文章编号:1000-5404(2008)12-1173-03

论著

射频消融治疗兔肝VX2肿瘤后消融病灶鬼影细胞的形态变化

王 琦,马宽生,李廷军,王铁虎,欧 霞,王曙光 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 观察射频消融治疗兔VX2肿瘤后病灶鬼影细胞存在的时间及不同时间段形态的变化。**方法** 将VX2肿瘤组织块接种于32只新西兰兔肝脏,建立肝脏肿瘤模型,2周后控制肿瘤边缘温度行射频治疗,于治疗结束后0、1、2、4周切取标本,在相邻切面分别行HE染色、NADH活力染色,观察鬼影细胞存在时间以及随时间变化过程。**结果** 射频治疗结束后4周,HE染色下鬼影细胞形态无明显变化,NADH染色显示无活力。**结论** 消融灶鬼影细胞形态至少能保持到治疗后4周,HE染色不能辨别是否是残癌,必须加用NADH活力染色,才能与残癌正确区分。

关键词: 射频消融;VX2肿瘤;鬼影细胞
中图法分类号: R730.21;R730.56;R735.7 **文献标识码:** A

Treatment of VX2 hepatic tumor in rabbits with radiofrequency ablation: a study of ghost cells in ablation zones

WANG Qi, MA Kuan-sheng, LI Ting-jun, WANG Tie-hu, OU Xia, WANG Shu-guang (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the existing time and the changes in different periods of ghost cells in rabbit hepatic VX2 tumor model after treatment with radiofrequency ablation (RFA). **Methods** Rabbit hepatoma models were established by implanting VX2 tumor mass into the liver of 32 New Zealand rabbits. RFA was applied to the tumor by controlling the marginal temperature of the tumors. The tissue samples were collected at 0,1,2,4 weeks after the treatment. We obtain the HE-stained specimens and NADH vital stained specimens form the close section to observe the the existing time and the changes in different periods of ghost cells. **Results** No changes was found in the morphous of ghost cells, no sign of vitality was showed in NADH staining 4 weeks after RFA. **Conclusion** The morphous of ghost cells in ablation zones was to maintain at least 4 weeks after treatment. The remnant tumor can not been indentified by HE but NADH staining.

Key words: Radiofrequency ablation; VX2 carcinoma; Ghost cell

射频消融(radiofrequency ablation, RFA)利用高频电流在电极针周围产生极性分子振荡导致发热,使治疗区域的组织温度升高,细胞产生热凝固性坏死,达到治疗肿瘤的目的[1,2]。在热凝固区,由于温度迅速升高,细胞内的酶和蛋白质瞬间凝固,细胞来不及发生自溶就已被固定,因此形态结构保存完好,组织虽已经失活但形态上与活体组织非常相似,称之为"鬼影现象",已发生凝固性坏死的肝脏肿瘤细胞形成"鬼影细胞"(ghost cell)。在HE染色下,由于没有明显的细胞形态改变,很难将其与活体肿瘤细胞区别开[3],容易造成消融病灶依旧存在残癌的误判。鬼影细胞能存在多久、存在有何意义等问题目前鲜见系统研究报道。本研究采用NADH(nicotinamide adenine dinucleotide)组织化学染色法,可正确区分鬼影细胞与残癌,并观察鬼影细胞存在的时间及不同时间段形态变化。

作者简介:王 琦,男,安徽省淮南市人,硕士研究生,主要从事肝肿瘤射频消融方面的研究。E-mail: qwang_1976@sina.com
通信作者:马宽生,E-mail: makuansheng@vip.sina.com
收稿日期:2008-01-29;修回日期:2008-04-02

1 材料与方法

1.1 实验动物及VX2瘤株

新西兰大白兔32只,雌雄不限,体质量2.0~2.5 kg,4~5月龄,由重庆市渝达实验兔场提供。随机分为4组:射频消融即刻组,射频消融治疗结果后1、2、4周组,每组均为8只。VX2肿瘤细胞由重庆医科大学实验动物研究所提供。

1.2 主要仪器及试剂

LDRF-120s型多极射频消融仪(绵阳立德电子技术有限公司);还原型辅酶Ⅰ(nicotinamide adenine dinucleotide,NAD)、吩嗪硫酸甲酯(phenazine methosulfate,PMS)和硝基蓝四唑盐(nitroblue tetrazolium,NBT)为美国Sigma公司产品;速眠新Ⅱ注射液(军事医学科学院军事兽医研究所)。

1.3 兔肝脏VX2肿瘤模型的制作

实验兔术前12 h内禁食,速眠新Ⅱ注射液肌肉注射(0.2

~0.3 ml/kg)麻醉。开腹暴露肝脏左叶,距其下缘约1.5 cm处用眼科镊沿向肝实质中央斜插约1 cm深,做成一直径为2 mm的隧道。将切成约1 mm×1 mm×1 mm的VX2肿瘤组织块植入隧道底部,压迫止血,沿植入肿瘤的肝叶表面向腹腔内加入10 ml蒸馏水以杀灭操作过程中可能脱入腹腔的癌细胞,依次缝合切口[4]。

1.4 实验动物射频消融治疗

饲养2周后,待肿瘤长到1.5 cm大小左右,行射频治疗。实验兔麻醉后开腹,将射频治疗针插入肿瘤中心部位,展开电极,测温电极探头置于肿瘤边缘,开始射频治疗。射频治疗参数:输出功率20 W,阻抗616~1 528 Ω,治疗时间为(119±13) s。Kelvin等[5,6]报道,消融灶温度达到60 ℃即刻引起细胞不可逆死亡,保证消融彻底。本实验中测温电极测得肿瘤边缘温度均超过60 ℃,确保肿瘤细胞完全消融失活。分别于射频结束后0、1、2、4周共4个时间点处死动物,以中心放射状取材至正常肝组织作为检测标本,每例标本分成两份,一块用4%甲醛溶液固定,行常规切片HE染色,另一块用OCT包埋后,放入液氮中速冻,冰冻切片作NADH肿瘤细胞活力染色。

1.5 NADH细胞活力染色

配置孵育液:NBT 100 mg,0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.8~8.0)80 ml, PMS 10 mg,4%乳酸钠溶液20 ml,NAD 50 mg[7]。按先后顺序加入上述试剂,搅拌均匀,粗滤纸过滤。

制作冰冻切片:标本入恒冷箱冰冻切片机,切成5 μm厚的组织片,贴于防脱载玻片上,入37 ℃孵育液反应30 min,双蒸馏水漂洗10 min,室温下晾干,甘油明胶封片。

2 结果

2.1 一般情况

实验兔肿瘤接种成功率为100%。在射频消融治疗后4周内,有1只因腹腔内感染衰竭死亡。射频消融处理后的大体标本呈灰白色,组织变脆,中心区可见黑色组织,为癌细胞严重脱水凝固炭化所致。中心区外呈干燥的凝固性坏死,与周围组织界限清楚,周边充血出血带呈淡褐色。

2.2 光镜观察

VX2肿瘤细胞HE染色下表现为:肿瘤组织与肝实质分界明显,有些肿瘤细胞聚集成癌巢样结构,肝索结构紊乱,肿瘤中心部分细胞因缺血发生坏死样改变。高倍镜下肿瘤细胞呈现中分化鳞癌的特征,异形性明显,形态不规则,体积较大,细胞核大小形态各异,排列紊乱,可见病理核分裂像;核染色深,染色质分布不均匀,核仁增大,数目常增多(图1)。

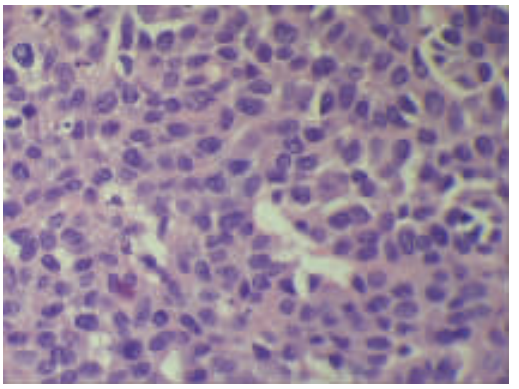
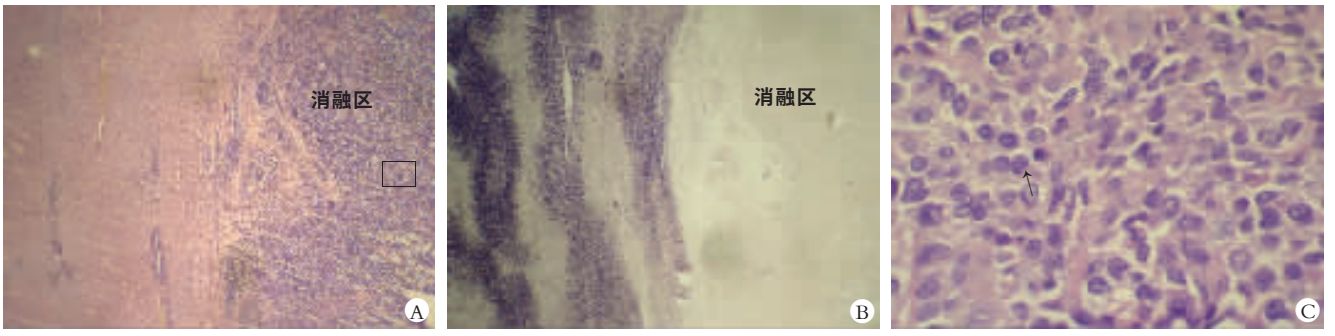


图1 VX2肿瘤细胞光镜观察 (HE×400)

射频当天标本HE染色,低倍镜下见消融边界达到肿瘤边缘正常肝组织,消融带边缘充血,消融区内大片组织坏死,细胞结构破坏,仅见组织轮廓,细胞核碎裂、核溶解,管内血液凝固(图2A)。在相邻切面行NADH染色,消融区外有活力的组织染成蓝紫色,而消融区域未见染色,证明细胞已完全失去活力(图2B)。但是在HE染色高倍镜下,发现消融区域呈灶状分布一些失去活力的细胞(箭头所示),其形态清晰完整,与活体肿瘤细胞无明显区别(图2C)。射频1周后标本中相邻切面的NADH染色证实消融灶无活体细胞存在,但在HE染色的高倍镜下仍发现与活体肿瘤细胞形态无明显差异的鬼影细胞。在射频治疗2周后标本中,经NADH染色证实灭活的消融病灶在HE染色高倍镜下仍发现灶状分布的鬼影细胞,形态与活体肿瘤细胞类似(图3)。毁损区外可见纤维、胶原组织增生。观察至射频第4周, NADH染色证明消融区无活力,相邻层面HE染色高倍镜下仍旧观察到与肿瘤细胞相似的鬼影细胞(图4)。毁损区外纤维、胶原组织增生更加明显,包绕在消融区外。

3 讨论

消融病灶典型的病理特征是以电极为中心的3个同心圆区域:A区为针空碳化区;B区为消融灶苍白区;C区为出血带区。本实验结果表明鬼影细胞在射频当天就已经存在,位于消融灶周边充血带区和中心



A:HE×40; B: NADH×40; C: HE×400 ↑:失去活力的细胞

图2 射频消融治疗当天消融灶HE染色、NADH染色光镜观察



A：HE ×40；B：NADH ×40；C：HE ×400　↑：鬼影细胞

图 3　射频消融治疗 2 周消融灶 HE 染色、NADH 染色光镜观察



A：HE ×40；B：NADH ×40；C：HE ×400　↑：鬼影细胞

图 4　射频消融治疗 4 周消融灶 HE 染色、NADH 染色光镜观察

针道炭化区域之间的消融毁损区内,数量不多,呈灶状分布。直至观察到治疗后 4 周,这种失活的细胞依旧存在,形态无显著变化,HE 染色下与活体肿瘤细胞不能明确区分。Miao 等[3]报道鬼影细胞存在可能的机制是:①射频高温凝固作用使细胞形态固定,阻止了细胞内溶酶体酶类的释放,延缓了后继的细胞自溶分解。②由于射频消融破坏了瘤内的血管,炎症细胞,如巨嗜细胞、中性粒细胞不能浸润这些区域参与组织自溶,因而细胞形态能够长久保留下来。

有研究者采用 NADH 染色评价射频治疗后的消融灶,证实此方法评价消融病灶坏死范围是特异和有效的[6,8,9]。我们在 RFA 中发现,有些肿瘤虽然经过彻底的消融治疗,但是在肿瘤切除后的病理报告中,仍然报告存在残癌,认为消融治疗不彻底,这种残癌究竟是真正没有灭活的肿瘤组织,还是由于高温形成已经失活的鬼影细胞,在 HE 染色下通常难以辨别,容易造成消融病灶依旧存在残癌的误判。以往国外学者也仅仅报道在 HE 染色下发现鬼影细胞这种现象[3],并未深入研究。本实验中我们引入了 NADH 细胞活力染色法研究鬼影细胞,将鬼影细胞同残癌细胞正确区分开。

本实验结果提示:RFA 治疗后判断消融病灶治疗效果,常规 HE 染色不可靠,必须加用 NADH 染色才能有效防止误判。由于技术条件限制,我们仅在组织切片相邻层面分别采用 HE 染色和 NADH 染色进行研究,如何实现在同一切面观察鬼影细胞,还需寻找新的技术来支持。关于鬼影细胞何时最终消失,还有待于进一步的观察研究。

参考文献:

[1] 马宽生. 肝癌的局部消融治疗及进展[J]. 肝胆外科杂志, 2005, 13(4): 250 – 252.

[2] 马宽生, 陈　敏, 丁　钧, 等. 射频消融治疗肝肿瘤 315 例报告[J]. 消化外科, 2005, 4(5): 307 – 310.

[3] Miao Y, Ni Y, Mulier S, *et al*. Treatment of VX2 liver tumor in rabbits with "wet" electrode mediated radio-frequency ablation[J]. Eur Radiol, 2000, 10(1): 188 – 194.

[4] 范林军, 何振平, 马宽生, 等. 兔肝 VX_2 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.

[5] Morimoto M, Sugimori K, Shirato K, *et al*. Treatment of hepatocellular carcinoma with radiofrequency ablation: radiologic-histologic correlation during follow-up periods[J]. Hepatology, 2002, 35(6): 1467 – 1475.

[6] Ng K K, Lam C M, Poon R T, *et al*. Porcine liver: morphologic characteristics and cell viability at experimental radiofrequency ablation with internally cooled electrodes[J]. Radiology, 2005, 235(2): 478 – 486.

[7] 王廷华, 齐建国, Leong Seng Kee, 等. 组织细胞化学理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 79 – 80.

[8] Simon C J, Dupuy D E, Iannitti D A, *et al*. Intraoperative triple antenna hepatic microwave ablation[J]. AJR Am J Roentgenol, 2006, 187(4): W333 – W340.

[9] Shen P, Geisinger K R, Zagoria R, *et al*. Pathologic correlation study of microwave coagulation therapy for hepatic malignancies using a three-ring probe[J]. J Gastrointest Surg, 2007, 11(5): 603 – 611.

（编辑　吴培红）