

大鼠种植型肝癌无水乙醇瘤内注射的实验研究

• 实验研究 •

邵成伟 王培军 田建明 张火俊 左长京 郝西彦 任方远 袁庆中 李树平

【摘要】 目的:探讨无水乙醇瘤内注射(PEI)疗法对大鼠种植型肝癌的治疗效果。**方法:**制作大鼠肝癌动物模型,应用 PEI 疗法进行治疗,1 周后用影像学 and 病理检查观察肿瘤大小、坏死、凋亡变化,与对照组比较,并观察生存期的长短。**结果:**PEI 治疗前,大鼠肝肿瘤平均体积为 $(100 \pm 6) \text{ mm}^3$,乙醇治疗后 1 周,大鼠肝肿瘤平均体积为 $(120 \pm 10) \text{ mm}^3$,而荷瘤对照组肝肿瘤平均体积为 $(190 \pm 11) \text{ mm}^3$;治疗组肿瘤生长率为 20%,而荷瘤对照组肝肿瘤生长率为 90% ($P < 0.05$)。治疗组病理切片光镜下肿瘤明显凝固性坏死,并可诱发细胞凋亡;生存期明显延长。**结论:**PEI 可明显抑制肿瘤生长,促进肿瘤凝固性坏死,诱发细胞凋亡,延长大鼠生存期。

【关键词】 大鼠;肝癌;乙醇;实验研究

【中图分类号】 R815; R814.42; R445.2; R735.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1009-0313(2003)06-0387-03

Experimental study of percutaneous ethanol injection (PEI) on rats with implanted liver tumor SHAO Chengwei, WANG Peijun, TIAN Jianming, et al. Department of Radiology, Second Military Medical University Changhai Hospital, Shanghai 200433

【Abstract】 Objective: To study the effects of percutaneous ethanol injection (PEI) on rats with implanted liver tumor. **Methods:** Direct cancerous ascites injection method was used to make rats liver tumor model, then the liver tumor were treated with PEI. Tumor size, necrosis and apoptosis were observed after one week by imaging and pathology method. The results were compared with those of control group. The survival times were observed also. **Results:** Before PEI, rats liver tumor volume were $(100 \pm 6) \text{ mm}^3$. One week after PEI, tumor volume in PEI group $(120 \pm 10) \text{ mm}^3$ were significantly smaller than those of control group $(190 \pm 11) \text{ mm}^3$. Tumor growth rate in PEI group (20%) were obviously lower than those of control group (90%, $P < 0.05$). Coagulation necrosis, apoptosis and survival time in PEI group increased significantly than those of control group. **Conclusion:** The growth of rats liver tumor is inhibited significantly by PEI, and the survival time will be longer.

【Key words】 Rats; Liver neoplasms; Ethanol; Experimental study

肝癌早期发现手术切除是目前公认较彻底的治疗方法。然而大多数病人发现肝癌时已丧失了手术切除机会,因此非手术疗法成为目前研究热点。本文进行大鼠种植型肝癌无水乙醇瘤内注射(percutaneous ethanol injection, PEI)的相关实验研究,观察 PEI 疗法对大鼠种植型肝癌的疗效及进一步探讨无水乙醇治疗肝癌的机制。

材料与方法

1. 实验动物及器材

普通 SD 雄性健康成年大鼠 50 只,体重 $(200 \pm 20) \text{ g}$ 。断奶 Wistar 大鼠,体重 60~80g,供瘤株传代用,每周传代一次。所有实验动物均由中科院上海实验动物中心提供。常用手术器材:无水乙醇 20ml, CT、MR 扫描仪各 1 台。

2. 荷瘤大鼠模型制作

Walker-256 瘤株由上海医学院提供,将冻存的瘤株复苏,体外培养至细胞数 $(2 \sim 6) \times 10^6/\text{ml}$ 时,取 1ml 注入 1 只大鼠腹腔内,7d 后抽取血性腹水 1ml,再传至另外 1 只大鼠腹腔,1 周后血性腹水生成,肿瘤细胞活性稳定便可使用。本文采用经浓缩后癌性腹水微量直接肝叶内注射法^[1],接种 7d 后大鼠肿瘤直径可达 6~8mm,应用此方法制作大鼠肝癌模型成功率接近 100%。

3. 实验动物分组

瘤株接种 7d 后,根据 CT 扫描结果,选取肝肿瘤直径 6~8mm 荷瘤大鼠 40 只,随机分为荷瘤对照组(未予任何治疗)和无水乙醇瘤内注射组,每组分别为 20 只。

4. 实验治疗方法

PEI 组大鼠均在无菌条件下开腹,暴露肝肿瘤,直视下用 1ml 注射器抽取无水乙醇,采用瘤内多点注射方式(3 点或更多),充分保证肿瘤被乙醇浸泡。

5. 观察内容

影像学改变:Walker-256 瘤株接种后第 7d,所有大鼠均行 CT 扫描,观察影像学特点,并测量肝肿瘤的长、宽径,按公式:

$$\text{肿瘤体积} = \text{最大径} \times \text{最小径}^2 / 2$$

计算肝肿瘤体积。随后治疗组予以相应治疗,治疗后 1 周行 MRI 检查,观察 PEI 治疗后肝肿瘤影像学特征变化并测量肿瘤体积,比较治疗组与对照组肝肿瘤平均体积的差异,计算肿瘤生长率。

病理学变化:治疗前处死 5 只荷瘤大鼠,切取荷瘤肝组织送病理,HE 染色和 MG-P-MY 组合染色,行光镜检查,观察其病理学特征。PEI 治疗后 1 周,治疗组处死 5 只大鼠,送病理检查,观察 PEI 治疗后肿瘤组织病理学改变。

生存期观察:所有剩余大鼠均观察它们的生存时间,并进行生存期的比较。

6. 统计学处理

* 国家自然科学基金资助课题(30070233)

作者单位:200433 上海,第二军医大学长海医院放射科
作者简介:邵成伟(1974-),男,安徽人,博士,主要从事肿瘤的影像诊断及介入治疗。

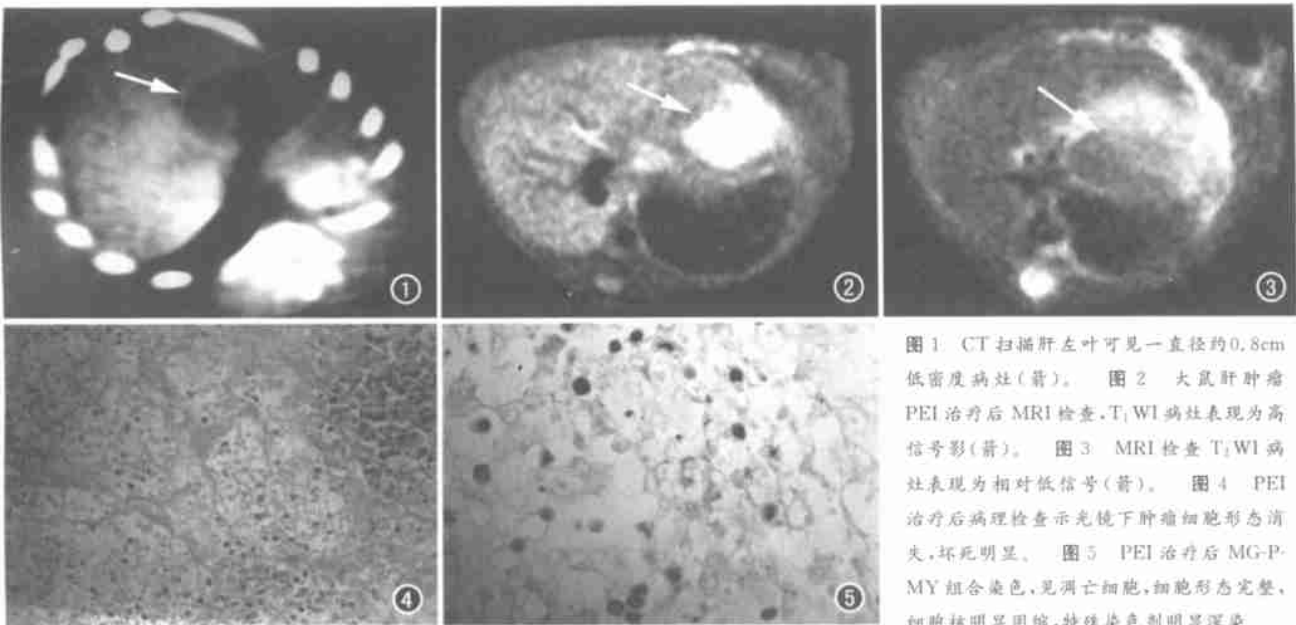


图1 CT扫描肝左叶可见一直径约0.8cm低密度病灶(箭)。图2 大鼠肝肿瘤PEI治疗后MRI检查,T₁WI病灶表现为高信号影(箭)。图3 MRI检查T₂WI病灶表现为相对低信号(箭)。图4 PEI治疗后病理检查示光镜下肿瘤细胞形态消失,坏死明显。图5 PEI治疗后MG-P-MY组合染色,见凋亡细胞,细胞形态完整,细胞核明显固缩,特殊染色剂明显深染。

所有数据均采用 SAS 6.02 统计软件进行处理, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

较则有显著改善,平均生存期(32±2)d($P < 0.05$)。

结 果

讨 论

1. 影像学观察结果

治疗前,PEI组与对照组大鼠CT平扫,各组肝肿瘤大小之间差异无显著性意义,肝癌灶均表现为略低密度影(图1);PEI治疗后1周,无水乙醇瘤内注射组大鼠肝肿瘤体积小5只,体积保持不变8只,有增大表现2只,PEI组大鼠肝肿瘤MRI检查于T₁WI表现为高信号影,T₂WI表现为相对低信号(图2、3),而荷瘤对照组大鼠肝肿瘤体积均明显增大,PEI组与对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。PEI治疗后2周随访,有5只大鼠出现肿瘤增大表现,但与对照组比较,肿瘤增大速度明显减慢。

无水乙醇瘤内注射为肝癌非手术疗法中较为广泛采用的一种^[2,3]。PEI治疗肝癌的机制是无水乙醇注入肿瘤内部后,通过细胞脱水及蛋白变性等过程,促使肿瘤组织凝固性坏死,从而达到杀灭肿瘤细胞,抑制肿瘤的生长和转移的作用。本实验发现,直视下无水乙醇注入大鼠肝肿瘤后,原呈乳白色鱼肉样肿瘤组织随着无水乙醇的注入、弥散,迅速发生变化,呈乳黄色样,这是由于无水乙醇能够迅速促使肿瘤组织发生凝固性坏死,肿瘤组织生物学特性发生改变。病理检查光镜下见肿瘤细胞形态学表现消失,细胞崩解,呈无定形结构,并见细胞核碎片、固缩表现。另外我们采用MG-P-MY组合染色法^[4]发现大鼠肝肿瘤细胞在治疗前仅能见到少量凋亡细胞,镜下表现为细胞核明显固缩,特殊染色剂明显深染。PEI治疗后,每个高倍镜视野内可见多个凋亡细胞,这提示PEI治疗除明显促进肿瘤组织凝固性坏死,还具有诱发肿瘤细胞凋亡的作用。细胞凋亡为细胞的程序性死亡,存在着严格的调控机制。PEI治疗后,局部坏死组织、变性蛋白质及乙醇本身等均可能诱发细胞凋亡,凋亡的启动对于肿瘤细胞的杀灭具有积极的意义,PEI诱发凋亡的详细机制尚有待进一步深入研究。

表1 PEI治疗前后与荷瘤对照组肿瘤体积变化比较

	例数	肿瘤体积(mm ³)		生长率
		治疗前	治疗后	
荷瘤对照组	15	100±6	190±11	90%
PEI治疗组	15	100±6	120±10	20%

注:PEI治疗后治疗组与荷瘤对照组肿瘤体积比较 $P < 0.05$

2. 病理检查结果

治疗前肝肿瘤切片,HE染色、光镜下均见明显肿瘤细胞染色,核大、深染,坏死不明显,肿瘤周边少许炎性细胞浸润;PEI治疗后治疗区可见大片凝固性坏死,肿瘤细胞形态消失,并见细胞核碎片固缩表现(图4)。采用甲基绿、派洛宁G和马体黄S组合染色法,治疗前肿瘤组织可见少数凋亡细胞,PEI治疗后凋亡细胞明显增多(图5)。

3. 生存期比较结果

荷瘤对照组大鼠随着时间延长,大鼠毛发蓬松,进食量少,精神萎靡,活力明显减低,于瘤株接种18d起开始死亡,平均生存期(20±2)d;而PEI治疗组大鼠治疗后精神状态与对照组比

由于乙醇促使组织发生凝固性坏死,CT平扫时凝固性坏死与肝肿瘤组织以及残存瘤组织均表现为略低密度灶,必须依靠碘对比剂来进行鉴别,通过血流动力学特征来识别无强化的低密度凝固性坏死区及动脉期强化的残存癌灶。必须做好高质量的动态增强扫描或螺旋CT多期扫描,依赖“快进快出”的动脉早期强化表现来判断。MRI自旋回波序列T₂WI对评价肿瘤凝固性坏死情况较有价值,凝固性坏死在MRI中可引起T₂时间缩短,在T₂WI表现为低信号,这是由于与正常肝组织相比,凝固性坏死的瘤组织自由水含量减低,而残存癌灶在T₂WI仍呈相对高信号。因此,无水乙醇瘤内注射后评价其疗效时,

采用 MRI 较为直观^[5]。本实验结果显示治疗组大鼠肝肿瘤行 PEI 1 周后 MRI 检查于 T₁WI 表现为高信号影, T₂WI 表现为相对低信号, 影像学检查结果与人肝癌 PEI 后影像学结果相仿。实验中发现, 无水乙醇瘤内注射时必须慢, 推注时用力要轻, 否则无水乙醇很容易沿针道返流, 一方面损伤周边组织器官, 另一方面无法保证肿瘤被乙醇完全而充分浸泡, 从而减低了疗效。

虽然研究结果表明, 大鼠肝癌无水乙醇瘤内直接注射治疗后肿瘤凝固性坏死明显。但实验发现, 随着时间延长, 治疗 2 周后大鼠肝肿瘤仍有 5 只重新开始生长, 虽然与对照组比较, 肿瘤增长速度明显减慢。我们分析认为, 由于肿瘤内可能存在纤维分隔, 阻止了无水乙醇的充分弥散, 必然造成活性癌组织残存, 肿瘤重新生长。另外, 虽然治疗时采用了多点注射方式, 但仍很难保证所有肿瘤组织的完全彻底坏死, 尤其在肿瘤周边, PEI 治疗未能充分地杀灭肿瘤细胞, 而治疗干预往往会更加刺激肿瘤生长的作用。病理组织切片表明肿瘤细胞大量增殖, 主要表现在肿瘤边缘, 中心可见大片凝固性坏死表现。因此实验结果提示对于肝肿瘤的治疗必须定期随访, 采用重复治疗,

或者结合其它非手术治疗方法, 如 TACE、电化学、射频治疗等, 目前普遍认为采用综合治疗效果较好^[6]。

参考文献

- 邵成伟, 王培军, 田建明, 等. 直接注射法制作大鼠肝癌模型[J]. 中国医学影像技术, 2002, 18(8): 731-732.
- Huo TI, Huang YH, Wu JC, et al. Survival benefit of cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma treated by percutaneous ethanol injection as a salvage therapy[J]. Scand J Gastroenterol, 2002, 37(3): 350-355.
- Livraghi T. Treatment of hepatocellular carcinoma by interventional methods[J]. Eur Radiol, 2001, 11(11): 2207-2219.
- 龚志锦, 詹容洲, 郑建明, 等. MG-PMY 显示乳腺肿瘤细胞凋亡的组化染色法[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1997, 13(Suppl): 6-7.
- 郭俊渊. 现代腹部影像诊断学[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 611.
- Kanada K, Kitamoto M, Aikata H, et al. Combination of transcatheter arterial chemoembolization using cisplatin-lipiodol suspension and percutaneous ethanol injection for treatment of advanced small hepatocellular carcinoma[J]. Am J Surg, 2002, 184(3): 284-290.

(2003-01-14 收稿)

氮氧化合物中毒一例

• 病例报道 •

向红 牟方红 罗江平 汪明全

【中图分类号】R814.41; R595.1; R563.1 【文献标识码】D 【文章编号】1000-0313(2003)06-0389-01

病例资料 患者, 男, 36 岁, 某化工厂工人。因抢救事故时吸入泄漏的一氧化氮、二氧化氮等氮氧化合物气体后, 感头昏、乏力、胸闷、咽部疼痛和咳嗽。当时未作任何治疗, 在家自行服用感冒药(具体不详)后病情无好转, 上述症状加重, 并出现咳嗽, 初时为白色泡沫痰, 后呈淡黄色粘液痰, 次日出现痰中带血丝, 被急送当地县医院诊治, 病情无明显好转。遂转入我院, 门诊以“氮氧化合物中毒, 吸入性肺炎”收入。查体: 生命体征平稳, 神清, 咽部稍充血, 双肺呼吸音粗糙, 可闻及少许中、小湿啰音, 无哮鸣音, 上腹部压痛, 无反跳痛和肌紧张。实验室检查: 白细胞总数 $9.9 \times 10^9/L$, 中性粒细胞 92.6%。

X 线检查: 入院时床旁胸片示双肺中下部纹理增多、模糊, 并可见片絮状影, 弥漫分布, 密度浅淡, 境界欠清(图 1)。给予抗感染、大剂量维生素 C、激素、祛痰、平喘、制酸及调节水电解质平衡等对症支持治疗, 5d 后复查胸片, 仅见双肺纹理增多, 较模糊, 双肺中下部片絮状影已基本吸收消散(图 2)。

讨论 氮氧化合物(主要为一氧化氮和二氧化氮)吸入后, 导致呼吸道炎症、支气管痉挛、肺泡上皮细胞和毛细血管内皮细胞损伤, 从而形成间质性和肺泡性肺水肿。其肺部的 X 线改变主要取决于吸入量、浓度及作用时间。轻度中毒以气管、支气管损伤为主, 临床主要呈支气管炎或支气管周围炎表现, 可无异常 X 线征象, 或仅示肺纹理增多、紊乱。重度中毒则以肺



图 1 双肺中下部可见片絮状影, 弥漫分布, 密度浅淡, 境界欠清。图 2 5d 后复查胸片, 双肺中下部片絮状影已基本吸收消散。

部损害为主, 表现为肺炎, 间质性和肺泡性肺水肿, 呈弥漫分布的斑片状、云絮状阴影, 密度浅淡均匀, 动态变化快, 经对症治疗后, 可于短期内吸收。本例病史明确, X 线表现典型, 早期诊断、及时治疗有利于疾病的康复。

参考文献

- 李谷龙. 急性炮烟中毒肺部 X 线表现[J]. 实用放射学杂志, 2000, 16(3): 186-187.
- 王安潮. 纤维支气管镜检查对急性氮中毒的诊断意义[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1997, 15(2): 86-88.

(2002-10-22 收稿 2002-12-13 修回)

作者单位: 404000 重庆, 三峡中心医院放射科(向红、罗江平、汪明全), 呼吸科(牟方红)
作者简介: 向红(1967~), 男, 重庆万州人, 主治医师, 从事影像诊断工作。