

• 实验研究 Experimental research •

温控射频消融治疗 VX2 肝癌实验研究

朱先海, 王伟昱, 施长果, 秦汉林, 吕维富

【摘要】 目的 探索不同温度控制条件下射频消融(RFA)治疗兔 VX2 肝癌后靶区内肿瘤细胞凋亡及增殖变化。**方法** 采用开腹组织块法构建兔 VX2 肝癌模型,随机分为对照组(n=6,未行 RFA)和实验组 A 组(n=24,射频针温度 50~70℃)、B 组(n=24,射频针温度 70~90℃)、C 组(n=24,射频针温度 90~110℃)。实验组分别接受 CT 引导下不同温控 RFA,靶区由消融中心向外周依次分为针道区、消融区和交界区;采用苏木精-伊红(HE)染色观察肿瘤及周围肝组织病理学变化,脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)和增殖细胞核抗原(PCNA)免疫组化法检测各区带肿瘤细胞凋亡及增殖情况。**结果** RFA 后实验组各组各区带 6 个时间点(术后即刻、1、3、7、14、21 d)标本肿瘤细胞凋亡指数(AI)和增殖指数(PI)与对照组比较,均有统计学差异($P<0.05$);B、C 组各区带各时间点 AI 均高于 A 组($P<0.05$),B、C 组间无明显差异($P>0.05$);术后 7、14、21 d 时 B、C 组消融区和交界区 PI 均低于 A 组($P<0.05$),且术后 21 d 时 C 组 PI 低于 B 组($P<0.05$)。**结论** RFA 温控在 50~110℃能达到基本灭活针道区兔 VX2 肝癌细胞的作用,选择 90~110℃温控更利于彻底控制肿瘤。

【关键词】 VX2 肝癌; 温控模式; 射频消融; 细胞凋亡; 细胞增殖

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2016)-01-0056-05

Temperature-controlled radiofrequency ablation for the treatment of hepatocellular carcinoma VX2: an experimental study ZHU Xian-hai, WANG Wei-yu, SHI Chang-gao, QIN Han-lin, LÜ Wei-fu. Department of Cancer Interventional Radiology, Anhui Provincial Tumor Hospital, Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui Province 233004, China

Corresponding author: LÜ Wei-fu, E-mail: lwf99@126.com

【Abstract】 Objective To explore the apoptosis and proliferation of tumor cells in target area of VX2 liver cancer rabbits after radiofrequency ablation (RFA) treatment under different temperature-controlled conditions. **Methods** Rabbit VX2 carcinoma model was established by using laparotomy and tissue block implantation method. The experimental rabbits were randomly divided into the control group (n=6, not receiving RFA), the study group A (n=24, RF needle temperature 50℃-70℃), the study group B (n=24, RF needle temperature 70℃-90℃), and the study group C (n=24, RF needle temperature 90℃-110℃). All rabbits in the three study groups received CT-guided RFA under different temperature-controlled conditions. The target area was divided, in the order from the ablation center to the periphery, into the needle area, the ablation area and the border area. After the treatment, tissue samples were collected. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of tumor and the surrounding liver tissue. TdT-mediated dUTP nick end labeling assay (TUNEL) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemical method were employed to detect the tumor cell apoptosis and proliferation in each area. **Results** After RFA treatment, the apoptotic index (AI) and proliferation index (PI) of each area determined at six points of time (immediately after RFA, and at one, 3, 7, 14 and 21 days after RFA) in the three study groups were significantly different from those in the control group ($P<0.05$). AI values at each point of time in the study group B and C were significantly higher than those in the study group A ($P<0.05$), while no

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2016.01.014

作者单位: 233004 合肥 安徽省肿瘤医院肿瘤介入科(朱先海、王伟昱、施长果、秦汉林);安徽医科大学附属省立医院放射介入科(吕维富)

通信作者: 吕维富 E-mail: lwf99@126.com

statistically significant differences existed between the study group B and the study group C ($P>0.05$). At 7, 14 and 21 days after RFA, PI values at the ablation area and the border area in the study group B and C were significantly lower than those in the study group A ($P<0.05$), besides, at 21 days after RFA, PI values of the study group C were significantly lower than those of the study group B ($P<0.05$). Conclusion RFA temperature, when it is controlled within 50°C – 110°C , can basically inactivate rabbit VX2 liver cancer cells in needle tract area, however, the use of 90°C – 110°C temperature is more conducive to completely control the tumor. (J Intervent Radiol, 2015, 25: 56-60)

【Key words】 VX2 liver carcinoma; temperature-controlled mode; radiofrequency ablation; apoptosis; proliferation

肝癌是临床最常见恶性肿瘤之一。我国是肝癌高发地区,多数患者查出时已属晚期,死亡率高^[1-2]。射频消融(RFA)作为一种微创治疗手段,治疗肝脏肿瘤日趋广泛,其基本原理是将电能转化成热能杀灭肿瘤细胞,是一种局部肿瘤热疗方法^[3]。本实验探索不同温控条件下 RFA 治疗兔肝 VX2 肿瘤后肿瘤细胞凋亡、增殖变化,旨在为临床制定详细 RFA 方案和改善局部疗效提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料包括 3~5 个月龄、体重 2.5~3.0 kg 新西兰健康大白兔 78 只(雌雄不限)、VX2 肝癌细胞株(安徽医科大学附属省立医院实验动物中心提供)、HGCF-3000 型冷极射频肿瘤治疗仪(珠海和佳医疗设备公司)、Eclipse800i 高级生物显微镜(日本 Nikon 公司)、Lightspeed 16 排多层螺旋 CT(美国通用公司)、脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)试剂盒(南京凯基生物技术公司)和兔抗增殖细胞核抗原(PCNA)(北京中杉金桥生物技术公司)。

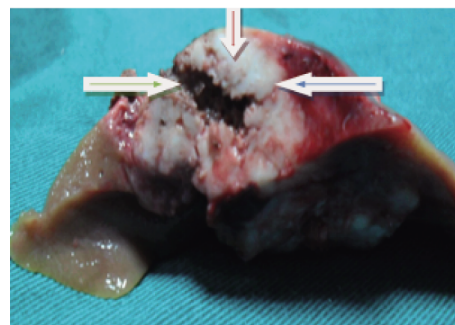
1.2 实验方法

本实验经安徽医科大学动物实验伦理委员会讨论批准。将冰冻 VX2 肝癌细胞株以常规细胞培养法复苏后,接种于新西兰大白兔后腿肌肉或皮下,制成荷瘤种兔,瘤体长大后取生长旺盛的瘤体边缘组织,剪成约 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 大小颗粒状;大白兔耳缘静脉麻醉后,以开腹组织块法接种于肝左叶;2 周后采用 CT 检查证实 VX2 肝癌模型建立,肿瘤直径约 2 cm。随机将模型分为对照组($n=6$)和实验组($n=72$),对照组模型兔在 3 周内不同时段处死,取肝内肿瘤组织待测;实验组再随机分为 A、B、C 组(每组 $n=24$),均在开腹条件下行 CT 引导下 RFA。

RFA 术前禁食 12 h,3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)

耳缘静脉注射麻醉后,开腹直视下将单极冷循环射频针刺入肿瘤内行 RFA。实验组射频针温度参数:A 组 $50\sim 70^{\circ}\text{C}$ 、B 组 $70\sim 90^{\circ}\text{C}$ 、C 组 $90\sim 110^{\circ}\text{C}$ 。每组射频电压与治疗时间不变,均为 48 V、15 min。

RFA 术后即刻、1、3、7、14、21 d 共 6 个时间段处死实验兔,取出肝脏。将残瘤大体标本分为针道区、消融区、交界区(图 1),3 个区带标本分别置入 4%甲醛浸泡,然后脱水、烘干、石蜡包埋,作苏木精-伊红(HE)染色和 TUNEL、PCNA 免疫组化检测,分析瘤体经不同温度 RFA 治疗后不同区带内肿瘤细胞活性变化特点。



针道区(左箭头)、消融区(上箭头)、交界区(右箭头)

图 1 RFA 术后残瘤大体标本

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行数据处理。所有结果以均数 \pm 标准差表示,计算多组间差异用单因素方差分析(ANOVA),两两比较用 q 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

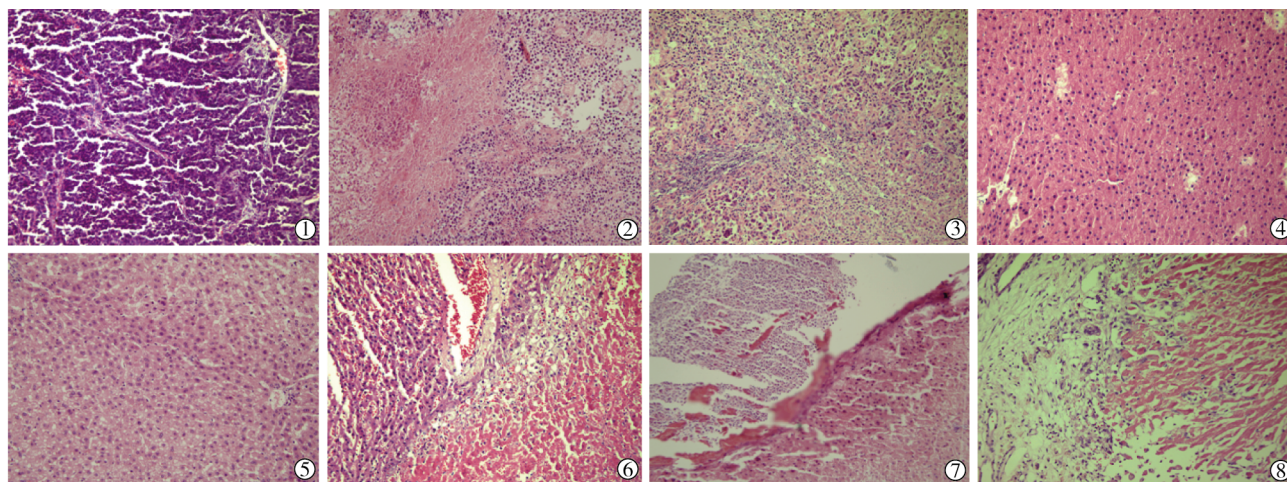
2 结果

2.1 HE 染色观察

HE 染色观察病理变化发现,针道区:术后 1~3 d 大量细胞结构消失,胞核固缩、核碎裂等,7 d 时出现部分肿瘤细胞溶解液化,14~21 d 时肿瘤细胞溶解液化范围扩大;消融区:A 组术后 1~3 d 可见

少量凝固性坏死细胞和凋亡细胞,7 d 后其内见较多存活肿瘤细胞和炎性细胞,21 d 后见到大量存活肿瘤细胞,B、C 组术后 1~3 d 可见大量凝固坏死细胞和少量坏死细胞,7 d 后消融区逐渐变成白色

并与周围区域分界欠清,炎性细胞浸润明显,21 d 后可见部分存活肿瘤细胞;交界区:A 组术后 7 d 见较多肿瘤细胞,B、C 组术后 21 d 见较多肿瘤细胞。(图 2)



①对照组肿瘤细胞;②RFA 后 21 d 针道区;③术后 21 d 50~70℃组消融区;④术后 21 d 70~90℃组消融区;⑤术后 21 d 90~110℃组消融区;⑥术后 21 d 50~70℃组交界区;⑦术后 21 d 70~90℃组交界区;⑧术后 21 d 90~110℃组交界区

图 2 RFA 前后不同区带内肿瘤细胞活性变化 HE 染色显像

2.2 TUNEL 染色观察

TUNEL 检测实验组和对照组肿瘤细胞凋亡率(用凋亡指数 AI 表示)见表 1。实验组 3 组 RFA 术后标本各区带不同时间点 AI 与对照组(0.05 ± 0.07)

比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);3 组术后 1 d 时标本 AI 明显高于其它时间点($P < 0.05$),B、C 组各区带各时间点 AI 均高于 A 组($P < 0.05$),B、C 组间无明显差异($P > 0.05$)。

表 1 RFA 后标本各区带不同时间点肿瘤细胞 AI

组别	位置	术后即刻	术后 1 d	术后 3 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d
A 组(50~70℃)	针道区	0.13 ± 0.10	0.22 ± 0.19	0.16 ± 0.14	0.14 ± 0.15	0.14 ± 0.19	0.12 ± 0.02
	消融区	0.14 ± 0.04	0.38 ± 0.17	0.20 ± 0.15	0.19 ± 0.08	0.18 ± 0.08	0.10 ± 0.08
	交界区	0.19 ± 0.10	0.39 ± 0.11	0.21 ± 0.12	0.20 ± 0.17	0.15 ± 0.05	0.09 ± 0.14
B 组(70~90℃)	针道区	0.20 ± 0.10	0.28 ± 0.09	0.27 ± 0.04	0.25 ± 0.13	0.23 ± 0.16	0.19 ± 0.12
	消融区	0.47 ± 0.04	0.54 ± 0.07	0.38 ± 0.05	0.30 ± 0.12	0.24 ± 0.18	0.19 ± 0.05
	交界区	0.50 ± 0.10	0.59 ± 0.10	0.39 ± 0.05	0.35 ± 0.02	0.29 ± 0.18	0.22 ± 0.04
C 组(90~110℃)	针道区	0.21 ± 0.10	0.30 ± 0.07	0.27 ± 0.12	0.26 ± 0.08	0.26 ± 0.18	0.20 ± 0.09
	消融区	0.49 ± 0.04	0.60 ± 0.17	0.38 ± 0.05	0.33 ± 0.18	0.20 ± 0.19	0.19 ± 0.15
	交界区	0.51 ± 0.10	0.61 ± 0.12	0.40 ± 0.18	0.36 ± 0.12	0.20 ± 0.08	0.19 ± 0.05

2.3 PCNA 免疫组化检测

PCNA 免疫组化法检测实验组和对照组肿瘤细胞增殖指数(PI)见表 2。实验组 3 组 RFA 术后标本各区带不同时间点 PI 与对照组(0.20 ± 0.29)比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。3 组间针道区不同时间点 PI 无明显差异($P > 0.05$);3 组间消融区与交界区 PI 在术后即刻、1 d、3 d 时无明显差异($P > 0.05$);术后 7 d、14 d 时 B、C 组消融区与交界区 PI 低于 A 组($P < 0.05$),B、C 组间无明显差异($P > 0.05$);术后 21 d 时,B、C 组消融区与交界区 PI 指数低于 A 组($P < 0.05$),且 C 组低于 B 组($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 温控 RFA 后肿瘤组织学改变

RFA 主要通过电极发射中高频电磁波引发电极周围细胞中极性分子产生高速共振,将电磁能转化为热能,使电极附近组织温度短时间内升高,导致肿瘤组织发生凝固性坏死^[4]。根据热传导衰减原理,本实验中将 RFA 靶区分为针道区、消融区、交界区。针道区针道周围组织呈炭化样或汽化空泡样改变;消融区呈凝固苍白状;交界区位于坏死组织周围残存活体组织,表现为水肿、充血、出血和炎性细胞浸润。本实验专注观察不同 RFA 温度引发的肝肿瘤与

表 2 RFA 后标本各区带不同时间点肿瘤细胞 PI

组别	位置	术后即刻	术后 1 d	术后 3 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d
A 组(50~70℃)	针道区	0.02±0.02	0.02±0.03	0.04±0.02	0.04±0.08	0.04±0.15	0.05±0.09
	消融区	0.02±0.04	0.03±0.15	0.05±0.05	0.10±0.09	0.13±0.13	0.19±0.10
	交界区	0.02±0.11	0.04±0.09	0.06±0.18	0.13±0.15	0.17±0.08	0.22±0.05
B 组(70~90℃)	针道区	0.02±0.01	0.02±0.07	0.03±0.12	0.04±0.03	0.04±0.10	0.05±0.02
	消融区	0.02±0.04	0.02±0.17	0.04±0.04	0.05±0.18	0.07±0.18	0.12±0.05
	交界区	0.02±0.10	0.02±0.19	0.04±0.10	0.06±0.12	0.08±0.14	0.15±0.05
C 组(90~110℃)	针道区	0.01±0.17	0.02±0.04	0.03±0.10	0.04±0.02	0.04±0.10	0.04±0.19
	消融区	0.02±0.01	0.02±0.07	0.03±0.15	0.04±0.19	0.06±0.09	0.07±0.05
	交界区	0.02±0.05	0.02±0.09	0.04±0.09	0.05±0.02	0.07±0.08	0.09±0.06

肝组织基本改变,HE 染色发现 3 组标本针道区均可发现大量肿瘤细胞坏死,说明消融温度控制在 50~110℃范围内均可灭活针道内肿瘤细胞;消融区肿瘤坏死程度及范围与消融温度有关,温度越高肿瘤坏死越彻底、范围越大;交界区肿瘤细胞复活与消融温度选择也有关,温度越高肿瘤细胞复活需要时间越长。

3.2 温控 RFA 对肿瘤细胞凋亡的影响

TUNEL 检测方法可用于石蜡包埋组织切片、冰冻组织切片、培养细胞及组织中分离细胞的细胞凋亡测定。本实验采用 TUNEL 法检测兔 VX2 肝癌 RFA 后靶区不同区带肿瘤细胞变化。研究表明,RFA 时高温可诱导促凋亡蛋白表达,下调抑制凋亡蛋白表达,促进细胞凋亡^[5-6]。

本实验 3 组标本经 RFA 后均出现凋亡现象,术后 1 d AI 值达高峰,其中 C 组交界区 AI 值最高,这是由于针道区和消融区主要表现为凝固性坏死,而交界区主要表现为细胞凋亡^[7];B、C 组 RFA 后各区带不同时间点 AI 均高于 A 组,说明随着温度升高,各区带 AI 呈上升趋势,与组织学观察结果一致。相关研究发现,局部组织温度超过 45~50℃时,细胞膜即遭破坏,发生蛋白变性;局部温度达 90~100℃时,组织细胞双层脂膜溶解,细胞内蛋白质变性,线粒体酶和溶酶体酶发生不可逆性变化,细胞内外水分丢失,导致组织凝固性坏死^[8-10]。本实验发现 RFA 后 B、C 组标本 AI 无明显差异,考虑是由于肿瘤细胞在相应温度范围内发生了凝固性坏死。

3.3 不同温度 RFA 对肿瘤细胞增殖的影响

PCNA 相对分子质量为 36 000,合成于细胞核内,为 DNA 聚合酶 δ 辅助蛋白。细胞核内存在可溶性与不溶性 PCNA,不溶性 PCNA 较稳定,检测其在细胞中的表达可作为评价细胞增殖状态的指标之一^[11]。本实验检测 3 组针道区内 PI 均明显低于对照组,且 3 组间针道区不同时间点 PI 无明显差异,说明 50~110℃消融温度均可导致针道区肿瘤细胞坏

死,诱导细胞凋亡而抑制细胞增殖。有研究发现,恶性肿瘤细胞表面带有高负电荷,细胞表面负电荷增加可导致细胞间接触抑制消失,从而促进肿瘤细胞增殖和转移^[12]。热疗可使肿瘤细胞表面负电荷发生不可逆性降低,抑制肿瘤细胞增殖。本研究发现 RFA 后 7 d、14 d 时 B、C 组消融区与交界区 PI 低于 A 组,B、C 组间无明显差异,即 A 组 PI 升高最快,可能与瘤体边缘的烤箱效应及热流失效应所致瘤体外周温度不足有关。RFA 温度主要影响细胞周期中 S 期细胞,抑制 DNA 复制起始和新合成染色质折叠,损伤染色质结构,RFA 温度升高时可直接打断和终止 DNA 复制,导致细胞死亡。细胞周期阻滞于 S 期,PCNA 合成减少,细胞增殖受到抑制^[13]。本实验 RFA 术后 21 d 时,不仅 B、C 组消融区与交界区 PI 低于 A 组,而且 C 组低于 B 组,说明 RFA 温度越高,肿瘤增殖能力越弱,残留肿瘤组织复活所需时间越长。

本研究结果提示,RFA 温控在 50~110℃能达到基本灭活针道区兔 VX2 肝癌细胞的作用。在 RFA 治疗中,应将温度控制于 90℃~110℃,尽量一次性实施彻底消融肿瘤;可采用多点穿刺法加大消融范围,同时缩短再次治疗时间间隔或联合其它疗法。

[参考文献]

- [1] 陈敏山,李锦清,张耀军.射频消融在小肝癌治疗中的地位[J].癌症,2007,26:449-452.
- [2] Veenendaal LM, Borel Rinkes IH, Van Hillegersberg R. Multi-polar radiofrequency ablation of large hepatic metastases of endocrine tumours[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006, 18: 89-92.
- [3] 朱军,曹跃勇,赵少勇,等.肝动脉化疗栓塞序贯冷循环射频消融治疗原发性肝癌的体会[J].介入放射学杂志,2005,14:603-605.
- [4] Peng ZW, Chen MS, Liang HH, et al. A case-control study comparing percutaneous radiofrequency ablation alone or combined with transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma[J]. Eur J Surg Oncol, 2010, 36: 257-263.
- [5] 孙登华,钱锋,孙光,等.射频消融技术的临床应用进展

- [J]. 吉林医学, 2012, 33: 2823-2825.
- [6] 蒲德利, 廖江荣. 射频消融联合化疗治疗周围型中晚期非小细胞肺癌疗效观察[J]. 介入放射学杂志, 2013, 22: 129-132.
- [7] 张振华, 邝晓聪, 杨红, 等. 射频消融干预下兔 VX2 肿瘤病理学与凋亡的评估[J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21: 1602-1606.
- [8] Yu J, Liang P, Yu X, et al. A comparison of microwave ablation and bipolar radiofrequency ablation both with an internally cooled probe: results in ex vivo and in vivo porcine livers[J]. Eur J Radiol, 2011, 79: 124-130.
- [9] Leber B, Mayrhauser U, Leopold B, et al. Impact of temperature on cell death in a cell-culture model of hepatocellular carcinoma[J]. Anticancer Res, 2012, 32: 915-921.
- [10] 阙雪峰, 郑传胜. 射频消融治疗肝癌的进展[J]. 临床放射学杂志, 2011, 30: 1227-1229.
- [11] Kudo M, Sakaguchi Y, Chung H, et al. Long-term interferon maintenance therapy improves survival in patients with HCV-related hepatocellular carcinoma after curative radiofrequency ablation. A matched case-control study[J]. Oncology, 2007, 72: 132-138.
- [12] Lyng H, Monge OR, Bohler PJ, et al. Relationships between thermal dose and heat-induced tissue and vascular damage after thermoradiotherapy of locally advanced breast carcinoma[J]. Int J Hyperthermia, 1991, 7: 403-415.
- [13] Yoo J, Kim HR, Lee YJ. Hyperthermia enhances tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in human cancer cells[J]. Int J Hyperthermia, 2006, 22: 713-728.

(收稿日期: 2015-03-11)

(本文编辑: 边 信)

·读者-作者-编者·

《介入放射学杂志》常用缩略语

本刊 2016 年可直接在论文中使用的缩略语如下。

AVM	arteriovenous malformation	动静脉血管畸形
BAI	bronchial arterial infusion	支气管动脉灌注术
BCS	budd-chiari syndrome	布-加综合征
CT	computed tomography	计算机断层成像
CTA	computed tomography angiography	CT 血管成像
DSA	digital subtraction angiography	数字减影血管造影
ECT	emission computed tomography	发射型计算机断层成像
ERCP	endoscopic retrograde cholangiopancreatography	内镜逆行胰胆管造影术
GDC	guglielmi detachable coil	电解可脱弹簧圈
HCC	hepatic cell carcinoma	肝细胞癌
MRI	magnetic resonance imaging	磁共振成像
MRA	magnetic resonance angiography	磁共振血管成像
NBCA	N-Butyl-2-Cyanoacrylate	正丁基-2-氰基丙烯酸酯
ONYX	ethylene-vinyl alcohol copolymer	乙烯-乙醇共聚物
PDA	patent ductus arteriosus	动脉导管未闭
PEI	percutaneous ethanol injection	经皮无水乙醇注射
PET	positron emission tomography	正电子发射体层摄影
PKP	percutaneous kyphoplasty	经皮椎体后凸成形术
PLD	percutaneous lumbar discectomy	经皮(穿)腰间盘切除术
PTA	percutaneous transluminal angioplasty	经皮腔内血管成形术
PTCA	percutaneous transluminal coronary angioplasty	经皮冠状动脉成形术
PTBD	percutaneous transhepatic biliary drainage	经皮穿肝胆管引流术
PVA	polyvinyl alcohol	聚乙烯醇
PVP	percutaneous vertebroplasty	经皮椎体成形术
TACE	transcatheter arterial chemoembolization	经动脉灌注化疗栓塞术
TAE	transcatheter arterial embolization	经动脉栓塞术
TAI	transcatheter arterial infusion	经动脉灌注术
TIPS	transjugular intrahepatic portosystemic shunt	经颈静脉肝内门体分流术
UAE	uterine arterial embolization	子宫动脉栓塞术
VSD	ventricular septal defect	室间隔缺损