

肝脏血流不同阻断方式对兔肝射频消融效果的影响

黄 焯 乔 伟 刘 政

摘 要 **目的** 研究肝脏血流不同阻断方式对兔肝射频消融的增强效果。**方法** 将42只健康新西兰大白兔分为三组:单纯消融组(NO组)、门静脉阻断联合射频消融组(PV组)和肝动脉、门静脉全阻断联合射频消融组(HA+PV组),每组14只,按分组对各兔肝血管进行不同处理后,行超声引导下射频消融,参数设定为15 W、80℃,消融时间1 min。消融24 h后,行超声造影检查测量消融灶各径线,每组各取10只兔对其消融灶行大体测量,然后采用量筒排液法测量体积;每组各取1只兔行肝组织病理检查,各组余3只兔分别于术前和术后1、3、5、7 d抽取兔肝动脉血检测丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(GGT)、谷氨酰转肽酶(ALP)水平;比较各组上述参数的差异。**结果** 超声造影和大体标本测得的消融灶范围在NO组、PV组、HA+PV组三组间两两比较,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),且以HA+PV组消融灶最大。超声造影测得消融灶径线与大体标本相应测值比较,差异均无统计学意义。各组实验兔ALT、AST均于术后1 d达到高峰,随后缓慢下降,术后7 d基本恢复至术前水平。各组间ALT、AST、ALP、GGT不同时间点变化趋势未见明显差异。**结论** 单独阻断门静脉血流或同时阻断门静脉、肝动脉血流均能有效增大兔肝射频消融灶各径线及体积,且全阻断效果最好。

关键词 射频消融;血流阻断;肝脏;兔

[中图分类号]R445.1;R-332

[文献标识码] A

Effect of hepatic-blood flow occlusion on liver radiofrequency ablation in rabbits

HUANG Ye, QIAO Wei, LIU Zheng

Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China

ABSTRACT **Objective** To evaluate the effect of hepatic-blood flow occlusion on liver radiofrequency ablation in rabbits.**Methods** Forty-two rabbits were assigned to one of three vascular occlusion groups, no occlusion (NO group), portal vein (PV group), both hepatic artery and portal vein (HA+PV group), each group included 14 rabbits. Radiofrequency lesions were created in vivo using RITA 1500 system with cool tip radiofrequency electrode, the parameters were set at 80℃, output at 15 W for 1 min. After ablation for 24 h, the diameters of ablation lesion were measured by contrast-enhanced ultrasound (CEUS). The rabbit liver tissue was taken, and the gross of the ablation lesion was measured. Then the volume was measured by cylinder drainage method. The atrial blood of 3 rabbits in each group was taken, and the AST, ALT, GGT and ALP were detected before therapy, and 1, 3, 5, 7 d after therapy. The differences of the above parameters in each group were compared.**Results** There were statistical differences among three groups in the size of ablation zone by CEUS or the gross specimen measurement, the ablation zone of the HA + PV group was the largest. The diameters of ablation lesion measuring by CEUS had no significant difference compared with the specimen gross measurement. The blood level of ALT, AST raised after treatment and got the peak value 1 d after therapy, then declined slowly. They almost back to the baseline 1 week later. There were no significant difference in AST, ALT, ALP, GGT among three groups.**Conclusion** Blocking the portal vein blood flow alone or simultaneously blocking the portal vein and hepatic artery blood flow can effectively increase the diameter and volume of the rabbit liver radiofrequency ablation lesion, and the total blocking effect is the best.

KEY WORDS Radiofrequency ablation; Vascular occlusion; Liver; Rabbit

目前,超声引导下射频消融已成为直径<3 cm肝肿瘤的主要治疗方法之一,特别是对于部分因肝功能储备不足而无法手术的小肝癌患者,超声引导下射频消融已成为首选治疗方案^[1]。但研究^[2]发现对于直径3~5 cm的肝肿瘤,其射频消融术后完全消融率仅45%~70%,而直径>5 cm的肝肿瘤,其完全消融率下降至23%~45%,因此该方法应用范围被局限于较小的肝肿瘤。影响消融的一个重要原因是肿瘤内部及周边丰富的血流灌注导致了散热效应,从而使消融灶体积受到限制。假设在阻断肝血供时联合射频消融,则可能减少散热,增大消融灶体积,从而提高肿瘤消融率。肝脏为肝动脉、门静脉双重供血,故本实验拟通过观察兔肝血流不同阻断情况下射频消融效果,以探讨阻断肝脏血流增强射频消融的应用价值。

材料与方法

一、实验动物及分组

健康成年新西兰大白兔42只,由陆军军医大学第二附属医院实验动物中心提供,雌雄不限,体质量2.2~2.5 kg。分为三组:单纯消融组(NO组)、门静脉阻断联合射频消融组(PV组)和肝动脉、门静脉全阻断联合射频消融组(HA+PV组),每组14只。本实验经我院动物伦理委员会批准。

二、实验仪器及材料

射频消融仪使用1500 X冷循环射频消融系统(美国Rita公司),配备18 G单极消融针,治疗端长度5 mm。超声诊断仪使用VINNO 70彩色多普勒超声诊断仪[飞依诺科技(苏州)有限公司],9L线阵探头,频率4~12 MHz。奥林巴斯CX 22光学显微镜;脂氟显微泡造影剂(陆军军医大学第二附属医院超声科自制),微泡粒径2 μm ,浓度(4~9) $\times 10^{10}/\text{ml}$;速眠新注射液(吉林敦化市圣达动物药品有限公司);2%戊巴比妥钠(美国Sigma-Aldrich公司);4%多聚甲醛(上海经科化学科技有限公司)。

三、实验方法

1. 制备动物模型:实验兔禁食12 h,速眠新0.1 ml/kg臀部肌肉注射,待肌肉松弛后,再沿耳缘静脉注入2%戊巴比妥0.15 ml/kg,而后予以0.2 ml/20 min用量维持麻醉。取仰卧位固定,双后肢内侧备皮后贴电极板,上腹部备皮、消毒、铺巾,随后沿剑突下缘处作横行切口约10 cm,开腹后剪断肝镰状韧带。NO组不行血

管阻断处理;PV组在仔细分离门静脉后,用血管夹夹闭阻断门静脉;HA+PV组夹闭肝十二指肠韧带以阻断肝动脉、门静脉血流。三组经上述处理完成后轻柔暴露兔肝。

2. 射频消融方法:行彩色多普勒超声检查确定入肝血流状态达到预设方案后,选择合适消融区域,于二维超声引导下插入射频消融针,尽量避开肝内较大血管,于距肝包膜表面约1 cm处开始消融,参数设置为80℃、15 W,消融时间1 min。消融结束后,即刻松开PV组和HA+PV组血管夹,再行彩色多普勒超声确定入肝血流恢复正常后关腹。

3. 测量消融灶:①于消融结束24 h后行超声造影检查。每组各取10只实验兔,麻醉后沿上次手术切口开腹暴露肝叶消融部位。B型超声模式下沿消融针道作扇形扫查,观察消融灶范围、形态、边界,而后于最大消融切面固定探头,调至CBI造影模式,静脉团注脂氟显0.05 ml/kg,随后团注2.0 ml生理盐水,于平行针道行扇形扫查寻找最大消融切面,于动脉相测量其左右径及垂直径,随后旋转探头90°,测量消融灶垂直针道切面上下径。②大体消融灶测量:超声造影结束后,经耳缘静脉推注2%戊巴比妥2.0 ml处死实验兔,摘取肝叶,B型超声引导寻找超声造影下平行针道最大消融切面,沿其切开消融灶,观察消融区域,测量消融灶左右径及垂直径。沿消融区域边缘仔细分离凝固型坏死组织,放入预先记录刻度的装水量筒内测量体积。

4. 病理检查:消融结束24 h后,每组各取1只实验兔,切下肝组织(包含消融灶及其周围正常肝组织交界区),生理盐水漂洗干净,浸润于20倍体积4%多聚甲醛溶液中固定至少24 h,然后石蜡包埋制作切片,HE染色后光镜观察。

5. 肝功能检查:每组另取3只实验兔分别于术前和术后1、3、5、7 d抽取兔肝动脉血检测丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(GGT)、谷氨酰转肽酶(ALP)水平,比较各组间上述参数的差异。

四、统计学处理

应用SPSS 19.0统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,经检验均符合正态分布,组间比较行单因素方差分析,若方差齐性,采用LSD法进行两两比较;方差不齐,则采用Tamhane法。组内比较行配对t检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、各组射频消融术后消融灶各径线、体积比较

1. 各组消融灶超声造影测值比较

超声造影模式下各组消融灶均呈类椭圆形血流灌注缺损区域。HA+PV组超声造影测得的左右径、垂直径、上下径均最大, PV组次之, NO组最小, 两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表1和图1。

表1 各组消融灶超声造影测值比较($\bar{x} \pm s$) cm

组别	左右径	垂直径	上下径
NO组	1.36±0.30	0.90±0.14	0.99±1.71
PV组	1.60±0.15 [△]	1.05±0.13 [△]	1.21±0.18 [△]
HA+PV组	1.95±0.24 ^{△*}	1.23±0.09 ^{△*}	1.49±0.18 ^{△*}

与NO组比较, [△] $P < 0.05$; 与PV组比较, ^{*} $P < 0.05$

2. 各组消融灶大体标本测值比较

NO组消融灶平均体积0.85 ml, PV组1.56 ml, HA+PV组2.44 ml。HA+PV组为NO组的2.87倍, PV组为NO组的1.84倍。HA+PV组消融灶左右径、垂直径、体积均最大, PV组次之, NO组最小, 两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表2。各组大体观察均可见肝左叶内不同大小的类椭圆形灰黄色消融灶, 与正常肝组织界限清晰(图2), HA+PV组消融灶范围最大, PV组其次, NO组最小。

3. 超声造影与大体标本测量左右径、垂直径比较

超声造影测得消融灶左右径和垂直径与大体标

本相应测值比较, 差异均无统计学意义, 见表3。

二、各组病理观察

光镜观察示三组病理改变相似, 均可见大片红色凝固性坏死区域, 与周围正常肝小叶存在明显界限, 坏死灶内肝细胞核浓缩、核碎裂, 边缘组织内可见大量炎性细胞浸润, 部分中央静脉淤血(图3)。

三、各组肝功能比较

消融后各组兔AST、ALT测值均于术后1 d达到峰值, 且HA+PV组最高, 随后缓慢回落, 至术后7 d均基本回落至术前水平。三组兔术前与术后各时间点ALP、GGT测值比较差异均无统计学意义; 三组间各时间点ALT、AST、ALP、GGT趋势变化比较差异均无统计学意义。见图4。

表2 各组大体标本消融灶测值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	左右径(cm)	垂直径(cm)	体积(ml)
NO组	1.37±0.30	0.83±0.13	0.85±0.24
PV组	1.63±0.12 [△]	1.05±0.18 [△]	1.56±0.20 [△]
HA+PV组	2.03±0.26 ^{△*}	1.24±0.11 ^{△*}	2.44±0.60 ^{△*}

与NO组比较, [△] $P < 0.05$; 与PV组比较, ^{*} $P < 0.05$

表3 超声造影与大体标本测量测值比较($\bar{x} \pm s$) cm

方法	左右径	垂直径
超声造影测量	1.64±0.34	1.06±0.18
大体标本测量	1.68±0.36	1.04±0.21
t值	-1.274	1.127
P值	0.213	0.269

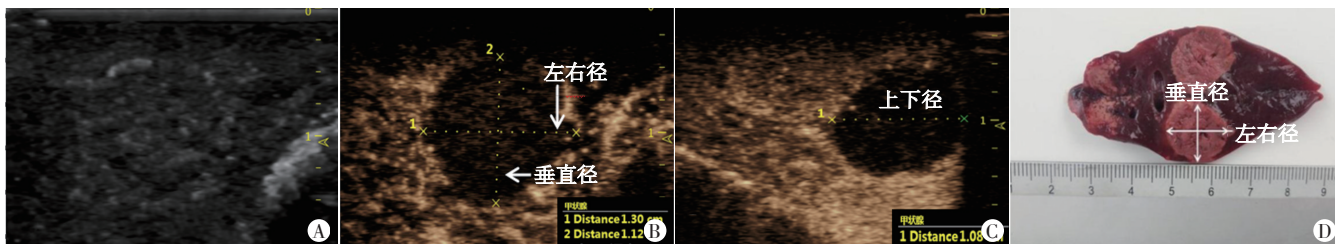
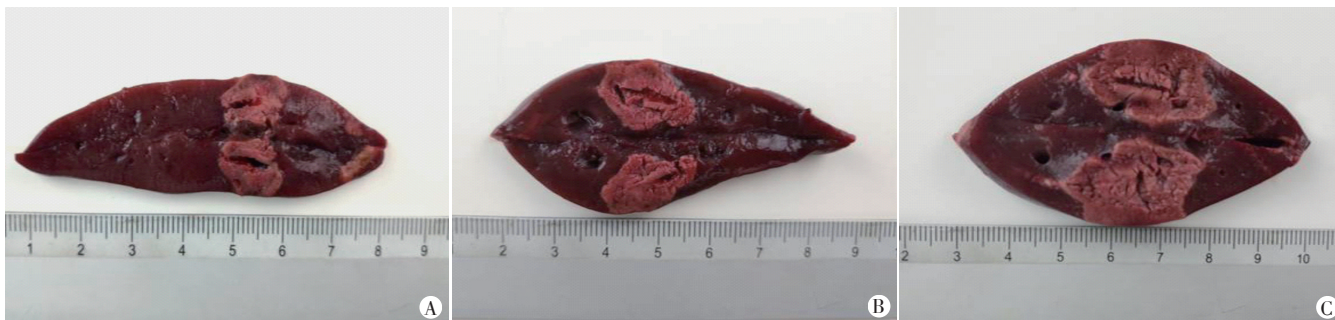


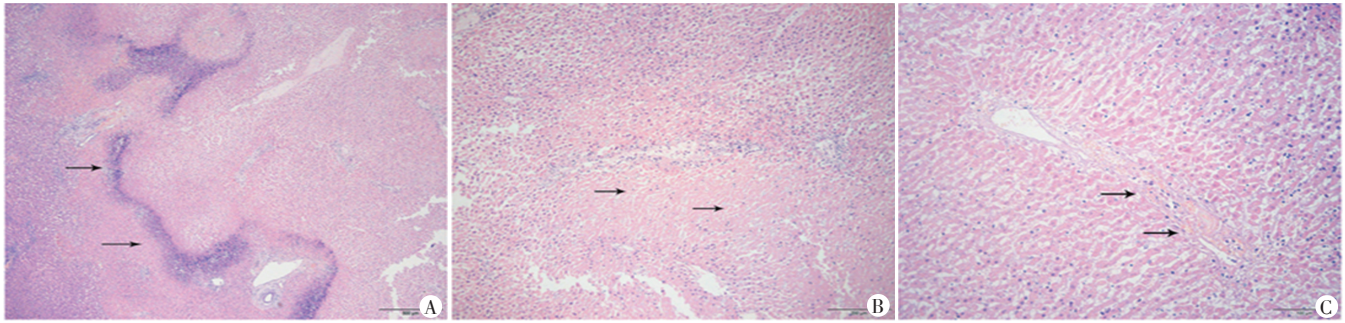
图1 PV组消融灶二维超声、超声造影和大体标本(对切剖面)图像
A: 二维超声示消融灶周边可见高回声充血水肿带, 部分边界不清; B、C: 超声造影示消融灶呈类圆形, 边界清楚, 其内消融完全; D: 大体标本消融灶呈灰黄色, 边界清晰, 左右径1.4 cm, 垂直径1.1 cm

图1 PV组消融灶二维超声、超声造影和大体标本(对切剖面)图像



A: NO组; B: PV组; C: HA+PV组

图2 各组兔肝消融灶大体标本图(对切剖面)



A:可见大片凝固性坏死灶,周边炎性细胞大量浸润(箭头示,×40);B:消融灶肝细胞变性坏死,细胞核固缩、碎裂、溶解(箭头示,×100);C:消融灶中央静脉内可见血栓形成(箭头示,×200)

图3 消融灶病理图(HE染色)

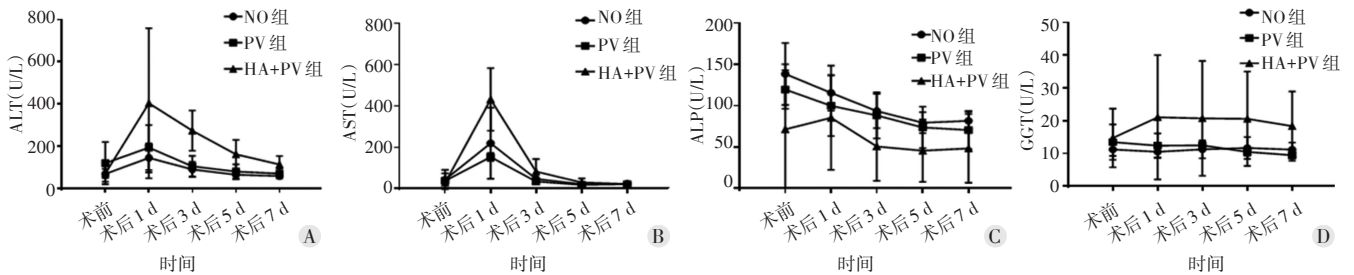


图4 各组ALT、AST、ALP、GGT(A~D)测值变化折线图

讨 论

射频消融通过电极传导电流使周围组织中的离子发生振荡,从而产生热效应致使肿瘤细胞损伤坏死。Goldberg等^[3]研究发现在肿瘤灌注丰富区域,流动的血液可以快速从组织中带走热量,这一散热现象称为“热沉效应”。热沉效应减少了热量聚集和热消融灶体积,限制了射频消融的疗效。临床上也尝试采用多针或多点消融的方法,但对于直径4.4~5.6 cm的肿瘤,需要精确布针4~6个点才能完全覆盖病灶,达到理想的消融效果,这不仅增加了操作的复杂性和创伤性,而且形成的消融灶形态可能不规则^[4]。从肝肿瘤的大体病理形态看,最佳消融方式是形成一个覆盖肿瘤的各类球形消融灶。本实验通过比较兔肝不同血流阻断模式下射频消融效果,旨在探讨入肝血流阻断联合射频消融的应用价值。

正常肝脏75%由门静脉供血。单纯门静脉阻断后,拟消融部位的血流灌注减少,但肝动脉血流仍可部分散热,从而造成消融灶较全阻断小。临床研究^[5]发现,门静脉或肝静脉血流阻断联合射频消融后,可降低最大直径<35 mm且邻近血管>4 mm的肝肿瘤术后18个月原位复发率至11%,虽然这提示单阻断门静脉仍存在热沉效应,但因肿瘤周边及卫星灶多有门静脉供血环绕,其散热作用不容忽视,阻断了门静脉血

供,或通过阻断肝静脉减缓了门静脉流速后,病灶周边及卫星灶可能得到更有效的消融,原位复发率降低。由于兔肝动脉分离牵拉过程中易痉挛,导致大面积肝脏坏死,故本实验未设置单纯肝动脉阻断组。因兔肝较薄,平均厚度仅为1.5~2.0 cm,为真实反映各组消融灶边界,本实验消融时间较短,仅1 min。本实验测量大体标本发现,PV组消融灶体积为NO组的1.84倍,HA+PV组为NO组的2.87倍,且三组间平行针道最大消融切面左右径、垂直径、体积两两比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。由于大体标本无法测量消融灶上下径,故采用超声造影测值统计,结果表明,三组间消融灶上下径两两比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。本实验结果显示,入肝血流全阻断联合射频消融、门静脉阻断联合射频消融均较单纯消融能有效增大消融灶各径线及体积,且全阻断效果最好。与既往实验研究^[6]结果相符,再次验证了阻断肝血流可显著增强射频消融治疗效果。

本实验射频消融术后24 h,二维超声观察到消融灶周围组织充血水肿明显,与周围组织界限不够清晰;而超声造影可清楚显示类圆形消融区域,且本实验研究中三组超声造影测得消融灶平行针道切面左右径、垂直径与大体标本相应测值比较差异均无统计学意义,初步表明消融24 h后,超声造影观察消融灶较二维模式更加清晰,能更好地反映实际消融灶大小。

本实验通过检测实验兔肝功能发现,三组 ALT、AST 水平均于术后 1 d 达到峰值,而后缓慢下降,术后 7 d 基本降至术前水平,以 HA+PV 组最高, PV 组次之, NO 组最低,这提示肝脏射频消融治疗可以引起肝酶谱升高。但各组间 ALT、AST 不同时间点测值比较均未见明显差异,且术后 7 d 均降至术前水平,初步表明入肝血流阻断联合射频消融并未引起严重肝功能损害。ALP 是家族锌金属酶的一部分,其高度浓缩在胆小管的微绒毛及几种其他组织如骨、肠中,在胆汁淤积等情况下升高明显,而本实验中各组 ALP、GGT 测值在术前和术后各时间点比较差异均无统计学意义,说明单纯射频消融及阻断肝血流联合射频消融均未引起明显胆管损伤。

本实验不足在于:①未涉及肝肿瘤模型,而肝肿瘤较正常肝脏供血模型有差异。既往实验研究^[7]证实兔肝 VX2 肿瘤 Pringle 法联合射频消融与单纯射频消融效果有明显区别,但目前尚无动物肿瘤模型下门静脉阻断联合射频消融的研究,下一步可行相关研究。②本实验采用单针射频消融,而目前单极针、双极针乃至多级针均广泛应用于临床,该结论能否适用于非单极针消融模型尚待进一步研究。

既往研究^[8]报道肝动脉化疗栓塞联合射频消融治疗不仅能有效延长肝肿瘤患者平均生存时间,还可扩大消融灶的短径。临床也有学者^[9]尝试在腹腔镜下行 Pringle 法结扎肝十二指肠韧带阻断入肝血流增大消融效果,但操作复杂,费用偏高。也有研究^[10]尝试经颈静脉入路阻断猪肝静脉血流,通过减缓肝动脉、门静脉血流速度降低热沉效应,同样较好地增强了射频消融疗效,但该操作需在 DSA 引导下实施。已有研究^[11]证实超声引导下门静脉穿刺安全性较高,门脉球囊阻断可在超声引导下直接进行,操作实时可控,无长时间辐射损伤。对于临床上较大肝肿瘤拟行射频消融的患者,可探索使用超声引导下穿刺阻断门脉血流方法,并可结合经导管动脉化疗栓塞术治疗,能更好地降低热沉效应,增大射频消融范围,降低术后局部复发率,延长患者生存时间。

综上所述,单独阻断门静脉血流或联合阻断门静

脉、肝动脉血流均能有效增大肝脏射频消融灶各径线及体积,且联合阻断效果最好。该方法可使病灶得到更好的消融,从而降低术后原位复发率,延长肝肿瘤患者的生存时间。

参考文献

- [1] Jacobs A. Radiofrequency ablation for liver cancer[J]. Radiol Technol, 2015, 86(6):645-648.
- [2] Yan K, Chen MH, Yang W, et al. Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: long-term outcome and prognostic factors [J]. Eur J Radiol, 2008, 67(2):336-347.
- [3] Goldberg SN, Hahn PF, Tanabe KK, et al. Percutaneous radiofrequency tissue ablation: does perfusion-mediated tissue cooling limit coagulation necrosis? [J]. J Vasc Interv Radiol, 1998, 9(1):101-111.
- [4] Chen MH, Yang W, Yan K, et al. Large liver tumors: protocol for radiofrequency ablation and its clinical application in 110 patients——mathematic model, overlapping mode, and electrode placement process[J]. Radiology, 2004, 232(1):260-271.
- [5] de Baere T, Deschamps F, Briggs P, et al. Hepatic malignancies: percutaneous radiofrequency ablation during percutaneous portal or hepatic vein occlusion[J]. Radiology, 2008, 248(3):1056-1066.
- [6] Chinn SB, Lee FT Jr, Kennedy GD, et al. Effect of vascular occlusion on radiofrequency ablation of the liver: results in a porcine model[J]. Am J Roentgenol, 2001, 176(3):789-795.
- [7] 韩建波,仇毓东,张炜炜,等.肝脏血流阻断下兔 VX2 肝肿瘤射频消融的疗效观察[J].世界华人消化杂志,2009,17(4):352-356.
- [8] Morimoto M, Numata K, Kondou M, et al. Midterm outcomes in patients with intermediate-sized hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial for determining the efficacy of radiofrequency ablation combined with transcatheter arterial chemoembolization[J]. Cancer, 2010, 116(23):5452-5460.
- [9] Santambrogio R, Costa M, Barabino M, et al. Laparoscopic radiofrequency of hepatocellular carcinoma using ultrasound-guided selective intrahepatic vascular occlusion [J]. Surg Endosc, 2008, 22(9):2051-2055.
- [10] Subrt Z, Ferko A, Hoffmann P, et al. Temporary liver blood-outflow occlusion increases effectiveness of radiofrequency ablation: an experimental study on pigs[J]. Eur J Surg Oncol, 2008, 34(3):346-352.
- [11] 唐启彬,王捷.原发性肝癌术后超声引导下经皮经肝门静脉穿刺化疗安全性分析[J].腹部外科,2015,28(2):90-92.

(收稿日期:2018-12-12)