

文章编号:1005-6947(2007)08-0770-04

· 基础研究 ·

射频消融联合亚砷酸治疗兔肝 VX2 肿瘤的实验研究

张盟辉¹, 王巧玲², 孔宪炳³, 宋瑞卿⁴, 甘兆红¹, 樊伟¹, 王辉¹

(1. 山东省济南市第四人民医院 普通外科, 山东 济南 250031; 2. 山东省济南市第二人民医院 外科, 山东 济南 250001; 3. 重庆医科大学附属第一医院 肝胆外科, 重庆 400016; 4. 山东省鄄城人民医院 外科, 山东 鄄城 274500)

摘要:目的 探讨射频消融联合亚砷酸局部治疗对兔肝 VX2 肿瘤的有效性和安全性,并探讨其机制。方法 建立新西兰兔肝 VX2 肿瘤模型 28 只,随机分为 4 组,每组 7 只,分别进行亚砷酸(亚砷酸组)、射频消融(射频组)、射频消融加亚砷酸(联合组)和生理盐水(对照组)治疗。于术前、术后 1, 3, 7d 和 14d 耳缘静脉抽血检查丙氨酸转氨酶(ALT),同时行超声学检查。治疗后第 14 天处死所有实验动物,通过免疫组织化学方法检测 VEGF,并分析其与肿瘤体积的相关性。结果 联合组治疗后仅第 1 天 ALT 与术前差异有显著性($P < 0.05$),第 3 天下降至接近术前水平;联合治疗能更好地抑制肿瘤生长;亚砷酸组、射频组及联合组肿瘤组织 VEGF 水平均低于对照组($P < 0.05$),射频组低于亚砷酸组($P < 0.05$),联合组低于其余 2 组,VEGF 表达强度与肿瘤体积呈显著正相关($r = 0.78, P < 0.01$)。结论 联合治疗能通过抑制肿瘤新生血管生成而抑制肿瘤生长,且对肝脏无明显损害。

[中国普通外科杂志,2007,16(8):770-773]

关键词: 肝肿瘤/治疗; 射频消融; 亚砷酸; 血管内皮生长因子; 疾病模型,动物

中图分类号:R 735.7 文献标识码:A

Experimental study of radiofrequency ablation combined with arsenious acid therapy on liver VX2 tumors in rabbits

ZHANG Meng-hui¹, WANG Qiao-ling², KONG Xian-bing³, SONG Rui-qing⁴, GAN Zhao-hong¹, FAN Wei¹, WANG Hui¹

(1. Department of General Surgery, the Fourth Municipal Hospital of Jinan, Jinan 250031, China; 2. Department of Surgery, the Second Municipal Hospital of Jinan, Jinan 250001, China; 3. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 4. Department of Surgery, Juancheng Peoples Hospital, Juancheng, Shandong 240100, China)

Abstract: Objective To evaluate the safety and efficacy of combining radiofrequency ablation (RFA) with arsenious acid (AA) locally to treat liver VX2 tumor in rabbits, and to explore its mechanism.

Methods Twenty-eight New Zealand White rabbits with implanted liver VX2 tumors were randomly divided into four groups: control group ($n = 7$), AA group ($n = 7$), RFA group ($n = 7$), and combination (RFA + AA) group ($n = 7$). ALT was measured before treatment and on the day 0, day 3, day 7 and day 14 after treatment, meanwhile ultrasonic (US) examination was performed. All rabbits were killed 14 days after treatment. Vascular endothelial growth factor (VEGF) was examined by immunohistochemistry, and the relationship of VEGF and gross tumor volume was analyzed.

Results Combination (RAF + AA) therapy caused little damage to hepatic function but had better inhibited tumor growth. The level of VEGF in AA, RFA and RAF + AA group was lower than that of the control group ($P < 0.05$), The level of VEGF in the RFA group were lower than the AA group ($P < 0.05$) while in the RAF + AA group it was the lowest.

Conclusions Combined (RAF + AA) therapy can inhibit VEGF expression which can inhibit tumor growth and with no significant liver damage.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(8): 770-773]

收稿日期:2007-01-05; 修订日期:2007-08-01。

作者简介:张盟辉,男,山东鄄城人,山东省济南市第四人民医院主治医师,主要从事原发性肝癌的治疗方面的研究。

通讯作者:张盟辉 E-mail:drzhmh@163.com

Key words: Liver Neoplasms/ther; Radiofrequency Ablation; Arsenious Acid; Vascular Endothelial Growth Factor; Disease Models, Animal

CLC number: R 735.7

Document code: A

射频消融(radiofrequency ablation, RFA)是治疗肝癌的一种新手段,疗效确切^[1]。临床研究发现,对直径大于5cm的恶性肿瘤治疗不彻底是RFA所面临的一大难题^[2-3]。笔者采用RFA联合亚砷酸局部治疗兔肝VX2肿瘤,观察联合治疗的有效性和安全性,并通过对新生血管形成的影响来探讨其机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

新西兰大白兔28只,雄性,兔龄3~5个月,体重2.5~3.0kg,由重庆医科大学实验动物中心提供。VX2肿瘤种兔,购于重庆医科大学超声研究所。亚砷酸注射液(10mL:10mg/支),哈尔滨伊达药业有限公司惠赠。LDRF-120S型多极射频治疗仪,系中国绵阳生产。生物显微镜,系日本Olympus生产。兔抗兔血管内皮生长因子(VEGF)多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。LOGIO9型超声仪系美国GE公司生产。

1.2 方 法

1.2.1 模型制作 采用组织块移植法^[4]。切取VX2肿瘤种兔生长旺盛的“鱼肉样”肿瘤组织块,剪成约1mm×1mm×1mm大小的组织块,置于RPMI 1640培养液中备用。实验动物术前12h内禁食不禁饮,实验时采用3%戊巴比妥钠按30mg/kg经兔耳缘静脉注射麻醉。上腹部用8%硫化钠脱毛。严格无菌操作。于剑突下1cm处取2~3cm长的正中切口,逐层入腹。暴露兔肝脏左叶靠近胆囊的较厚处,用显微外科直血管钳沿肝包膜下向肝实质中央插入约1cm,做成一直径为2~3mm的隧道。取备用的瘤组织块植入隧道底部,用无菌棉球轻压隧道表面及入口处至彻底止血,依次缝合切口。术毕肌注射青霉素10万U。

1.2.2 分组与处理 移植后2周超声测得直径约2.0~2.5cm的移植瘤视为移植成功。将荷瘤兔28只按随机数字表随机分为4组,即对照组(生理盐水组)、射频组、亚砷酸组和联合组(射频和亚砷酸组),每组7只。荷瘤兔均开腹直视下进行实验处理。射频治疗用动物用射频电极对肿瘤进行射频治疗,采用基础功率为20W,时间为4min。亚砷酸剂量依据治疗人急性早幼粒细胞白血病10mg/kg(体重),按照人与兔间体表面积折

算等效剂量比值计算出为0.6mg/kg,并稀释至总量为2.7mL;用5mL无菌注射器向移植瘤内注射。联合治疗时与射频治疗同时进行。空白对照组仅给生理盐水2.7mL瘤内注射,操作过程同亚砷酸组。

1.2.3 肝脏功能和超声检测 于治疗术前、术后1,3,7d和14d耳缘静脉抽血查ALT。同时行彩色超声检查,测量肿瘤的最小径(a1)与最大径(b1)。计算肿瘤体积及肿瘤体积抑制率。肿瘤体积= $a1 \times b1^2 / 2$ ^[5],肿瘤体积抑制率=(对照组平均体积-实验组体积)/对照组平均体积×100%。

1.2.4 免疫组织化学染色和结果判断标准 于治疗后第14天处死所有动物取标本,测量各组肿瘤的大小,并剖视大体标本,测量肿瘤的最小径(a2)与最大径(b2),并计算肿瘤体积及肿瘤体积抑制率。将动物肝标本用10%甲醛液固定,石蜡包埋,切成5μm厚的组织片。免疫组化染色按SABC说明书并参考二抗要求进行,用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。

观察镜下观察肿瘤细胞以胞浆出现棕黄色的颗粒为VEGF阳性细胞。高倍镜下取4个不同的视野,各记数100个细胞,按阳性细胞占所计数细胞的百分比计算:<5%为阴性(-);5%~15%为弱阳性(+);15%~50%为阳性(++);>50%为强阳性(+++)。

1.3 统计学处理

数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用SAS8.01统计软件分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。各组之间的两两比较采用SNK法分析($\alpha = 0.05$)。VEGF与肿瘤体积的关系用秩检验分析。

2 结 果

2.1 联合治疗的安全性

新西兰大白兔ALT正常值范围是30~110U/L。联合组ALT在术后第1天比术前明显升高,差异有显著性($P < 0.05$),但平均值在正常范围内;第3天下降,接近术前水平($P > 0.05$);第7天恢复至术前水平,第14天正常或稍低。射频组ALT变化趋势同联合组,各时相无显著性差异($P > 0.05$)。对照组和亚砷酸组治疗后ALT与术前无显著性差异($P > 0.05$)(表1)(图1)。

表1 各组治疗前后 ALT 值比较 (U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	治疗前(U/L)	治疗后(U/L)			
		第1天	第3天	第7天	第14天
对照组(n=7)	32.57±4.72	32.54±3.81	34.19±4.11	35.64±4.94	37.18±5.34
亚硝酸组(n=7)	32.79±4.08	34.23±4.14	34.15±5.31	33.62±4.83	33.18±4.49
射频组(n=7)	33.01±3.21	46.17±6.57 [†]	38.43±5.37	32.25±5.33	33.24±5.21
联合组(n=7)	32.83±3.47	49.63±7.15 [†]	46.32±6.20	35.21±5.26	32.53±4.37

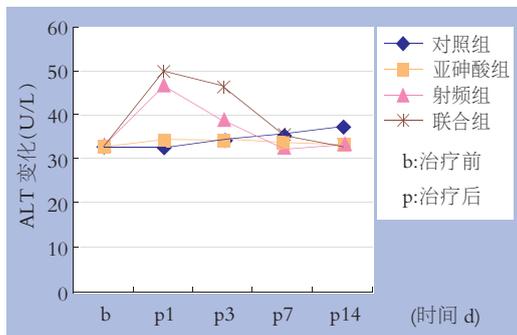
注:† 与治疗前比, $P < 0.05$ 

图1 各组治疗前后 ALT(U/L)变化趋势

2.2 各组兔肝 VX2 肿瘤的体积

二维超声所测的肿瘤体积显示,联合组和射频组治疗后肿瘤体积第1天稍微增大(表2)(图2),但与治疗前差别无显著性($P > 0.05$),然后逐渐减小;对照组肿瘤体积逐渐增大。治疗14d时直视所测联合组肿瘤体积水平小于其他各组,差别有显著性($P < 0.05$);射频组体积小于亚硝酸组,差异有显著性($P < 0.05$)(表3)。

表2 不同时相各组肿瘤体积($\text{cm}^3, \bar{x} \pm s$)

组别	治疗前($\bar{x} \pm s$)	治疗后($\bar{x} \pm s$)			
		第1天	第3天	第7天	第14天
对照组(n=7)	3.20±0.15	3.31±0.17	3.86±0.24	4.59±0.33	6.68±0.42
亚硝酸组(n=7)	3.32±0.13	3.43±0.14	3.37±0.16	3.61±0.25	4.01±0.31
射频组(n=7)	3.26±0.12	3.38±0.16	3.18±0.09	2.85±0.08	1.93±0.06 ²⁾
联合组(n=7)	3.30±0.14	3.41±0.15	2.74±0.11	2.32±0.07	1.25±0.08 ¹⁾

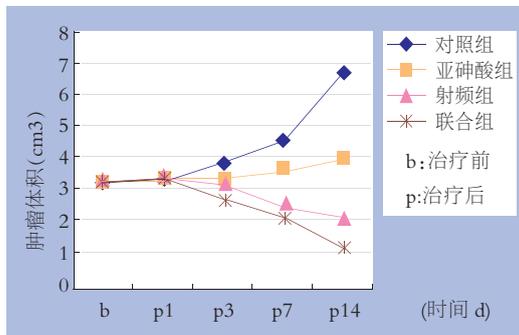
注:1)与同时间其他组比较, $P < 0.05$;2)与同时间射频组比较, $P < 0.05$ 

图2 不同时期各组肿瘤体积的变化趋势

表3 治疗后14d时实测各组肝移植瘤平均体积和肿瘤体积抑制率

分组	瘤体积($\text{cm}^3, \bar{x} \pm s$)	肿瘤体积抑制率(%)
对照组	7.18±2.21	0 ^{1),2)}
亚硝酸组	4.28±1.26	48.3 ^{1),2)}
射频组	1.67±0.35	75.9 ¹⁾
联合组	1.02±0.13	85.8

注:1)与联合组比较, $P < 0.05$;2)与射频组比较, $P < 0.05$

2.3 各组肿瘤组织中 VEGF 蛋白表达水平的比较

治疗第14天时各治疗组肿瘤组织 VEGF 表达水平均低于对照组(均 $P < 0.05$);以联合组最低($P < 0.05$);射频组低于亚硝酸组($P < 0.05$)(表4)(图3-4)。

表4 治疗第14天各组肝移植瘤组织中 VEGF 蛋白表达

组别	VEGF 表达程度				性率(%)
	(-)	(+)	(++)	(+++)	
对照组	0	1	2	4 ^{1),2)}	100
亚硝酸组	2	3	2	0 ^{1),2)}	71.4
射频组	3	2	2	0 ¹⁾	57.1
联合组	5	1	1	-	28.6

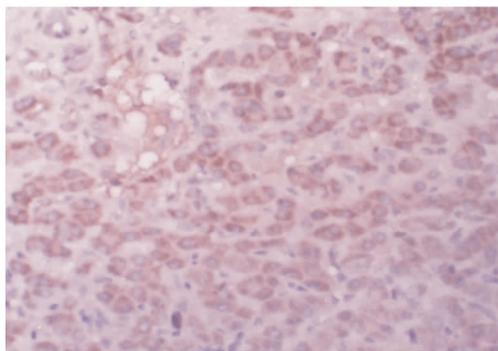


图3 对照组 VEGF 免疫组化染色(SABC × 200)

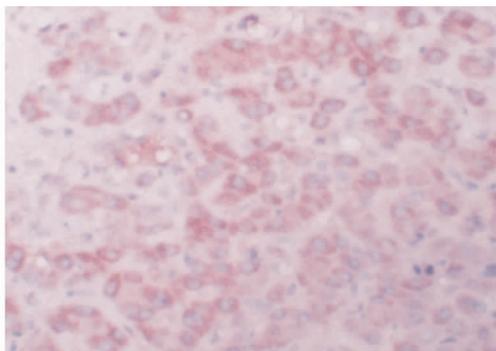


图4 联合组 VEGF 免疫组化染色(SABC × 200)

2.4 VEGF 与肿瘤体积的关系

经秩检验显示 VEGF 表达与肿瘤体积呈重度正相关 ($r = 0.78, P < 0.05$) (图 5)。

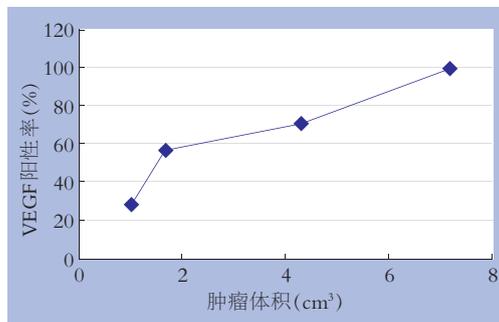


图 5 VEGF 表达与肿瘤体积关系

3 讨 论

本实验结果表明,联合治疗仅造成兔肝功能的一过性损害,是安全的。此结果与范林军等^[6]的报道一致。然而,联合治疗却能缩小肿瘤的体积,治疗第 14 天时与射频消融组、亚砷酸组和对照组相比差异有显著性 ($P < 0.05$)。且发现联合治疗组病灶完全凝固性坏死或肿瘤体积明显减小,超声发现肿瘤治疗灶中心和周边没有血流信号或明显减少,频谱多普勒未探及血流频谱;而单纯射频消融治疗后肿瘤中心和周边有少量血流信号。说明联合治疗具有明显协同增强作用,可能机理是亚砷酸离解增加局部离子量,从而增加射频电流使产热增加。溶液可使热传导加快而均匀,减少射频针的炭化^[7],同时亚砷酸导致肿瘤细胞对热的敏感性增加,而增强射频的作用从而增大治疗范围。射频消融产生局部高温,使癌细胞产生凝固性坏死或损伤,受损的癌细胞对亚砷酸敏感性增加,耐受性降低,从而增加亚砷酸的治疗作用。

VEGF 可促进内皮细胞分裂增殖、血管生成,并使血管通透性升高,血浆外渗,为内皮细胞移动提供暂时的基质成分^[8],从而促进肿瘤的生长与转移。VEGF 在正常组织很少表达,而本实验结果显示,对照组 VEGF 表达率为 100%。在治疗 14d 时联合治疗组、射频消融组和亚砷酸组均较对照组明显降低 ($P < 0.05$)。且 VEGF 与肿

瘤体积呈正相关。因为亚砷酸不仅能抑制 VEGF 的基础分泌,还能抑制表皮生长因子等作用后的诱导分泌^[9]。亚砷酸主要成分三氧化二砷,有显著抑制内皮细胞增生作用和鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM) 血管形成的作用^[10]。单纯射频亦可明显抑制肿瘤组织 VEGF 蛋白的表达;其机制可能是热消融导致肿瘤细胞坏死或失活,也可能是坏死组织引起的免疫反应抑制了肿瘤 VEGF 蛋白的表达。联合治疗后肿瘤组织 VEGF 蛋白的表达水平明显低于对照组与单纯射频、亚砷酸组。说明联合治疗通过热消融与亚砷酸的协同作用能更强地抑制肿瘤 VEGF 蛋白的表达,从而抑制肿瘤血管生成,破坏了恶性肿瘤的生长、浸润和转移必需的条件,提高了肿瘤的治疗效果。

参考文献:

- [1] 梁惠宏,陈敏山,王旭东,等. 经皮射频消融治疗不同类型肝癌的疗效分析[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(12): 756 - 757.
- [2] Lim H, Goldberg SN, Dodd GD, *et al.* Essential techniques for successful radiofrequency thermal ablation of malignant hepatic tumors [J]. *RadioGraphics*, 2001, 21(9): S17 - S39.
- [3] Wong SL, Edwards MJ, Chao C, *et al.* Radiofrequency ablation for unresectable hepatic tumors [J]. *Am J Surg*, 2001, 182(6): 552 - 557.
- [4] 郭卫平,刘燕,王执民,等. 兔肝 VX2 移植瘤改良模型的建立[J]. 中国医学影像技术, 2002, 18(3): 397 - 399.
- [5] Garsson G, Gullberg B, Hafstrom L. Estimation of liver tumor volume using different formulas - an experimental study in rats [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1983, 105(1): 20.
- [6] 范林军,何振平,马宽生. 兔肝 VX2 肿瘤移植模型的复制及其意义[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2004, 11(1): 45 - 48.
- [7] 黄健清,刘海鹰,余南荣,等. 射频联合多齿针无水酒精注射的实验研究[J]. 中国普通外科杂志, 2006, 15(7): 529 - 532.
- [8] Brown LF, Lanir N, McDonagh J, *et al.* Fibroblast migration in fibrin gel matrices [J]. *Am J Pathol*, 1993, 142(1): 273 - 283.
- [9] 李江涛,区庆嘉,魏 箐. 三氧化二砷诱导肝癌细胞凋亡的初步研究[J]. 癌症, 2000, 19(12): 1087.
- [10] 华海清,秦叔逵,王锦鸿. 三氧化二砷抗肿瘤血管形成研究[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 15, 12(1): 27 - 31.