技术方法 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000872

不可逆性电穿孔对山羊肝脏靶区内血管结构的影响

刘 颖[1],熊正爱[2],李成祥[3],姚陈果[3],姜 蓉[4]

(1. 重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第二医院妇产科,重庆 400010;3. 重庆大学输配电装备及系统安全与新技术国家重点实验室,重庆 400030;4. 重庆医科大学干细胞与组织工程研究室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨不可逆性电穿孔(irreversible electroporation, IRE)对消融区域内血管结构的影响。**方法**:固定脉宽 100 μs,频率 1 Hz,电压 2 000 V,脉冲数 120 个,彩色超声探头引导电极针经皮选择血管区域消融山羊肝脏组织,处理后 24 h 复查超声了解消融区内血管二维超声及多普勒血流影像学变化。对消融区内血管以及周边肝脏组织取材,行 HE 及 Masson 染色,通过组织病理学方法评价组织损伤情况。**结果**:IRE 作用范围区域内肝脏组织被完全消融,而大体标本显示血管结构完好,超声影像提示消融区内直径为 2.47 mm 的血管连续性完整,走行清晰,彩色多普勒血流显像(color doppler flow imaging,CDFI)可以观察到血管内彩色多普勒血流频谱。血管组织学染色示内皮细胞连续性完好,血管周围胶原纤维、血管平滑肌结构完整。**结论**:IRE 消融后靶区内肝脏小动脉、小静脉及肝内胆管结构无损伤,从而为生长在大血管周围、手术进行有困难的肿瘤消融提供可能。

【关键词】脉冲电场;不可逆性电穿孔;肝脏;血管

【中图分类号】R575 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2015-12-15

作者介绍:刘 颖,Email:84642002@qq.com,
研究方向:肿瘤物理治疗;

通信作者:熊正爱,Email:docxza@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81201745),重庆市教委科学技术研究资助项目(编号:KJ1400223)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160224.1438.002.html (2016-02-24)

orouracil in plasma:application to pharmacokinetics and steady state concentration monitoring[J]. Int J Clin Pharmcol Ther,2014,52(12):1093-1101.

[7] Lin Y,Li Y,Ooi CP. 5-Fluorouracil encapsulated HA/PLGA composite microspheres for cancer therapy[J]. J Mater Sci Mater Med,2012,23(10):2453-2460.

[8] Shalin PT,Ajit PR,Shivayya SA. Inter-polymer complex microspheres of chitosan and cellulose acetate phthalate for oral delivery of 5-fluorouracil[J]. Poly Bull,2014,71(8):2113-2131.

[9] Cheng M,Liu Z,Wan T,et al. Preliminary pharmacology of galactosylated chitosan/5 -fluorouracil nanoparticles and its inhibition of hepatocellular carcinomaa in mice[J]. Cancer Biol Ther,2012,13(14):1407-1416.

[10] Shakeri-Zadeh A,Shiran MB,Khoee S,et al. A new magnetic nanocapsule containing 5-fluorouracil:In vivo drug release,antitumor, and proapoptotic effects on CT2- 6 cells allograft model[J]. J Biomater Appl,2014,29(4):548-556.

[11] Bai DS,Jin SJ,He R,et al. Granuloma induced by sustainned-release fluorouracil implants misdialgnosed as a hepatic tumor:A case Report[J]. Oncol Lett,2014,8(2):742-744.

[12] Kulthe SS,Bahekar JK,Godhani CC,et al. Modulated release of 5-fluorouracil from pH-sensitive and colon targeted pellets:an industrially Feasible app- roach[J]. Drug Dev Ind Pharm,2013,39(1):138-145.

[13] Cirillo G1,Iemma F,Puoci F,et al. Imprinted hydrophilic Nanospheres as drug delivery systems for 5-fluorouracil sustained release[J]. J Drug Target,2009,17(1):72-77.

[14] Hitzman CJ,Elmquist WF,Wattenberg LW,et al. Development of respirable,sustained release microcarrier for 5-fluorouracil I:In vitro assessment of l-iposomes,microspheres,and lipid coated nanoparticles [J]. J Pharm Sci,2006,95(5):1114-1126.

[15] Wu PC,Huang YB,Chang JS,et al. Design and evaluation of sustained release microspheres of potassium chloride prepared by Eudragit [J]. Eur J Pharm Sci,2003,19(2-3):115-122.

[16] Wei YM,Zhao L. In vitro and in vivo evaluation of Ranitidine Hydrochloride loaded hollow microspheres in rabbits[J]. Arch Pharm Res, 2008,31(10):1369-1377.

[17] Zhao L,Wei YM,Yu Y,et al. Polymer blends used to prepare nifedipine loaded hollow microspheres for a floating-type oral drug delivery system:in vitro evaluation[J]. Arch Pharm Res,2010,33(3):443-450.

[18] 魏郁梦,赵 领,索国清,等. 肠道用药物的中空微球载体的制备方法[P]. 发明专利号:ZL200610095105.5

(责任编辑:张辉洁)

Effect of irreversible electroporation on the structure of blood vessels of goat livers

Liu Ying[1], *Xiong Zhengai*[2], *Li Chengxiang*[3], *Yao Chenguo*[3], *Jiang Rong*[4]

(*1. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*;
2. Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;
3. State Key Laboratory of Power Transmission Equipment & System Security and New Technology;
4. Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To investigate the effect of irreversible electroporation(IRE) ablation on the structure of blood vessels. ***Methods***: Pulsed electric fields(PEFs) with permanent duration(100 μs), frequency(1 Hz), voltage(2 000 V) and pulses(120 pieces) were performed on the electrodes which were placed under ultrasound guidance through the animal skin to the target area. The treated area was observed by real-time ultrasound scanning and color Doppler flow imaging at 24 hours after IRE ablation. Histological changes of the blood vessels in treated areas were observed by HE staining and Masson staining. ***Results***: Gross section examination showed the structural integrity of vascular within IRE-ablated zone. The imaging of two-dimensional ultrasound showed that blood vessels were intact and there was color doppler flow imaging in blood vessels. Endothelial cells of blood vessels were not ablated by IRE. The blood vessel wall structures which mainly formed by vascular elastic and collagenous structures, peri-cellular matrix proteins and vascular smooth muscle structures was not damaged. ***Conclusion***: IRE-ablation retains important vital structures such as hepatic arteries, hepatic veins, intra--hepatic bile duct and perivascular elastic fiber structure and collagen fiber structure in the ablation zone. IRE could produce a more complete ablation effect even there are large vessels traversing though the ablation zone.

【Key words】pulse electric fields; irreversible electroporation; liver; blood vessels

不可逆性电穿孔(irreversible electroporation, IRE)技术是指在一定能量参数的电场作用下，细胞膜磷脂双分子层在电场应力作用下发生不可逆性穿孔而导致的细胞死亡。既往国内外的研究已经证实了 IRE 技术对靶区具有细胞膜性结构成分的广泛、精确、有效的杀伤作用[1-4]。无论在正常组织或肿瘤组织中，血管都是重要组织结构之一，有时肿瘤组织会紧邻甚至包绕机体重要的血管等脉管系统。IRE 肿瘤消融技术在有效杀灭病变组织的前提下是否会对靶区内血管结构造成损伤以及在消融靠近大血管的肿瘤时 IRE 效果如何，是 IRE 治疗肿瘤安全性与有效性研究和 IRE 临床化推行进程中的一项重要研究内容。

1 实验材料与方法

1.1 实验动物

山羊 4 只，购于重庆医科大学实验动物中心(使用许可证号为[SYXK](渝)2007-0001)，雌雄不拘，4~6 月龄，体质量 25~30 kg，在清洁实验条件下粗饲料配合营养饲料混合喂养。实验过程均严格执行我国《实验动物管理条例》中的相关规定。

1.2 仪器设备

脉冲电场肿瘤治疗仪：由重庆大学输配电装备与系统安全与新技术国家重点实验室自行开发研制。输出脉冲电压峰值可达 3 000 V，上升时间为 ns 级，脉宽 μs 级，重复频率 0~100 Hz，电压峰值、脉冲宽度和重复频率在取值范围内任意可调，通过电容的储能放电产生电脉冲。实验时用美国 Tektronix TDS3032B 示波器实时监测波形。实验用电极针为医用不锈钢材质，直径 0.95 mm。治疗仪配置两个输出端，分别连接两个电极针，治疗时通过两个电极针将脉冲电场施加于靶向组织。B 超监测仪：采用 PHILIPS-110 型彩色超声诊断仪，腹部探头发射频率 5 MHz。

1.3 实验过程

山羊治疗前 1 d 开始禁食，8 h 前禁饮水，实验当天肝区对应的皮肤备皮，肌肉注射陆眠灵(盐酸塞拉嗪注射液，1.5~2.0 ml/100 kg，长春军需大学兽医研究所生产)联合地西泮注射液(10~20 mg/100 kg，吉林济邦药业有限公司生产)持续麻醉。麻醉平稳后置于无菌手术台，取左侧卧位(山羊于 IRE 前 1 周，手术取下覆盖肝脏组织的第 9~12 肋骨，利于电极针穿刺以及减少超声监测肋骨成像干扰)。常规碘伏皮肤消毒，铺无菌手术巾，无菌电极针在超声探头引导下经皮穿刺进入腹腔肝脏右叶包膜以下，针将脉冲电场施加于“靶向”组织，选择血管区域进行 IRE 消融。治疗参数为：固定电压 2 000 V，脉宽 100 μs，频率 1 Hz，120 个脉冲。每个山羊肝脏右叶作用 2 个点，共计 8 个试验点。治疗结束后肌肉注射苏醒灵Ⅲ号(长春军需大学兽医研究所生产)0.15 ml/kg。术后山羊予以

青霉素钠 80 万 U/d 肌肉注射预防术后感染。

1.4 B 超复查及实验取材

分别于消融后即刻、24 h 行超声检查了解消融区内血管二维及多普勒血流影像学改变。处理后 24 h，过量麻药处死山羊，取下肝脏，沿着与电极针垂直方向以 3~5 mm 厚度逐层水平切开处理区肝脏组织，肉眼观察到消融区内包含有血管结构即取材，4%多聚甲醛固定，石蜡包埋，行苏木精-伊红（HE）及 Masson 三色法（根据 Masson，1929）染色组织学观察。

2 结 果

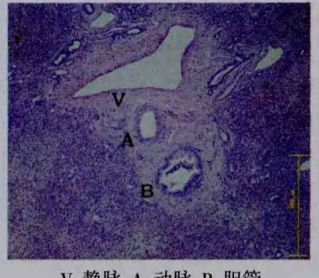
2.1 消融区内血管肉眼观

标本取材后肉眼观察（图 1），IRE 作用范围区域内肝细胞坏死轮廓呈淡黄色“椭圆梭形”，针尖处坏死最为明显，靶区内血管结构完整（包括管径在 10 mm 以上的肝内大血管和管径在 2 mm 左右的肝内小血管），血管结构连续性存在，未受明显损伤，最小一根血管内径测量值为 1.5 mm。消融区内无明显出血灶。



图 1 消融区域内血管结构肉眼观

Fig.1 Blood vessels keep intact at 24h post IRE



V：静脉；A：动脉；B：胆管

图 2 消融区域内血管 HE 染色（100×）

Fig.2 HE staining of blood vessels and bile duct post IRE in the ablated zone（100×）

2.2 超声血管影像

IRE 处理前超声扫查靶区肝脏实质组织，往往可以清晰识别直径在 2 mm 左右的小血管，IRE 消融后进行超声复查，血管二维影像提示消融区内的血管连续性完整（图 3），其中一根经超声测量直径为 2.47 mm，走行清晰，深入消融区域内，血管彩色多普勒血流显像（color doppler flow imaging，CDFI）可以观察到血管内彩色多普勒血流频谱（图4）。

2.3 血管组织学染色

HE 染色消融区包绕的血管管腔内皮细胞完整，且在管腔内连续分布，内皮细胞呈长梭形，胞质淡红，胞核居中、染色深蓝色，核所在部位隆起，细胞基底面附着于基膜上（图 5）。Masson 血管组织染色提示围绕在内皮细胞外的血管胶原纤维结构完整，胶原纤维内含有部分平滑肌细胞，血管内膜线完整、连续、清晰（图 6）。图 2 可见治疗靶区内肝小叶结构破坏、肝细胞坏死，但消融区内动脉、静脉、胆管结构完整，动脉、静脉血管内皮细胞连续性良好，管道结构完整，周围伴随有胶原纤维的增生。



箭头指示范围为消融区

图 3 IRE 术后二维超声示消融区内血管影像完整

Fig.3 Blood vessels keep intact under US observation post IRE in the ablated area

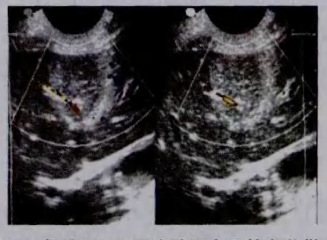


图 4 IRE 术后 CDFI 示消融区内血管多普勒血流信号（与图 3 为同一根血管）

Fig.4 Blood vessels keep intact under CDFI observation post IRE in the ablated area

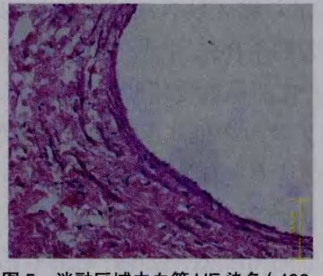


图 5 消融区域内血管 HE 染色（400×）

Fig.5 HE staining of blood vessels post IRE in the ablated zone（400×）

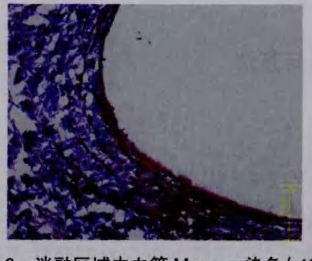


图 6 消融区域内血管 Masson 染色（400×）

Fig.6 Masson staining of blood vessels post IRE in the ablated zone（400×）

3 讨 论

脉冲功率技术在生物医学工程领域的应用发展迅速，作为一种新型的肿瘤物理治疗模式，IRE 消融肿瘤组织与传统消融技术（如射频消融、聚焦超声消融及冷冻消融等）最大的区别在于 IRE 不依赖热效应对靶区组织进行有效杀伤[5-6]，从而避免了血液流动热沉效应的影响，电场能量可以在靶区组织内实现有效传递和积累。国内外的研究已经证实了 IRE 技术对靶区细胞膜性成分的广泛、精确、有效、安全的杀伤作用[1-4,7]。血管是机体组织重要结构之一，有时病变组织会紧邻或者包绕人体内重要的血管、胆管等脉管系统，为肿瘤的手术切除带来一定的困难和风险，传统的消融技术也会因为热量的传递损伤周围重要的管道组织。因此，IRE 治疗后消融区内血管结构在受到高强度脉冲电场作用后血管结构、功能的改变以及当 IRE 消融靠近大血管的肿瘤时其安全性的研究是 IRE 临床化进程中需要关注的重要问题。

实验的过程中，对靶区标本取材肉眼观察发现，IRE 作用范围区域内血管结构完整（包括管径在 10 mm 以上的肝内大血管和管径在 1.5~2 mm 左右的肝内小血管），未受脉冲电场影响。在靶区内血管功能测评方面，通过彩色超声血管二维影像提示消融区内的血管连续性完整，走行清晰，CDFI 可以观察到血管内彩色多普勒血流频谱，二维超声测量到的该血管内径为 2.47 mm。组织学染色下，血管结构连续性完好，血管周围弹性纤维结构完整。消融区域内肝脏小血管的结构和功能未受到脉冲电场的影响，究其原因，脉冲电场与传统热消融技术引起蛋白质变性的损伤机理的不同之处在于，不可逆性电穿孔作用的靶点在于有细胞膜结构的实质细胞（如肝脏实质细胞），而不会对消融区管道系统（如动脉、静脉、胆管）的重要组成结构，如弹性纤维、胶原纤维、细胞周围基质蛋白造成彻底的结构破坏，从而保存了靶区内重要管道系统（血管、胆管）结构的完好性。

在实验中观察到 IRE 非热肿瘤消融术治疗后病灶内滋养血管和毛细血管网被大量破坏，HE 切片染色可以观察到消融区内肝组织出血，肝细胞间隙可见大量红细胞[2]，而靶区内较大血管无损伤或栓塞。这些重要的组织内的脉管系统在消融术后得以保存，术后坏死区的炎症反应更小，坏死组织的吸收更快，同时有利于消融区域内组织细胞的再生和功能及结构的恢复。Chen 等[8]和 Deodhar 等[9]使用不可逆性电穿孔分别消融猪在体肝脏组织和肾脏组织，IRE 术后 14 d 及 3 周分别观察到消融区有部分肝组织再生及消融区有肾盏黏膜层增生。IRE 非热肿瘤消融技术保存了靶区肝脏小动脉、小静脉及肝内胆管等管道结构及功能的完整性，同时也为使用 IRE 消融包绕重要大血管周围生长、手术进行有困难的肿瘤消融提供理论依据。

本实验从功能和组织学角度评价了 IRE 选择消融后靶区组织血管的损伤情况。从光镜及彩色超声血管影像及血流变化等角度观察，靶区较大血管组织未受到损伤，血管功能存在，血流动力学稳定，但也有学者报道 IRE 后 2 d，HE 染色观察到血管内皮的损伤，但消融区域内的血管及胆管结构保持完整[7]，若需进一步验证血管内皮有没有超微结构的改变，应加入超微透射电镜等方式进行进一步更为细致的评价。

参 考 文 献

[1] Lee EW, Chen C, Prieto VE, et al. Advanced Hepatic Ablation Technique for Creating Complete Cell Death: Irreversible Electroporation[J]. Radiology, 2010, 255(2): 426-433.

[2] 刘 颖，周 玮，熊正爱，等. 超声引导不可逆电穿孔消融山羊肝脏的实验研究[J]. 解放军医学杂志，2011，36(3)：254-256.

[3] Rubinsky B, Onik G, Mikus P. Irreversible electroporation: a new ablation modality -clinical implications[J]. Technol Cancer Res Treat, 2007, 6(1): 37-48.

[4] 周 玮，熊正爱，刘 颖，等. 不可逆性电穿孔致 Hela 细胞凋亡与坏死的作用研究[J]. 第三军医大学学报，2010，32(18)：1941-1944.

[5] Long G, Bakos G, Shires PK, et al. Histological and finite element analysis of cell death due to irreversible electroporation[J]. Technol Cancer Res Treat, 2014, 13(6): 561-569..

[6] Phillips M, Maor E, Rubinsky B. Nonthermal irreversible electroporation for tissue decellularization[J]. J Biomech Eng, 2010, 132(9): 091003.

[7] Scheffer HJ, Nielsen K, de Jong MC, et al. Irreversible Electroporation for nonthermal tumor ablation in the clinical setting: a systematic review of safety and efficacy[J]. J Vasc Interv Radiol, 2014, 25(7): 997-1011.

[8] Chen X, Ren Z, Zhu T, et al. Electric Ablation with irreversible electroporation (IRE) in vital hepatic structures and follow-up investigation[J]. Sci Rep, 2015, 5: 16233.

[9] Deodhar A, Monette S, Single GW Jr, et al. Renal tissue ablation with irreversible electroporation: preliminary results in a porcine model [J]. Urology, 2011, 77(3): 754-760.

（责任编辑：张辉洁）