文章编号:1000-5404(2005)03-0223-04

论著

腹腔温热灌注化疗的安全性实验研究

付 涛,刘宝华 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨腹腔温热灌注化疗的安全性和可行性。**方法** 将24只新西兰大白兔随机分成4组,每组6只。A组(腹腔温热灌注化疗组),B组(腹腔温热灌注组),C组(腹腔常温灌注化疗组),D组(单纯手术组)。观察术中生命体征及术后血常规、肝功、肾功变化、腹腔粘连情况以及肝脏、肾脏、脾脏、吻合口组织的病理学改变。测定A、D组吻合口破裂压。**结果** A、B组兔呼吸、脉搏、动脉血压在灌注过程中有增快和升高,但均未超出正常范围。白细胞及红细胞的变化各组间并无显著差异($P>0.05$),A组血小板有轻度减少,并与其余各组相差显著($P<0.05$)。尿素氮变化仅C组与其余各组相差显著($P<0.05$),有轻度增高,而肌酐变化各组间无明显差异($P>0.05$)。A、B、C组腹腔粘连的程度较D组为轻。A、D组吻合口破裂压无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 腹腔温热灌注化疗不会对兔造成严重影响,是安全和可行的。

关键词: 丝裂霉素;热疗;化疗
中图法分类号: R-332; R452; R459.4 **文献标识码:** A

Experimental study of reliability and feasibility of intraperitoneal hyperthermic chemotherapy

FU Tao, LIU Bao-hua (Department of General Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To evaluate the safety of intraperitoneal hyperthermic chemotherapy. **Methods** Twenty four New Zealand rabbits were randomly divided into four groups: group A (intraperitoneal hyperthermic chemotherapy group), group B (intraperitoneal hyperthermic perfusion group), group C (intraperitoneal normothermic chemotherapy group), and group D (operation group). Vital signs of the rabbits were observed during the operations, and blood routine, liver function, and renal function of the rabbits were measured postoperatively. Intraperitoneal adherence and pathologic changes of the livers, kidneys, spleens, and tissues of stoma were observed. Bursting pressure of the stomas was measured in groups A and D. **Results** The breath, pulse, and arterial blood pressure increased in rabbits in groups A and B, but all were in normal ranges. There was no significant difference in changes of WBC and RBC between the four groups ($P>0.05$). Platelet decreased significantly in group A ($P<0.05$), and BUN increased significantly in group C ($P<0.05$). Intraperitoneal adherence was more obvious in group D. There was no significant difference in bursting pressure of stomas between groups A and D. **Conclusion** Intraperitoneal hyperthermic chemotherapy, resulting in no harm to rabbits, is safe and feasible.

Key words: Mito mycinC; hyperthermia; chemotherapy

1980年Spratt等[1]第1次应用腹腔温热灌注化疗(intraperitoneal hyperthermic chemotherapy, IHCP)成功治疗了1例腹膜假粘液瘤。近年来,IHCP又备受关注,并在世界各地广泛应用,取得了令人满意的疗效[2-5]。由于该方法利用高热及化疗药物的综合作用杀伤肿瘤细胞,是否会影响到腹腔脏器功能、吻合口愈合、血液等,一直是医师们考虑的焦点问题。本实验旨在探讨IHCP的安全性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康新西兰大白兔,雌雄各半,共24只,体质量2.5~4.5 kg,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.2 实验用品

非循环式腹腔温热灌注仪由第三军医大学大坪医院野战

作者简介:付 涛(1975-),男,湖南省湘乡市人,硕士,主治医师,主要从事胃肠肿瘤临床方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68757248

收稿日期:2004-09-20;修回日期:2004-12-06

外科研究所第四研究室制作。丝裂霉素 C(Mitomycin C, MMC)由浙江海正药业股份有限公司生产,浙卫药准字(1996)第192101号,2 mg/瓶。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组 将24只动物随机均分为4组,每组6只。A组:腹腔温热灌注化疗组;B组:腹腔温热灌注组;C组:腹腔常温灌注化疗组;D组:单纯手术组。

1.3.2 手术模型 所有动物予戊巴比妥钠 40 mg/kg 静脉注射麻醉,距肛缘 20 cm 切除一段长约 5 cm 的结肠,4-0 丝线全层间断缝合。

1.3.3 MMC 用量计算 计算 60 kg 人体表面积为 $S = K \times W^{2/3} = 11 \times 60^{2/3} \div 100 \approx 1.686\ m^2$,而 3 kg 兔体表面积为 $S = K \times W^{2/3} = 9.8 \times 3^{2/3} \div 100 \approx 0.204\ m^2$。根据 Koga 等[6]报道的非循环式腹腔温热灌注化疗中 MMC 总量可用至 64~100 mg,取最大值 100 mg,MMC 用量为 59.31 mg/m^2。计算兔 MMC 用量 = 0.204 × 100 ÷ 1.686 ≈ 12 mg。

1.3.4 灌注方法 除 D 组外,灌注前在膈下置入液管 1 根,自切口上端穿出固定,在盆底左右侧各置出液管 1 根,分别自左右下腹另行戳孔引出固定,逐层关腹。出入液管连接非循环式腹腔温热灌注仪,持续灌注 1 h。A 组:腹腔内予(42±0.5)℃生理盐水2 000 ml(含 MMC 12 mg)灌注;B 组:腹腔内予(42±0.5)℃ 生理盐水 2 000 ml 灌注;C 组:腹腔内予(37±0.5)℃生理盐水2 000 ml 灌注。A、B 两组入、出液温度分别控制在 43~44 ℃和 41~42 ℃,这样腹腔温度就维持在(42±0.5)℃,C 组入、出液温度分别控制在 38~39 ℃和 36~37 ℃,这样腹腔温度就维持在(37±0.5)℃。灌注结束后拔管,留置 1 根出液管作为引流管。

1.3.5 观察指标 ①术中生命体征:术中监测各组兔呼吸、脉搏、动脉血压、肛温;②血常规、肝功、肾功生化:术前 1 d 和术后第 1、3、5、7 天耳缘静脉抽血测定血常规、肝功、肾功生化;③吻合口破裂压:术后第 7 天处死 A、D 组实验兔。切取以吻合口为中心约 5 cm 的肠管(不分离周围粘连组织),于离体后 10 min 内测定。肠管离体后轻柔挤出粪团,生理盐水冲洗,两断端夹闭,在肠管侧壁作 2 个荷包,分别插入注水管和压力计管,收紧荷包并打结。将肠管置入盛有生理盐水的烧杯中,以2 mmHg/s 的速度向肠腔内注入空气,以烧杯中出现气泡时(即肠管破裂时)的压力为吻合口破裂压[7]。

1.4 病理组织学观察

术后第 7 天处死所有实验兔。观察腹腔粘连情况,切除肝脏、肾脏、脾脏、腹膜、吻合口组织以 10% 甲醛液固定,石蜡包埋、均片、HE 染色,光镜下观察。

1.5 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 术中生命体征的变化

A、B 组兔呼吸、脉搏、动脉血压在灌注过程中有升高,但均未超出正常范围;C、D 组无明显变化。A、B 组兔术前肛温为 37.5~38.5 ℃,麻醉后降至 35.5~36.5 ℃,灌注过程中肛温波动在 36~37 ℃之间。C、D 组肛温术中无明显变化。

2.2 血常规、肝功、肾功生化

术前 1 d 和术后第 1、3、5、7 天测定的各组血常规、肝功、肾功生化主要指标见表 1。

表 1 各组各时点各指标变化

Tab 1 Changes of indexes at different time points in each group

Group	Time (d)	WBC ($\times 10^9$/L)	RBC ($\times 10^9$/L)	PLT ($\times 10^9$/L)	Albumin (g/L)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	BUN (mmol/L)	Cr (μmol/L)
A	−1▲	8.47±1.80	5.47±0.25	223±83	25.55±3.43	82.90±45.05	75.87±18.95	6.52±1.33	82.87±13.66
	1	11.25±2.63	5.15±0.31	249±70	22.60±2.04	61.92±28.39	70.18±24.06	6.13±0.58	98.67±16.94
	3	11.43±1.39	5.16±0.37	348±117	20.83±3.76	29.27±16.09	45.77±14.54	5.17±1.00	85.67±13.03
	5	9.33±3.10	4.59±0.72	226±78	17.77±4.45	43.82±17.50	35.20±6.02	6.33±0.95	96.83±10.82
	7	7.52±1.62	4.34±0.53	186±60	15.92±2.33	28.67±5.24	28.67±5.24	4.67±1.18	81.00±14.25
B	−1	8.07±1.65	5.33±0.46	272±84*	23.55±2.37*	48.25±22.44	45.27±9.68	5.42±0.98#	88.98±8.38
	1	9.53±1.57	4.99±0.57	296±90*	24.50±2.17*	49.33±17.84	49.87±11.18	6.53±1.17#	83.17±7.94
	3	9.45±2.29	4.83±0.62	403±110*	24.67±2.07*	39.70±20.68	41.83±8.91	5.95±1.17#	79.75±11.54
	5	9.92±1.76	4.79±0.74	438±141*	21.23±1.42*	32.83±16.89	36.10±9.43	4.91±1.04#	77.24±17.12
	7	9.35±2.22	5.07±0.57	403±140*	23.17±2.23*	35.83±8.08	35.83±8.08	4.85±1.22#	84.34±11.17
C	−1	8.42±1.40	5.59±0.48	333±77*	23.43±1.77	61.87±47.94	68.97±23.63	6.60±1.65*	77.68±13.25
	1	13.67±2.33	5.06±0.56	360±87*	23.17±3.37	52.17±29.32	64.00±23.35	7.82±1.06*	84.18±20.98
	3	7.95±1.31	4.89±0.53	318±70*	22.17±3.31	39.67±21.23	56.33±24.14	7.45±1.21*	87.22±15.59
	5	8.48±1.82	5.14±0.46	364±112*	20.50±1.87	43.38±23.92	50.78±22.16	7.15±1.70*	94.63±14.76
	7	7.08±0.95	5.32±0.46	349±100*	21.00±2.37	55.58±26.09	55.58±26.09	7.10±2.13*	96.78±14.99
D	−1	8.50±1.62	5.55±0.20	319±84*	25.83±0.98**	57.17±39.77	41.00±24.50#	5.83±1.82#	84.67±13.17
	1	10.10±1.83	5.28±0.33	349±59*	25.33±1.75**	58.50±37.77	44.17±27.69#	5.93±0.57#	91.02±14.02
	3	9.72±1.70	5.20±0.43	326±89*	23.00±1.10**	51.00±38.90	33.33±19.40#	5.59±1.01#	78.00±12.65
	5	9.77±1.77	5.30±0.27	382±130*	22.80±1.90**	53.13±40.32	33.30±17.62#	5.71±1.90#	81.67±15.16
	7	9.22±1.30	5.38±0.23	355±81*	24.33±1.03**	33.83±24.39	33.83±24.39#	4.54±1.06#	82.18±12.73

▲: the day before operation; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* A group; #: $P<0.05$ *vs* C group

2.3　吻合口破裂压

A组吻合口破裂压为(196 ± 27) mmHg，D组吻合口破裂压为(209 ± 19) mmHg，两组间无显著性差异($t = 0.944$，$P > 0.05$)。

2.4　病理组织学观察

各组除吻合口局部见轻度粘连外，未见明显腹腔粘连，其中又以D组粘连面积较大或粘连带较多。肝脏、肾脏、脾脏未见明显病理学改变。光镜下各组动物吻合口见肠粘膜上皮移行，愈合良好，肌层明显增厚，其间见大量胶原纤维形成，紧密交叉排列。

3　讨论

IHCP应用于临床已有20多年的历史，它能有效杀灭腹腔内游离的癌细胞和微小癌转移灶，预防肿瘤复发，提高术后生存率。由于IHCP是一种侵入性治疗方法，不可避免地会对机体产生不利影响。在IHCP应用于临床的过程中也发生了许多的并发症，如肠梗阻[8]、吻合口漏[8,9]、肾功能损害[10]、骨髓抑制[8]等。因此，在IHCP应用于临床前有必要对其安全性进行全面的评估。

本实验中A、B组兔呼吸、脉搏、动脉血压在灌注过程中有增快和升高，但均未超出正常范围。尽管如此，IHCP治疗过程中生命体征的监测也十分必要。A、B组动物直肠温度在灌注过程中始终波动在36～37 ℃之间，说明42 ℃左右的腹腔温热灌注对中心体温影响不大，不必对头部或全身放置冰袋降温。

丝裂霉素C主要通过肾脏排泄，其主要副作用之一是肾毒性。而药代动力学研究表明，IHCP时，MMC血浆浓度在开始灌注后45 min达峰值，此时灌注液中MMC浓度减低60%，IHCP结束后2 h MMC自血液及尿液中消失[11]。腹膜中MMC的药时曲线下面积(area under the curve，AUC)约是血浆中的23.5倍[12]。张森等[13]以浓度为10 mg/L的MMC 8 000 ml行IHCP时MMC进入体循环的药量低于单次静脉化疗(20 mg/m^2)药量。因此，即使MMC有一定的肾毒性，IHCP时一般也不会造成严重的肾功能损害。本研究中尿素氮变化C组与其余各组相差显著($P < 0.05$)，而肌酐变化各组间无明显差异。从变化曲线可见，C组尿素氮和肌酐显著增高，说明单纯腹腔化疗会造成一定程度的肾功能损害，而腹腔温热灌注化疗却不会造成明显肾功能损害，可能与温热造成肾脏血流增加，加快排泄有关。病理检查各组均未见肾脏明显损害。

Daly[14]指出腹腔化疗后约有2/3药物经门静脉到达肝脏，而进入体循环的仅占1/3，这对防治肿瘤肝转移，减轻化疗毒、副作用具有积极意义。IHCP时吸收的MMC约有2/3进入肝脏，而MMC主要在肝脏中生物转化，有时会引起肝脏功能的障碍。A组白蛋白出现明显的下降(与B、D组相差显著)；B组白蛋白在术后第1、3天有所增高，后降至正常；C、D组白蛋白均有轻度下降。各组方差分析结果显示，白蛋白降低与化疗药物有关，虽然温热灌注组显示温热可以促进白蛋白的合成，但由于温热同时促进了化疗药物的吸收，吸收的药物抑制肝脏合成白蛋白，从而造成白蛋白的降低。各组ALT、AST均未见明显增高，A组ALT、AST反而有明显的下降。术后第7天肝脏切片也未见明显病理学改变。说明采用MMC行腹腔温热灌注化疗不会对肝功能造成严重破坏，而对白蛋白合成的抑制作用则值得注意。临床应用时应定期监测血清蛋白含量，适时补充白蛋白。

骨髓抑制是MMC最严重的毒性，可致白细胞减少(85%～95%)及血小板减少(11%～44%)，白细胞减少常发生于用药后4～6周，一般在6～8周恢复。约有19%～24%的病人发生贫血。本实验方差分析结果显示，白细胞及红细胞的变化各组间并无显著差异($P > 0.05$)，可能由于观察时间较短(仅1周)的缘故。A组血小板有轻度减少，并与其余各组相差显著($P < 0.05$)，而C组与其余各组无显著性差异，说明引起骨髓抑制是温热和化疗二因素共同作用的结果，可能与温热造成化疗药物吸收增多有关。说明腹腔温热灌注化疗会造成一定程度的骨髓抑制，因此在临床应用时须严格控制温度及药量，定时复查血常规。

腹腔粘连几乎是腹部手术后不可避免的后果，超过90%的腹腔手术会导致腹腔粘连，而后者又是造成肠梗阻的最主要原因[15]。Cubukcu等[16]指出MMC可以有效的防止腹腔粘连，这是因为MMC能够抑制成纤维细胞的增殖。本实验中A、B、C组腹腔粘连的程度较D组为轻，也说明了MMC具有减少腹腔粘连的作用。

为了解温热灌注是否会造成吻合口愈合不良，Shimizu等[17]在小鼠体内作了实验，结果显示在最初3 d里，温热灌注造成了粘膜损害，同时出现伤口边缘明显炎性细胞浸润，纤维素和肌层增厚。术后温热组的肠段抗拉力的增高明显高于对照，指出温热灌注不会对吻合口愈合造成不良影响。本研究中A、D组吻合口破裂压无显著性差异，说明IHCP对吻合口愈合无显著影响。

本研究结果初步表明，IHCP治疗过程不会对兔造成严重影响。只要严格控制灌注温度和药量，术中严密监测血压、脉搏、呼吸，术后定期复查肝功、肾功、血常规，适时补充白蛋白，IHCP是可行和安全的。

参考文献：

[1] Spratt J S, Adcock R A, Muskovin M, *et al*. Clinical delivery system for intraperitoneal hyperthermic chemotherapy[J]. Cancer Res, 1980, 40(2): 256－260.

[2] Zanon C, Clara R, Bortolini M, *et al*. Chemohyperthermia for advanced abdominal malignancies: a new procedure with closed abdomen and previously performed anastomosis[J]. Int J Hyperthermia, 2001, 17(5): 456－464.

[3] 吴承堂，黄祥成，卿三华. 直肠癌术式和热灌注化疗与预后的关系[J]. 中华胃肠外科杂志，2001，4(2)：88－90.

[4] Yonemura Y, de Aretxabala X, Fujimura T, *et al*. Intraoperative chemohyperthermic peritoneal perfusion as an adjuvant to gastric cancer: final results of a randomized controlled study[J]. Hepatogastroenterology, 2001, 48(42): 1776－1782.

[5] 傅庆国，郭仁宣，孟凡东. 大肠癌术后腹腔内温热化疗合并免疫治疗的临床研究[J]. 中华医学杂志，2002，82(11)：786－787.

[6] Koga S, Hamazoe R, Matea M, *et al*. Prophylactic therapy for peritoneal recurrence of gastric cancer by continuous hyperthermic peritoneal perfusion with mitomycin C[J]. Cancer, 1988, 61(2): 232－237.

[7] Okada M, Bothin C, Kanazawa K, *et al*. Experimental study of the influence of intestinal flora on the healing of intestinal anastomoses[J]. Br J Surg, 1999, 86(7): 961－965.

[8] 谭　广，吴功侃，李　琪，等. 腹腔热化疗对防治胃肠道癌术后复发的临床意义[J]. 中国实用外科杂志，2000，20(3)：165－166.

[9] 陈峻青，王舒宝，徐惠绵，等. 胃癌根治切除并腹腔温热、低渗液灌洗治疗的远期疗效[J]. 中国实用外科杂志，2000，20(7)：415－416.

[10] Kunisaki C, Shimada H, Nomura M, *et al*. Lack of efficacy of prophylactic continuous hyperthermic peritoneal perfusion on subsequent peritoneal recurrence and survival in patients with advanced gastric cancer[J]. Surgery, 2002, 131(5): 521－528.

[11] Glehen O, Mithieux F, Osinsky D, *et al*. Surgery combined with peritonectomy procedures and intraperitoneal chemohyperthermia in abdominal cancers with peritoneal carcinomatosis: a phase Ⅱ study[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(5): 799－806.

[12] Jacquet P, Averbach A, Stephens AD, *et al*. Heated intraoperative intraperitoneal mitomycin C and early postoperative intraperitoneal 5-fluorouracil: pharmacokinetic studies[J]. Oncology, 1998, 55(2): 130－138.

[13] 张　森，高　枫，陈利生，等. 丝裂霉素C在腹腔内温热灌注化疗的药代动力学[J]. 中华实验外科杂志，1999，16(4)：315－316.

[14] Daly J M, Kemeny N, Sigurdson E, *et al*. Regional infusion for colorectal hepatic metastases. A randomized trial comparing the hepatic artery with the portal vein[J]. Arch Surg, 1987, 122(11): 1273－1277.

[15] Menzies D. Postoperative adhesions: their treatment and relevance in clinical practice[J]. Ann R Coll Surg Engl, 1993, 75(3): 147－153.

[16] Cubukcu A, Alponat A, Gonullu NN. Mitomycin-C prevents reformation of intra-abdominal adhesions after adhesiolysis[J]. Surgery, 2002, 131(1): 81－84.

[17] Shimizu T, Maeta M, Koga S. Influence of local hyperthermia on the healing of small intestinal anastomoses in the rat[J]. Br J Surg, 1991, 78(1): 57－59.

（编辑　陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)03-0226-01

高碘酸硝酸银六甲基四胺马休黄染色改良法

Modified periodic acid silver nitrate methenamine-martius yellow staining

陶彩云　（三峡大学医学院病理解剖学教研室，宜昌 443003）

在病理检验技术中，显示尿酸盐的染色方法不多，有Orschedt等本精法，Mallory法，Cramer-Buettner六胺银法，及Schultze-Schmidt甲烯蓝法。这些技术方法显示尿酸盐结晶沉积在结缔组织中效果较好，但显示肾脏组织中尿酸盐的沉积有如下缺点：显微镜下不能清晰地观察尿酸盐结晶沉积在肾脏组织中刺激肾单腔增厚等现象；不能清晰地观察尿酸盐沉积在肾小管上皮细胞的现象。为此，作者做了一些有关更好地显示尿酸盐和肾小球单底膜及肾小管基膜二者之间的染色工作，肾脏组织中尿酸盐沉积部位与组织关系显示的非常清晰，使得该法优于上述染色法。经多次实验获得满意结果，此法操作简单，结果稳定，易于掌握。

作者简介：陶彩云（1962－），女，发酵省气象局人，主管技师，主要从事病理技术方面的研究。电话：0717-6697198

收稿日期：2004-08-30；修回日期：2004-12-06

1　材料与方法

1.1　材料

成年健康Wistar大鼠20只（华中科技大学同济医学院实验动物中心提供），体质量160－200 g，用含有黄嘌呤的饲料喂养，每日4 g/kg，1周后血尿酸升高，第10天出现肾功能衰竭。将实验鼠肾脏右侧切开，冷水洗，直接投入95%乙醇中固定。

1.2　方法

用95%乙醇固定肾组织72 h[更换2～3次固定液]，无水乙醇脱化脱水20 min；正丁醇(Ⅰ)2 h；正丁醇(Ⅱ)4 h；置60℃温箱浸蜡4 h左右，包埋，切片4 μm，常规脱蜡水洗，1%高碘

（下转233页）