

·实验研究 Experiment research·

经皮瘤内注射 ^{32}P 玻璃微球对肝癌组织的影响

王金胜, 曹喜才, 汪雅娟, 范志斌, 姜付显, 韩燕, 李斌, 阎世鑫,
谭建, 王晓东

【摘要】 目的 探讨经皮瘤内注射 ^{32}P 玻璃微球(^{32}P -GMS)对肝癌瘤组织的影响及其最佳剂量。方法 建立 24 只兔 VX2 肝癌模型,分为 A、B、C、D 4 组并分别经皮瘤内注射 37、74、111 和 148 个放射性强度单位(MBq)的 ^{32}P -GMS,7、14 和 21 d 后分批处死实验兔并取注射部位肿瘤组织,在光镜和电镜下观察其病理变化。**结果** 注射 ^{32}P -GMS 剂量与肿瘤细胞的放射性损害相关。A、B 组不能完全杀死瘤组织;C 组肿瘤细胞几乎完全消失,纤维结缔组织对瘤灶形成完整的包绕;D 组未见存活的肿瘤组织,但见正常肝组织亦被累及。**结论** 经皮瘤内注射适量的 ^{32}P -GMS 可以最大限度地杀伤瘤组织,本实验显示 111 MBq 为最佳剂量,对于阻止肝癌转移具有重要意义。

【关键词】 肝癌; ^{32}P 玻璃微球;瘤内注射;病理

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1008-794X(2006)-12-0742-04

Influence on the tumor after percutaneous intra-tumor injection of ^{32}P -GMS in liver cancer WANG Jin-sheng, CAO Xi-cai, WANG Ya-juan, FAN Zhi-bing, JIANG Fu-xian, HAN Yan, LI Bin, YAN Shi-xin, TAN Jian, WANG Xiao-dong. Department of Radiology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China.

【Abstract】 Objective To study the influence on the tumor after percutaneous intra-tumor injection of ^{32}P -GMS in liver cancer as well as its suitable dose. **Methods** 24 New Zealand rabbits were used to establish the animal model of VX-2 liver cancer, and divided into A, B, C and D groups with individually 37, 74, 111 and 148 MBq of ^{32}P -GMS being injected, respectively; and then pathological changes of tumor were observed by light and electron microscope respectively. **Result** The dose of ^{32}P -GMS was obviously correlated with the radioactivity damage of tumor cells. In the A and B groups, the tumor cells were not observed to disappear completely after injection of ^{32}P -GMS, but in C group, tumor cells were almost completely disappeared and surrounded by a lot of connective tissue. Although the tumor cells were found to disappear completely in D group, normal liver tissues were also involved. **Conclusion** Percutaneous intra-tumor injection of ^{32}P -GMS with suitable dose that may induce the tumor tissue to be maximally damaged and may also provide some significances to prevent the tumor metastasis. (J Intervent Radiol, 2006, 15; 742-745)

【Key words】 Liver cancer; ^{32}P -GMS; Injection of intra-tumor; Pathology

肝癌一经诊断多属中、晚期,同时常伴有肝硬化,85%~90%失去手术机会,且术后复发率高,多数患者需要非手术治疗^[1]。经皮瘤内注射 ^{32}P -玻璃微球(^{32}P -GMS)内照射治疗肝癌,取得了令人满意的临床效果^[2];我们通过兔肝癌动物模型经皮瘤内注射 ^{32}P -GMS 后,对肿瘤杀伤作用及转移的影响作了实验研究,并探讨内照

射治疗肝癌的最佳剂量。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用 24 只新西兰大白兔,体重 2.0~2.5 kg,雌雄各半(由天津医科大学动物实验中心提供)。

1.1.2 瘤株 使用 VX2 瘤株(由上海中山医院周康荣教授惠赠),其种类为 VX2 鳞状细胞癌。

1.1.3 所用药物 放射性核素 ^{32}P -GMS(由中国核动力研究设计院提供)与超液化碘油 0.1 ml 在振荡

基金项目:天津市自然科学基金资助项目(003607111)

作者单位:300052 天津医科大学总医院放射科

通讯作者:王金胜

器(转速 10 000 转/s)上充分混匀 2 ~ 3 min,使悬浮液均匀。 ^{32}P -GMS 发射纯 β 射线,平均能量 0.59 Mev,最大能量 1.71 Mev,最大射程 8 mm,半衰期 14.3 d。

1.1.4 影像检查设备 GE Signa 1.5T 超导型磁共振扫描仪。

1.2 方法

1.2.1 肝肿瘤模型建立 参照张洪新等^[3]报道的方法建立 VX2 兔肝癌模型,经肿瘤形态学观察证实具有肝癌的特性,为中分化鳞癌;主要由肝动脉供血,且血供丰富,与人类肝癌病理学形态表现相似^[4]。

1.2.2 实验分组 将同一批肝脏肿瘤模型建立成功的实验兔随机分为 4 组,每组 6 只,分别为 A、B、C、D 组;向瘤块中心注入不同放射性活度的 ^{32}P -GMS 与超液化碘油的悬浮液,各组的放射性活度分别为 37、74、111 和 148 MBq。

1.2.3 经皮瘤内注射 ^{32}P -GMS 采用开腹模拟临床的 B 超定位,依据 MRI 检查结果估算进针的深度和位置,直视下向肿瘤内注入 ^{32}P -GMS。

1.2.4 MRI 检查 各实验组在瘤内注药前及注药后 7、14 和 21 d 时,利用 MRI 平扫和增强检查观察肿瘤体积和信号演变规律。

1.2.5 肿瘤体积估算 通过 MRI 成像计算,测得肿瘤最大长径(a)及与其垂直方向的最小径(b),利用椭球体积计算公式 $V = 0.5 \times a \times b^2$ 计算肝肿瘤的体积^[5,6]。

1.2.6 病理学检查 各实验组动物在注药后 7、14 和 21 d 分批处死,解剖兔肝脏取出瘤块,测量瘤块大小。取注药层面肿瘤组织加 4%甲醛固定,以石蜡包埋(切片厚度 5 μm)行 HE 染色和加拿大树脂胶封固后作光镜观察。另外,取注药层面肿瘤组织加 4%戊二醛·多聚甲醛液固定,以环氧树脂 Epon 812 包埋行瑞典 LKB-IV 型超薄切片机切片(切片厚度 500 ~ 700 \AA)和柠檬酸铅、醋酸铀双染后行日本 JEOL-100 CX 电镜观察,主要观察不同剂量 ^{32}P -GMS 在不同时间致肿瘤坏死超微结构之病理改变。

2 结果

2.1 病理改变

2.1.1 大体观察 各组注药前肿瘤直径 1 cm 左右,与正常肝实质分界清,呈类圆形,质硬;表面可见多个灰白色大小不等的肿瘤结节和丰富的供血血管,血管扩张迂曲;切面的边缘呈鱼肉样,中央可见坏死组织。

注药后各组肿瘤体积均缩小,肿瘤血管减少,中央可见坏死液化组织,部分病灶周边可见质硬的白色纤维结缔组织。

2.1.2 光镜观察 注药前各组光镜下可见瘤内多发片状浸润性癌巢,与正常肝实质无明显界限,间质分界不清,结缔组织较少,中央片状坏死区,肿瘤细胞分散排列,新生毛细血管丰富;肿瘤细胞体积大,形态不规则,胞质丰富,淡红染色,核大小形态各异染色不均,核分裂多见,间质内可见大量炎症细胞浸润。

2.1.2.1 A 组:注药后 1 周可见多处小片状浸润性癌巢,中央片状无结构坏死区,新生毛细血管较丰富;3 周后病灶内癌巢残存,周边少量纤维组织生成,仍可见新生毛细血管以及胞质丰富的瘤细胞和核分裂,部分可见核固缩、崩解,间质内炎症细胞浸润。

2.1.2.2 B 组:可见少量癌巢分布在瘤块的最外围,并可见范围扩大的纤维包裹,中央坏死区面积小,毛细血管罕见;体积萎小的肿瘤细胞胞质少,核固缩和崩解,并可见大量炎症细胞浸润。

2.1.2.3 C 组:注药后 2 周末见确切癌巢,纤维结缔组织对病灶形成完整的包绕而使其与正常肝组织分界清楚,部分纤维结缔组织透明变性、钙化,新生毛细血管罕见;高倍镜下病灶边缘与正常肝细胞分界清,胞质少并可见核固缩和崩解,中央少量炎症细胞浸润(图 1)。

2.1.2.4 D 组:注药后 1 周末见残存癌巢,中央有少量坏死区;可见核固缩、崩解和炎症细胞浸润明显,原肿瘤细胞区域部分发生透明变性;3 周后病灶与正常肝细胞分界仍不清,肿瘤病灶周围未见纤维结缔组织对病灶形成包绕(图 2)。

2.1.3 电镜观察 注药前各组肝肿瘤细胞呈类圆形,表面有浅的核内陷,部分可见 2 个毗邻的大核;肿瘤细胞胞质丰富,细胞器失去正常肝细胞分布,线粒体大小不一、嵴丰富生长紊乱,多数线粒体已与核被膜紧密相接,粗面内质网分布成簇,其形态与走向紊乱、池(cistern)呈多种变异形,大小不一;肿瘤细胞核染色质丰富,大小形态不等、核内位置不一、疏密分布不均,可见 1 ~ 2 个边缘不规则的大核仁或有少量小窗孔,偶见小的假包涵体(图 3)。

2.1.3.1 A 组:肝肿瘤细胞胞质内线粒体全部变小,大部分均呈暗调,注药前嵴丰富的大椭圆形线粒体消失;核糖体极少,粗面内质网池膜大部分消失而相互融合,扩张的大池内有崩解的胞质物质和凝聚

的颗粒;核普遍变小,其内有分散的小灶性核溶解,核仁、核窗孔变小,可见双核的肿瘤细胞;核内染色质均变为密集的粗颗粒,几乎分不清异染色质与常染色质,部分核隙周边有一浓重的异染色质带,几乎看不到核孔。

2.1.3.2 B组:肝肿瘤细胞内可见以扩张溶解粗面内质网池为中心的溶解区,较A组增大1倍,线粒体小而暗,有几处溶解消失,胞核染色质溶解较A组重,核溶解面积增大1倍,核较小。

2.1.3.3 C组:肿瘤细胞全部死亡,肿瘤成分大片凝固性坏死,仅见残留的微胆管;大部分细胞器无结

构,细胞质、细胞器、内质网、核糖体仅留崩解后膜泡的残迹;线粒体全部变暗,几处溶解消失;胞质内大的次级溶酶体增多,造成胞质、胞核,尤其是胞质严重溶解,细胞周边凝固残留成分较多,形成厚细胞壁的植物细胞样改变;细胞核严重溶解消失(图4)。

2.1.3.4 D组:肿瘤细胞全部死亡,细胞膜破裂,大面积胞质溶解殆尽,肿瘤细胞整体结构破坏,细胞间界限部分消失;在细胞器水平无一存活的细胞器,每个细胞器均遭不可逆的损害,发生肿胀、溶解、凝结和蛋白质沉着吸附;细胞核严重溶解,染色质大量丢失。

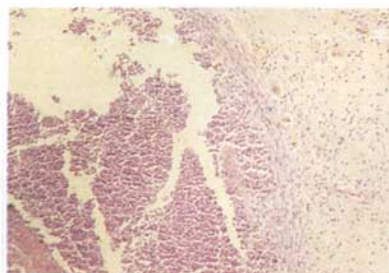


图1 C组注药后2周示中央大片无结构坏死区伴炎细胞浸润,未见残存肿瘤组织,病灶被纤维结缔组织包裹完全($\times 100$)

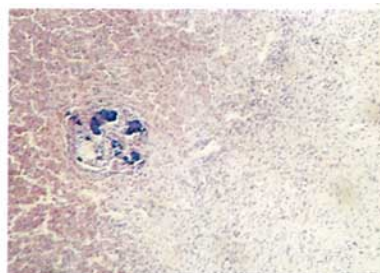


图2 D组注药后1周示炎细胞浸润明显,尤以肿瘤病灶周边为著,未见残存的肿瘤细胞,病灶与正常肝细胞之间无纤维分隔形成($\times 200$)

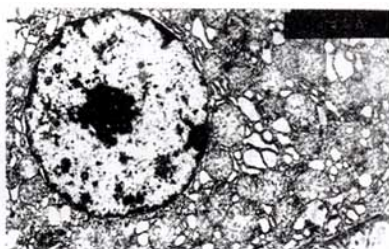


图3 注药前示肝肿瘤细胞核和核仁大,核染色质凝成不整形块,线粒体大,嵴丰富且异位贴近核被膜,粗面内质网池扩张、分布杂乱($\times 9900$)

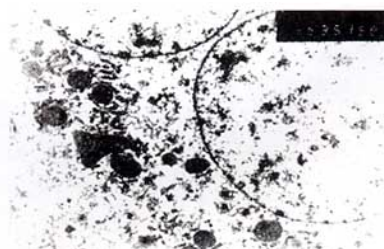


图4 C组注药后1周示肝肿瘤细胞核严重受损,染色质溶解,胞质粗面内质网池融合,膜崩解,核糖体溶解和线粒体呈高电子密度($\times 9900$)

3 讨论

1996年Tian等^[7]首先报道经皮瘤内注射 ^{90}Y -GMS治疗肝癌,取得了令人鼓舞的疗效。放射性核素主要包括 ^{90}Y -GMS和 ^{32}P -GMS,后者具有较长的半衰期及较强的组织穿透力,具有更广阔的应用前景。瘤内注射 ^{32}P -GMS剂量关系到治疗效果和不良反应的严重程度,经皮注射多大剂量 ^{32}P -GMS可使多大的肿瘤在多长时间坏死,以及其使用剂量的估算方法,一直是研究的热点。由于缺乏相对标准的临床治疗剂量方案,各文献所报道的有效率和生

存期也不尽相同^[8]。

^{32}P -GMS在组织内的平均射程为3.2 mm,内照射过程中绝大多数能量均集中在这个距离内;超过一定距离后,单纯增加点源的放射性活度并不能增加吸收剂量和增大平均射程。所以,合适的注射剂量决定疗效。本研究各实验组注药前肿瘤长径均在1 cm左右,随着点源剂量增加,对肿瘤杀伤范围也逐渐扩大,直至完全杀灭肿瘤组织;这是由于增高注射点放射强度可以导致辐射范围内肿瘤细胞死亡时间提前,更多的肿瘤细胞被“陷落”到杀伤半径内,从而增加了放射源的作用范围^[9,10]。

各组注药前,病灶内多发大片癌细胞巢与正常肝实质分界不清,呈弥漫浸润性生长,类似人肝癌。瘤内注射 ^{32}P -GMS 后,A 组在病灶周边还可见到多处小片状浸润性癌巢,新生毛细血管较丰富,提示点源剂量(37 MBq)不足以杀死直径 1 cm 实体性肝癌。B 组残存癌巢分布在瘤块的最外围,新生毛细血管较 A 组明显减少。C 组在注药后 2 周,即 ^{32}P -GMS 第一个半衰期完成时,肿瘤组织几乎死亡殆尽;注药后 3 周光镜和电镜观察见癌巢消失,并可见大部分细胞器形成厚细胞壁的植物细胞样改变,纤维结缔组织对病灶形成完整的包绕,使其与正常肝实质完全分隔,分界清楚,并可见透明变性、钙化,罕见新生毛细血管^[1]。D 组未见残存癌巢,肿瘤病灶内还见到广泛的透明变性和多发的钙化灶,肿瘤病灶与正常肝实质之间未形成纤维结缔组织分隔、与正常肝细胞分界仍不清,且病灶周围肝组织有轻度受累,提示其点源放射性活度过高,早期即对杀伤半径内的肿瘤细胞造成迅速而严重的破坏,纤维结缔组织替代不全或亦受到放射损害,同时累及正常肝组织,并引起持续多量的炎症细胞浸润。

通过光镜和电镜观察经皮瘤内注射 ^{32}P -GMS 后病理变化,说明 C 组剂量 111 MBq 是经皮瘤内注射 ^{32}P -GMS 治疗直径 1 cm 实性肝癌的最佳剂量,既可达到肿瘤细胞完全坏死,又在病灶周边形成完整的纤维组织包膜,这对于阻止肿瘤局部浸润和防止癌细胞远处转移有一定价值。

[参考文献]

- [1] Ramsey DE, Kernagis LY, Soulen MC, et al. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma [J]. J Vasc Interv Radiol, 2002, 13: S211 - S221.
- [2] Liu L, Jiang I. Clinical and experimental study on regional administration of phosphorus 32 glass microspheres in treating hepatic carcinoma [J]. WJG, 1999, 16: 530 - 536.
- [3] 张洪新,王执民,曹伟,等.兔 Vx-2 移植性肝癌模型的建立及其影像学表现[J].介入放射学杂志,2002,11:193 - 196.
- [4] 李欣,郑传胜,冯敢生,等.移植性大鼠肝癌模型肝动脉栓塞前后的影像学特征与病理分析[J].临床放射学杂志,2002,21:239 - 241.
- [5] 钱骏,冯敢生,Joehen T,等.同种移植大鼠肝细胞模型的建立及其磁共振表现[J].中华放射学杂志,2002,36:455 - 458.
- [6] 刘山荣,王建华,周康荣,等.原发性肝癌碘油栓塞后 MRI 随诊临床应用价值:兼与 DSA 临床随访对比[J].临床放射学杂志,2004,23:70 - 74.
- [7] Tian JH, Xu BX, Zhang JM, et al. Ultrasound-Guided internal radiotherapy using ^{90}Y -glass microspheres for liver malignancies [J]. J Nucl Med, 1996, 37: 958 - 963.
- [8] Ho S, Lan WY, Leung TWT, et al. Internal radiation therapy for patients with primary or metastatic hepatic cancer [J]. Cancer, 1998, 83: 1894 - 1907.
- [9] 谭建,董峰,孙福印,等.肿瘤内注射 ^{32}P -和 ^{90}Y -玻璃微球后放射性剂量与生物效应的关系[J].癌症,1999,18:395 - 397.
- [10] Park YN, Kim YB, Yang KM, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis [J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124:1061 - 1065.
- [11] 石建光,刘勇,曹喜才.支气管肺癌动物模型的制作[J].介入放射学杂志,2002,11:227 - 229.

(收稿日期:2005-11-28)