

## • 实验研究 Experimental research •

## CT 导引纳米刀消融猪肝脏可行性实验研究

朱统寅, 孙军辉, 陈新华, 彭志毅, 任志刚, 聂春晖, 周坦洋, 张雄信, 王伟林, 郑树森

**【摘要】 目的** 评估 CT 导引经皮纳米刀消融猪肝组织的可行性及安全性。**方法** 10 头成年巴马小型猪随机分为实验组(n=7)和对照组(n=3),全身麻醉下将 NanoKnife 纳米刀双针电极经 CT 导引穿刺至肝脏肝门区及肝脏近胆囊处,依标准参数进行消融。术后 2 h、2 d、7 d、14 d 取材作生化、病理学检查。**结果** 所有实验过程均顺利,未出现出血、感染、气胸、死亡等严重并发症,所有实验猪均存活至实验终点。生化指标检测提示肝功能及心肌酶谱指标出现一过性升高,消融后 14 d 逐渐恢复正常;病理学检查提示消融后 2 d 内消融区细胞完全死亡,血管内皮轻度损伤,2 d 后产生再次内皮化,14 d 后平滑肌细胞重新长入。**结论** 纳米刀消融邻近肝门大血管、胆管、胆囊的猪肝脏组织是安全可行的,为纳米刀技术临床应用提供了大动物实验依据。

**【关键词】** 消融; 纳米刀; 计算机断层扫描; 动物实验

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2016)-04-0337-04

CT-guided NanoKnife ablation of experimental pig liver: a feasibility study ZHU Tong-yin, SUN Jun-hui, CHEN Xin-hua, PENG Zhi-yi, REN Zhi-gang, NIE Chun-hui, ZHOU Tan-yang, ZHANG Xiong-xin, WANG Wei-lin, ZHENG Shu-sen Interventional Diagnosis and Treatment Center of Hepatobiliary and Pancreatic Diseases, Affiliated First Hospital, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang Province 310003, China

Corresponding author: SUN Jun-hui, E-mail: sunjh121@163.com

**【Abstract】 Objective** To evaluate the feasibility and safety of CT-guided percutaneous NanoKnife ablation of liver tissues in experimental pigs. **Methods** A total of 10 adult Bama miniature pigs were randomly divided into the study group (n=7) and the control group (n=3). Under general anesthesia and guided by CT scan, the double-needle electrode of NanoKnife was inserted to the hepatic portal area and the liver tissue near the gallbladder; then, the ablation was conducted by using standard parameters. Each time at 2 h, 2 d, 7 d and 14 d after the ablation the liver specimens were collected and sent for biochemical and pathological examinations. **Results** The ablation procedure was smoothly accomplished in all pigs, and no serious complications such as hemorrhage, infection, pneumothorax, death, etc. occurred. All experimental pigs were survival to the end of the experiment. Biochemical examinations indicated that after ablation the liver function indexes and myocardial enzyme levels showed a transient elevation, which gradually returned to normal in 14 days. Pathological examinations revealed that complete death of cells and slight injury of vascular endothelium in ablation zone could be observed within 2 days after treatment; two days later re-endothelialization appeared and in 14 days the smooth muscle cells grew again. **Conclusion** It is feasible and safe to use NanoKnife to ablate experimental pig liver tissue that is adjacent to the hepatic hilar larger vessels, bile duct or gallbladder. This study provides the experimental basis of large animals for clinical

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2016.04.015

基金项目: 国家自然科学基金(81371658、81172315/H1617)、浙江省医药卫生科研项目(2013KYB097)、浙江省科技厅重大科技专项计划项目(2013C03010)、浙江省“十二五”基层卫生适宜技术成果转化工程重大项目(2013T301-15)

作者单位: 310003 杭州 浙江大学医学院附属第一医院肝胆胰介入诊治中心

通信作者: 孙军辉 E-mail: sunjh121@163.com

application of NanoKnife technology.(J Intervent Radiol, 2016, 25: 337-340)

【Key words】 ablation; NanoKnife; computed tomography; animal experiment

肝癌目前仍是我国最常见恶性肿瘤之一,也是癌症死亡主要原因之一。肝癌可治愈手段有肝移植、肝切除、局部消融治疗<sup>[1]</sup>。手术切除可使患者得到最佳生存受益,但确诊时仅有 10%~15%患者适宜手术<sup>[2]</sup>。根据美国肝病研究协会推荐,消融治疗可作为非手术患者最佳治疗手段<sup>[3]</sup>。目前应用最广泛的是射频消融(RFA),但病灶周围的胆囊、胃、结肠等有可能受到损伤,且由于“热池效应”,大血管周围病灶难以彻底消融<sup>[4]</sup>。不可逆电穿孔(IRE)是一种非热能消融新技术,通过释放微秒级高压脉冲在细胞膜上产生不可逆性穿孔,进而导致细胞凋亡,此过程不产生热量,该技术商业化程度最高的就是纳米刀<sup>[5]</sup>。纳米刀消融大动物肝脏组织实验研究报道较少<sup>[6-8]</sup>,为此本研究评价纳米刀消融小型猪肝组织的可行性及安全性,为临床应用提供大动物实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和器材

实验取健康成年巴马小型猪 10 头,雌雄不限,体重 25~30 kg,购买并饲养于浙江大学医学院动物中心,笼舍、饲料、卫生条件均采用统一规范标准。主要实验器材包括 NanoKnife 纳米刀(美国 AngioDynamics 公司产品,由发生器、消融探针 1 支主针和 1~5 支副针、心电同步仪等组成)、心电监护仪、荷兰 Philips 公司 Brilliance 256 层螺旋 CT 机。

### 1.2 实验方法

10 头成年巴马小型猪随机编号为 1~10,分为实验组(7 头)和对照组(3 头)。纳米刀消融前禁食 12 h 以上,禁水 6 h 以上。穿刺耳缘静脉置入留置针并建立静脉通道,罗库溴铵 50 mg 静脉注射作诱导麻醉,丙泊酚 150 mg/h 和罗库溴铵 10 mg/h 维持麻醉;气管插管,连接呼吸机、心电监护仪监测心率、呼吸,右侧腹部术区备皮;实验猪左侧卧位固定于螺旋 CT 扫描床上,扫描电压为 120 kV、层厚 5 mm、层距 5 mm,体表放置自制金属定位栅格,将肝脏近肝门区、肝脏近胆囊区作为消融靶区,设计穿刺路径,避开肋骨、血管及其它脏器,确定体表穿刺点并作好标记;常规消毒、铺巾,切开穿刺点皮肤约 3 mm 小口,在 CT 导引下按预定穿刺路径将 2 支 19 G 消融探针(长 15 cm,电极暴露长度 2 cm)平行

穿刺至肝脏肝门区及肝脏近胆囊处消融靶区,探针间距为 1.0~2.0 cm;给予单次电脉冲观察肌肉收缩情况,符合要求后进行消融治疗(电流 50 A,电压 3 000 V,单次脉冲时间 0.07 ms,共发射 90 次);消融结束后拔除探针,螺旋 CT 确认无严重并发症后作穿刺点消毒并覆以敷贴,麻醉复苏。术后 24 h 作实验猪肝增强 CT 检查。

### 1.3 监测项目

实验组监测:①术中、术后并发症;②生化检查:术前采血确定检测指标基线,术后 2 h、2 d、7 d、14 d 采血观察肝功能、心肌酶谱等指标变化;③病理检查:随机选取实验猪,分别于术后 2 h(1 头)、2 d(2 头)、7 d(2 头)、14 d(2 头)处死,获取消融区肝组织,浸于 4%甲醛溶液制作病理切片,苏木精-伊红(HE)染色后观察组织坏死及修复情况。对照组监测:随机选取上述时间点处死实验猪并作病理观察。

## 2 结果

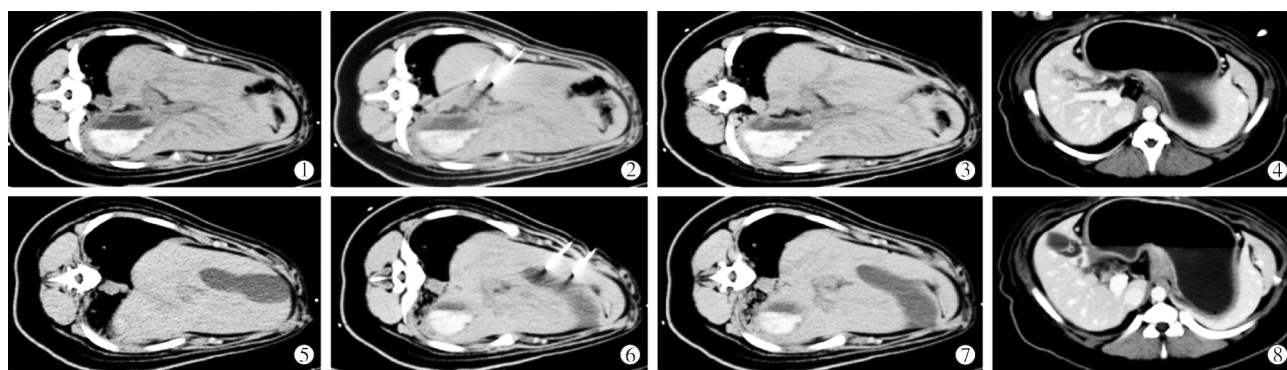
所有实验猪纳米刀消融均顺利完成,术中麻醉良好,未出现明显心律失常(室性心动过速、房颤等),未见出血、感染、气胸、死亡等并发症。术后所有实验猪均成功复苏,复苏时间 0.5~2 h,饲养情况良好,活动及进食与术前无异。消融后 24 h 肝脏增强 CT 检查提示未见出血、门静脉血栓、胆囊坏死等严重并发症(图 1)。

生化指标检测提示消融后 2 d 内肝脏及心肌产生一过性损伤,14 d 后所有指标恢复术前水平(图 2)。

HE 染色提示消融后 2 d 内消融区细胞完全死亡,血管内皮轻度损伤,2 d 后产生再次内皮化,14 d 后平滑肌细胞重新长入(图 3)。

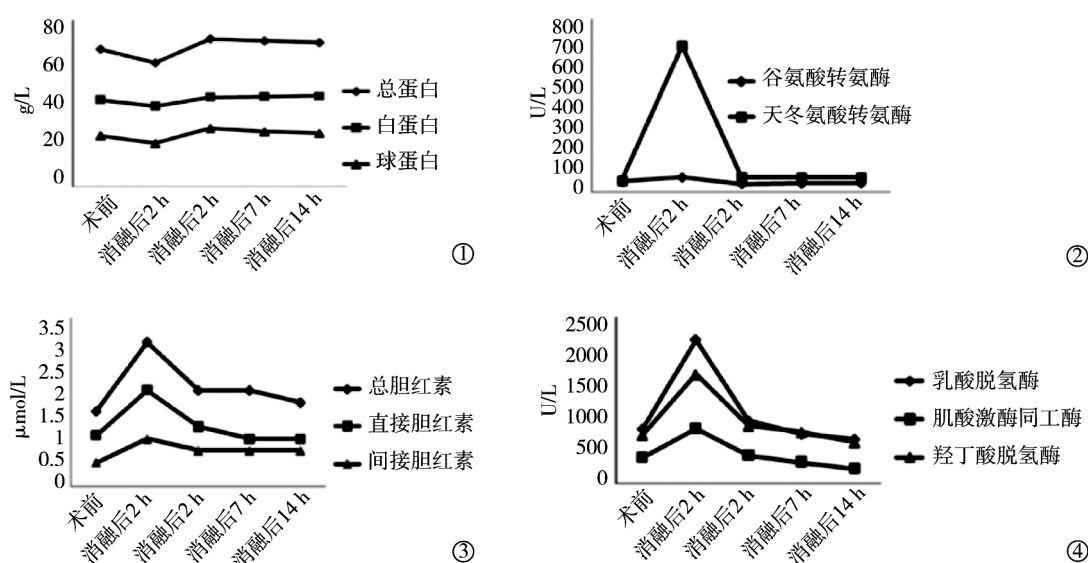
## 3 讨论

本实验采用螺旋 CT 作为纳米刀消融术影像引导手段的原因:①CT 具有良好的空间分辨率,可清晰显示消融探针与靶区、周围结构位置关系,必要时可作三维重建,使位置关系显示更加直观,提高穿刺准确性;②扫描速度快,一次肝脏平扫可在数秒内完成,节约手术时间。纳米刀消融术要求消融探针之间互相平行,探针穿刺深度一致,探针间距



实验动物 1: ①消融前; ②双针消融探针平行穿刺至门静脉右支旁; ③消融后 2 h; ④消融后 24 h 示门静脉右支通畅, 未见充盈缺损或狭窄。实验动物 2: ⑤消融前; ⑥双针消融探针平行穿刺至胆囊颈旁肝组织; ⑦消融后 2 h; ⑧消融后 24 h 示消融区周边胆囊轻度水肿增厚

图 1 纳米刀消融小型猪肝组织前后增强 CT 影像



①消融后 2 h 血清白蛋白、球蛋白轻度下降, 2 d 后恢复术前水平; ②消融后 2 h 天冬氨酸转氨酶明显升高, 谷氨酸转氨酶轻度升高, 2 d 后逐渐恢复术前水平; ③消融后 2 h 总胆红素、直接胆红素、间接胆红素轻度升高, 2 d 后逐渐恢复术前水平; ④消融后 2 h 乳酸脱氢酶、肌酸激酶同工酶、羟丁酸脱氢酶明显升高, 2 d 后逐渐下降, 14 d 恢复术前水平

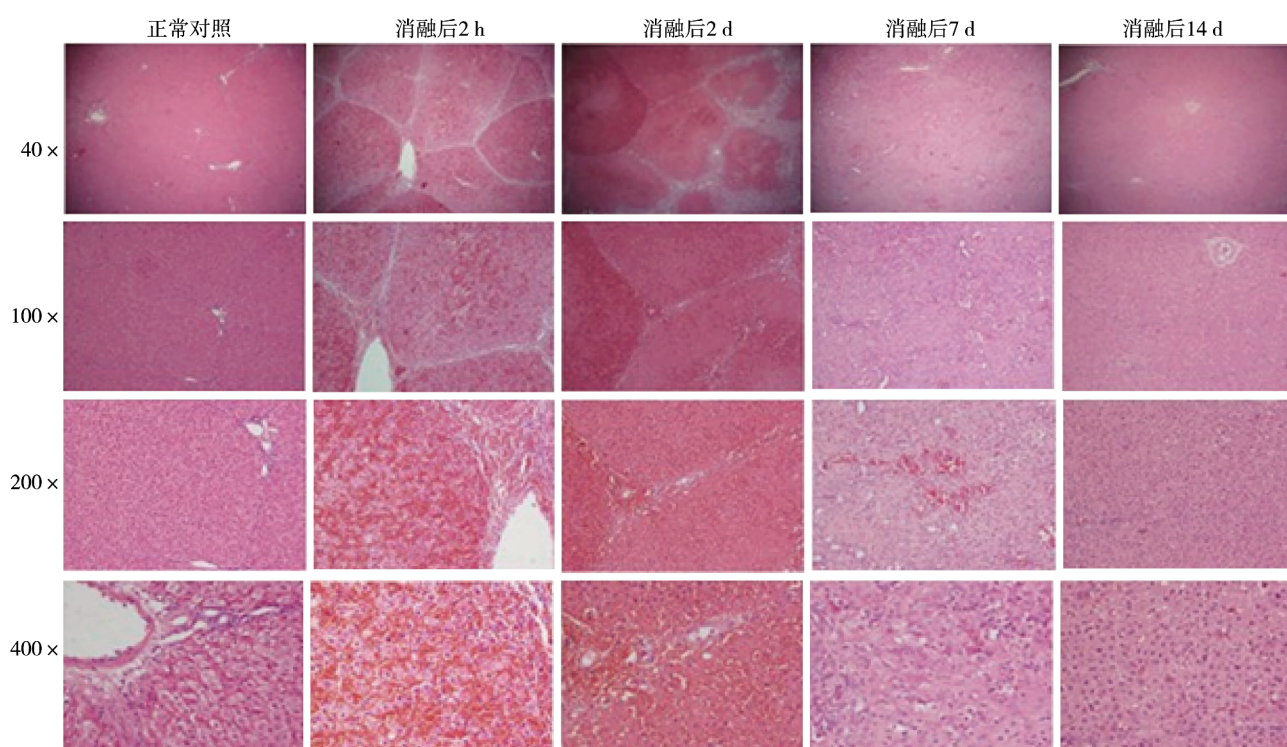
图 2 纳米刀消融小型猪肝组织前后肝功能、心肌酶谱指标变化

在一定范围内(一般要求 1.0~2.2 cm)<sup>[9]</sup>, 尤其是在需要多针矩阵时穿刺难度更大, 而螺旋 CT 扫描可清晰显示针尖及各针之间位置关系, 精确导引穿刺过程。此外, 确定皮肤穿刺点后, 各消融探针可同时作穿刺, 分步进针, 这样可及时扫描, 按需调整, 减少扫描次数, 降低辐射剂量, 节约手术时间。当然, CT 导引的组织分辨率不如 MRI 导引, 实时性不如 B 超导引。

本实验中所有消融过程均顺利, 未见与消融相关的严重并发症, 如心律失常、出血、感染、胆囊坏死、门静脉血栓等。经皮穿刺是一种微创介入技术, 创伤小, 并发症少。消融后所有实验猪均复苏成功, 所需时间 0.5~2 h, 部分实验猪复苏时间较长, 推测与术中追加肌松剂、实验猪保暖不足有关。因此建

议, 追加肌松剂要谨慎, 不宜过量, 只要确保消融时肌肉收缩轻微, 不引起消融探针移位即可; 增加术中实验猪保暖, 非手术区可适当覆盖毛毯等。

本实验发现纳米刀消融可造成肝功能一过性损伤, 但损伤程度较轻, 恢复快, 如心肌酶指标天冬氨酸转氨酶、乳酸脱氢酶、肌酸激酶同工酶、羟丁酸脱氢酶、胆红素在消融后 2 h 明显升高, 白蛋白、球蛋白等轻度下降, 2 d 后诸指标基本恢复至术前水平, 14 d 时所有指标均恢复至术前水平。可见, 纳米刀消融对心肌造成的损伤呈急性暂时性, 未造成持续性损伤。病理检查显示, 纳米刀消融可将消融区内细胞完全破坏, 而富含胶质成分的血管、胆管得以保留, 这与文献报道相符<sup>[10]</sup>。因此, 纳米刀消融技术可能适合于邻近大血管、胆管、胆囊、胃肠道的肝



HE 染色显示消融区出血改变,保留相对完整的肝脏形态;消融区内所有肝小叶均完整,血管及胆管轻度水肿,无结构破坏。消融后 2 h、2 d、7 d 消融区内见广泛彻底的细胞凋亡,但正常肝组织架构得以保留;消融后 2~7 d,见大量中性粒细胞和嗜酸性粒细胞浸润,较大血管和胆管架构得以保留,但可见轻度血管炎、多灶性内皮不完整、水肿、肌层分离、中性粒细胞浸润、胆管炎;消融 14 d 后见广泛的肝细胞再生

图 3 实验组和对照组 HE 染色观察所见

肿瘤消融治疗,而这些区域不适合采用传统的热消融方法。

本研究不足之处:①实验样本数量较少,消融后随访时间短,缺乏消融区肝组织修复再生情况长期随访;②对照组未作穿刺处理,未评估消融探针机械损伤。

总之,本研究显示 IRE 技术消融邻近肝门大血管、胆管、胆囊的肝组织是安全可行的,为 IRE 技术临床应用提供了大动物实验依据。

#### [参考文献]

- [1] Chen X, Ren Z, Li C, et al. Preclinical study of locoregional therapy of hepatocellular carcinoma by bioelectric ablation with microsecond pulsed electric fields ( $\mu$ sPEFs)[J]. Sci Rep, 2015, 5: 9851.
- [2] Figueras J, Jaurieta E, Valls C, et al. Resection or transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: outcomes based on indicated treatment strategy[J]. J Am Coll Surg, 2000, 190: 580-587.
- [3] Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2005, 42: 1208-1236.
- [4] Cho YK, Kim JK, Kim MY, et al. Systematic review of randomized trials for hepatocellular carcinoma treated with percutaneous ablation therapies[J]. Hepatology, 2009, 49: 453-459.
- [5] Golberg A, Bruinsma BG, Uygun BE, et al. Tissue heterogeneity in structure and conductivity contribute to cell survival during irreversible electroporation ablation by "electric field sinks"[J]. Sci Rep, 2015, 5: 8485.
- [6] 李成祥, 孙才新, 姚陈果, 等. 不可逆电穿孔治疗技术的临床前大动物实验研究[J]. 高电压技术, 2010, 36: 1253-1257.
- [7] 梁冰, 牛立志, 曾健澄, 等. 不可逆电穿孔消融兔胆囊侧肝脏病理学观察[J]. 介入放射学杂志, 2014, 23: 320-324.
- [8] 孙钢. 不可逆电穿孔技术消融肿瘤研究进展[J]. 介入放射学杂志, 2015, 24: 277-281.
- [9] Ricke J, Jurgens JH, Deschamps F, et al. Irreversible electroporation (IRE) fails to demonstrate efficacy in a prospective multicenter phase II trial on lung malignancies: the ALICE trial[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2015, 38: 401-408.
- [10] 黎升, 曾奇, 钟锐, 等. 不可逆电穿孔与射频消融后猪肝再生的比较[J]. 中华医学杂志, 2015, 95: 66-68.

(收稿日期:2015-11-29)

(本文编辑:边 皓)