

• 实验研究 Experimental research •

射频消融治疗大鼠肝泡状棘球蚴病及病理改变

桑泽杰, 朱帝文, 纪卫政, 任伟新, 顾俊鹏, 张海潇, 温浩

【摘要】 目的 观察大鼠肝泡状棘球蚴病(HAE)射频消融术后 3、5、7 d 肝脏功能变化情况,及术后 7 d 的病理形态学改变,探索射频消融治疗大鼠 HAE 的安全性及疗效。**方法** 取 30 只成功接种 HAE 模型大鼠,分成对照组(假手术组)10 只和实验组 20 只,对照组仅开腹后缝合,实验组在开腹直视下行病灶完全消融,两组均分别于术前及术后 3、5、7 d 剪尾取血,检测天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT)水平。第 7 天处死全部大鼠,取大鼠肝泡状棘球蚴组织行病理检查,将肝功能测定结果与病理改变进行综合分析。**结果** 射频消融术后,显微镜下大鼠肝脏消融范围内病灶组织完全坏死。术后第 3 天,AST、ALT 明显升高,第 5 天逐渐恢复,第 7 天基本恢复至正常。术后肝功能变化与射频消融毁损区范围有关,并与消融后病理相对应。**结论** 短期内直视下射频消融治疗 HAE 技术简便易行,消融病灶液化坏死明显,可以完全消融。可能是治疗早期微小及难治性 HAE 的新选择。

【关键词】 肝泡状棘球蚴病; 射频消融; 动物实验

中图分类号:R53 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2014)-01-0054-04

Radiofrequency ablation therapy for hepatic alveolar echinococcosis in experimental rats: pathological observation SANG Ze-jie, ZHU Di-wen, JI Wei-zheng, REN Wei-xin, GU Jun-peng, ZHANG Hai-xiao, WEN Hao. Department of Interventional Radiology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Corresponding author: REN Wei-xin, E-mail: rxw1031@163.com

【Abstract】 Objective To observe the pathological changes and the liver function changes in experimental rats with hepatic alveolar echinococcosis (HAE) after radiofrequency ablation (RFA) therapy, and to discuss the safety and the efficacy of radiofrequency ablation. **Methods** A total of 30 rats with successfully established hepatic alveolar echinococcosis were randomly divided into control group ($n = 10$) and study group ($n = 20$). Only laparotomy and suture were performed in the rats of the control group, while laparotomy and RFA under direct vision were carried out in the rats of the study group. Serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels of all rats in both groups were determined before and 3, 5, 7 days after the treatment. All the rats were sacrificed on the seventh day. The diseased tissues were collected and sent for pathologic examination. The hepatic function results and the pathologic changes were analyzed. **Results** Microscopically, complete necrosis of the diseased tissue within the region of RFA was seen in the rats of study group after RFA. On the third day after RFA, the serum AST and ALT levels were significantly elevated, which were gradually restored on the fifth day, and they became normal on the seventh day. After the treatment, the hepatic function changes were associated with the ablated extent and were essentially in agreement with the pathologic changes. **Conclusion** For the treatment of HAE, RFA under direct vision is effective and technically-simple. Obvious liquefaction of the lesion can be obtained.

Therefore, RFA is a useful new alternative for the treatment of early, tiny and refractory HAE. (J Intervent Radiol, 2014, 23: 54-57)

【Key words】 hepatic alveolar echinococcosis; radiofrequency ablation; animal experiment

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技支撑项目(2013911128)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2014.01.015

作者单位: 830054 乌鲁木齐 新疆医科大学第一附属医院介入放射科(桑泽杰、任伟新、顾俊鹏、朱帝文、张海潇、纪卫政);新疆包虫病临床研究所(温浩)

通信作者: 任伟新 E-mail: rxw1031@163.com

射频消融(radiofrequency ablation, RFA)是 20 世纪 90 年代初发展的微创治疗肝肿瘤的方法,通过热能使肿瘤组织发生凝固性坏死。肝癌的 RFA 治疗效果与肿瘤大小相关,对于直径 ≤ 3 cm 的小肝癌,其治疗效果可与外科手术媲美^[1],近年来认为 ≤ 7 cm 的病灶都可以经 RFA 完全消融。RFA 具有适应证广泛、机体创伤小、手术安全性高的特点,有效性和适应证较宽、不良反应及并发症少,能最大限度地保护剩余肝功能,已广泛应用于肝癌的局部治疗^[2]。肝泡状棘球蚴病(hepatic alveolar echinococcosis, HAE)是一种人兽共患寄生虫病,由多房棘球蚴绦虫感染所致,多为肝脏原发病灶,主要分布在我国西北部和西南部地区。该病发病率低,为 0.3% ~ 4.8%,某些牧区高达 10%,是一种常见的地方病,新疆为该病高发区之一^[3]。其生长方式类似肿瘤,呈浸润性生长,侵犯周围组织,同时可向远处转移,故又称“虫癌”^[4]。确诊该病时大部分患者已失去根治性切除机会,手术切除率仅为 20% ~ 40%^[5]。目前该病多为手术切除联合阿苯达唑治疗,研究表明在患者生存概率和并发症发生率方面姑息性手术联合药物组与单纯药物组无差异,且姑息性手术联合药物治疗患者的病情更容易恶化,甚至死亡^[6]。本实验在直视下行 RFA 治疗 HAE,探讨 RFA 治疗 HAE 的安全性和有效性,通过天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT)评估肝功能受损程度,探讨 RFA 对残余病灶组织泡球蚴存活的影响,对早期微小和难治性 HAE 治疗提供新的选择。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择 2 月龄清洁级雄性 Wistar 大鼠 50 只,体重(0.20 ± 0.05)kg(新疆医科大学实验动物中心供给),大鼠饲养在清洁环境中。参照文献制作大鼠 HAE 的疾病模型^[7]。并于接种 6 个月后用 B 超筛查 HAE 种植情况^[8],选择无钙化型 HAE 模型动物。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及处理 取 30 只病灶直径(0.75 ± 0.25)cm 的 HAE 模型大鼠,分成对照组(假手术组)10 只和实验组 20 只。对照组开腹暴露 HAE 病灶后缝合;实验组大鼠麻醉后,背部脱毛、分离和暴露 HAE 病灶,直视下将射频电极插入肝脏病灶中心,调节功率为 50 W,时间 2 min。两组动物分别于术前及术后 3、5、7 d 剪尾取血,检测 AST 和 ALT 水平。第 7 天处死全部大鼠,取 HAE 组织标本,部分置于

4%甲醛溶液中固定 48 h,石蜡包埋,连续 5 μ m 切片(每份标本 5 片)、脱蜡、染色后行病理检测,与肝功能测定结果一并进行综合分析。

1.2.2 HAE 分级 根据泡球蚴的角质层、生发层在光镜下的病理形态学改变和育囊发育情况分为 3 级^[9]。0 级(基本正常):泡状棘球蚴结构基本正常,多数见育囊或芽生结构,育囊内有数量不等的原头节,钙颗粒形态正常。I 级(变性改变):泡状棘球蚴结构存在,角质层和生发层可辨认,组织普遍变性肿胀,很少见育囊和原头节。II 级(坏死):泡状棘球蚴结构失常,生发层细胞核固缩、溶解或消失,育囊与原头节少见;偶见钙颗粒,形态模糊;重者有纤维组织增生和炎性细胞浸润。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RFA 对肝功能的影响

实验组 AST 和 ALT 在术后第 3 天达最高值,分别为(193.89 ± 9.31)u/L 和(60.07 ± 2.68)u/L,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$);第 5 天 AST 和 ALT 值逐渐下降,分别为(169.04 ± 7.76)u/L 和(41.31 ± 2.18)u/L,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$);第 7 天两者均恢复至正常水平,分别为(106.73 ± 5.15)u/L 和(31.57 ± 3.44)u/L,与对照组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 HAE 模型大鼠的病理改变

实验组大鼠在实验过程中意外死亡 1 只。RFA 术后 7 d,实验组病理变化以 II 级为主(17/19),光镜下角质层、生发层模糊,部分生发层细胞空泡变、核溶解;I 级 2 只,光镜下可见泡状棘球蚴结构失常,角质层、生发层普遍变性、分离或断裂、脱落,皮层变薄,部分结构被破坏(图 1)。

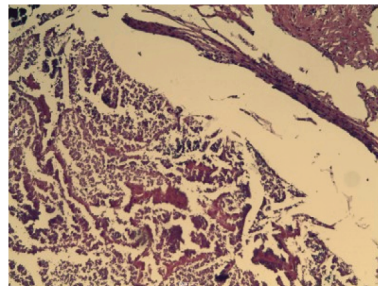


图 1 实验组病理变化以 II 级(坏死)为主(HE, $\times 200$)

2.3 组织病理学改变

肝 HAE 模型病灶呈浸润性生长,无包膜,泡球

蝾病灶细胞呈巢片状或假腺样分布,排列较为紧密,局部紊乱,细胞体积大,形态不规则,胞质嗜双色性,核大小不一,深染,核染色质粗,核仁明显。消融治疗后,射频毁损区呈类球形。标本毁损区中央呈灰白色,周边水肿出血呈暗红色,与周围正常组织分界不清(图 2)。

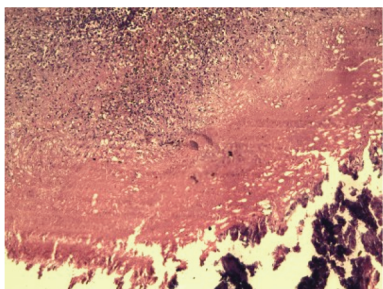


图 2 RFA 后中心区为大片不定形坏死组织;周边见炎症反应带,其内较多中性粒细胞、淋巴细胞及红细胞聚集;外围为残存的泡球蝾病灶及其边缘带组织(HE,×200)

3 讨论

RFA 机制是射频电磁波震动引起离子相互摩擦产生热量;电极针局部组织传至病灶周围温度可达 45 ~ 50℃,引起组织脱水及蛋白质变性;局部温度超过 70℃时,导致蛋白质凝固性坏死^[10-11]。但是,局部温度超过 100℃时,电极针周围病灶组织出现炭化与气化,此现象阻碍了热量传导。Valley 公司的冷循环电极通过热传导系统带走热量,保持射频电极局部病灶周围的相对低温,减少或避免消融病灶局部组织的气化和炭化,同时可保证或扩大消融灶的范围^[10,12-13]。同时,病灶周边的微血管及组织凝固,使之不能继续向病灶供血,不仅促进残存病灶死亡还有利于防止病灶转移^[14]。一直以来,手术切除是 HAE 仅有的治疗方法^[15]。而对早期的小病灶 HAE,手术治疗尚有争议,主要以姑息性药物阿苯达唑治疗,但由于该药溶解性较低,且在体内广泛分布,极大地减低了其生物利用度。近年以 RFA 为代表的局部治疗为肝脏等实性占位病变治疗提供了新的选择。而 RFA 的出现大大提高了局部治疗的疗效,有文献报道 RFA 治疗肝囊性包虫病的离体动物实验显示,RFA 具有良好的效果^[16]。Thanos 等^[17]报道术后联合 RFA 治疗 1 例复杂肝包虫囊肿取得满意疗效。

RFA 治疗 HAE 仅有个案报道,尚无大量有对照的研究。本实验 RFA 后 HAE 病灶完全坏死率与文献报道相似^[18-19],RFA 灶周边为炎症反应,细胞间通透性增大,可见大量红细胞渗出,炎症细胞聚集。

术后肝功能检测表明,RFA 治疗 HAE 安全,疗效肯定,有强大的促进组织坏死作用。RFA 治疗 HAE 有一定优势,实验中部分 HAE 消融模型建立在 HAE 移植瘤基础上,对动物肝脏损伤很小,相应的动物耐受力则很强。我们在大鼠肝脏上同时观察 RFA 后残余病灶和 RFA 治疗后局部致热性损伤引起的良性炎症反应,模拟人原发性 HAE 的 RFA 后残余病灶,提供了仿真的临床研究模型,比较适用于原发性 HAE 的 RFA 后的病理学研究及疗效判定等相关研究。

本实验定制的灌注型 RFA 电极借助微量水泵将冷生理盐水泵入消融病灶组织内部,通过此方式既降低病灶组织周围区域温度,减少或避免炭化和气化的发生,又增加消融病灶组织内的离子数目,增强了离子震动及热传导,在不增加功率的情况下扩大病灶消融范围^[10,12-13]。

RFA 治疗因创伤小、并发症少、疗效确切等优点,已成为最有前景的热凝固消融方式。RFA 治疗 HAE 的目的在于原位灭活泡状棘球蚴,最小限度地损伤正常肝组织;假手术组 AST 和 ALT 水平无明显变化,而实验组行 RFA 后第 3 天 AST 和 ALT 水平明显升高,第 5 天仍较正常稍高,可能为 RFA 引起病灶局部微血管及组织凝固,局部有效血流绝对灌注较少,导致病灶局部细胞缺血缺氧,高能磷酸化合物如 ATP 减少,Na⁺-K⁺-ATP 泵的酶活性下降,Ca²⁺跨膜内流增加,引起 ATP 分解活跃,为自由基的生成提供底物。同时,内流的 Ca²⁺还可激活蛋白酶,催化次氧嘌呤的氧化反应,最终生物膜脂质氧化损伤。但在第 7 天,实验组 AST 和 ALT 趋于正常,表明 RFA 虽对大鼠肝功能有一定的损伤,但仍可恢复。

实验组大鼠病灶经 RFA 后损伤主要以坏死为主(Ⅱ级),但仍有少数Ⅰ级病变,可能与泡球蚴病灶约 0.8 cm 有关,血供主要来自于门静脉^[20-22],RFA 治疗时由门静脉带走较多热量,消融不完全。此外,特殊部位如膈顶、心脏、靠近肠道等部位,也是消融不完全的原因^[23-25]。本研究结果提示,开腹直视下 RFA 在治疗大鼠 HAE 方面有较大的应用潜力,短期内病灶液化坏死明显,HAE 完全灭活,我们认为 RFA 在治疗 HAE 中可能有重要作用,对于治疗微小及难治性 HAE,可能是一种选择,可望为临床治疗 HAE 提供新的治疗方法。

本实验通过制作大鼠 HAE RFA 治疗模型,初步观察 RFA 后短期内病灶的病理学改变及肝功能损害,揭示 RFA 后残余病灶的生物学活性改变,为

进一步 RFA 治疗早期 HAE 小病灶及其临床应用提供理论依据。RFA 治疗后大鼠泡球蚴病灶周边微血管的改变、远期复发转移及再次治疗等问题有待于进一步的研究。

[参考文献]

- [1] N'Kontchou G, Mahamoudi A, Aout M, et al. Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: long-term results and prognostic factors in 235 Western patients with cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2009, 50: 1475 - 1483.
- [2] Kim JW, Shin SS, Kim JK et al. Radiofrequency Ablation combined with trans-catheter arterial chemoembolization for the treatment of single hepatocellular carcinoma of 2 to 5 cm in diameter: comparison with surgical resection [J]. *Korean J Radiol*, 2013, 14: 626 - 35.
- [3] 王成伟, 张林. 肝脏泡状棘球蚴病的 CT MRI 表现[J]. *中国现代医学杂志*, 2007, 20: 2536 - 2538.
- [4] Ammann RW, Hirsbrunner R, Cotting J, et al. Recurrence rate after discontinuation of long-term mebendazole therapy in alveolar echinococcosis (preliminary results) [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1990, 43: 506 - 515.
- [5] Polat KY, Balik AA, Celebi F. Hepatic alveolar echinococcosis: clinical report from an endemic region [J]. *Can J Surg*, 2002, 45: 415 - 419.
- [6] 阿依甫汗·阿汗, 张日新, 张金辉, 等. 姑息性手术加药物和单纯性药物治疗肝泡状棘球蚴病的循证医学效果评价[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21: 1868 - 1872.
- [7] 张金辉, 温浩, 刘章锁, 等. 原发性肝泡球蚴动物模型的建立[J]. *中国局解手术学杂志*, 2000: 11 - 13.
- [8] 朱帝文, 任伟新, 顾俊鹏, 等. 超声在筛检大鼠肝泡状棘球蚴病模型中的应用价值[J]. *中国医学影像技术*, 2009, 25: 363 - 365.
- [9] 陆依媛, 李清华, 张伟明. 临床检验自动化分析仪器标准化操作规程[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2006: 9 - 15.
- [10] Ni Y, Mulier S, Miao Y, et al. A review of the general aspects of radiofrequency ablation[J]. *Abdom Imaging*, 2005, 30: 381 - 400.
- [11] Dupuy DE, Goldberg SN. Image-guided radiofrequency tumor ablation: challenges and opportunities-part II [J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2001, 12: 1135 - 1148.
- [12] Mulier S, Ni Y, Miao Y, et al. Size and geometry of hepatic radiofrequency lesions [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2003, 29: 867 - 878.
- [13] Lee JM, Han JK, Kim SH, et al. Bipolar radiofrequency ablation in ex vivo bovine liver with the open-perfused system versus the cooled-wet system [J]. *Eur Radiol*, 2005, 15: 759 - 764.
- [14] 郭俊渊. 现代腹部影像诊断学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 611.
- [15] Ammann RW. Improvement of liver resectional therapy by adjuvant chemotherapy in alveolar hydatid disease [J]. *Swiss Echinococcosis Study Group (SESG). Parasitol Res*, 1991, 77: 290 - 293.
- [16] Lamonaca V, Virga A, Minervini MI, et al. Cystic echinococcosis of the liver and lung treated by radiofrequency thermal ablation: an ex-vivo pilot experimental study in animal models [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15: 3232 - 3239.
- [17] Thanos L, Mylona S, Brontzakakis P, et al. A complicated post-surgical echinococcosis cyst treated with radiofrequency ablation [J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2008, 31: 215 - 218.
- [18] 封云, 佟小强, 杨敏, 等. 正常动物肝脏的射频消融实验[J]. *中国介入影像与治疗学*, 2005, 2: 211 - 214.
- [19] Morimoto M, Sugimori K, Shirato K, et al. Treatment of hepatocellular carcinoma with radiofrequency ablation: radiologic-histologic correlation during follow-up periods [J]. *Hepatology*, 2002, 35: 1467 - 1475.
- [20] 任伟新, 肖湘生. 肝泡状棘球蚴病门脉血供的实验研究[J]. *中国介入影像与治疗学*, 2007, 4: 142 - 147.
- [21] 樊玉祥, 任伟新, 迪理木拉提·巴吾冬, 等. DSA 评价大鼠肝泡状棘球蚴病血供 [J]. *中国介入影像与治疗学*, 2012, 09: 37 - 40.
- [22] 朱帝文, 穆民, 任伟新, 等. 经门静脉药物灌注化疗栓塞治疗大鼠肝泡状棘球蚴病的电镜观察 [J]. *介入放射学杂志*, 2013, 22: 614 - 627.
- [23] 潘杰, 陈绍辉, 卢欣, 等. 全麻下 CT 引导下经穿刺射频消融治疗肝内特殊部位的恶性肿瘤 [J]. *介入放射学杂志*, 2010, 06: 478 - 481.
- [24] 彭国文, 李晓群. 射频消融及组合方案治疗特殊/高危部位肝癌的中远期疗效[J]. *介入放射学杂志*, 2013: 525 - 528.
- [25] 翟博, 李晓燕, 刘晟, 等. 膈顶部原发性肝癌的射频消融 [J]. *介入放射学杂志*, 2009, 18: 357 - 361.

(收稿日期: 2013-07-10)

(本文编辑: 侯虹鲁)