

· 基础研究 ·

射频热凝家兔肝组织的热效应观察

梅斌 陈孝平 万春 李杰

【摘要】 目的 研究射频热凝家兔肝组织的热效应范围,并观察肝细胞、肝内动脉、静脉及胆管组织的损伤情况。**方法** 将 40 只家兔随机分为 2 组(实验组与对照组,每组 20 只),均分别剖腹暴露肝脏,于实验组家兔肝膈面插入射频针并给予射频热凝处理,对照组家兔手术操作与实验组相同,但不给予射频热凝处理。2 组家兔分别于术后 1,5,10,15 d 各处死 5 只,取肝脏不同部位进行常规切片染色,观察肝细胞、动脉、静脉及胆管组织的损伤情况。采用 TUNEL 法检测肝细胞、胆管上皮细胞的凋亡率,并测定家兔术前、术后血清 GPT、T-BIL 及 D-BIL 水平。**结果** 通过组织学观察,发现该射频热凝治疗仪(单电极)对家兔肝组织的最大热效应损伤半径为 2.5 cm,在坏死区域内可见肝细胞、血管及胆管等均有程度不一的损伤。距凝固坏死区外边缘 2.0 cm 范围内的肝细胞、胆管上皮细胞的凋亡指数均高于对照组相应部位细胞,差异有统计学意义($P < 0.01$);另外还发现实验组家兔肝细胞的凋亡指数也高于同区域胆管上皮细胞凋亡指数($P < 0.01$)。**结论** 对射频热效应耐受性由高至低排列依次为:胆管 > 动脉 > 静脉 > 肝细胞,正常家兔肝细胞对射频热效应的敏感性大于胆管上皮细胞,细胞凋亡可能与射频热效应相关,即射频热凝能引发肝细胞、胆管上皮细胞凋亡。

【关键词】 射频; 家兔; 肝; 凋亡

The thermal effect of cool-tip radiofrequency generator on liver tissue of rabbit MEI Bin, CHEN Xiao-ping, WAN Chun, LI Jie. Department of Hepatic Surgery Center, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To investigate the ablation range of Cool-tip radiofrequency generator and its thermal effect on liver cells, intrahepatic artery, vein and biliary duct. **Methods** Forty healthy New Zealand rabbits were divided into an experimental group and a control group. The rabbits of the experimental group were treated with one session of radio-frequency delivered by Cool-tip radio-frequency generator and killed at 1, 5, 10, 15 days after the treatment. Histologic manifestations of the liver cells, intrahepatic artery, vein and biliary duct were characterized under light microscope. Apoptosis detected by TUNEL served as the index of thermosensitivity. GPT, T-BIL, D-BIL level were also tested before and after the treatment. **Results** The ablation radius of the Cool-tip radio-frequency lesion generator was 2.5 cm. There were lesions of different degrees in liver cells, intrahepatic artery, vein and biliary duct. The apoptosis index of hepatocytes and biliary epithelial cells within 2 cm to the edge of coagulated region in the experimental group was higher than those in the control group($P < 0.01$). As well, the apoptosis index of hepatocytes was also higher than that of biliary epithelial cells($P < 0.01$). **Conclusion** The tolerance to radio-frequency ablation of various tissues from high to low was as bile duct > artery > vein > liver cells. The thermosensitivity of the normal rabbit hepatocyte was higher than that of biliary epithelial cells to radiofrequency ablation. Apoptosis was correlated to the thermal effect induced by RFA.

【Key words】 Radio-frequency; Rabbits; Liver; Apoptosis

肝癌是威胁我国人民群众身体健康的常见疾病之一,目前手术切除仍是治疗肝癌的首选方法;但由于我国肝癌患者多伴有不同程度肝硬化,致使肝癌切除率较低,同时肝癌切除患者术后的复发率亦较高,因此针对不可切除肝癌及复发性肝癌的治疗已成为目前肝癌研究领域的重要组成部分。近年来,随着冷冻、微波及射频等治疗技术的出现,针对上述肝癌患者的治疗呈现出崭新前景,特别是射频热凝治疗,具有疗效确切、副损伤

轻微、操作简便等优点,已逐渐受到人们重视^[1-3]。冷循环射频热凝治疗仪是最近投入临床试用的一种新型射频热凝治疗仪器,其输出功率远高于目前普通的射频热凝治疗仪,但要临床广泛应用尚缺乏全面的活体研究资料。本研究以活体家兔肝脏为研究对象,观察该射频热凝治疗仪的热效应范围、对家兔肝组织的损伤效应以及肝内动、静脉及胆管组织的损伤情况,从而为临床更好地应用该治疗仪提供实验依据。现报道如下。

材料与方法

一、分组及处理

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心

选取健康成年新西兰大耳白兔 40 只(由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供),体重为 2.5 ~ 3.0 kg,雌雄不限,将其随机分为实验组与对照组,每组 20 只。实验组动物均在全麻条件下以正中切口剖腹,暴露肝脏,以膈面肝门右侧 2 cm 处为穿刺点,垂直肝膈面插入射频针(单电极),插入深度为 1.5 cm。采用冷循环射频热凝治疗仪(由美国 Radionics 公司生产的 Cool-tip 治疗仪)对上述各实验组动物进行治疗。射频热凝治疗参数:输出功率为 30 ~ 40 W,电阻 180 ~ 190 Ω ,治疗时间为 8 min,且均只给予 1 次治疗,于射频热凝治疗完毕后严格止血并关闭腹腔。对照组动物除不进行射频热凝治疗外,其它操作步骤均与实验组相同。待各组动物清醒后妥善喂养。

二、取材与切片制备

实验组动物分别于治疗后 1 d、5 d、10 d 及 15 d 时处死(每观察点各处死 5 只动物),暴露动物肝脏,取穿刺点及其外周多处肝组织(以穿刺点为圆心,于 0.5 cm、1.0 cm、1.5 cm、2.0 cm、2.5 cm、3.0 cm、3.5 cm、4.0 cm 为半径的圆周区域内共取标本 16 处)和肝门部位组织块,面积约为 0.5 cm $\times$ 0.5 cm,经多聚甲醛固定后,行常规切片及 HE 染色。对照组动物则于相同时间点取相应部位肝组织与之对照。

三、观察指标

观察各组动物实验后不同时间段肝脏坏死灶的形态改变。通过观察肝细胞常规切片以了解其变性、坏死情况,并与对照组比较;观测冷循环射频热凝治疗仪的热效应损伤半径,并同时观察穿刺点周围不同内径的动脉、静脉及胆管组织的损伤情况(如管壁是否破裂、闭塞及内皮细胞有否脱落等)。

各组动物分别于术前及术后 1 d、5 d、10 d 及 15 d 时抽取静脉血,测定血清谷丙转氨酶(GPT)、总胆红素(T-BIL)及直接胆红素(D-BIL)水平;同时检测射频热凝治疗 1 d 后,实验组动物距凝固坏死区外边缘 2.0 cm 以内区域肝细胞及胆管上皮细胞的凋亡情况。采用德国 Boehringer-Mannheim 公司出品的 In Situ Cell Death Detection 试剂盒,按说明书的介绍(采用 TUNEL 法)检测肝细胞、胆管上皮细胞的凋亡情况;其中以染色切片中细胞核出现棕黄色或棕褐色颗粒为凋亡阳性细胞。根据相应公式计算凋亡指数,凋亡指数 = (凋亡阳性细胞数/观察总细胞数) $\times$ 100%;用图像分析法计算距凝固坏死区边缘不同距离处肝细胞、胆管上皮细胞的凋亡指数,并计算各自均数。

四、统计学分析

采用 SPSS 11.5 版统计学软件,对计量资料进行方差分析与 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、射频热凝的热效应损伤半径分析

通过大体观察各组实验动物标本,发现经射频热凝治疗 1 d 后,距穿刺点 1 cm 内的肝组织呈现凝固坏死征象,为白色均质样结构;而距穿刺点 1 ~ 2 cm 区域为鲜红色反应区。射频热凝治疗结束 5 d 后,坏死区域半径扩大至 1.5 cm,其外 1 cm 区域仍为鲜红色反应区(图 1)。射频热凝治疗结束 10 d 后,坏死区半径扩大至 2.5 cm,此时已无明显反应区。射频热凝治疗结束 15 d 后,坏死区不再进行性扩大,与 10 d 时比较,差异无统计学意义。

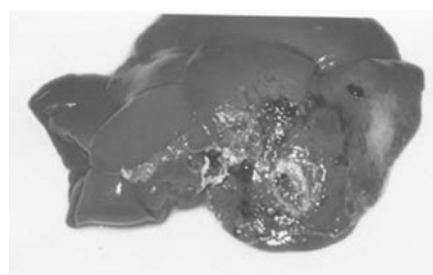


图 1 射频热凝 5 d 后肝脏凝固坏死区肉眼观察

二、家兔肝细胞损伤情况比较

对各组实验动物肝细胞进行组织学观察后发现,坏死区域病理改变主要为肝细胞片状破裂、空泡变、核溶解等。鲜红色反应区则主要表现为肝细胞水样变、炎性细胞浸润、空泡样变、脂肪变性、胞体增大、胞核深染等(如图 2),部分细胞核可见变形、碎裂或固缩,偶见凋亡小体。另外在射频热凝治疗结束 1 d 后,坏死区域外围部分也表现出肝细胞水样改变,至射频热凝结束后 15 d 时,整个坏死区域才全部表现为肝细胞坏死,即提示肝细胞组织学改变要晚于大体形态学改变。

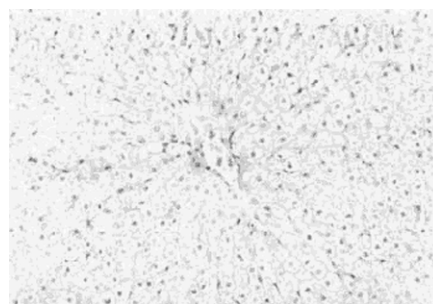


图 2 鲜红色反应区组织学光镜观察(HE 染色, $\times 100$)

三、家兔肝脏管腔结构损伤情况比较

通过观察实验动物后发现,血管上皮细胞及胆管内皮细胞对射频热凝效应的耐受性明显强于肝细胞,如距穿刺点 2 cm 以外区域的管腔结构均无明显损伤,而距穿刺点 1 cm 以内区域的各种管腔结构均表现出

不同程度的破坏,包括动、静脉、胆管管腔闭塞、静脉内血栓形成(如图 3),内皮细胞凝固性坏死、空泡变、脱落、肿胀等(如图 4)。其中 1 只家兔的射频穿刺点距其肝门组织约 1 cm,于射频热凝结束 1 d 后死亡,组织学检查示其门静脉分支内有血栓形成,肝动脉分支闭塞,胆管内皮肿胀。距穿刺点 1~2 cm 范围内的管腔结构损伤程度随着其内径的增大而减小,且胆管组织的损伤程度明显轻于血管组织,动脉的损伤程度明显轻于静脉。内径 $<100\ \mu\text{m}$ 的胆管组织表现为内皮细胞肿胀(如图 5),而内径 $>100\ \mu\text{m}$ 的胆管组织则无显著改变;内径 $<500\ \mu\text{m}$ 的静脉表现为程度不一的上皮细胞脱落、管壁部分破坏、血小板聚集或上皮细胞肿胀等,而内径 $>500\ \mu\text{m}$ 的静脉则无明显改变;内径 $<50\ \mu\text{m}$ 的动脉表现为管壁增厚、上皮肿胀,而内径 $>50\ \mu\text{m}$ 者无显著改变。

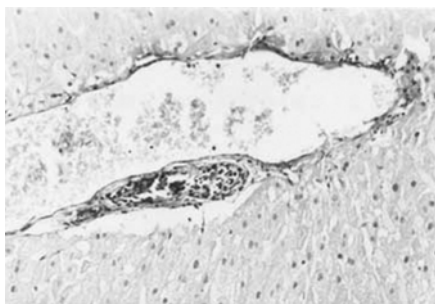


图 3 静脉内血栓形成(HE 染色, $\times 100$)

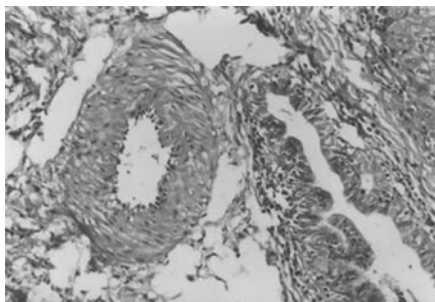


图 4 动、静脉内皮细胞可见空泡变、脱落及肿胀等(HE 染色, $\times 100$)

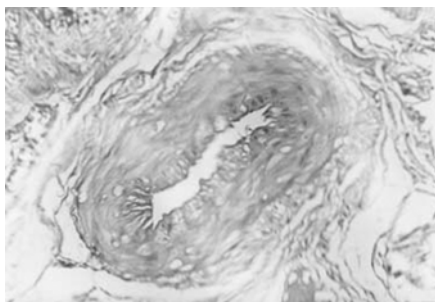


图 5 内径 $<100\ \mu\text{m}$ 胆管内皮细胞肿胀(HE 染色, $\times 100$)

四、肝细胞、胆管上皮细胞凋亡结果分析

距凝固坏死区外边缘 2.0 cm 范围内的肝细胞、胆

管上皮细胞凋亡指数均明显高于对照组相应部位细胞的凋亡指数,差异有统计学意义($P < 0.01$)。实验组动物的肝细胞凋亡指数高于同区域胆管上皮细胞的凋亡指数。距凝固坏死区外边缘 1.0 cm 范围内的肝细胞、胆管上皮细胞凋亡指数分别为 $(9.96 \pm 0.18)\%$ 和 $(6.11 \pm 0.36)\%$,其间差异有统计学意义($P < 0.01$)。随着离凝固坏死区外边缘距离的增加,肝细胞凋亡指数呈现逐渐降低趋势。

五、射频热凝对肝脏功能的影响

实验组动物经射频热凝治疗前、后的血清 GPT 变化详见表 1。表中数据显示,经射频热凝治疗后,血清 GPT 含量显著升高($P < 0.05$),但于术后 15 d 时又恢复至治疗前水平;家兔射频热凝治疗前、后其血清 T-BIL、D-BIL 水平均无显著改变($P > 0.05$),具体数据详见表 1。

表 1 实验组动物经射频热凝治疗前、后血清 GPT、T-BIL 及 D-BIL 的变化

检测指标	检测时间				
	术前	术后 1 d	术后 5 d	术后 10 d	术后 15 d
GPT(U/L)	47 ± 16	153 ± 23 *	169 ± 45 *	83 ± 21 *	54 ± 18
T-BIL($\mu\text{mol/L}$)	13.2 ± 3.6	15.1 ± 3.0	14.9 ± 2.5	13.7 ± 2.1	14.3 ± 2.8
D-BIL($\mu\text{mol/L}$)	6.9 ± 2.3	7.3 ± 1.9	7.5 ± 2.1	6.8 ± 2.0	7.3 ± 2.5

注:与术前比较, * $P < 0.05$

讨 论

射频热凝治疗是近年逐渐发展起来的一项新型肿瘤局部治疗技术,在针对肝癌不可切除患者的治疗中取得了良好疗效;但由于人体肝脏结构的复杂性(如具有肝动脉、门静脉、肝静脉、胆管四类管腔系统等),致使射频热凝治疗时诱发的副损伤不容忽视^[4-6],尤其是对血管、胆管类组织的热损伤(其中以胆管热损伤最为显著)^[7-9],可导致患者术后肝功能不良,甚至引发肝功能衰竭。因此需要对射频热凝治疗的热效应范围、对肝组织的损伤程度以及对肝内动、静脉及胆管系统的影响效应有全面的了解,才能正确、科学地指导临床应用。由于射频热凝治疗仪的热效应损伤半径受诸多因素影响,如治疗功率、肝脏质地、局部散热状况、电极数量、生物种属等,因此,选用动物进行射频热凝实验对指导临床具有重要参考价值。

一、冷循环射频热凝治疗仪的热效应损伤半径及其对临床的指导价值

通过本研究结果发现,该冷循环射频热凝治疗仪(单电极)对家兔肝脏组织的最大热效应损伤半径为 2.5 cm,这与临床相关研究结果一致。因此,临床上对于直径小于 3.0 cm 的肿瘤,可采用单电极单次治疗,以确保肿瘤治疗的彻底性。对于直径大于 3.0 cm 的肿瘤,则需采用集束电极或多点穿刺治疗,以扩大热效

应作用范围;同时由于射频热凝治疗的热效应具有“滞后性”,其热效应半径随术后时程增加而扩大,于术后 10~15 d 时达到最大,因此在临床应用中应注意此特点。在开腹应用射频热凝技术治疗患者时,应了解其热损伤范围要大于术中肉眼所见的大体形态范围,而术后进行影像学检查以了解疗效的最佳时机是术后 2 周左右。

二、冷循环射频热凝治疗仪的副损伤及安全措施

本研究结果表明,冷循环射频热凝治疗仪对正常肝细胞、血管及胆管组织均有不同程度的损伤效应。对其热效应耐受性由高至低依次为:胆管>动脉>静脉>肝细胞。距穿刺点 1 cm 以内区域的各种管腔结构均表现出不同程度的器质性病变;距穿刺点 1~2 cm 区域内的管腔组织损伤则随着内径的增大而减小,且多为功能性改变;距穿刺点 2 cm 以外区域则无明显改变。从理论上分析,射频热效应对管腔组织的副损伤程度与管腔内流量成负相关,管腔大者散热性能较强,因此内径越小者损伤越严重。但是流量小于血管的胆管组织损伤程度为何轻于血管,似难以解释,尚有待进一步研究。

本研究同时还发现,射频热效应的损伤范围不仅局限于凝固坏死区域内,凝固坏死区域外的肝细胞及胆管内皮细胞虽无明显形态学改变,但其凋亡指数却明显高于对照组,提示凋亡可能是较轻微热损伤的作用结果,而细胞坏死则是更加严重的损伤结果。细胞的存活取决于对热应激的敏感性,因此凋亡可作为判断细胞热敏性的重要指标之一^[10],即细胞凋亡明显的组织其热敏性较高,反之则热敏性较低。进一步研究后还发现,肝细胞的凋亡指数大于胆管上皮细胞,说明肝细胞的热敏性显著大于胆管上皮细胞;同时还证实凋亡参与了射频热效应诱发的肝细胞、胆管上皮细胞损伤过程,如距凝固坏死区外边缘 2 cm 以内区域的肝细胞、胆管上皮细胞均有不同程度的热损伤。

参考上述结果,在临床应用射频热凝治疗时,应注意射频穿刺点须距离较大管腔结构 2 cm 以上,避免 1 cm 以内,如实在必要时可距离 1~2 cm,但应严密观察患者术中、术后有无不良反应。

三、射频热凝治疗对肝脏功能的影响及其意义

本研究结果表明,实验家兔经射频热凝治疗后,其血清 GPT 水平明显升高,在治疗结束后 5 d 时达峰值,于 10~15 d 内逐渐恢复至治疗前水平。这可能与部分肝细胞坏死、破裂及肝酶释放等有关。而血清 T-

BIL、D-BIL 于治疗前、后无明显变化,说明实验家兔肝脏功能变化不大,提示射频热凝治疗是安全的,对肝脏功能的影响有限。因此,对于临床上因肝功能不良而无法行手术切除的肝癌患者,射频热凝治疗应是理想的选择之一。当然,患者术后的护肝治疗也是必需的,特别是前面提到的射频穿刺点距离较大管腔 1~2 cm 的患者,由于其热损伤较大,可能肝功能损伤亦较严重,因此必须进行有效的护肝治疗。

综上所述,本研究结果提示,射频热凝治疗肿瘤患者具有安全、快速、疗效确切等优点,但其临床应用需严格遵守一定的原则进行,如射频穿刺点须距离较大的管腔组织 2 cm 以上等。

参 考 文 献

- 1 Ruers TJ, Jong KP, Ijzermans JN. Radiofrequency for the treatment of liver tumours. *Dig Surg*, 2005, 22: 245-253.
- 2 Lencioni R, Della PC, Bartolozzi C. Percutaneous image-guided radiofrequency ablation in the therapeutic management of hepatocellular carcinoma. *Abdom Imaging*, 2005, 30: 401-408.
- 3 Xu HX, Lu MD, Xie XY, et al. Prognostic factors for long-term outcome after percutaneous thermal ablation for hepatocellular carcinoma: a survival analysis of 137 consecutive patients. *Clin Radiol*, 2005, 60: 1018-1025.
- 4 Frich L, Edwin B, Brabrand K, et al. Gastric perforation after percutaneous radiofrequency ablation of a colorectal liver metastasis in a patient with adhesions in the peritoneal cavity. *Am J Roentgenol*, 2005, 184: 120-122.
- 5 Kawasaki T, Kudo M, Chung H, et al. Hepatocellular carcinoma that ruptured during radiofrequency ablation therapy. *J Gastroenterol*, 2004, 39: 1015-1016.
- 6 Rhim H, Dodd GD, Chintapalli KN, et al. Radiofrequency thermal ablation of abdominal tumors: lessons learned from complications. *Radio-graph*, 2004, 24: 41-52.
- 7 Raman SS, Aziz D, Chang X, et al. Minimizing central bile duct injury during radiofrequency ablation: use of intraductal chilled saline perfusion-initial observations from a study in pigs. *Radiology*, 2004, 232: 154-159.
- 8 Marchal F, Elias D, Rauch P, et al. Biliary lesions during radiofrequency ablation in liver-study on the pig. *Eur Surg Res*, 2004, 36: 88-94.
- 9 Stippel DL, Bangard C, Kasper HU, et al. Experimental bile duct protection by intraductal cooling during radiofrequency ablation. *Br J Surg*, 2005, 92: 849-855.
- 10 Nakao K, Otsuki Y, Akao Y, et al. The synergistic effects of hyperthermia and anticancer drugs on induction of apoptosis. *Med Electron Microsc*, 2000, 33: 44-50.

(收稿日期: 2005-10-27)

(本文编辑: 易 浩)