

## ·实验研究 Experimental research·

## 大鼠肝脏组织不可逆电穿孔消融能量效应和热效应研究

朱金俊, 黄伟伟, 包家立, 胡亚楠

**【摘要】目的** 研究梯度能量不可逆电穿孔(IRE)在肝脏组织消融中的能量效应和热效应。**方法** 对大鼠肝组织分别施加 5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70 J 梯度能量电脉冲。3 d 后观察消融区域病理反应,统计消融面积,建立消融面积和能量效应公式。实时测量 IRE 过程中所产生的热效应,并提出一种预测消融后组织温度的仿真方法。**结果** 经 IRE 处理后,大鼠肝脏组织内形成边界明显的消融区域。随着 IRE 能量提高,消融面积增加,且与脉冲能量呈指数关系。大鼠肝脏消融中 IRE 能量效应阈值为 20 J。此外,实验和仿真数据共同表明,IRE 处理后肝组织存在热效应,但可调节脉冲参数以避免热损伤。**结论** IRE 在肝脏组织消融中具有能量效应和可控的热效应,为未来实验和手术治疗提供了理论和实践依据。

**【关键词】** 不可逆电穿孔;能量效应;热效应;肝组织消融;温度仿真

中图分类号:R318 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2022)-03-0267-05

**The energy effect and thermal effect of irreversible electroporation ablation on the hepatic tissues in experimental rats** ZHU Jinjun, HUANG Weiwei, BAO Jiali, HU Yanan. *Research Team of Biophysics and Medical Engineering, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Bioelectromagnetic, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang Province 310058, China*

Corresponding author: BAO Jiali, E-mail: baojl@zju.edu.cn

**【Abstract】Objective** To investigate the energy effect and thermal effect of the gradient energy irreversible electroporation(IRE) on the ablation of hepatic tissues. **Methods** Gradient energy pulses of 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 and 70 J were applied to the rat hepatic tissues, respectively. After 3 days, the pathological changes of the hepatic ablated zones were examined, the ablation areas were measured, and the formulas for the ablation area and energy effect were established. The thermal effects produced during IRE process were measured in real time, and a simulation method for predicting tissue temperature after ablation was proposed. **Results** After IRE treatment, an ablated area with sharp border was formed in the rat hepatic tissue. With the increase of IRE energy, the size of ablated area increased; and an exponential relationship existed between the size of ablated area and pulse energy. The energy effect of IRE in rat hepatic ablation had a threshold value of 20 J. In addition, both the experiment and the simulation data showed that there was thermal effect in hepatic tissue after IRE treatment, but which could be avoided by adjusting pulse parameters. **Conclusion** For ablation of hepatic tissues, IRE has both energy effect and controllable thermal effect, which provides theoretical and practical basis for the future experiments and surgical treatment. (J Intervent Radiol, 2022, 31: 267-271)

**【Key words】** irreversible electroporation; energy effect; thermal effect; hepatic tissue ablation; temperature simulation

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2022.03.012

基金项目: 传染病防治国家科技重大专项项目(2018ZX10301201-002)

作者单位: 310058 杭州 浙江大学医学院浙江省生物电磁学重点实验室生物物理与医学工程研究组

通信作者: 包家立 E-mail: baojl@zju.edu.cn

不可逆电穿孔(irreversible electroporation, IRE)是一种新型肿瘤消融技术,可使组织中细胞膜形成不可逆性穿孔,从而有效破坏细胞<sup>[1-4]</sup>。IRE 生物效应可能与其能量具有相关性,电脉冲能量(E)会随着电压(U)、脉冲持续时间(t)、脉冲数量(N)等电参数的变化而变化: $E=N \int_0^T \frac{U(t)^2}{R} dt$  (1),其中 T 为脉冲持续总时间,R 为负载阻抗。对于单脉冲,较低电压与较长脉冲持续时间组合、较高电压与较短脉冲持续时间组合所引起的细胞凋亡现象,并无明显差异<sup>[5]</sup>。当较低单脉冲能量通过脉冲数量累积,可与较高单脉冲能量和较少脉冲数量组合引起相近的细胞凋亡水平,体现出能量具有累积效应<sup>[6-7]</sup>。普遍认为 IRE 释放过程中不产生热效应<sup>[8-9]</sup>,但也有研究认为产生的热量不可忽略<sup>[10]</sup>,温度升高会对组织造成热损伤。本研究旨在以 IRE 能量累积效应为依据,探索单脉冲累积引起的总能量增加对大鼠肝脏组织消融的影响,并通过测量 IRE 消融时组织实时温度,对其热效应进行研究,同时建立一种仿真方法对 IRE 消融最终温度进行预测。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和主要仪器

清洁级 Sprague-Dawley 大鼠(浙江省医学科学院实验动物中心提供),平均体质量 200 g。所有实验过程均符合我国《实验动物管理条例》有关条款。

实验仪器主要有电脉冲系统 OX4-5 型电穿孔仪(杭州场皿科技公司),脉冲电场发生的简要示意电路如图 1 所示,由电源、电容器组、开关和脉冲控制器、并行电阻及负载组成;YP5008G 型多路温度记录仪(深圳永鹏仪器公司)。

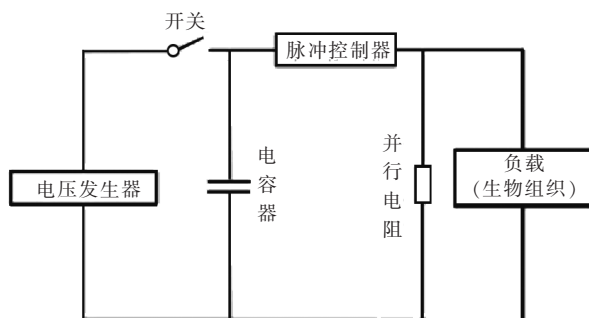


图 1 脉冲发生电路

### 1.2 IRE 消融

电脉冲处理前以 1%戊巴比妥钠麻醉大鼠,将脉冲发生器、电极针进行连接,用铁架台固定电极

针,针间距为 5 mm;大鼠以躺姿固定于手术台,手术区域消毒并暴露肝脏;将电极垂直插入大鼠肝中,施加电脉冲。实验分为 11 组,脉冲个数分别为 10、20、30、40、50、60、70、80、100、120、140 个,每组总能量分别为 5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70 J。脉冲释放结束后将脏器回纳腹腔,常规闭腹并消毒。

### 1.3 实时温度测量

通过热电偶测温仪分别测量肝脏组织在电脉冲暴露时的实时温度。热电偶放置的测量点如图 2 所示。共设置 15 个测量点,测量点 1~5 放置于电极针中上侧,间距为 2.5 mm;测量点 6~10 放置于电极针右侧,间距为 2.5 mm;测量点 11~15 放置于电极针的右下侧,间距为 2.5 mm。

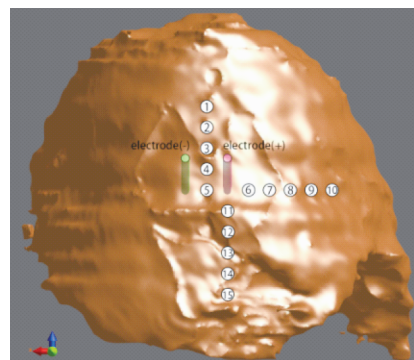


图 2 热电偶测量点示意图

### 1.4 病理检查

饲养 3 d 后,对大鼠行安乐死。将肝组织置于 4%甲醛溶液中浸泡 48 h,石蜡包埋,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,制成组织切片并行苏木精-伊红(HE)染色,通过 Olympus VS200 数字切片扫描仪进行扫描,获得病理学彩色扫描图。通过 ImageJ 软件进行消融面积计算。

### 1.5 温度仿真

采用 Sim4Life 人体生物电磁仿真软件(瑞士 IT'IS 基金会)进行温度仿真。通过生物热方程计算组织中温度(T)分布: $\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} = 0.5 \sigma E^2 + \nabla \cdot (k \nabla T) + W_b C_b (T_b - T)$  (2),根据式 2 选择大鼠模型肝组织构建三维有限元模型,进行温度值仿真。仿真参数如表 1 所示。

### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件分析结果,以均值±标准误差表示, $n=3$ ,取平均值进行比较, $P<0.05$  为差异有统计学意义。采用 GraphPad Prism 8 软件绘制图表。

表 1 仿真参数

参数	符号	数值	单位	参考文献
组织密度	$\rho$	1 078.75	kg/m <sup>3</sup>	[11]
组织比热容	$C_p$	3 540.20	J/(kg·K)	[11-12]
电导率	$\sigma$	1 078.75	S/m	[13]
组织导热率	$k$	0.52	W/(m·K)	[11-12]
血液密度	$\rho_b$	1 000	kg/m <sup>3</sup>	[14]
血液灌注率	$W_b$	$1.03 \times 10^{-3}$	m <sup>3</sup> /(m <sup>3</sup> ·s)	[14]
血液比热	$C_b$	4 180	J/(kg·K)	[14]
动脉血温度	$T_b$	310	K	[14]

## 2 结果

### 2.1 IRE 引起肝脏消融的病理组织学观察

组织消融情况如图 3 所示,消融区域边界清晰。消融 1 区域是插入深度约为 2 mm、直径为 0.35 mm 的电极针所在区域;2 区域是靠近电极的组织被热损伤区域,肝组织结构消失,呈现均匀的红色染色固化状态,中心电极温度达到组织热固定阈值(图 3②);3 区域肝组织结构保留,但肝核消失,肝窦扩张,显示有 Kupffer 细胞残留(图 3②④);4 区域是修复与再生结合区,大量肉芽组织形成,5 区域中肝细胞轻度受损,呈细胞水肿状态(图 3③)。电场暴露引起的消融部位邻近血管和胆管仍保留完整(图 3⑤)。

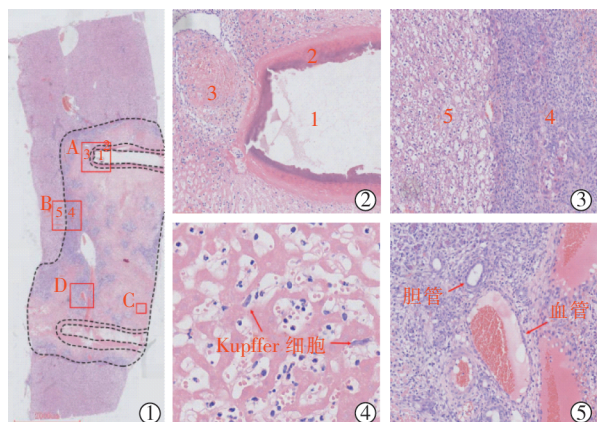
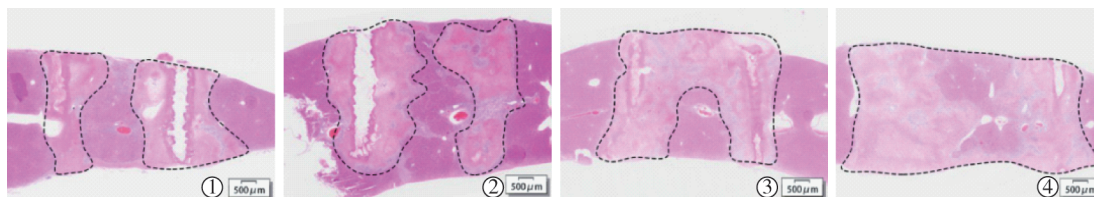


图 3 肝脏消融 3 d 后组织学所见  
①组织 HE 染色切片图(10×),包括 A、B、C、D 区;②A 区放大图(150×);③B 区放大图(150×);④C 区放大图(400×);⑤D 区放大图(200×)

图 3 肝脏消融 3 d 后组织学所见

### 2.2 IRE 能量效应

实验发现,电脉冲能量 < 20 J 时肝脏组织消融



虚线所框选面积为消融区域 ①5 J 能量;②10 J 能量;③15 J 能量;④20 J 能量

图 5 不同能量组织 HE 染色切片代表图(10×)

面积随能量逐步增加,最大消融面积约为 30 mm<sup>2</sup>;电脉冲能量 > 20 J 后,肝脏组织消融面积不再继续增大(图 4)。不同能量的组织 HE 染色切片代表图如图 5 所示。

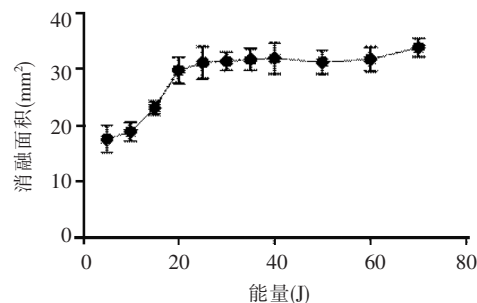


图 4 能量与肝脏组织消融面积关系

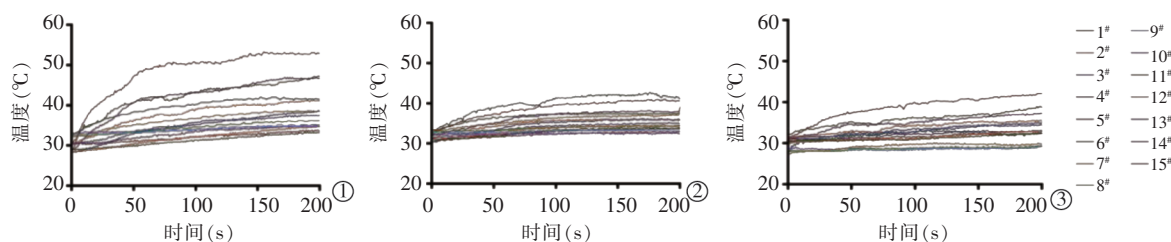
### 2.3 IRE 热效应

大鼠肝脏温度 15 个测量点(图 2)实时数据如图 6 所示,实验发现在能量为 0.5 J、释放频率为 1 Hz 电脉冲下,肝脏温度在 50 s 内快速上升,在 50~150 s 进入缓慢上升,在 150~200 s 温度趋于稳定(图 6①);在能量为 0.25 J、频率为 1 Hz 和 0.5 J、频率为 0.5 Hz 电脉冲作用下,肝脏温度在 100 s 内上升,在 100~200 s 温度趋于稳定(图 6②③)。用 Sim4Life 软件根据具体电脉冲参数对大鼠肝脏温度分布进行仿真(图 7),可见距离电极越近的区域,温度越高;电极针附近等温线接近圆形,随着距离增加逐渐变成葫芦状,最终呈椭圆形分布;越靠近电极,温度变化率越大。将 15 个测量点仿真温度和实验测量最终温度进行对比,数值高度吻合(图 8)。

## 3 讨论

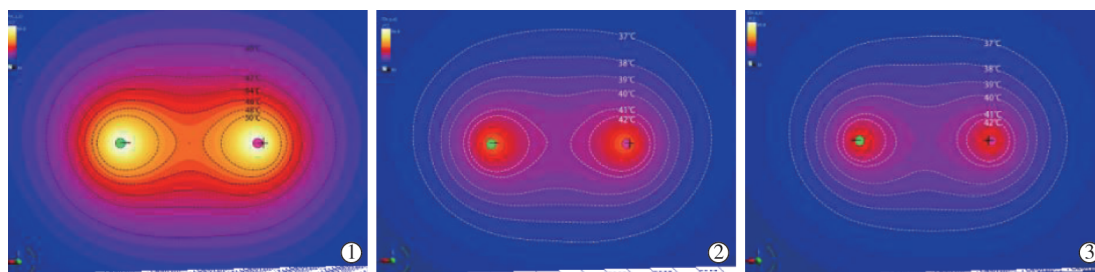
IRE 消融技术是除了射频消融<sup>[15-16]</sup>、微波消融<sup>[17-18]</sup>、光热消融<sup>[19]</sup>、激光消融<sup>[20]</sup>、冷冻消融<sup>[21-22]</sup>之外另一种良恶性肿瘤消融方法,具有可应用于血管、胆管、胰管和神经等重要组织结构附近良恶性肿瘤消融的优势<sup>[23]</sup>,也可使肝血管肝门得以保留<sup>[24]</sup>。IRE 已成为肝门等重要结构附近良恶性肿瘤安全消融治疗的手段之一。然而,IRE 在组织消融中的能量





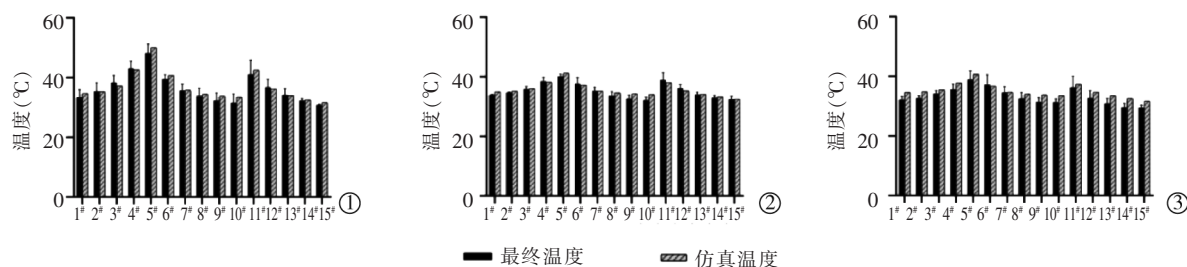
①单脉冲能量为 0.5 J, 释放频率为 1 Hz; ②单脉冲能量为 0.25 J, 释放频率为 1 Hz; ③单脉冲能量为 0.5 J, 释放频率为 0.5 Hz

图 6 不同参数脉冲暴露下肝脏温度实时变化曲线



①单脉冲能量为 0.5 J, 释放频率为 1 Hz; ②单脉冲能量为 0.25 J, 释放频率为 1 Hz; ③单脉冲能量为 0.5 J, 释放频率为 0.5 Hz

图 7 不同参数脉冲暴露下肝脏仿真温度分布图



①单脉冲能量为 0.5 J, 释放频率为 1 Hz; ②单脉冲能量为 0.25 J, 释放频率为 1 Hz; ③单脉冲能量为 0.5 J, 释放频率为 0.5 Hz

图 8 电脉冲作用下测量最终温度和仿真温度对比

效应和热效应仍有待进一步研究。本研究通过观察 IRE 处理后肝脏组织病理学切片发现, 肝脏消融区域与周围组织有明显分界, 且区域内细胞发生凝固性坏死, 这说明 IRE 能引起肝组织消融并限定在一定范围, 提示 IRE 应用于肝脏组织消融的有效性; 同时发现 IRE 在组织消融过程中可避开邻近血管和胆管, 具有保护敏感部位优势(图 3⑤), 这提示只要给予的能量合适, IRE 对于重要结构周围恶性肿瘤的消融具有安全性。

IRE 能量会随着电场强度、脉冲持续时间、脉冲数量等电参数变化而变化。目前应用比较成熟的纳米刀系统(美国 AngioDynamics 公司)所引起的消融面积会随着电场强度增加而增加<sup>[25]</sup>。有研究认为 IRE 引起消融的电场强度阈值为 750 V/cm<sup>[26]</sup>, 也有研究表明阈值为 125 V/cm<sup>[27]</sup>, 这种差异可能是脉冲个数不同所引起。本研究通过改变脉冲个数探究梯度能量 IRE 作用下消融面积, 发现在一定能量范围内, 消融面积随能量增加而增大, 但当能量达

到特定值后, 面积不再随能量而改变, 这个特定值可被认为是 IRE 治疗时应选择的最优值, 因为它既保证消融有效性, 又可节约能量并降低高能量可能带来的不良反应, 如肌肉收缩和热效应等<sup>[28]</sup>。本研究统计梯度能量 IRE 处理后肝脏消融面积并进行数据拟合, 得出相应的能量效应经验公式:  $A = 17 \times \left(1 - e^{-\frac{E}{18}}\right) + 18$  (3), 其中 A 为消融面积, E 为电脉冲能量。

目标组织温度高于 45~50℃ 这一“致死温度范围”20 s 后组织就会被高温破坏<sup>[13]</sup>。本实验中采用 0.5 J 单脉冲能量, 以 0.5 Hz 频率进行释放, 实时测量目标组织温度变化, 最高温度位于 5 号测量点处, 约为 40℃, 比实验前提高约 10℃(图 6③)。通过测量不同电参数 IRE 处理时肝脏组织温度实时变化, 均发现温度逐渐上升, 并最终趋于稳定; 在相同脉冲频率下, 当能量增加时, 组织温度也会相应增加(图 6①②), 同时在相同能量条件下, 当脉冲频率

增加时,组织温度也会相应增加(图 6①③)。根据电脉冲具体参数进行温度分布仿真模拟发现,其与实验得出的最终温度高度吻合(图 8)。实验和仿真结果共同表明,IRE 治疗过程中热效应是存在的,所以需要在手术前根据电脉冲体参数充分预测 IRE 暴露后组织热量分布。

本研究旨在探索 IRE 在大鼠肝脏组织消融中的能量效应和热效应,结果显示消融部位肝脏组织发生凝固性坏死,消融区域与周边组织存在明显分界,血管胆管未见明显损伤。IRE 在肝脏消融中存在能量效应,并可得出对应的能量效应经验公式,同时 IRE 也会引起组织热效应。因此,应在术前优化电参数,确定 IRE 最优能量,并避免产生热损伤。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 朱统寅,孙军辉,陈新华,等. CT 导引纳米刀消融猪肝脏可行性实验研究[J]. 介入放射学杂志, 2016, 25:337-340.
- [3] Wang W, Hou S, Ni J, et al. Effectiveness and safety of irreversible electroporation for recurrent hepatocellular carcinoma ineligible for thermal ablation after surgery[J]. J Intervent Med, 2020, 3: 151-155.
- [4] 李 鑫,刘凤永,袁宏军,等. 纳米刀治疗肝癌[J]. 介入放射学杂志, 2017, 26:939-943.
- [5] Weaver JC, Smith KC, Esser AT, et al. A brief overview of electroporation pulse strength - duration space: a region where additional intracellular effects are expected[J]. Bioelectrochemistry, 2012, 87: 236-243.
- [6] Shawki MM, Farid A. Low electric field parameters required to induce death of cancer cells[J]. Electromagn Biol Med, 2014, 33: 159-163.
- [7] Zhou W, Xiong Z, Liu Y, et al. Low voltage irreversible electroporation induced apoptosis in HeLa cells[J]. J Cancer Res Ther, 2012, 8: 80-85.
- [8] Narayanan G. Irreversible electroporation [J]. Semin Intervent Radiol, 2015, 32: 349-355.
- [9] Scheffer HJ, Nielsen K, de Jong MC, et al. Irreversible electroporation for nonthermal tumor ablation in the clinical setting: a systematic review of safety and efficacy[J]. J Vasc Interv Radiol, 2014, 25: 997-1011.
- [10] Scheffer HJ, Vogel JA, van den Bos W, et al. The influence of a metal stent on the distribution of thermal energy during irreversible electroporation[J]. PLoS One, 2016, 11: e0148457.
- [11] McIntosh RL, Anderson V. A comprehensive tissue properties database provided for the thermal assessment of a human at rest [J]. Biophys Rev Lett, 2010, 5: 129-151.
- [12] Bernardi P, Cavagnaro M, Pisa S, et al. Specific absorption rate and temperature elevation in a subject exposed in the far-field of radio-frequency sources operating in the 10-900-MHz range[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2003, 50: 295-304.
- [13] Cosman ER Jr, Cosman ER Sr. Electric and thermal field effects in tissue around radiofrequency electrodes[J]. Pain Med, 2005, 6: 405-424.
- [14] 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, 2014, 13: 561-569.
- [15] 赵 堃,姜安娜,王 红,等. 探讨应用射频电极针治疗较大肝肿瘤布针模式比较[J]. 介入放射学杂志, 2020, 29:907-912.
- [16] Wang WD, Hou SN, Zhong ZL, et al. Radiofrequency ablation combined with transcatheter arterial chemoembolization therapy versus surgical resection for Barcelona Clinic Liver Cancer(BCLC) A hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. J Intervent Med, 2018, 1: 49-57.
- [17] 侯训博,刘瑞宝,尹立楠,等. 低功率微波消融联合化疗栓塞治疗特殊部位肝细胞癌的临床应用[J]. 介入放射学杂志, 2020, 29:1105-1109.
- [18] Wu M, Gao S, Song H, et al. Percutaneous microwave ablation combined with simultaneous transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma with macrovascular invasion or extrahepatic metastases[J]. J Intervent Med, 2019, 2: 55-59.
- [19] 许 军,贺克武,高 斌. 金纳米棒联合内放疗靶向性肿瘤治疗的研究进展[J]. 介入放射学杂志, 2015, 24:540-543.
- [20] 罗鹏飞,陆骊工,陈晓明,等. 经肝动脉栓塞化疗结合局部消融治疗大肠癌肝转移[J]. 介入放射学杂志, 2003, 12:340-344.
- [21] 王辅明,李 娜,罗 荣,等. 国产冷冻设备(靶向刀)消融活体猪肝的实验研究[J]. 介入放射学杂志, 2020, 29:278-282.
- [22] Wang GZ, He XH, Wang Y, et al. Image-guided cryoablation in unresectable or recurrent advanced colorectal cancer: a retrospective study[J]. J Intervent Med, 2018, 1: 92-97.
- [23] Wu ZY, Su TW, Sun FK, et al. Irreversible electroporation treatment of pheochromocytoma at a complex site: a case report [J]. J Intervent Med, 2020, 3: 101-105.
- [24] 梁 冰,牛立志,曾健滢,等. 不可逆电穿孔消融胆管侧肝脏病理学观察[J]. 介入放射学杂志, 2014, 23:320-324.
- [25] Rossmeisl JH Jr, Garcia PA, Pancotto TE, et al. Safety and feasibility of the NanoKnife system for irreversible electroporation ablative treatment of canine spontaneous intracranial gliomas[J]. J Neurosurg, 2015, 123: 1008-1025.
- [26] Jiang CL, Davalos RV, Bischof JC. A review of basic to clinical studies of irreversible electroporation therapy[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2015, 62: 4-20.
- [27] Rubinsky J, Onik G, Mikus P, et al. Optimal parameters for the destruction of prostate cancer using irreversible electroporation [J]. J Urol, 2008, 180: 2668-2674.
- [28] 袁 晶,董守龙,陈玉潇,等. 高频双极脉冲不可逆电穿孔消融猪肝组织的安全性和有效性研究[J]. 中华消化外科杂志, 2019, 18:979-985.

(收稿日期:2021-04-15)

(本文编辑:边 倩)