

·实验研究 Experimental research·

不可逆电穿孔消融兔胆囊侧肝脏病理学观察

梁 冰, 牛立志, 曾健滢, 周 亮, 周序琰, 方 刚, 姚 飞, 邓春娟,
汪 媛, 张 波, 李书英, 邓春梅, 杨惠霏, 李家亮, 刘建国, 徐克成

【摘要】 目的 研究靠近胆囊 0.5 cm 处不可逆电穿孔肝脏消融的安全性和有效性。**方法** 采用新西兰白兔 3 只作为实验动物,在靠近胆囊 0.5 cm 处肝脏进行不可逆电穿孔消融,并于 7 d 后观察消融区域的肝脏病理反应和胆囊损伤情况。**结果** 3 只动物均成功完成消融。消融 7 d 后,肝脏面原消融区平均直径 3.00 cm 黄色坏死灶,肝膈面形成 1 个平均直径 1.67 cm 类圆形黄色坏死灶。2 只实验兔消融部位和腹壁、1 只肝叶和膈肌发生小片段浅度粘连。2 只肠系膜则与胆囊消融灶区发生严重粘连。光镜下可见肝大片坏死且消失,仅有部分凝固性坏死肝组织残留,外围有少量斑点状钙化,炎性肉芽组织和小胆管显著增生。肝门静脉血管平滑肌损伤不明显,肌层小范围纤维素样变性、胆囊黏膜上皮大部分坏死,胆囊外结缔组织水肿、胆总管部分黏膜上皮坏死,部分上皮仍存在,肌层完好。**结论** 消融部位肝脏组织完全坏死,消融灶和周围组织分界明显,胆囊出现损伤,但无胆囊漏发生。因此,对于靠近胆囊的肝脏肿瘤而言,不可逆电穿孔可能是一种相对安全有效的选择。

【关键词】 肝脏;不可逆电穿孔消融;胆囊;兔

中图分类号:R735.7 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2014)-04-0320-05

Irreversible electroporation ablation of the hepatic region close to the gallbladder: pathological observation in experimental rabbits LIANG Bing, NIU Li-zhi, ZENG Jian-ying, ZHOU Liang, ZHOU Xu-long, FANG Gang, YAO Fei, DENG Chun-juan, WANG Yuan, ZHANG Bo, LI Shu-ying, DENG Chun-mei, YANG Hui-fei, LI Jia-liang, LIU Jian-guo, XU Ke-cheng. Affiliated Fuda Cancer Hospital, School of Medicine, Ji'nan University, Guangzhou, Guangdong Province 510665, China

Corresponding author: XU Ke-cheng, E-mail: fudalab@gmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the safety and efficacy of irreversible electroporation (IRE) ablation of hepatic region close (0.5 cm) to the gallbladder. **Methods** Three New Zealand white rabbits were used for this study. The IRE probes, which were placed in the hepatic tissue, were 0.5 cm apart from the gallbladder, and IRE ablation was performed. Seven days after the treatment the pathological changes of the hepatic ablated zones and gallbladders were examined. **Results** Successful IRE ablation was accomplished in all 3 rabbits. Seven days after the treatment the experimental rabbits were sacrificed, and their livers and gallbladders were collected and sent for pathological examination. Macroscopically, the hepatic surface of the ablated area showed a yellow necrotic lesion, which was (3.00 ± 0.50) cm in size. At the diaphragmatic surface of the liver a round yellow lesion was seen with a size about (1.67 ± 1.15) cm. Slight superficial adhesion could be seen at the ablated areas and abdominal wall ($n = 2$), hepatic lobe ($n = 1$) and diaphragm ($n = 1$). Serious adhesion of mesentery with the ablated gallbladder was seen in two rabbits. Microscopically, massive necrosis or disappearance of the hepatic tissue together with a little residual hepatic coagulation necrosis and speckled calcifications at the peripheral region could be detected. Inflammatory granulation and prominent proliferation of the tiny biliary ducts were also observed. The damage of the vascular smooth muscle

in the portal vein was not obvious. Small area of fibrinoid degeneration was seen in the muscular layer. Mucosal epithelial necrosis of the gallbladder and connective tissue edema outside the gallbladder could also be observed.

Conclusion Complete necrosis of the hepatic

基金项目:广州天河区科技计划项目(2013KW051)

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2014.04.012

作者单位:510665 广州暨南大学医学院附属复大肿瘤医院

通信作者:徐克成 E-mail: fudalab@gmail.com

tissue at the ablated area can be achieved by IRE ablation. The ablated zone has a clear demarcation with the surrounding tissue. No gallbladder leakage occurs although the gallbladder is damaged. Therefore, for the hepatic tumors, which are located close to the gallbladder, irreversible electroporation ablation may be regarded as a relatively safe and effective treatment. (J Intervent Radiol, 2014, 23: 320-324)

【Key words】 liver; irreversible electroporation ablation; gallbladder; rabbit

我国是原发性肝癌的高发国家,病死率占恶性肿瘤的第 2 位^[1]。肿瘤手术切除是目前肝癌患者获得长期生存乃至根治的主要方法之一,但能获得手术切除的患者低于 20%。对于不可切除的肝癌,化疗已成为最主要的治疗手段,但由于可能的不良反应,化疗的疗效仍然有限。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。目前,射频消融^[2]、微波消融^[3]、冷冻消融^[4]和不可逆电穿孔^[5]都已成功用于治疗肝癌。其中,不可逆电穿孔是最近刚开始在临床应用的肿瘤消融新技术,该技术利用高压直流电发出的强大电场的作用,在细胞膜上产生多个细孔从而不可逆转地破坏细胞,导致即时肿瘤细胞死亡^[6-7]。由于消融产生在细胞膜上的细孔为纳米级别的空洞,该技术又被称为纳米刀。对于肝脏肿瘤消融,对靠近隔膜穹顶第一肝门和邻近胆囊部位的肿瘤进行消融,由于可能会引发严重的并发症,一直是经皮穿刺消融肝脏肿瘤的难点甚至是禁忌^[8]。由于不可逆电穿孔具有消融范围明确、消融时间短、对神经和血管具有保护作用的优点,在肝脏肝门和胆囊等关键部位的消融可能具有一定优势。因此,本研究在白兔肝脏靠近胆囊 0.5 cm 处进行不可逆电穿孔消融,观察消融 7 d 后肝脏情况和胆囊的病理损伤,以探讨不可逆电穿孔对于靠近胆囊的肝脏消融的有效性和安全性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雌性普通级新西兰兔 3 只,体重 2.5 ~ 30 kg,由南方医科大学实验动物中心提供,动物生产许可证号[SCXK(粤)2011-0015],动物合格证号[粤监证字 44002100000654]。

1.1.2 主要实验器械和药品试剂 AngioDynamics 纳米刀系统(美国 AngioDynamics 公司),包括主机、长 15 cm 和有效距离 0 ~ 4 cm 的纳米刀电探针(美国 AngioDynamics 公司,批号 20400104);监护仪(荷兰 Philips 公司,型号 M8001A),ID3.0 气管导管购自泰科医疗器材国际贸易(上海)有限公司(批号为 11004113042)、ENT-1001 婴儿型呼吸囊购自台

湾-彦大有限公司(批号为 20100426)、阿托品购自天津药业集团新郑股份有限公司(批号为 715765U),盐酸氯胺酮注射液购至福建古田药业有限公司(批号为 H35020148)。盐酸戊己奎醚(长托宁)注射液购至城都力思特制药(批号为 120607)公司,维库溴铵粉针剂购自浙江仙琚药业(批号为 130303),硫酸阿托品注射液购自徐州莱恩药业(批号为 1211112),新斯的明注射液购自上海信谊金朱药业(批号 120802)。

1.2 方法

1.2.1 术前准备及麻醉 动物禁食 24 h,禁水 12 h。术前在实验兔腿部肌肉内注射阿托品(0.02 mg/kg)及盐酸氯胺酮注射液(44 mg/kg)诱导麻醉后,家兔仰卧位固定,在剑骨突后缘至耻骨前缘备皮,行气管切开后置入 ID 3.0 号气管导管,肌肉注射维库溴铵 0.12 mg/kg。选用婴儿型呼吸囊控制呼吸,控制潮气量为 50 ml,呼吸频率为 30 ~ 50 次/min,呼吸比为 1 : 1 和氧分压为 100%。开腹前按体重 44 mg/kg 后腿肌肉注射氯胺酮注射液以维持麻醉。手术结束,自肌肉注射维库溴铵 30 min 后给予阿托品、新斯的明各 0.1 mg 拮抗肌肉松弛,30 min 重复 1 次。

1.2.2 纳米刀消融步骤 动物麻醉后开腹,暴露肝左上叶,直视下将纳米刀电探针 1 (P+) 和探针 2 (P-)垂直插入肝脏面 0.5 cm,2 针距离 1.5 cm,使与胆囊壁距离为 0.5 cm,设置探针有效距离为 0.5 cm,起始电压为 2 250 V、脉冲长度 70 ms 和数字脉冲 90 Hz 后启动系统,消融术程约 1 min,电击结束后拔出探针即完成纳米刀消融术。于消融区两端各置一缝线作为标记后结束手术,将脏器回纳腹腔,常规闭腹,待实验动物苏醒后自由饮食,护理期间不给予药物。

1.2.3 术中与术后观察 术中观察电消融时肝脏及胆囊表面形态变化,用游标卡尺测量并记录组织表面消融区域最大半径。术后第 7 天对实验兔实行安乐死,观察肝脏与胆囊消融区域及周边脏器形态变化。

1.2.4 病理检查 取组织标本置甲醛中固定 24 h 以上,石蜡包埋,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,连续

切片,厚度 5 μm ,常规苏木精-伊红(HE)染色,封片后镜下观察。

1.3 统计学处理

采用 Graphpad Prism 5(GraphPad,USA)软件进行统计学分析。计量数据用平均值 \pm 标准偏差($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

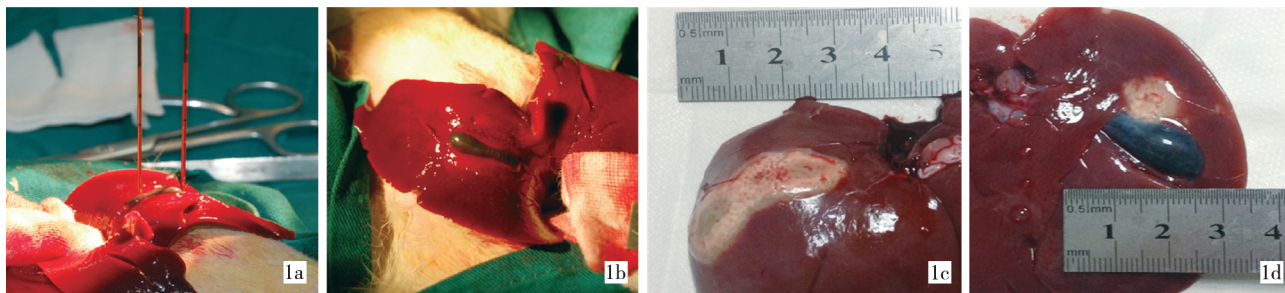
2 结果

2.1 术中与术后消融区形态观察

2.1.1 术中肝脏及胆囊形态变化 消融过程中未见肝脏和胆囊表面有显著外观改变(图 1a),消融结

束后肝消融区颜色略深,边缘不清晰,穿刺部位有少量出血,周围组织形态及颜色无异常(图 1b)。

2.1.2 术后消融区域及周边脏器形态变化 消融 7 d 后肝膈面原消融区可见一 8 字型黄色坏死灶,表面最大径平均为 3.00 cm,外周有一圈淡粉红色的分隔带,与周围组织分界明显(图 1c);肝脏面形成一类圆形黄色坏死灶(图 1d),表面最大径平均为 1.67 cm。将坏死灶以术中消融区两端缝线作连线,垂直肝叶剖开后,可见坏死灶全层贯穿左肝叶,其他区域肝脏组织未见异常。靠近肝消融区一侧胆囊壁颜色变浅,发白。



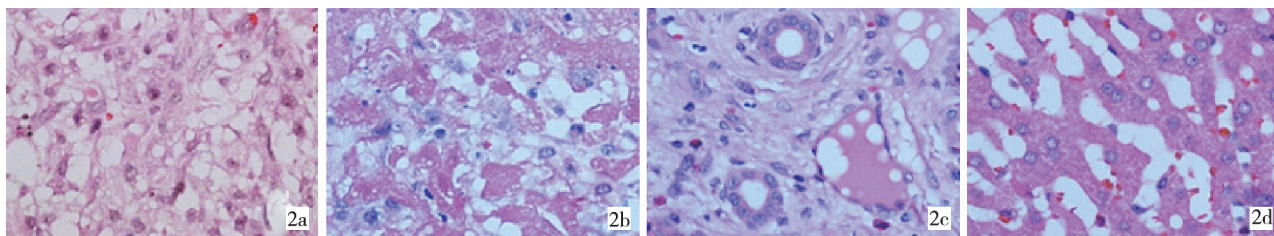
1a 距胆囊边缘 0.5 cm 插入纳米刀探针 1b 纳米刀消融后,未见明显消融区边缘 1c 消融 7 d 后肝膈面坏死灶 1d 消融 7 d 后肝脏面坏死灶

图 1 不可逆电穿孔肝脏消融过程

2.1.3 粘连情况 2 只实验兔腹壁、1 只肝叶和膈肌与肝膈面消融区发生小片段浅度粘连。2 只肠系膜则与胆囊消融灶区发生严重粘连。

2.2 病理组织学观察

2.2.2 肝消融区 7 d 后组织学观察 光镜下可见肝组织大片坏死消失,仅有部分凝固性坏死肝组织轮廓残留,外围有少量斑点状钙化,炎性肉芽组织和残留小胆管显著增生(图 2)。



2a 肉芽组织增生 2b 肝组织坏死区可见凝固性坏死组织 2c 小胆管显著增生 2d 正常肝组织

图 2 兔肝脏消融 7 d 后组织学所见(HE, $\times 400$)

2.2.3 肝门静脉、胆囊和胆总管消融 7 d 后组织学观察 ① 肝门静脉血管平滑肌损伤不明显,肌层损伤不理想,小范围纤维素样变性(图 3a)。② 胆囊黏膜层上皮大部分坏死脱落,小部分仍存在,肌层损伤不明显,胆囊浆膜层充血水肿,少量炎细胞浸润(图 3b)。③ 胆总管部分黏膜上皮坏死,部分上皮仍存在,浆膜层充血水肿,少量炎性细胞浸润(图 3c)。

3 讨论

不可逆电穿孔是 2012 年 4 月美国 FDA 批准应

用于临床的肿瘤消融新技术。该技术具有以下特点:① 不可逆电穿孔可通过诱导细胞凋亡,引发肿瘤组织坏死^[9-11]。② 与已有的热消融技术如射频消融、微波消融和冷冻消融不同,不可逆电穿孔无需热能,通过改变细胞膜通透性即可导致组织死亡。因此,该法不受热沉效应影响。③ 不可逆电穿孔可在消融区和非消融区产生明显的边界,这将最大可能的减少对肿瘤组织的损伤,减少并发症的发生。④ 消融时间短。与传统消融技术(30 min ~ 数小时)相比,不可逆电穿孔可在微秒到毫秒治疗时间内有

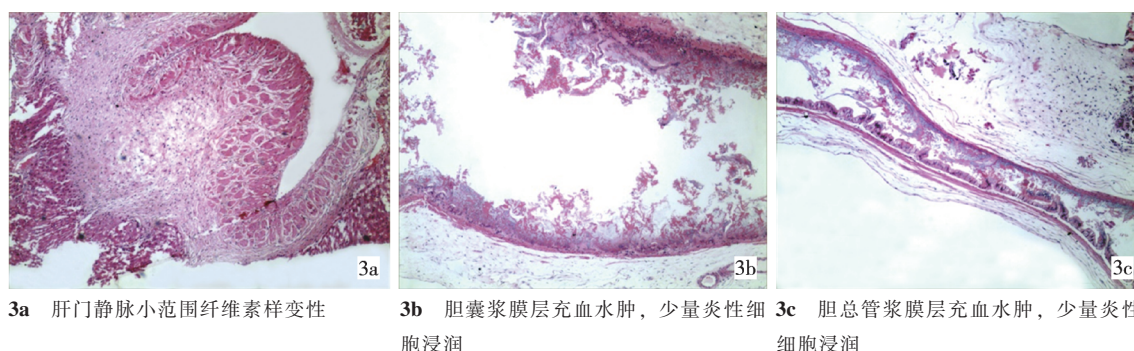


图 3 胆囊、肝门静脉、胆囊消融 7 d 后病理学观察(HE,×40)

效导致组织死亡。非热细胞死亡及治疗时间显著减少。⑤ 对神经和大血管的保护作用^[12-15]。这使不可逆电穿孔可以在富含大血管或神经的部位消融肿瘤,而不用担心并发症的发生。因此,由于不可逆电穿孔的上述优势,该方法已在肝癌消融方面进行了初步的临床应用,并显示出非常广阔的应用前景^[16-17]。

由于肝脏组织血供较为丰富,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。由于不可逆电穿孔没有“热沉”效应,该技术在治疗接近血管的肿瘤上独具优势^[18]。但是,由于不可逆电穿孔的研究尚处于初级阶段,其消融肝脏肿瘤的适应证和禁忌证尚未深入研究。对于不可逆电穿孔来说,靠近膈膜穹顶,第一肝门和邻近胆囊部位的肿瘤消融,也可能会引发膈肌穿孔或胆囊漏发生,需要对其进行深入系统研究。本研究利用新西兰白兔模型,在白兔肝脏靠近胆囊处 0.5 cm 处进行不可逆电穿孔消融,观察 7 d 后肝脏的消融情况和胆囊的病理损伤,以探讨不可逆电穿孔对于靠近胆囊的肝脏消融的有效性和安全性。本次研究发现,消融 7 d 后肝脏面原消融区 3.00 cm 黄色坏死灶,肝膈面形成 1 个 1.67 cm 类圆形黄色坏死灶。外周有一圈淡粉红色的分隔带,与周围组织分界明显。2 只实验兔消融部位和腹壁、1 只肝叶和膈肌发生小片段浅度粘连。光镜下可见肝大片坏死且消失,仅有部分凝固性坏死肝组织残留,外围有少量斑点状钙化,炎性肉芽组织和小胆管显著增生。肝门静脉血管平滑肌损伤不明显,肌层小范围纤维素样变性、胆囊黏膜上皮大部分坏死,胆囊外结缔组织水肿、胆总管部分黏膜上皮坏死,部分上皮仍存在,肌层完好。2 只兔肠系膜则与胆囊消融灶区发生严重粘连。因此,从目前的结果来看,不可逆电穿孔靠近胆囊 0.5 cm 消融肝脏,肝脏组织坏死明确,胆囊出现明确损伤,但没有胆囊漏发生。

总之,本研究对肝脏靠近胆囊 0.5 cm 处进行不

可逆电穿孔消融,以观察该方法在临床上靠近胆囊的肝脏肿瘤消融的安全性和有效性。结果显示,消融部位肝脏组织完全坏死,消融灶和周围组织分界明显,胆囊出现损伤,但没有胆囊漏发生。因此,对于靠近胆囊的肝脏肿瘤来说,不可逆电穿孔可能是一种相对安全有效的选择。还需要对该技术作进一步研究,以在治疗时正确选择患者,减少潜在并发症的发生,从而明确不可逆电穿孔的适应范围和临床应用价值。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55: 10 - 30.
- [2] Cucchetti A, Piscaglia F, Cescon M, et al. Systematic review of surgical resection vs radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19: 4106 - 4118.
- [3] Itoh S, Ikeda Y, Kawanaka H, et al. Efficacy of surgical microwave therapy in patients with unresectable hepatocellular carcinoma [J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18: 3650 - 3656.
- [4] Mu F, Niu L, Li H, et al. Percutaneous comprehensive cryoablation for metastatic hepatocellular cancer [J]. Cryobiology, 2013, 66: 76 - 80.
- [5] Cheung W, Kavnoudias H, Roberts S, et al. Irreversible electroporation for unresectable hepatocellular carcinoma: initial experience and review of safety and outcomes [J]. Technol Cancer Res Treat, 2013, 12: 233 - 241.
- [6] Long G, Bakos G, Shires PK, et al. Histological and finite element analysis of cell death due to irreversible electroporation [J]. Technol Cancer Res Treat, 2013: [Epub ahead of print].
- [7] Lee EW, Loh CT, Kee ST. Imaging guided percutaneous irreversible electroporation: ultrasound and immunohistological correlation [J]. Technol Cancer Res Treat, 2007, 6: 287 - 294.
- [8] Wu B, Xiao YY, Zhang X, et al. Magnetic resonance imaging-guided percutaneous cryoablation of hepatocellular carcinoma in special regions [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2010, 9: 384 - 392.
- [9] Xiao D, Yao C, Liu H, et al. Irreversible electroporation and

- apoptosis in human liver Cancer cells induced by nanosecond electric pulses[J]. Bioelectromagnetics, 2013, 34: 512 - 520.
- [10] Lee YJ, Lu DS, Osuagwu F, et al. Irreversible electroporation in porcine liver: acute computed tomography appearance of ablation zone with histopathologic correlation [J]. J Comput Assist Tomogr, 2013, 37: 154 - 158.
- [11] Schmidt CR, Shires P, Mootoo M. Real-time ultrasound imaging of irreversible electroporation in a porcine liver model adequately characterizes the zone of cellular necrosis [J]. HPB (Oxford), 2012, 14: 98 - 102.
- [12] Li W, Fan Q, Ji Z, et al. The effects of irreversible electroporation (IRE) on nerves [J]. PLoS One, 2011, 6: e18831.
- [13] Maor E, Ivorra A, Leor J, et al. The effect of irreversible electroporation on blood vessels [J]. Technol Cancer Res Treat, 2007, 6: 307 - 312.
- [14] Lee YJ, Lu DS, Osuagwu F, et al. Irreversible electroporation in porcine liver: short-and long-term effect on the hepatic veins and adjacent tissue by CT with pathological correlation [J]. Invest Radiol, 2012, 47: 671 - 675.
- [15] Kingham TP, Karkar AM, D'angelica MI, et al. Ablation of perivascular hepatic malignant tumors with irreversible electroporation[J]. J Am Coll Surg, 2012, 215: 379 - 387.
- [16] Charpentier KP. Irreversible electroporation for the ablation of liver tumors: are we there yet? [J]. Arch Surg, 2012, 147: 1053 - 1061.
- [17] Narayanan G. Irreversible electroporation for treatment of liver Cancer[J]. Gastroenterol Hepatol (N Y), 2011, 7: 313 - 316.
- [18] Cannon R, Ellis S, Hayes D, et al. Safety and early efficacy of irreversible electroporation for hepatic tumors in proximity to vital structures[J]. J Surg Oncol, 2013, 107: 544 - 549.
- (收稿日期:2013-12-20)
(本文编辑:侯虹鲁)

·消 息·

2014 年《介入放射学杂志》继续教育通知

为满足全国介入放射学工作者,尤其是基层和地处偏僻地区的介入放射学工作者对继续教育的需求,充实基础理论知识,促进介入放射学医疗水平,提高教育和科研质量,节省介入放射学工作者接受继续教育的费用和时间,在本刊编委会专家们的积极支持下,经批准 2014 年《介入放射学杂志》将继续开设函授继续教育,项目名称“介入放射学新技术推广和诊疗规范普及”,编号:2014-09-01-193(国),学习结束将授予国家级 I 类学分 10 分。愿参加者请报名,具体实施方案如下:

1. 学员对象:具有初、中级以上专业技术职称,正在从事介入放射学及其相关专业技术工作的人员均可参加。
 2. 继续教育内容:介入放射学新技术和介入诊疗规范,每期以继续教育,讲座,综述等形式刊登于本刊杂志上。
 3. 学员报名步骤:欲参加此项继续教育项目者请将回执(可复印)填写后寄回,(回执请务必填写完整,信封上注明“参加继续教育”)。编辑部以收到学员报名和继续教育费后给予登记注册和编号。
 4. 考试方法:编辑部定期将试卷寄给注册过的学员(试卷复印无效),考试分上下半年各一次,上半年于 6 月份进行,下半年于 12 月份进行。考试合格的学员,将发给学分证书(年底)。
 5. 收费标准:每位参加者需交学习资料费,邮寄费,学分证书等费用共计 230 元。欲参加者,请与编辑部联系、咨询。
- 地 址:上海市华山路 1328 号《介入放射学杂志》编辑部
邮 编:200052
电 话:021-62409496,021-81818191
E-mail:jrfxzz@163.com

参加“介入放射学新技术推广和诊疗规范普及”继续教育回执

姓 名		性 别		出生年月		学 历	
职 称		职 务		参加工作时间			
单 位				电 话			
地 址				邮 编			
E-mail				手 机			