自主研发电化学治疗同轴电极在动物模型中的初步应用

张 琳,黄学全,王 健,刘凤秀,胡珊珊,吴 倩 (第三军医大学西南医院放射科,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 观察同轴电极和针式电极对肝脏毁损的情况,初步评价自主研发电化学治疗(EChT)同轴电极的应用价值。**方法** 同轴电极和传统针式电极分别对5只犬肝脏进行EChT。在25 mA条件下,分别检测电量5、10、20、40、90 C时阴、阳极周围组织坏死量,并观察病变及相邻区域组织结构的变化。EChT前后检测血中肝脏酶ALT、AST、GGT和ALP的变化。**结果** 两种电极的阴、阳极均随着电量的增大而组织毁损范围增大,其走向接近对数曲线。外周阴极的毁损体积较阳极为大,在相同电量作用下,同轴电极与传统针式电极效力相当。在阳极区呈凝固坏死,阴极水肿坏死。超微结构显示在阳极坏死程度与距电极的距离相关。阳极周围坏死边缘pH4.5~5.5,阴极周围坏死边缘pH9~10。EChT前后肝脏酶谱没有显著差异,但AST、ALT、GGT和ALP均有升高趋势。**结论** 自主研发电化学治疗同轴电极与传统针式电极具有相近的肝脏毁损作用,毁损范围与电量呈正相关;并发症少,安全性高,是具有广泛临床治疗前景的电化学治疗电极。

[关键词] 电化学治疗;电极;同轴电极;动物模型

[中图分类号] R730.56;R312;R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2010)03-0184-04

An initial application of self-made concentric electrode of electrochemotherapy in treatment of animal model

ZHANG Lin, HUANG Xue-quan, WANG Jian, LIU Feng-xiu, HU San-san, WU Qian (Department of Radiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe comparison of liver lesions in concentric- and needle- electrodes and initially evaluate clinical value of self-made concentric electrode of electrochemotherapy (EChT). **Methods** Livers of 10 dogs (5/5) were performed with EChT by concentric- and needle- electrodes, respectively. In the condition of 25mA, volumes of necrosis around anode and cathode were respectively measured at the electrical quantity of 5, 10, 20, 40, and 90C, and the lesions, adjacent tissues and change of ultra-structures were observed. Levels of ALT, AST, GGT and ALP in blood were measured before and after EChT. **Results** The volumes of destructive lesions enlarged with increase of electrical quantities of anode and cathode, whose lines were like logarithmic curves. The lesion volume of peripheral cathode was large than that of anode. In the condition of equal electrical quantity, the effects of concentric- and needle- electrodes were equal. Coagulation necrosis was observed at anode, and edema necrosis at cathode. The ultra-structure showed that degree of the anode necrosis was correlated to its distance to the electrode. The PH of necrotic margin around anode ranged from 4.5 to 5.5 and that around cathode from 9 to 10. There were no significant differences between pre-EChT and post-EChT, but AST, ALT, GGT, and ALP all tended to increase. **Conclusion** The efficiencies of liver destructions are equivalent between concentric- and needle- electrodes. The destructive volume is positively correlated to electrical quantity. EChT with concentric electrode is clinically prospective with more safeties and less complications.

Keywords: electrochemotherapy; electrode; concentric electrodes; animal model

随着电化学治疗(electrochemotherapy,EChT)的广泛开展,为了提高电化学治疗的效率,将电极末端做成不同的形状,如螺旋形、平板形等。并根据使用部位的特殊性,做成特殊电极,如用于前列腺增生、食管癌治疗的导管电极。然而在肝脏、肺等内脏器官仍然广泛采用直针式电极[1-4]。目前的方法存在以下几个主要的问题:①一次治疗需要进行多次插入电极,操作上费时费力,患者并发症机率增大;②电极之间的间距难以控制,影响电极之间的电流分配,从而影响治疗效果;③长时间治疗和呼吸运动的影响,必将对电极的固定带来困难,电极有可能滑出靶点,影响疗效和增加并发症。本研究设计的EChT同轴伞状电极,可显著减少插入次数,确保电极分布均衡,插入组织锚定良好不易滑脱,可望解决上述不便。体外实验表明,它与传统的针式电极电解效果相当。本研究通过在体动物实验,观察同轴伞状电极EChT的可行性及生物效应,以获取适应人类的更可靠的EChT剂量,初步评价自主研发同轴电化学治疗电极的应用价值。

[作者简介] 张 琳(1973-),山东省邹城市人,主治医师,讲师,医学博士,主要从事肿瘤侵袭转移机制及介入治疗方面的研究。电话:(023)68754421

[通迅作者] 黄学全,电话:(023)68754421,E-mail:huangxq217@mail.tmmu.com.cn

[收稿日期] 2010-02-02 [修回日期] 2010-03-15

1 材料与方法

1.1 材料

成年杂种犬10只,体重10~12 kg,雌雄不限(第三军医大学实验动物中心提供)。随机分为实验组和对照组各5只。同轴伞状电极为自主研发,以铂铱合金电极、绝缘导管及绝缘涂料组成,展开半径为2.0 cm和3.5 cm;针式铂铱电极(9:1)和绝缘导管购自北京中国原子能科学研究院;ZAY-6B型电化学治疗仪购自北京航空航天大学测控研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 手术方法 动物手术遵循无菌操作原则,以3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)大隐静脉注射麻醉,仰卧固定,沿正中切口开腹,显露肝脏,从膈面将电极插入肝脏。实验组在左肝中间叶插入同轴电极,展开3.5 cm,周边为阴极,中央为阳极。对照组将带绝缘导管的传统针式电极1只插入左内段肝实质作为阳极,尖端裸露5 mm。另在其周围直径3.5 cm的圆形区域内均匀插入阴极电极5只,裸露部分2 mm。两组均通以相同的电流25 mA,电压3~6 V,所给电量分别为5、10、20、40、90 C。

1.2.2 肝功能检测 术前和术后即刻分别抽取静脉血,检测血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、谷氨酰转肽酶(GGT)和碱性磷酸酶(ALP)的变化。

1.2.3 大体和组织学观察 肝脏被整体取下,剖开进行大体观察和测量,破坏区呈类圆形,测量其平均直径(dm)。破坏区的体积为:$V = \pi dm3/6$。具有代表性的病变用10%福尔马林固定,常规石蜡包埋、切片,观察组织学改变。

1.2.4 电镜观察 距电极不同距离取材,即毁损中心区、毁损边缘区、毁损区邻近正常区域,2%戊二醛固定后送检,超薄切片透射电子显微镜观察。

1.3 统计学处理

所有数据应用SPSS 12.0统计软件统计分析。$P<0.05$有显著性差异,$P<0.01$相差非常显著。

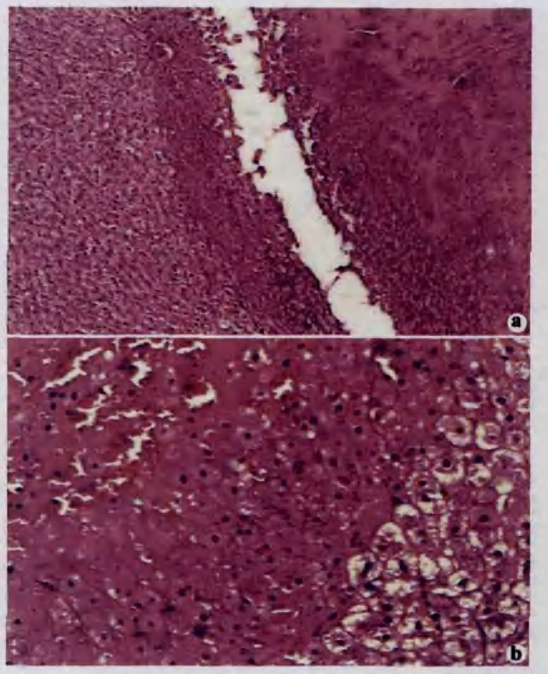
2 结果

2.1 大体及光镜观察

EChT数分钟即见到细小气泡从导管逸出,随着时间延长可见EChT区域肝脏颜色呈绛紫色,局部变硬。病变大致呈球形。阳极毁损区灰褐色,无光泽,边界清晰。阴极毁损区暗红色,变硬水肿,边界欠清晰。随着电量增加,毁损区扩大。阳极区表现为凝固性坏死,组织显著脱水、肝细胞变小、胞浆少、核固缩,病变区与周围正常组织界限清楚,病变区大量微血栓形成。坏死区和"健康"组织间仅几层细胞作为过渡带。阴极区毁损病变由于电渗透作用而显著水肿,胞浆肿胀,偶尔可见胞膜破裂,梗塞很少见。电解坏死区和邻近"正常"肝组织边界清晰。邻近的正常肝组织在光镜下显示正常(图1)。

2.2 透射电镜观察

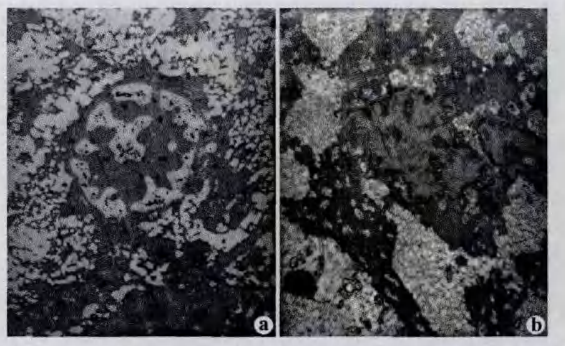
阳极破坏中心区线粒体和过氧化物酶小体形态异常,外膜缺失;粗面内质网上的核糖体更加致密和弥漫性透光度增加;



a:阳极区,显示凝固性坏死等病变,边界清晰;b:阴极区,显示水肿变性及溶解坏死,边界清晰

图1 犬肝脏EChT电极区组织病理变化(HE ×100)

糖原失去其形态特征;胞核内常染色质变形再分布,异染色质疏松。在阴极区,不象在阳极一样细胞损伤和距电极间距离有相关性;在阴极电极邻近区严重损伤,表现为细胞质肿胀、空泡化及细胞器溶解,少量线粒体残留但结构模糊(图2)。



a:阳极区细胞固缩,细胞器破碎,线粒体膜不完整,染色质固缩、碎裂;b:阴极区胞浆肿胀,细胞器破坏,核膜皱缩

图2 犬肝脏EChT电极区超微结构变化(TEM ×8 000)

2.3 电量与组织毁损量的关系

根据测量值计算组织毁损量(表1),两种电极的阴、阳极(25 mA)均随着电量的增大而组织毁损范围增大($P<0.01$),其走向接近对数曲线。外周阴极的毁损体积较阳极为大($P<0.05$),在相同电量作用下,同轴电极与传统针式电极效力相当($P>0.05$)。

表1 两种电极的阴、阳极电量与组织毁损的关系($\bar{x} \pm s$)

电量	阳极组织毁损体积		阴极组织毁损体积	
	同轴电极	针式电极	同轴电极	针式电极
5 C	173 ± 13	168 ± 19 *	219 ± 26#	240 ± 23 *#
10 C	350 ± 24	309 ± 37 *	425 ± 37#	433 ± 46 *#
20 C	651 ± 62	578 ± 81 *	794 ± 69#	826 ± 95 *#
40 C	949 ± 92	920 ± 133 *	1182 ± 124#	1191 ± 140 *#
90 C	1245 ± 165	1312 ± 225 *	1563 ± 198#	1660 ± 297 *#

*:与同极性相同电量同轴电极比较,$P > 0.05$;#:与相同电量和电极阳极比较,$P < 0.05$

2.4 pH变化

阳极(25 mA,40 C)区中央pH值1~2,阴极(25 mA,40 C)区中央11~12。阳极周围坏死边缘pH4.5~5.5,阴极周围坏死边缘pH9~10。在阳极和阴极的组织显示特征性的pH值。在阳极周围pH最低,并迅速升高,在数毫米范围升至中性。相反,在阴极区pH达最高,并迅速降低至中性,但其变化幅度低于阳极(表2)。

表2 阴阳极组织毁损区边缘pH值变化梯度

电极	电极周围pH值						
	-6 mm	-4 mm	-2 mm	0 mm	2 mm	4 mm	6 mm
同轴阳极	1.0	1.5	2.4	5.2	6.9	7.4	7.4
针式阳极	1.1	1.6	2.7	5.3	6.7	7.3	7.4
同轴阴极	13.0	12.0	10.3	9.1	8.1	7.3	7.4
针式阴极	13.2	12.0	10.6	9.0	7.8	7.2	7.4

2.5 肝脏酶谱变化

EChT前后肝脏酶谱没有显著差异,但AST、ALT、GGT和ALP均有升高趋势(表3)。

表3 血清酶谱变化($\bar{x} \pm s$, IU/L)

检测时相	ALT	AST	GGT	ALP
EChT前	32.8 ± 11.1	49.3 ± 26.9	9.9 ± 10.9	93.5 ± 31.6
EChT后即刻	30.8 ± 37.7 *	53.4 ± 22.3 *	10.1 ± 11.8 *	99.8 ± 12.5 *

*:与EChT前比较,$P > 0.05$

3 讨论

3.1 EChT的毁损机理

虽然在EChT中有许多复杂的变化和化学反应,但是普遍认为水的转移和阴阳极酸碱度改变是最根本的(毁损)因素。Vijh认为EChT致组织坏死的重要原因是阳极脱水和阴极的水肿。这种损害被阳极高浓度的H^+和阴极高浓度的OH^-强化[4]。

von Euler等[5]在离体实验中研究了不同pH水平对R3230AC乳腺肿瘤细胞的细胞毒作用和pH值的影响方式,认为pH变化可抑制增殖和降低细胞存活力,在低pH值条件下杀灭肿瘤细胞的方式至少有凋亡和坏死两种方式,然而在高pH只有坏死。该研究提示EChT时低pH环境可导致组织细胞凋亡。此外,还支持在EChT中阳极较阴极更为有效的理论。Nilsson等[6]通过数学模型研究认为组织毁损的最可能的的因素是阳极的酸和阴极的碱。假定pH值高于或低于某个值时可导致组织毁损,通过模型计算的pH值能够很好地与实验中毁损区测得的值吻合。细胞毒作用与电量、电流和作用时间相关[7]。

EChT还引起肿瘤细胞通透性增加,使化疗药物更容易进入细胞内,发挥更大的杀死肿瘤细胞的作用。同时肿瘤血管内皮细胞改变,管腔内血栓形成,可使小动脉肌层持续性收缩甚至闭塞,毛细血管及囊状小管通透性增加导致局部充血水肿,静脉闭塞,肿瘤组织呈低灌注状态,生长受到抑制[8-10]。

3.2 组织毁损与电量的关系

在本研究中,采用自主研制的同轴伞状电极和传统针式电极在分布、电流、电量一致时其毁损效率相当。就毁损的范围而言,阴极毁损效率高于阳极,但是阳极毁损程度更为严重。阴、阳极组织毁损的剂量—反应曲线均接近对数曲线,这有助于解释EChT领域中早期研究的结果。Berry[11]曾对这种现象做出解释,随着毁损范围的扩大,病变边缘增宽,更多的缓冲物质减轻损害,并且pH梯度越来越小。因此,组织毁损特性减弱。另外,在阳极随着脱水程度的增加,导电性下降,干扰电流传导。阴极的水肿使毁损范围增大。因此,在大动物大块肝脏组织进行研究非常重要,以便获取适合人类的更可靠的EChT剂量。

3.3 安全性评价

EChT主要并发症为:①术中、术后疼痛,有时较剧烈,治疗前后可给予镇静、镇痛药;②术后发热,一般38 ℃以下,一周内多可恢复正常;③正常皮肤、组织轻度灼伤;④治疗肺癌或肝脏顶部病变时发生气胸或血气胸。肝脏酶谱水平没有显著意义的升高,经保肝、支持治疗,多在1周后恢复。在本试验中没有严重并发症发生,与文献报道一致[8-10]。

总之,自主研发的同轴伞状电化学治疗电极与传统针式电极具有相近的肝脏毁损作用,毁损范围与电量呈正相关。并发症少,安全性高,是一种具有广泛临床治疗前景的电化学治疗电极。

[参考文献]

[1] 杨 孔,秦天莺,伍红贤,等.肿瘤电化疗法与机理分析[J].生物医学工程学杂志,2008,25(1):49-52.

[2] 王建娜,贺利民,马 磊,等.组织内化疗结合电化学治疗原发性巨块型肝癌的临床观察[J].现代肿瘤医学,2003,11(3):193-195.
[3] Nilsson E, von Euler H, Berendson J, et al. Electrochemical treatment of tumours[J]. Bioelectrochemistry, 2000,51(1):1-11.
[4] Vijh AK. Electrochemical treatment (ECT) of cancerous tumours: necrosis involving hydrogen cavitation, chlorine bleaching, pH changes, electroosmosis[J]. Int J Hydrogen Energy, 2004,29(6):663-665.
[5] von Euler H, Soderstedt A, Thorne A, et al. Cellular toxicity induced by different pH levels on the R3230AC rat mammary tumour cell line. An in vitro model for investigation of the tumour destructive properties of electrochemical treatment of tumours[J]. Bioelectrochemistry, 2002, 58(2):163-170.
[6] Nilsson E, Fontes E. Mathematical modelling of physicochemical reactions and transport processes occurring around a platinum cathode during the electrochemical treatment of tumours[J]. Bioelectrochemistry, 2001,53(2):213-224.
[7] von Euler H, Olsson JM, Hultenby K, et al. Animal models for treatment of unresectable liver tumours: a histopathologic and ultra-structural study of cellular toxic changes after electrochemical treatment in rat and dog liver[J]. Bioelectrochemistry, 2003,59(1-2):89-98.
[8] Nomikou N, McHale AP. Electrokinetic dispersion of a cancer chemotherapeutic drug for the treatment of solid tumours[J]. Cancer Lett, 2009,279(2):202-208.
[9] Colombo L, Gonzalez G, Marshall G, et al. Ion transport in tumors under electrochemical treatment: *in vivo*, *in vitro* and *in silico* modeling [J]. Bioelectrochemistry, 2007,71(2):223-232.
[10] Aguilera AR, Cabrales LEB, Ciria HMC, et al. Distributions of the potential and electric field of an electrode elliptic array used in tumor electrotherapy: Analytical and numerical solutions[J]. Mathematics and Computers in Simulation, 2009,79(7):2091-2105.

(编辑:余汇洋)

(上接第183页)

按捺正、端挤捺正、扣挤捏合、顺骨捋筋等几种。伸直型骨折时,骨折远端向桡侧和背侧移位,掌倾角减小或负角,尺偏减小或完全消失,甚至负角,有的伴有短缩移位。

整复手法有:前臂旋前一人整复法、牵抖复位法、提按复位法[6]。复位时,先仔细阅片,结合手摸心会详细了解骨折情况,后行拔伸牵引,纠正嵌插或短缩移位,充分利用由DRC、DIC等背侧韧带和关节囊及骨膜组成的背侧软组织绞链和桡舟韧带和关节囊及骨膜组成的桡侧软组织绞链的内夹板作用,采用端挤捺正和/或扣挤捏合手法并配合尺偏和适当旋后牵引纠正桡偏移位,再采用提按捺正和/或扣挤捏合手法,并配合掌倾牵引即可使骨折复位。DRC韧带坚韧,为背侧主要韧带,其与DIC呈"Z"形分布,牵引时二者之间的夹角增大,可使牵引力量缓冲而不能使背侧软组织绞链充分紧张而影响复位,这在复位中应充分注意。

屈曲型骨折相对少见,骨折线由背侧下方斜向掌侧上方,骨折平面同伸直型骨折,但移位方向相反。整复手法有:三人复位法、一人复位法等几种[6]。复位时,在阅片、手摸心会基础上拔伸牵引,纠正嵌插移位,并在此基础上进行下一步整复。桡偏整复类似伸直型。腕关节韧带掌侧较背侧密集强韧,数量较多,总体结构呈双"V"形结构,由RSC韧带和UC韧带共同构成的弓形韧带作为稳定腕掌侧的重要结构的,与其他韧带一起成为掌侧的主要软组织绞链。牵引时,在此强大的软组织绞链的整复作用下,短缩及嵌插移位得以纠正,再结合端挤捺正和/或扣挤捏合手法并配合尺偏牵引进一步纠正桡偏移位,采用提按捺正和/或扣挤捏合手法,并配合背伸牵引即可使骨折复位。掌背侧移位和桡侧移位纠正顺序视具体情况而定,一般先纠正桡侧移位,后纠正掌背侧移位。背侧缘劈裂型骨折、掌侧缘劈裂型骨折复位类似前二者。

韧带的正常解剖和生理功能,保证了腕关节稳定性和功能的正常行使,也奠定了桡骨远端骨折手法复位治疗的解剖基础。但保守治疗的施行,应结合骨折的分型和严重性而确定入选标准。恰当的适应证,才能带来预期的治疗结果。对开放性骨折,骨折移位大、稳定性较差且累及关节面范围较广、对功能要求较高的骨折,手术治疗也许是更好的选择[4-7]。

[参考文献]

[1] 徐永清,钟世镇,徐达传,等.腕关节韧带的解剖学研究[J].创伤外科杂志,2006,8(1):52-54.
[2] 熊 革,王澍寰.腕关节检查图解[M].北京:人民军医出版社,2005.16.
[3] Blatter G, Magerl F, Bartonicek J. Conservative treatment of classical radius fractures[J]. Schweiz Rundsch Med Prax,1990,79(34):961-966.
[4] 李绍良,贡小英.对保守治疗桡骨远端骨折稳定性的评价[J].中华医学杂志,2006,86(11):759-762.
[5] 贡小英,荣国威,安贵生,等.桡骨远端不稳定骨折掌侧或背侧内固定的选择[J].中华外科杂志,2003,41(6):436-40.
[6] 孙树椿,孙之镐.临床骨伤科学[M].北京:人民卫生出版社,2006.75.
[7] Prommersberger KJ, Ring D, Pino JG, et al. Corrective osteotomy for intra articular malunion of the distal part of the radius[J]. J Bone Joint Surg Am,2006,88(1):202-211.

(编辑:左艳芳)