维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)05-0564-06

射频消融联合高频热疗对兔肝 VX2 肿瘤侵袭能力的影响

唐 荣[1],乔正荣[2],吴华平[1],张国武[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院血管外科,重庆 400016;2. 重庆市第八人民医院外科,重庆 400015)

【摘 要】目的:研究射频消融(radiofrequency ablation,RFA)联合高频热疗(High freguency hyperthermia,HFH)对兔肝 VX2 肿瘤侵袭能力的改变。方法:采用 RFA 和 HFH 治疗,用移植的方法建立兔肝 VX2 肿瘤模型,按治疗方法不同随机分为 4 组:空白组(A 组,8 只);RAF 组(B 组,8 只);HFH 组(C 组,8 只);RFA+HFH 联合治疗组(D 组,8 只)。结果:(1)肿瘤体积:B 组、D 组肿瘤体积在治疗后第 14d 明显缩小,B 组、D 组组内比较 ($P<0.05$),D 组缩小最明显,D 组与 B、C 组组间比较有明显差异($P<0.05$)。A 组及 C 组肿瘤体积继续增大,A 组增大显著高于各治疗组($P<0.05$)。(2)治疗 14d 后 MMP-2、MMP-9、CD34 阳性表达:肿瘤中心组织中,各指标阳性表达率在 B 组、D 组中最低,在 A 组最高,C 组与 A 组组间比较有明显差异($P<0.05$);肿瘤边缘组织中,治疗组的各指标阳性表达率均比与 A 组低,与 A 组比较均有明显差异($P<0.05$),D 组中各指标阳性表达率最低,D 组与 B 组、C 组比较均有明显差异($P<0.05$)。结论:RFA,HFH 2 种热疗方法均可降低肿瘤的侵袭力,将二者联合运用,降低肿瘤侵袭力的作用更明显。

【关键词】射频消融;高频热疗;肝肿瘤;侵袭转移

【中国图书分类法分类号】R454.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-26

Effect of therapeutic alliance of radiofrequency ablation and high-frequency thermotherapy on the invasion of cony liver cancer cell line VX2

TANG Rong, et al

(*Department of Vascular Surgery, the First Affiliate Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To study the effect of therapeutic alliance of radiofrequency ablation(RFA) and high-frequency thermotherapy(HFH) on the invasion of cony liver cancer cell line VX2. *Methods*: The cony liver cancer VX2 model was prepared by transplantion, according to the different treatment methods, the models were divided into four groups: Control group (group A 8); RAF group (group B 8), HFH group (group C 8); The therapeutic alliance of RFA+HFH group (group D 8). *Results*: (1)Gross tumor volume: the tumor volume of group B and D deflated significantly post-treatment 14 days, the group B and D compared within groups ($P<0.05$), the group D deflated more obviously .the group D compared with B and C, the group D deflated significantly ($P<0.05$). The tumor volume in group A augmented, the augmention in group A was more than every treatment groups ($P<0.05$). (2)The expression of MMP-2、MMP-9 and CD34: In the tumor central tissue, the expression of every index was the lowest in group B and D, the highest in group A, the group C compared with the group A was different significantly ($P<0.05$), the index in group D was the lowest, the group D compared with group B and C was different significantly ($P<0.05$). *Conclusion*: The thermotherapy methods RFA and HFH can depress the invasion of the tumor cells, but the effect of the therapeutic alliance of RFA+HFH was more obviously.

【Key words】 Radiofrequency ablation; High frequency hyperthermia; Tumor of liver; Invasion and metastasis

对不能进行手术切除的肝癌,RFA 和 HFH 是 2 种常见的姑息性治疗方法。RFA 主要利用高温使癌组织产生凝固性坏死[1],HFH 主要是在较低的高温下提高机体的免疫功能[2]。本实验通过 RAF、HFH 以及二者联合运用(HFH+RFA)对兔肝 VX2 肿瘤的治疗,研究热疗对肿瘤大小,以及 MMP-2、MMP-9、CD34 阳性表达率的影响,从而了解该实验对兔肝 VX2 肿瘤侵袭能力的影响[3],为临床治疗选择提供实验依据。

作者介绍:唐 荣(1975-),男,主治医师,硕士,研究方向:肿瘤微创治疗及血管研究。

通讯作者:乔正荣,男,教授,E-mail:qiaozhengrong@hotmail.com。

1 材料与方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 实验动物

清洁纯种新西兰大白兔 40 只,体质量 1.5 ~ 2.0kg,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 实验动物模型的建立

荷 VX2 肿瘤的种兔由重庆医科大学超声研究所提供。采用开腹包埋法接种成瘤法。动物经速眠新 0.15ml/kg 方法全麻后,固定其四肢备皮,据范林军等[4]报道方法建立兔肝 VX2 肿瘤模型,种植 3 周后肿瘤直径 20mm 左右,B 超检测符合标准即可分组治疗,自然生存期约 6~8 周。

1.3 主要实验仪器及试剂

1.3.1 实验仪器 HCGF-3000 型冷循环射频治疗仪及单极射频针,HG-2000 型体外高频治疗仪均为珠海和佳公司产品,B 型超声仪,全自动生化分析仪。以上设备均由重庆市第八人民医院肿瘤微创治疗中心提供。

1.3.2 实验试剂 一抗(兔抗兔 MMP-2 由武汉博士德生产,鼠抗兔 MMP-9 由中山生物制品公司生产,兔抗兔 CD34 由北京博奥森生产)。免疫组化 SABC 试剂盒、复合消化液、磷酸盐缓冲液、枸橼酸盐缓冲液等均购自武汉博士德生物制品公司。麻醉剂速眠新(为二甲苯胺噻唑、乙二胺四乙酸、盐酸二氢埃托啡和氟哌啶醇组成的复方制剂),购自长春军事医学科学院军事兽医研究所。

1.4 实验动物分组

建立肿瘤模型过程中死亡 6 只,2 只移植肿瘤失败,余 32 只符合标准。模型制成后随机分为 A、B、C、D 4 组,每组 8 只。空白组(A 组,8 只);RAF 组(B 组,8 只);HFH 组(C 组,8 只);RFA+HFH 联合治疗组(D 组,8 只)。

1.5 治疗方法

1.5.1 RFA 的治疗 速眠新麻醉后无菌条件下进腹,射频冷极针在肿瘤正中插入 2 ~ 3cm,保持针尖温度 15~25℃,组织温度 99℃,自动消融 5~10min(功率 80~200W);治疗区域组织质地变硬、颜色灰暗甚至发黑结束治疗。

1.5.2 HFH 的治疗 实验兔于第 1,4,7d 行 HFH 治疗,麻醉方法同前,将 HFH 治疗仪的两极分别置于兔肝区上下方,距皮肤 10 ~ 15cm 处,应用频率为 13.56MHz 的高频震荡电流,监测肛温,控制在 41.5℃,使肝区温度达 42.5 ~ 43.0℃,持续 15min 后结束治疗。

1.5.3 RFA+HFH 麻醉方法同前,RFA 方法治疗后,第 1、4、7d 分别行 1 次 HFH 治疗。

B 组、D 组 RFA 治疗术后连续 3d 肌注射青霉素 10 万 U/kg,每日 2 次。

1.6 标本采集

于第 14d 处死全部实验兔,切取肿瘤中心组织、边缘组织作为检测标本,标本均用 10%福尔马林固定,石蜡包埋,每例存档石蜡标本均作再次确认,每例标本选择蜡块 1 ~ 2 个,制成 4μm 的连续切片 4 张,3 张作免疫组化染色,1 张供 HE 染色。均采用免疫组化 SABC 法(步骤按产品说明书进行)。

1.7 结果观察

1.7.1 肿瘤生长率的观察 实验兔分别于治疗前 1d 和治疗后第 14d B 超测量肿瘤的最大径(a)、最小径(b)。计算肿瘤体积($V=Vab^2/2$),并计算肿瘤生长率:肿瘤生长率(%)=(治疗后体积 - 治疗前体积)/ 治疗后体积 × 100%,"+"示肿瘤体积增大;"-"示肿瘤体积缩小。

1.7.2 HE 染色对各组的病理观察

1.7.3 MMP-2,MMP-9,CD-34 的观察 MMP-2 基因阳性细胞胞浆、胞核内出现棕黄色颗粒;MMP-9 基因主要表达于肿瘤细胞浆中,阳性着色呈棕黄色细颗粒状;CD34 指数反映肝血窦的毛细血管,每个棕染的可与周围细胞或其他组织区分开的血管内皮或内皮细胞簇,均作为 1 个可计数的阳性染色细胞。以总灰度参数代表 MMP-2、MMP-9、CD34 的表达强度[5],总灰度参数采用平均灰度(总灰度 / 扫描面积):在 200× 镜下,随机测定 5 个高倍视野(测量距 115μm × 117.9μm)后计算其平均值,作为该切片的代表值(用日本 Olympuse BH-2 型显微镜照相)。采用德国 Leica 公司 Qwin 550W 型图像信号采集与分析系统,对 MMP-2、MMP-9、CD34 免疫组化切片进行图像分析处理。

1.7.4 统计学处理 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计分析软件采用 SPSS 12.0。数据经对数转换后服从正态分布且方差齐同者采用单因素方差分析进行多组间各参数的比较,两两比较采用 SNK 法;不服从正态分布者,采用成组设计多个样本比较秩和检验进行多组间参数比较。两两比较采用多个样本两两比较秩和检验。两样本比较采用 t 检验或秩和检验。

2 结 果

2.1 影像学检查结果

各组动物治疗前肿瘤体积无显著性差异 $P>0.05$,治疗后各组间肿瘤体积有显著性差异 $P<0.05$。B、D 组治疗后肿瘤体积与治疗前比较均显著缩小 $P<0.01$,A、C 组肿瘤体积与治疗前比较均显著增加 $P<0.05$。各组肿瘤生长率:A 组 +(28.84 ± 14.13)%、B 组 -(86.34 ± 10.38)%、C 组 +(22.37 ± 11.54)%、D 组 -(155.65 ± 52.17)%,见表 1。

2.2 病理结果

2.2.1 HE 染色结果

①A 组:瘤体未被结缔组织包裹(图 1),镜下可见明显肿瘤细胞增生,异型性明显(图 2),周围组织未见增生的胶原纤维,外周无明显炎性反应区。②D 组:大体见肝叶以肿瘤为中心,明显的分为 3 个带圈。最内层为褐色坏死区,中间为灰色损伤区,外周为炎性反应区,整个瘤体被结缔组织包裹(图 3)。HE 染色见肿瘤中心呈一片无定性的红色坏死物,

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 各组动物治疗前后肿瘤体积变化(mm^3) $n=8, \bar{x} \pm s$

	A 组	B 组	C 组	D 组
治疗前	$3035 \pm 230^{1,2}$	$3027 \pm 323^{1,3}$	$2998 \pm 232^{1,2}$	$3171 \pm 356^{1,3}$
治疗后 14d	4300 ± 298^{2}	$1615 \pm 290^{3,4}$	3850 ± 265^{2}	$1247 \pm 234^{3,4}$

1)各组间比较,$P>0.05$;2)A 组、C 组组内比较,$P<0.05$;3)B 组、D 组组内比较,$P<0.01$;4)D 组与 B 组组间比较,$P<0.05$。

四周见大量的中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞侵润,中心区外可见大量增生的胶原纤维(图 4)。③B 组:大体及 HE 染色与 D 组类似,但坏死及损伤面积较 D 组小。④C 组:HE 染色大体与 D 组类似,但瘤体未被结缔组织包裹,镜下未见增生的胶原纤维。

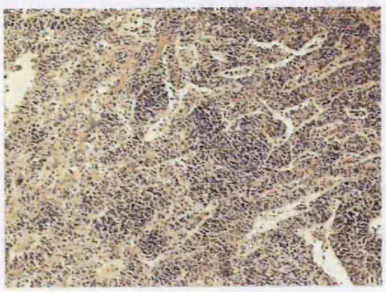
2.2.2 免疫组化结果

①A 组:MMP-2、MMP-9、CD34 阳性表达在肿瘤中心组织中均很明显(图 5,图 6),在肿瘤边缘组织的阳性表达也明显,与肿瘤组织中心相比,表达率较低(图 7,图 8)。②B 组与 D 组:肿瘤中心组织因为 RFA 治疗已经凝固性坏死,MMP-2、MMP-9、CD34 在肿瘤中心组织几乎无阳性表达,肿瘤边缘组织中各指标的阳性表达均比 A 组低,D 组(图 9、图 10)最为明显。③C 组:MMP-2、MMP-9、CD34 在肿瘤中心组织和边缘组织中均有一定阳性表达,但阳性表达均比 A 组低。

2.3 MMP-2、MMP-9、CD34 表达结果

2.3.1 肿瘤中心组织各组 MMP-2、MMP-9、CD34 阳性表达 各指标在 A 组阳性表达率最高,在 B 组、D 组阳性表达率最低。C 组与 A 组组间比较有明显差异($P<0.05$);B 组、D 组与 A 组组间比较有显著差异($P<0.01$)。见表 2。

2.3.2 肿瘤边缘组织各组 MMP-2、MMP-9、CD34 阳性表达 A 组阳性表达率最高,B 组、C 组的阳性表达率明显较低,D 组阳性表达率最低。B 组、C 组、



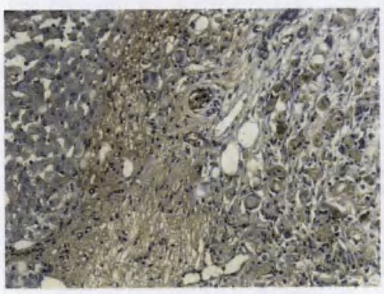


图 1 空白组肿瘤标本,周围组织剥离干净,与周围组织分界较清楚,能较完整剥离

图 2 空白组肿瘤组织中可见明显增生的肿瘤细胞,成团分布,沿肝小叶侵袭。异型性明显。HE×100

图 3 RFA+HFH 治疗后标本,可见明显分界线存在,中央为坏死区域,周围纤维组织包裹生长。

图 4 可见上方明显坏死的红色均染无定形物质,周围有明显纤维组织增生及炎性细胞侵润。HE×100

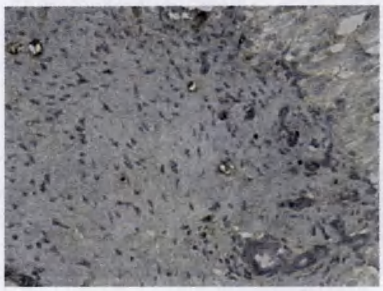
图 5 空白组 MMP-2 在肿瘤中心组织的分布,阳性细胞胞浆、胞核内出现棕黄色颗粒,可见密布的阳性分布区域,其中可见肿瘤细胞存在。SABC×400

图 6 空白组 MMP-9 在肿瘤中心组织的分布,阳性细胞胞浆内出现棕黄色颗粒,可见有明显MMP-9 阳性表达存在。SABC×200

维普资讯 http://www.cqvip.com







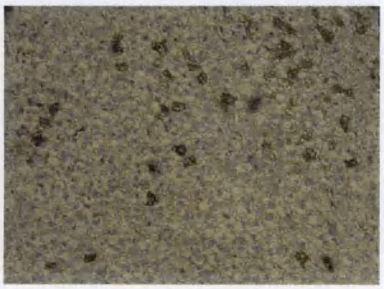


图 7 空白组 MMP-9 在肿瘤边缘组织的表达，可见点状分布的阳性区域，遍布整个视野。SABC×200

图 8 空白组 CD34 在肿瘤边缘组织的阳性表达，遍布整个视野区域。SABC×200

图 9 RFA+HFH 治疗组，肿瘤坏死边缘，纤维组织增生明显，可见少许 CD34 阳性细胞表达。SABC×200

图 10 RFA+HFH 治疗组，MMP-2 在肿瘤边缘组织的阳性表达，呈点状分布。SABC×200

D 组与 A 组组间比较有明显差异 $P<0.05$；C 组的阳性表达率明显低于 B 组 $P<0.05$；D 组与 B 组、C 组组间比较有明显差异 $P<0.05$。见表 3。

3 讨 论

RFA 是利用射频波在组织内传导时引起组织温度升高产生凝固性坏死而达到治疗目的，当温度不足以引起坏死时则可以诱导凋亡[6]。HFH 是应用高频振荡电流，产生高频电磁场作用于肿瘤组织，使肿瘤内温度升高到 41℃～43℃，抑制肿瘤细胞的 DNA、RNA 及蛋白质的合成，肿瘤细胞的增殖受限，最终使肿瘤细胞凋亡和坏死。与 RFA 比较，HFH 作用范围较广泛，在较低的高温下更能提高机体的免疫功能，且 HFH 作为一种局部无创性热疗方式，可以多次重复治疗。本实验将 RFA 与 HFH 联合运用，以期望降低肿瘤侵袭能力，最终提高热疗对肿瘤的治疗效果，为临床治疗选择提供实验依据。

肿瘤细胞脱离原发灶向临近纤维结缔组织侵润时，需要首先突破细胞外基质及基底膜屏障进而向远处转移，细胞外基质及基底膜的降解是肿瘤侵袭转移过程中最关键的一步。基质金属蛋白酶(MMPs)通过对细胞外基质(ECM)的降解而促进癌细胞对周围组织的侵润，其中Ⅳ型胶原酶(包括 MMP-2 和 MMP-9)与肿瘤侵袭转移的关系最为密切[7]。二者的表达是判定肝癌转移能力强弱的指标

表 2 肿瘤中心组织各组 MMP-2、MMP-9、CD34 阳性表达率

	A 组	B 组	C 组	D 组
MMP-2	80.70 ± 6. 30	2.18 ± 1.23[1,3]	63.52 ± 5.13[2]	2.13 ± 1.35[1,3]
MMP-9	80.14 ± 6. 15	2.02 ± 1.71[1,3]	60.15 ± 4.25[2]	1.90 ± 1.26[1,3]
CD34	84.61 ± 20.11	3.67 ± 2.08[1,3]	65.6 ± 17.15[2]	3.43 ± 2.38[1,3]

1. B 组、D 组与 A 组组间比较 $P<0.01$；2. C 组与 A 组组间比较 $P<0.05$；3. B 组与 D 组组间比较 $P>0.05$。

表 3 肿瘤边缘组织各组 MMP-2、MMP-9、CD34 阳性表达率

	A 组	B 组	C 组	D 组
MMP-2	48.03 ± 5.16	32.28 ± 5.37[1,2]	20.25 ± 4.26[1,2]	8.38 ± 3.77[1,3]
MMP-9	42.53 ± 6.13	29.67 ± 7.41[1,2]	18.42 ± 8.43[1,2]	9.78 ± 2.10[1,3]
CD34	66.78 ± 19.33	45.33 ± 8.63[1,2]	31.3 ± 12.36[1,2]	18.4 ± 3.43[1,3]

1. B 组、C 组、D 组与 A 组组间比较 $P<0.05$；2. B 组与 C 组组间比较 $P<0.05$；3. D 组与 B 组、C 组组间比较 $P<0.05$。

维普资讯 http://www.cqvip.com

之一[8]。MMP-2 是Ⅳ型胶原酶和明胶酶[9],通过降解细胞基质以及Ⅳ型胶原，形成局部溶解构成肿瘤移动的通道。有研究表明,MMP-2 在 mRNA 水平上的表达与肝癌肝外转移呈正相关,即癌组织中 MMP-2mRNA 表达阳性者,肝外转移发生率增加[10]。MMP-9 主要功能是降解基膜和细胞Ⅳ型胶原成分,为肿瘤的血管形成、恶性转化、侵润及转移提供有利条件[11]。另外,有研究表明,MMP-9 是动员被扣押的 VEGF 及肿瘤新生血管的形成所必需的[12],与肿瘤新生血管的形成有着重要的联系,癌组织中 MMP-9 基因呈显著高表达可以促进肿瘤新生血管的形成和肿瘤生长,有利于肿瘤细胞发生侵袭和转移。MMP-2 有激活 MMP-9 的功能,提示在肿瘤侵润和转移过程中,MMP-2 和 MMP-9 的作用可能有所不同。通过抑制 MMP-2、MMP-9 活性来控制肿瘤进展有可能成为肿瘤治疗的强有力手段[13]。

肝硬化组织的肝窦毛细血管化程度在某个区域显著升高,则是肝癌发生的危险信号。CD34 广泛分布于毛细血管内皮细胞,能显示极微小的肿瘤新生血管,具有较高的特异性和敏感性[14],在慢性乙型肝炎或慢性丙型肝炎组织中,CD34 阳性血窦内皮细胞高表达是 HCC 发生的危险因素[15]。CD34 是一种重糖化Ⅰ型跨膜蛋白,在各种血管源性肿瘤及多种肿瘤间质中小血管的表达已得到证实。研究表明,起源于骨髓的 CD_{34}^{+} 内皮祖细胞通过血流被编入活性的血管生成场所,与血管内皮生长因子(VEGF)协同作用。最近证明,从外周血分离出的 CD_{34}^{+} 单核血细胞分化为内皮细胞,并参与成人新生血管生成。

3.1 肿瘤大小的影响

从荷瘤兔肿瘤体积在治疗前后的变化可看到,B 组(RFA)、D 组(RFA+HFH)肿瘤体积在治疗后明显缩小,D 组最小。而 A(空白组)、C 组(HFH)则继续增大。分析原因为 B、D 组均行 RFA 治疗,局部组织发生凝固性坏死,继而液化吸收,导致肿瘤体积缩小,这与赵华栋等[16]RFA 治疗兔肝 VX2 肿瘤后所观察到肿瘤逐渐缩小的趋势一致。D 组在 RFA 治疗的基础上,又行 HFH 治疗,诱导了肿瘤细胞凋亡[2],使肿瘤坏死,体积进一步缩小。

3.2 MMP-2、MMP-9、CD34 阳性表达率

3.2.1 肿瘤中心组织的 MMP-2、MMP-9、CD34 阳性表达率 各指标在 B 组(RFA)、D 组(RFA+HFH)中最低,因为是 B 组和 D 组均行 RFA 治疗,肿瘤中心产生凝固性坏死所至。理论上,各指标在经过 RFA 治疗的肿瘤中心应该已经无表达,该实验中 B 组和 D 组仍有一定阳性表达率,分析原因是 RFA 治疗过程中,由于穿刺定位欠准确、肿瘤形状的不规则等原因,使 RFA 治疗后肿瘤组织仍有残存活肿瘤细胞的可能[17]。C 组(HFH)的各指标阳性表达率显著低于 A 组(空白组),证明 HFH 治疗提高了机体的免疫能力,在一定程度上抑制了肿瘤的侵袭能力。

3.2.2 肿瘤边缘组织的 MMP-2、MMP-9、CD34 阳性表达率 B 组(RFA)、C 组(HFH)、D 组(RFA+HFH)的各指标阳性表达率均显著降低于A组(空白组),说明 3 种治疗方式均有助于降低肿瘤侵袭力;HFH 治疗局部温度远低于 RFA 治疗,作用范围较射频消融广,在本实验中,C 组各指标明显低于 B 组,可以证实较低温度更有利于提高机体免疫功能;D 组各指标阳性表达率最低,说明 RFA 联合 HFH 治疗对肿瘤侵袭力的降低明显大于单独行 RFA 治疗或 HFH 治疗,因为 RFA 治疗已经使肿瘤本身产生凝固性坏死,肿瘤本身遭到几乎彻底的破坏,在此基础上多次使用 HFH 治疗,更加提高了机体的免疫力,使得肿瘤的侵袭力进一步降低。

本实验通过 RAF、HFH 以及二者联合运用对兔肝 VX2 肿瘤的治疗,研究三种热疗方式对肿瘤大小,MMP-2、MMP-9、CD34 阳性表达率的影响,其中 HFH+RFA 治疗模式对测指标的影响最为显著,说明 RFA 联合 HFH 治疗更能降低肿瘤的侵袭能力,从而提高肿瘤的疗效[18],为临床治疗选择提供实验依据。

参 考 文 献

[1] Mc Gahan JP,Browning PD,Brock JM,et al. Hepatic ablation using radio-frequency electrocautery[J]. Invest Radiol,1990;25:267-270.

[2] Ivarsson K,Myllymaki L. Heat shock protein 70(HSP70) after laser thermotherapy of an adenocarcinoma transplanted into rat liver [J]. Anticancer Res,2003;23(5A):3703-3712.

[3] Nelson AR,Fingleton B,Rothenberg ML,et al. Matrix metalloproteinases:bio logic activity and clinical implications[J]. J Clin Oncol,2000;18(5):1135-1149.

[4] 范林军,何振平,马宽生,等.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.

[5] 吕增发,王 林.MMP-2 和 MMP-9 在肝细胞癌中的表达及其临床意义[J]. 现代实用医学,2004;16(12):704-706.

[6] Ciocca DR,Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer:di-

维普资讯 http://www.cqvip.com

agnostic, prognostic, predictive, and treatment implications[J]. Cell Stress Chaperones, 2005; 10(2): 86-103.

[7] 兰春慧,陈东风,谢 彬,等. MMP-2/PCNA 在模拟介入治疗后的兔 VX2 肝癌中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报,2005;27(8):727-730.

[8] Park HS, Kim KR, Lee HJ, et al. Over expression of discoidin domain receptor increases the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells in association with matrix metall-oproteinase [J]. OncolRep, 2007; 18(6): 1435-1441.

[9] Longerich T, B reuhahn K, O denthalM, et al. Factors of transforming growth factor beta signalling are co-regulated in human hepatocellular carcinoma[J]. Virchows Arch, 2004; 445(6): 589-596.

[10] 洪坚善,彭 浩,段小娴,等. MMP-2 表达与肝细胞癌侵袭、转移的关系研究[J]. 广西医科大学学报,2005;22(6):850-852.

[11] Taras D, Blanc JF, Rullier A, et al. Pravastatin reduces lung metastasis of rat hepatocellular carcinoma via a coordinated decrease of MMP expression and activity[J]. J Hepatol, 2007; 46(1): 69-76.

[12] 钟 崇,郭荣平,石 明,等.VEGF 与 MMP-9 在肝癌组织中的表达及其临床意义[J]. 癌症,2006;25(5):599-603.

[13] Samantaray S, Sharma R, Chattopadhyaya TK, et al. Increased expression Of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2004; 130(1): 37-44.

[14] Ohmori S, Shiraki K, Sugimoto K, et al. Expression of CD34-positive sinusoidal endothelial cells in patients with HBV-associated chronic liver diseases [J]. Int J Mol Med, 2004; 14(2): 179-184.

[15] 李胜棉,姚树坤,冯 丽,等.不同病变肝组织中 CD34、CD31、Ki-67 的表达及意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2004;13(1):69-75.

[16] 赵华栋,包国强,马庆久,等.射频消融治疗兔肝脏肿瘤的实验研究[J]. 肝胆外科杂志,2006;14(4):301-303.

[17] Ohtsubo T, Saito H, Hoda 1, et al. Effects of sequence and temperature of hyperthermia and peplomycin on human pharyngeal carcinoma KB cells in Vitro[J]. Neoplasma, 1996; 43(3): 179-183.

[18] Niwa T, Takemura Y, Inoue T et al. Implant hyperthermia resonant circuit produces heat in response to MR1 unit radiofrequency pulses[J]. Br J Radiol, 2008; 81(961): 69-72.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 516 页)

从实验培养海马脑片的形态学、对外界刺激反应能力以及神经细胞的电生理反应性检测等方面,均证实用本方法培养的海马脑片至少可存活 4 周,且具备良好的活性和一定的生理功能,为进一步进行海马功能的研究提供了稳定的实验技术方法。

参 考 文 献

[1] Noraberg J ,Poulsen FR ,Blaabjerg M ,et al. Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage,neuroprotection and neurorepair[J]. Current Drug Targets- CNS & Neurological Disorders, 2005; 4(4): 435-452.

[2] Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue[J]. Neurosci Methods, 1991; 37(2): 173-182.

[3] Adamechik Y, Frantseva MV, Weisspapir M, et al. Methods to induce primary and secondary traumatic damage in organotypic hippocampal slice cultures[J]. Brain Res Brain Res Protoc, 2000; 5(2): 153-158.

[4] Steve CD, Kristy RCC, Donald CL, et al. Increased Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Formation of Basal Dendrites and Axonal Branching in Dentate Granule Cells in Hippocampal Explant Cultures[J]. The Journal of Neuroscience, 2002; 15(11): 9754-9763.

[5] Poulsen FR, Jahnsen H, Blaabjerg M, et al. Pilocarpine-induced seizure-like activity with increased BNDF and neuropeptide Y expression in organotypic hippocampal slice cultures[J]. Brain research, 2002; 950(1-2): 103-118.

[6] Poulsen FR., Lauterborn J, Zimmer J, et al. Differential expression of brain-derived neurotrophic factor transcripts after pilocarpine-induced seizurelike activity is related to mode of Ca^{2+} entry[J]. Neuroscience, 2004; 126(3): 665 - 676.

[7] 王玉兰,徐铁军,樊红彬,等. 离体培养海马脑片与在体发育海马结构形态学比较研究[J]. 徐州医学院学报,2002;22(6):482-485.

[8] Lee Y, Hamamure T, Ohashi K, et al. Carbamazepine suppresses methamphetamines mine induced Fos expression in a regionally specific manner in the rat brain. Possihle neural substrates responsible for antimony efects of mood stabilizers[J]. Neuropsychopharmacology, 2000; 22(5): 530-537.

[9] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinum thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987; 162(1): 156-159.

(责任编辑:谭乐勤)