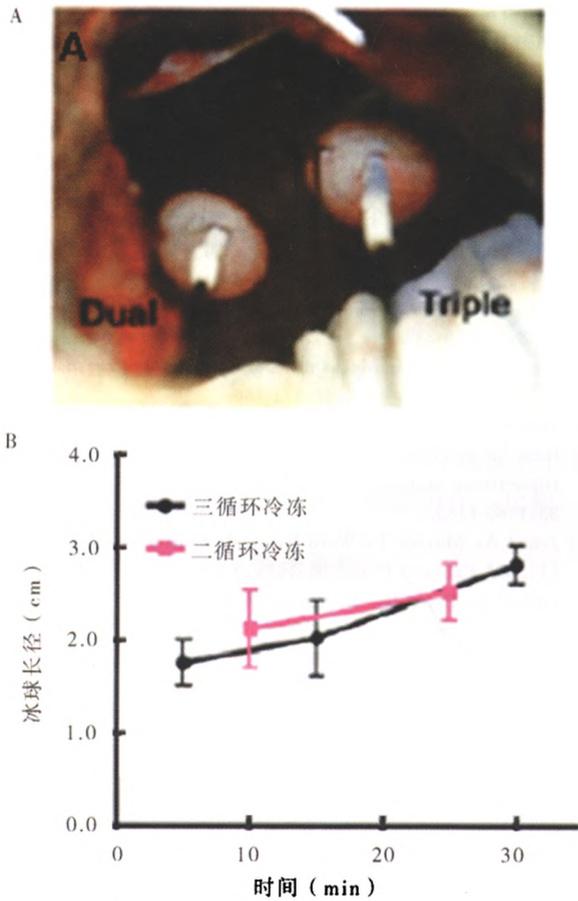


图1 肝脏冷冻。A. 肝脏表面形成的冰球;B. 冷冻个各时间点冰球大小变化

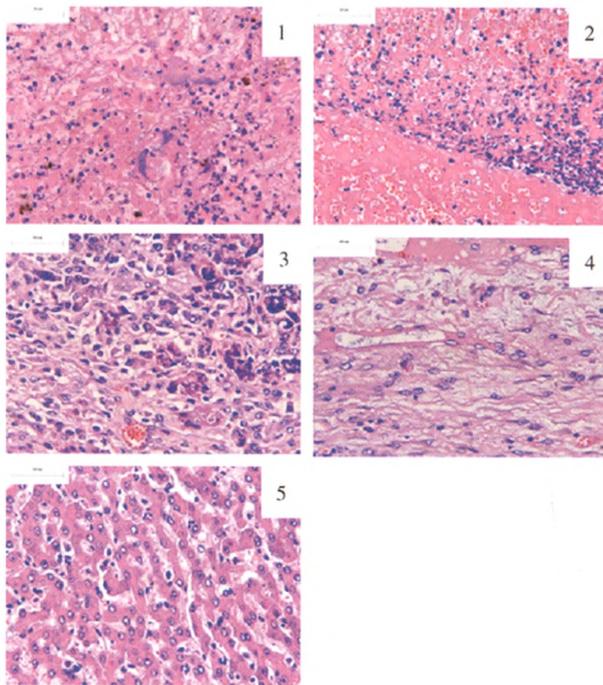


图2 冷冻损伤区7 d后病理变化(HE, ×400)。两循环组与三循环组在冷冻7 d病理观察显示有类似5个分区,分别为:(1)中心坏死区;(2)炎症区;(3)充血区;(4)肉芽肿区;(5)凋亡区

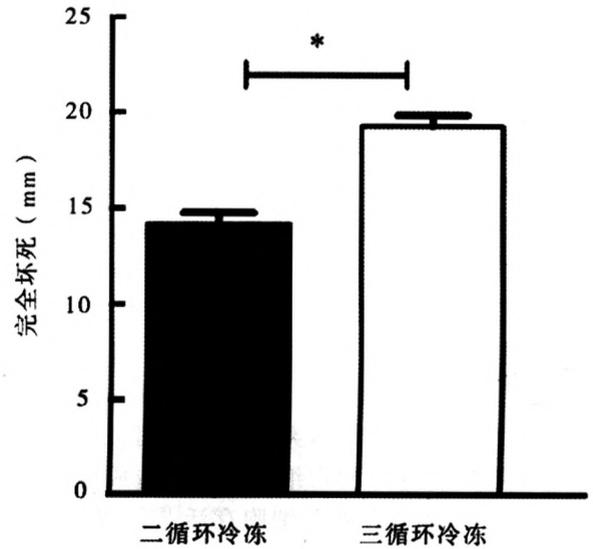


图3 7 d后两循环与三循环冷冻形成完全坏死区比较(* P=0.035)

性肿瘤的第二位^[10]。近年来,微创外科和肿瘤局部治疗的兴起为肝癌的治疗开辟了新的方向。其中,氩氦刀冷冻治疗因其具有微创,对肝脏功能影响小、重复性强以及在减少肿瘤残留和转移,增强机体免疫力及延长生存期等方面的明显优势,而逐渐成为无法切除的中晚期肝癌治疗的一种选择^[11-12]。临床研究表明,要提高肝癌氩氦刀冷冻治疗的效果,首先应该保证安全的无瘤边缘。精确的消融区控制及真实的冷冻损伤区评估是保证疗效的前提。肝脏组织因血供较为丰富,局部微环境差异较大,不同的消融程序对于消融效果影响较大^[6,8]。通常氩氦刀冷冻过程中冷冻中心点温度会在1 min内迅速降低至-140℃,并在冷冻中心点周围形成冰球。Whittaker指出冰球的形成还会受解冻时间的影响,第二冷冻周期后胞内形成较大规模冰晶^[13]。已有报道显示肺脏三循环冷冻消融的效果优于两个循环^[8-9],但尚无肝脏三个循环冷冻研究报道。为此,本次实验以西藏小型猪为模型,其肝部两循环冷冻与三循环冷冻消融进行了比较。

临床肝癌组织冷冻消融的范围主要是在CT或B超的监控下,通过冰球形成的可视化而实现的。为了达到肿瘤组织完全坏死,一般冷冻范围要超过肿瘤边缘1 cm^[14]。但是评价冷冻消融效果的最佳指标则是病理观察。病理学观察评价消融效果更为直观、准确,可真实反映冷冻消融的组织坏死范围。我们的研究结果显示,两循环组三循环组将冻坏死等温线向外推约5.1 mm(分别是1.42±0.7 cm和1.93±0.6 cm),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

超出了坏死区边沿约 2.3 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。在引起相同组织损伤的情况下,三循环冷冻组可引发更加大的完全坏死。因此,从消融效率上来看,在相同的冷冻时间内三循环冷冻肝脏消融效果更好。7 d 后病理观察显示,两组病理分区相似,都存在中心坏死区、炎症区、充血区、肉芽肿区和凋亡区,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。2009 年, Sabel 等报道冷冻可促使机体免疫激活,炎性细胞浸润会促使机体发生细胞凋亡,部分凋亡细胞因冷冻造成局部缺氧而最终坏死,但也有部分细胞存活^[15]。同时,有文章显示,化疗或者放疗引发的细胞凋亡可以通过 caspase-3 途径引起肿瘤复发^[16]。因此在冷冻消融治疗肿瘤过程中,在相同条件下应当尽量减小凋亡区,增大坏死区,将会达到更好消融效果。

总之,本研究表明,在肝脏三循环冷冻-复温程序较两循环复温-冷冻程序引起类似冷冻损伤,但三循环冷冻-复温程序会引起更为广泛的组织坏死(图 3)。三循环冷冻-复温程序更适合肝脏肿瘤的冷冻消融治疗。

参 考 文 献

[1] 闻炳基,李海兵,花金年,等. 氩氦刀冷冻时间与冰球大小的临床研究[J]. 肿瘤学杂志, 2005,6:458-460.
 [2] Arciero CA, Sigurdson ER. Liver-directed therapies for patients with primary liver cancer and hepatic metastases[J].

Curr Treat Options Oncol, 2006,7:399-409.
 [3] Chen HW, Lai EC, Zhen ZJ, et al. Ultrasound-guided percutaneous cryotherapy hepatocellular carcinoma[J]. Int J Surg, 2011, 9:188-191.
 [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 JM, Baust JG. Experimental cryosurgery investigations in vivo[J]. Cryobiology, 2009,59:229-243.
 [6] 周霖,杨永平,冯永毅. 氩氦刀冷冻治疗原发性肝癌的初步临床研究[J]. 癌症, 2009,28:58-62.
 [7] 徐克成,牛立志. 肝脏的冷冻治疗[J]. 世界华人消化杂志, 2008,16:229-235.
 [8] Gage AA, Baust J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery[J]. Cryobiology, 1998,37:171-186.
 [9] 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, 33:1180-1185.
 [10] Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005 [J]. CA Cancer J Clin, 2005,55:10-30.
 [11] Gage AA, Baust JG. Cryosurgery for tumors[J]. J Am Coll Surg, 2007,205:342-356.
 [12] Ng KK, Lam CM, Poon RT, et al. Comparison of systemic responses of radiofrequency ablation, cryotherapy, and surgical resection in a porcine liver model[J]. Ann Surg Oncol, 2004,11:650-657.
 [13] Whittaker DK. Repeat freeze cycles in cryosurgery of oral tissues[J]. Br Dent J, 1975,139:459-465.
 [14] Littrup PJ, Ahmed A, Aoun HD, et al. CT-guided percutaneous cryotherapy of renal masses[J]. J Vasc Interv Radiol, 2007,18:383-392.
 [15] Sabel MS. Cryo-immunology: a review of the literature and proposed mechanisms for stimulatory versus suppressive immune responses[J]. Cryobiology, 2009,58:1-11.
 [16] Huang Q, Li F, Liu X, et al. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy[J]. Nat Med, 2011,17:860-866.

(收稿日期:2012-08-16)