

· 实验研究 Experimental research ·

国产冷冻设备(靶向刀)消融活体猪肝的实验研究

王辅明, 李娜, 罗荣, 韦广旭, 杨继金

【摘要】目的 比较国产冷冻设备(靶向刀)1次冷-热循环和2次冷-热循环的消融范围及实际坏死范围的差异。方法 4只小型巴马猪(25~30 kg),随机分为A、B两组,麻醉后开腹暴露肝脏,放置冷冻针于合适肝叶部位进行冷冻消融,A组选择冷-热(10~3 min)1次循环模式,B组选择冷-热(10~3 min)2次循环模式。冷循环结束后扫描CT,计算机多平面重建(MPR)描绘出椭圆形冰球的最大宽径。术毕处死小型猪,取出靶区肝脏标本,固定48 h后,沿着冷冻针穿刺道垂直方向沿消融区域冰球的最大宽径处切开标本,石蜡包埋切片后进行HE及末端脱氧核苷酸转移酶-生物素 dUTP 切口末端标记法(TUNEL)染色。观察消融区域病理学改变,使用Toup View显微镜图像测量软件测量TUNEL染色下坏死区域的边界与针道的距离。结果 1次循环冰球的最大宽径为(27.6±0.9) mm,2次循环的冰球的最大宽径为(31.4±0.5) mm($P<0.01$)。1次循环冰球覆盖范围内实际坏死的边界距冰球覆盖范围的边界距离为(5.6±0.5) mm,2次循环冰球覆盖范围内实际坏死的边界距冰球覆盖范围的边界距离为(3.2±0.2) mm($P<0.01$)。结论 对于国产冷冻设备(靶向刀)2次循环较1次循环冰球形成范围更大,且实际坏死区域明显增大,而消融边缘更小。当前2次冷-热循环的消融治疗方案治疗肝脏肿瘤,至少要保证冰球要覆盖病灶周围正常肝脏组织3.5 mm以上才足够。

【关键词】 冷冻消融; 国产; 猪肝; 循环; 消融边缘

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2020)-03-0278-05

Experimental study on cryoablation of pig liver in vivo with domestic cryoablation device WANG Fuming, LI Na, LUO Rong, WEI Guangxu, YANG Jijin. Department of Interventional Radiology, Affiliated Changhai Hospital, Naval Military Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: YANG Jijin, E-mail: jijinyang@sina.com

【Abstract】Objective To compare the differences in ablation range and actual necrosis range between a single freezing-rewarming cycle treatment and twice freezing-rewarming cycles treatment with the domestic cryoablation device(target knife, Accu Target). Methods Four small Obama pigs(25-30 kg) were randomly and equally divided into group A and group B. Under general anaesthesia, laparotomy was performed to expose the liver. The cryoprobe was inserted in a suitable hepatic lobe to make cryoablation. For experimental pigs of group A the cryoablation treatment with a single freezing-rewarming (10 min and 3 min respectively) cycle treatment was adopted, while for experimental pigs of group B twice freezing-rewarming(10 min and 3 min respectively) cycles treatment was carried out. After the treatment, CT scan was performed and the maximum width size of ellipsoid ice-ball was outlined with multiplanar reconstruction (MPR) technique. The pigs were sacrificed after the procedure, and the target liver specimens were taken out and fixed for 48 hours. Along the vertical direction of the frozen needle puncturing track at the maximum width site of the ellipsoid ice-ball the specimens were cut apart. The sections of specimens were embedded

DOI: 10.3969/j.issn. 1008-794X. 2020.03.012

基金项目: 国家临床重点专科军队建设项目

作者单位: 200433 上海 海军军医大学附属长海医院介入科

通信作者: 杨继金 E-mail: jijinyang@sina.com

in paraffin and HE staining and TUNEL staining were performed. Pathological changes in ablated area were documented. Toup View microscope image measurement software was used to measure the boundary of necrotic area with TUNEL staining, and the distance between boundary and needle track was measured.

Results The maximum width of the ice-ball was (27.6 ± 0.9) mm in group A, which was (31.4 ± 0.5) mm in group B, the difference between the two groups was statistically significant ($P < 0.01$). The distances between the border of actual necrotic area and the edge of ice-ball in group A and group B were (5.6 ± 0.5) mm and (3.2 ± 0.2) mm respectively, the difference between the two groups was statistically significant ($P < 0.01$).

Conclusion In performing cryoablation therapy with domestic cryoablation device (target knife), the twice freezing-rewarming cycles treatment can produce bigger ice-ball, larger actual necrotic area and smaller ablation border than single freezing-rewarming cycle treatment does. When twice freezing-rewarming cycles treatment is adopted for hepatic tumor, it is essential to ensure that the ice-ball should cover the normal liver tissue around the lesion more than 3.5 mm. (J Intervent Radiol, 2020, 29: 278-282)

【Key words】 cryoablation; domestic target knife; pig liver; cycle; ablation border

冷冻消融作为一种局部消融治疗手段目前已经被广泛应用于全身实体肿瘤的治疗。治疗早期肾癌、前列腺癌和小肝癌的效果被认为与外科手术切除治疗效果相当^[1-3]。最新的临床随机对照研究表明,在治疗小于 3 cm 的肝癌冷冻消融和 RFA 治疗效果相当,在长径 3~4 cm 的肝癌冷冻消融治疗效果优于 RFA,在联合 TACE、放射性粒子、免疫治疗等其他治疗手段治疗大肝癌可以明显延长患者生存期^[4-7]。冷冻消融的治疗效果与包括温度、低温持续时间、降温及复温速率等消融参数密切相关。目前针对肝、肺肿瘤的冷冻消融,临床上普遍使用的是由 Littrup 等^[8]在 2009 年基于氩氦冷冻系统提出的先冷循环 10 min,然后复温 5 min,重复 2 次的冷冻消融方案。目前新型的冷冻设备靶向刀(Accu Target),采用了氩气和氮气混合气体作为冷媒,结合了氩气降温速率快,氮气极点温度低的特点,较氩氦刀具有更快的降温速率,和更低的极点低温^[9]。

本研究以活体小型巴马香猪为动物实验模型,设计不同的消融方案使用国产冷冻设备(靶向刀)消融小型猪肝脏组织,消融过程中 CT 监测靶区的冰球形成,消融术毕取出靶区肝脏组织固定、石蜡包埋、切片、末端脱氧核苷核转移酶-生物素 dUTP 切口末端标记法(TUNEL)染色及 HE 染色,探究 1 次冷-热循环和 2 次冷-热循环的消融范围及实际坏死范围的差异。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 经长海实验动物伦理委员会批准,共计 4 只巴马香猪纳入实验研究。实验用小型巴马香猪由上海市奉贤区银根实验动物公司提供,

体重范围 25~30 kg,雌雄不限,均具有健康检疫合格证书。

1.1.2 实验设备 本研究使用的冷冻设备选择低温冷冻系统(靶向刀型号 AT-2008II,上海导向医疗),冷媒为高压氮气和氩气(工作压力 1 300~1 500 ps),功率选择 100%。冷冻针直径为 1.5 mm,针尖带有实时测温功能,冷冻针工作区域长度为 1.5 cm。CT 设备为 16 排大孔径螺旋 CT(西门子公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验过程 小型巴马香猪随机分为 A、B 两组,每组 2 只。实验前禁食 12 h,使用速眠新 II 注射液合剂 0.1 mL/kg 和地西洋注射液 5 mg 的合剂于臀部肌肉注射诱导小型猪全身麻醉,待动物完全麻醉后,于耳缘静脉留置浅静脉针固定牢靠,20 mL 注射器手动缓慢推注丙泊酚维持麻醉,观察动物的麻醉状态及呼吸情况缓慢多次给药,丙泊酚的起始用量为 1 mL,术中递增给药。备硫酸阿托品注射液、尼可刹米、洛贝林等呼吸道急救药品备用,实验过程中当观察到动物出现呼吸道黏液分泌过多、梗阻等症状,立即注射呼吸系统急救药品改善缓解动物呼吸状况,以保证实验顺利完成。固定小型猪仰卧位于定制的简易手术台,中上腹部备皮沿右侧肋缘标记手术切口,消毒铺单,切开皮肤,逐层分离皮下组织,彻底暴露出肝脏。

将小型猪固定于定制手术台上后放置于 CT 扫描床上,预先扫描 1 次,设定好 CT 扫描的参数(90 kV, 1 mm 层厚,层距 1 mm),每只猪肝脏分别选择肝叶较厚实部分,切避开胆囊、大血管、主肝管作为目标消融区,每只猪肝脏选择 2 个目标消融区。靶消融区间隔距离 5 cm 以上,放置冷冻针,使用自制的固定支架固定好冷冻针,CT 扫描 1 次,确认冷冻针放

置位置满意后,开始冷冻消融。A 组选择冷冻消融方案为冷循环 10 min,复温 3 min,循环 1 次。B 组冷冻消融方案选择冷循环 10 min,复温 3 min,循环

2 次。每个靶区冷循环结束后扫描 CT,计算多平面重建(MPR)椭圆形低密度冰球影的最大宽径(见图 1)。



① CT 扫描横断面图像;② MPR 重建低密度影宽;③ MPR 重建低密度影长径

图 1 小型巴马香猪冷循环术毕 CT 扫描及 MPR 重建图像

1.2.2 标本处理 冷冻消融方案完成后,拔出冷冻针,沿冷冻针道插入大头针做好标记。大剂量推注丙泊酚处死小型猪,结扎肝脏主要大血管,取出靶区的肝脏组织标本,于 4% 甲醛溶液中固定 48 h,固定完成后,标本沿着冷冻针穿刺针道垂直方向,沿椭圆形消融区域的最大宽径处切开后石蜡包埋、切片、TUNEL 染色和 HE 染色。

1.2.3 染色方法 HE 染色主要用来观察冷冻消融术后消融区域内病理学改变, TUNEL 染色用以判读消融区域内实际坏死的范围,当细胞发生凋亡或坏死时,细胞核基因组 DNA 断裂时,暴露的 3'-OH 可以在末端脱氧核苷酸转移酶的催化下加上荧光素 (FITC) 标记的 dUTP,从而可以通过荧光显微镜下视野亮绿色染色为阳性坏死细胞。

1.3 统计学方法

所有统计分析均使用 SPSS (版本 22, 美国纽约, IBM 公司) 统计学软件。所有数据都表示为平均值 ± 标准差, CT 扫描显示冰球覆盖范围的最大宽径, 以及 TUNEL 染色标记的实际坏死半径, 均使用配对 *t* 检验的统计学方法进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

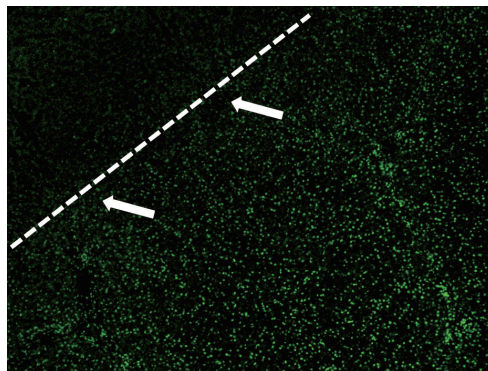
2.1 比较两种循环方案消融范围的差异

本组研究共计 8 个靶消融区, 其中 A 组 1 次 (冷-热 10~3 min) 循环方案的 4 个, B 组 2 次循环 (冷-热 10~3 min) 4 个。其中 1 次循环冰球低密度影的宽径为 (27.6 ± 0.9) mm, 2 次循环冰球低密度影的宽径为 (31.4 ± 0.5) mm, 2 次循环的消融范围较 1 次循环更大, 差异有显著统计学意义

($P < 0.001$)。

2.2 比较两种循环方案消融范围内实际坏死范围

在荧光显微镜下观察标本的 TUNEL 染色判读消融区域内实际坏死范围, 在 40× 倍视野下, 由穿刺点中央向外围观察针道周围的绿色荧光染色阳性细胞比例, 中央部分完全坏死区域阳性细胞均匀充满视野, 外围非冷冻区域鲜有阳性细胞表达, 视野向针道沿直线外移动时, 观察到出现阳性细胞比例急剧减少的区域, 标记该点为消融区域实际坏死边界 (见图 2)。每个切片, 沿针道穿刺点向外延伸, 每隔 90° 的方向标记一个点, 使用 Toup View 显微镜图像测量软件测量标记点距离针道的距离, 取 4 组数据平均值作为该切片的实际坏死半径。1 次循环的冰球范围内实际最大半径为 (8.4 ± 0.2) mm, 而 2 次循环的冰球范围内实际最大坏死半径为 (12.6 ± 0.4) mm。而 1 次循环冰球覆盖范围内实际坏死的边界距低密度影覆盖范围的边界距离为 (5.6 ± 0.5) mm, 而 2 次循环冰球覆盖范围内实际坏死的边界距低密度影覆



40× 镜下 TUNEL 染色消融区和正常肝组织之间 (白色箭头位置) 呈现一个绿色荧光阳性细胞明显减少过渡带

图 2 40× 镜下 TUNEL 染色

盖范围的边界距离为 (3.2 ± 0.2) mm (见表 1)。

表 1 两种循环方案 CT 扫描低密度影与实际

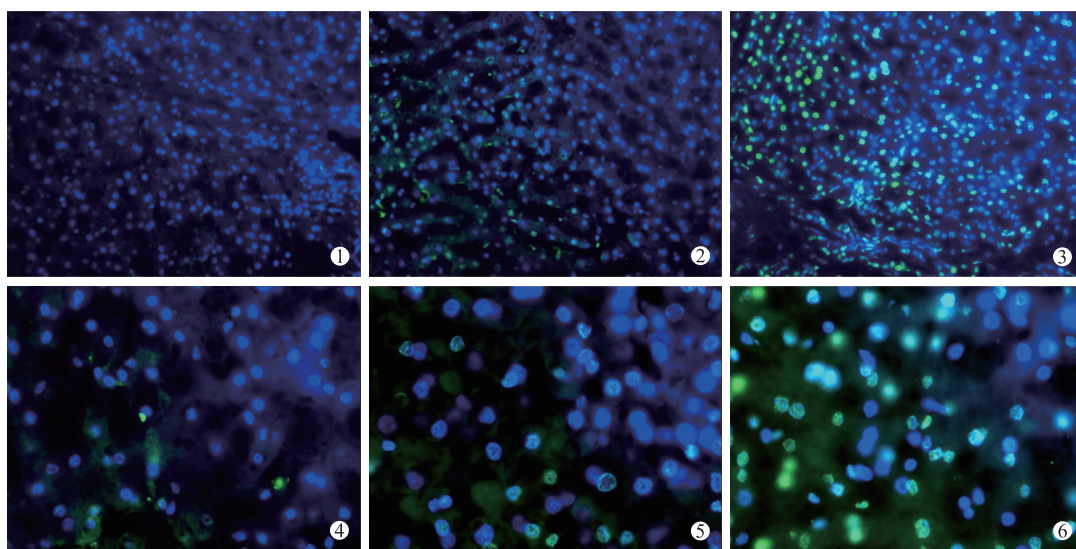
循环 次数	坏死范围的关系			mm
	冰球半径 (CT 扫描低密度影)	实际坏死半径 (TUNEL 染色)	消融边缘	
1	14.3 ± 0.5	8.4 ± 0.2	5.6 ± 0.5	4.9~6.4
2	15.7 ± 0.3	12.6 ± 0.4	3.2 ± 0.2	2.9~3.5

3 讨论

冷冻的治疗效果受多种因素影响: 冷冻速率、组织温度、冻融时间、循环时间以及间隔周期等^[10]。临床也在不断探索如何制定合理的冷冻消融方案。目前有很多动物实验表明, 延长冷循环时间或者增加循环次数可以造成冷冻区域更大的坏死范围。已有研究认为肝、肺 3 次冷-热循环的效果优于 2 次冷-热循环, 临床研究认为瘤体直径 < 3 cm 的晚期非小细胞肺癌 3 次冷-热循环治疗能获得较好的近期局部疗效, 但是目前 3 次循环的冷冻消融方案并未在临床上推广使用^[11-14]。“冷热 10~5 min” 2 次循环模式是基于早些年氩氦刀冷冻设备的基础上提出来的, 但是对于目前新型的冷冻消融设备(靶向刀), 采用了氩气和氮气混合气体作为冷媒, 结合了氩气降温速率快, 氮气极点温度低的特点, 较传统氩氦刀具有更快的降温速率, 和更低的极点低温, 冷循环开启后可在 60 s 内靶区温度降到 -170 °C, 复温采用电辅助加热的方式, 可在 30 s 内靶区温度上升

到 50 °C 左右。本研究显示 2 次循环的消融范围明显较 1 次循环更大, 1 次循环的消融范围局限, 且形成冰球范围内的有效坏死范围小, 因此认为对于国产冷冻消融设备(靶向刀), 2 次循环的消融方案仍然很有必要。

早前的实验研究比较超声引导下观察冰球范围与实际坏死的差异, 标记实际坏死的范围使用“印度墨汁”, 超声显示消融范围与实际坏死范围仅为 1 mm 左右的误差。“印度墨汁”标记实际坏死范围是基于碳粒廓清原理观察微循环血管是否破坏而判断坏死区域, 这种方法判读肿瘤细胞是否灭活似乎并不准确。目前临床上评价冷冻消融效果更多的是病理学观察, 临床上目前最常用判读坏死的病理染色为 HE 染色, 可以直观准确、真实地反映实际组织消融范围, Li 等^[13]在活体小猪肝脏冷冻术后 HE 染色观察主要分为中央坏死区, 炎症区域, 充血区, 肉芽肿区以及凋亡区, 在凋亡区域仍然存在正常的组织及细胞, 其他 4 个病理表现区域则认为实际坏死区域。在研究比较射频、冷冻及不可逆电穿孔几种消融方式边缘区域比较的实验中, 有学者使用 TUNEL 染色作为判读靶区内的实际坏死范围, 可以很好地标记靶区的无活性细胞, 细胞在 TUNEL 上 24 h 后不能存活的过渡区的最内侧可能代表肿瘤有效治疗的保守边界^[15-16]。本研究同样使用 TUNEL 染色法判读实际坏死范围, 可以准确地判读出冷冻消融术后实际坏死范围。



① TUNEL 染色 40×10 倍镜下, 正常肝组织区域, 视野内几乎无阳性坏死细胞染色; ② TUNEL 染色 40×10 倍镜下, 正常肝组织和消融区域过渡带, 视野内少量阳性细胞染色; ③ TUNEL 染色 40×10 倍镜下, 消融区域中央完全坏死带, 满视野均匀分布阳性坏死细胞染色; ④ TUNEL 染色 100×10 倍镜下, 正常肝组织区域, 视野内几乎无阳性坏死细胞染色; ⑤ TUNEL 染色 100×10 倍镜下, 正常肝组织和消融区域过渡带, 视野内少量阳性坏死细胞染色; ⑥ TUNEL 染色 100×10 倍镜下, 消融区域中央完全坏死带, 满视野均匀分布阳性坏死细胞染色。

图 3 TUNEL 染色图片

目前很多临床研究认为局部肿瘤进展率与技术成功率有关,是否达到完全消融是局部肿瘤进展的主要决定因素^[17-18]。从病理学层次上讨论,局部肿瘤进展可能与肿瘤周围 5~10 mm 范围内的微血管浸润及微卫星转移灶有关,但是个体特异性差异较大。Okusaka 等^[19]报道在 149 例切除的孤立性小肝癌中,19% 患者有外周有卫星病灶,33% 位于原肿瘤周围 5 mm 内,50% 位于原肿瘤 10 mm 以内。在另外一项单纯结节型肝癌的研究中,66.7% 患者在肿瘤周围 2 mm 处发现邻近微卫星病灶,其余 11.1% 患者微卫星病灶位于肿瘤周围 5 mm 内。为确保达到对病灶的完全消融,其他热消融方式比如射频、微波通常选择的做法是保证靶区消融范围足够大,覆盖肿瘤周围正常肝组织即所谓的消融安全边缘 5~10 mm,以保证消融区域完整的覆盖肿瘤。本实验表明,当前使用的 2 次循环的消融方案,消融范围与实际坏死区域的安全消融边缘为 (3.2 ± 0.2) mm,认为对于国产冷冻设备(靶向刀)消融范围至少要保证覆盖病灶周围正常肝脏组织 3.5 mm 以上,但是考虑可能存在的微卫星灶,条件允许的情况下冷冻范围覆盖正常肝脏组织最好在 10 mm 以上。

综上所述,目前广泛使用的 2 次冷-热循环的方案对于国产冷冻设备(靶向刀)仍然很重要,在消融肝脏肿瘤过程中,至少要保证冰球要覆盖病灶周围正常肝脏组织 3.5 mm 以上才足够。

[参 考 文 献]

- [1] Georgiades CS, Rodriguez R. Efficacy and safety of percutaneous cryoablation for stage 1A/B renal cell carcinoma: results of a prospective, single-arm, 5-year study[J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2014, 37: 1494-1499.
- [2] Chen Y, Gao SG, Chen JM, et al. Risk factors for the long-term efficacy, recurrence, and metastasis in small hepatocellular carcinomas[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 72: 627-631.
- [3] Li ZW, Zhang C, Lou C, et al. Comparison of percutaneous cryosurgery and surgical resection for the treatment of small hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6: 239-245.
- [4] Wang C, Wang H, Yang W, et al. Multicenter randomized controlled trial of percutaneous cryoablation versus radiofrequency ablation in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2015, 61: 1579-1590.
- [5] 何文真, 吴 强, 林 东, 等. 氩氦刀冷冻消融术联合 ¹²⁵I 粒子植入治疗中晚期原发性肝癌的疗效观察[J]. *广西医科大学学报*, 2015, 32: 749-751.
- [6] 李 征, 米登海, 杨克虎, 等. 肝动脉化疗栓塞术联合氩氦刀治疗肝癌疗效及安全性的系统评价[J]. *中国循证医学杂志*, 2013, 13: 31-38.
- [7] 周信达, 汤钊猷, 余 耀, 等. 冷冻肝切除对降低肝癌术后复发的初步评价[J]. *中华外科杂志*, 2005, 43: 439-441.
- [8] Littrup PJ, Jallad B, Vorugu V, et al. Lethal isotherms of cryoablation in a phantom study: effects of heat load, probe size, and number[J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2009, 20: 1343-1351.
- [9] 王辅明, 刘敬禹, 杨朝爱, 等. 国产冷冻设备(靶向刀)治疗肝癌临床应用[J]. *介入放射学杂志*, 2018, 27: 530-533.
- [10] Gage AA, Baust JM, Baust JG. Experimental cryosurgery investigations in vivo[J]. *Cryobiology*, 2009, 59: 229-243.
- [11] Hinshaw JL, Littrup PJ, Durick N, et al. Optimizing the protocol for pulmonary cryoablation: a comparison of a dual- and triple-freeze protocol[J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2010, 33: 1180-1185.
- [12] 曾健滢, 施娟娟, 牛 涛, 等. 3 次循环冷冻治疗进展期非小细胞肺癌近期疗效[J]. *介入放射学杂志*, 2018, 27: 79-83.
- [13] Li J, Chen J, Zhou L, et al. Comparison of dual- and triple-freeze protocols for hepatic cryoablation in a Tibet pig model[J]. *Cryobiology*, 2012, 65: 68-71.
- [14] Werner JD, Tregnago AC, Netto GJ, et al. Single 15-min protocol yields the same cryoablation size and margin as the conventional 10-8-10-min protocol: results of kidney and liver swine experiment[J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2018, 41: 1089-1094.
- [15] Cornelis FH, Durack JC, Kimm SY, et al. A comparative study of ablation boundary sharpness after percutaneous radiofrequency, cryo-microwave, and irreversible electroporation ablation in normal swine liver and kidneys[J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2017, 40: 1600-1608.
- [16] Komorizono Y, Oketani M, Sako K, et al. Risk factors for local recurrence of small hepatocellular carcinoma tumors after a single session, single application of percutaneous radiofrequency ablation[J]. *Cancer*, 2003, 97: 1253-1262.
- [17] Ng KK, Lam CM, Poon RT, et al. Thermal ablative therapy for malignant liver tumors: a critical appraisal[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18: 616-629.
- [18] Nakashima Y, Nakashima O, Tanaka M, et al. Portal vein invasion and intrahepatic micrometastasis in small hepatocellular carcinoma by gross type[J]. *Hepatol Res*, 2003, 26: 142-147.
- [19] Okusaka T, Okada S, Ueno H, et al. Satellite lesions in patients with small hepatocellular carcinoma with reference to clinicopathologic features[J]. *Cancer*, 2002, 95: 1931-1937.

(收稿日期: 2019-06-14)

(本文编辑: 俞瑞纲)