

· 实验研究 Experimental research ·

射频消融联合骨水泥对兔 VX2 椎旁肿瘤的杀伤作用

冯国栋, 何仕诚, 杜瑞杰, 虞文辉, 朱海东, 方 文, 郭金和, 邓 钢

【摘要】 目的 探讨射频消融(RFA)联合聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥对兔 VX2 腰椎旁肿瘤的杀伤作用。**方法** CT 引导下经皮穿刺成功构建兔 VX2 腰椎旁移植瘤模型 48 只,随机分为 4 组,每组 12 只。A 组兔模型瘤灶中心先行 RFA,后注入骨水泥 0.5 ml;B 组单纯注入骨水泥 0.5 ml;C 组单纯 RFA;D 组注入生理盐水 0.5 ml,作为对照组。术后 24 h 处死全部 4 组模型兔,分别在瘤灶中心或距骨水泥边缘 5、10、15、20 mm 处不同方向各取 2 mm 大小组织块 4 块,检测肿瘤细胞凋亡指数。**结果** A、B、C 组手术成功率均为 91.7%(11/12),D 组为 100%(12/12)。A、C 组瘤灶中心半径 10 mm 范围内肿瘤细胞呈大片状凝固性坏死,细胞形态消失,几乎检测不出凋亡存在。A 组距骨水泥边缘 10、15、20 mm 处平均肿瘤细胞凋亡率分别为 $(69.48 \pm 1.27)\%$ 、 $(59.05 \pm 3.02)\%$ 、 $(21.03 \pm 2.20)\%$,与对照组 $(10.25 \pm 0.79)\%$ 相比差异均有统计学意义 ($P < 0.01$);B 组距骨水泥边缘 5、10、15 mm 处平均肿瘤细胞凋亡率分别为 $(62.52 \pm 2.07)\%$ 、 $(45.07 \pm 3.14)\%$ 、 $(17.41 \pm 1.12)\%$,与对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),而 20 mm 处平均肿瘤细胞凋亡率为 $(11.15 \pm 0.97)\%$,与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.01$);C 组距瘤灶中心 10、15、20 mm 处平均肿瘤细胞凋亡率分别为 $(67.74 \pm 3.33)\%$ 、 $(56.36 \pm 3.63)\%$ 、 $(20.71 \pm 1.11)\%$,与 B 组、D 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$),与 A 组相比差异无统计学意义 ($P > 0.01$)。**结论** RFA 和骨水泥均可促进肿瘤细胞凋亡,RFA 杀伤肿瘤范围更大,RFA 联合骨水泥对肿瘤杀伤作用无明显增强。

【关键词】 聚甲基丙烯酸甲酯;射频消融;兔;VX2 肿瘤;凋亡

中图分类号:R681.53 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2016)-06-0519-05

The killing effect of radiofrequency ablation combined with polymethylmethacrylate injection on paravertebral VX2 carcinoma in experimental rabbits FENG Guo-dong, HE Shi-cheng, DU Rui-jie, YU Wen-hui, ZHU Hai-dong, FANG Wen, GUO Jin-he, DENG Gang. Department of Radiology, Affiliated Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing, Jiangsu Province 210009, China

Corresponding author: HE Shi-cheng, E-mail: shichenghe@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the killing effect of radiofrequency ablation (RFA) combined with polymethylmethacrylate (PMMA) injection on paravertebral VX2 tumor in experimental rabbits. **Methods** The paravertebral VX2 tumor model was successfully established by using CT-guided puncture inoculation of VX2 tumor in 48 rabbits. The rabbits were equally and randomly divided into 4 groups with 12 rabbits in each group. Rabbits of group A received RFA first, which was followed by subsequent injection of 0.5ml PMMA. Rabbits of group B received injection of 0.5 ml PMMA only. Rabbits of group C received RFA only. Rabbits of group D (used as the control group) only received injection of 0.5 ml saline. All the experimental rabbits were sacrificed 24 hours after the treatment, and in each rabbit 4 pieces of 2 mm sized tissue were taken from the tumor center or separately taken from 4 different sites, that were 5, 10, 15 and

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2016.06.013

基金项目:国家自然科学基金(81171434)、江苏省临床医学科技专项项目(BL2013029)

作者单位:210009 南京 东南大学附属中大医院放射科(冯国栋、杜瑞杰、虞文辉)、介入与血管外科(何仕诚、朱海东、方 文、郭金和、邓 钢)

通信作者:何仕诚 E-mail: shichenghe@vip.sina.com

20 mm away from PMMA edge, in order to test the tumor cell apoptosis index. **Results** Technical success rate was 91.7% (11/12) in all group A, B and C, and in group D the technical success rate was 100%. In group A and C, large patchy coagulation necrosis of tumor cells was observed within 10 mm range from the tumor center, the cells lost their morphology, and almost no apoptosis could be detected. In group A, the mean tumor cell apoptosis rates at the sites 10, 15 and 20 mm away from PMMA edge were $(69.48 \pm 1.27)\%$, $(59.05 \pm 3.02)\%$ and $(21.03 \pm 2.20)\%$ respectively, which was $(10.25 \pm 0.79)\%$ in group D; the difference between group A and group D was statistically significant ($P < 0.01$). In group B, the mean tumor cell apoptosis rates at the sites 5, 10 and 15 mm away from PMMA edge were $(62.52 \pm 2.07)\%$, $(45.07 \pm 3.14)\%$ and $(17.41 \pm 1.12)\%$ respectively, and the difference between group B and group D was statistically significant ($P < 0.01$); the mean tumor cell apoptosis rate at the site 20 mm away from PMMA edge was $(11.15 \pm 0.97)\%$, which was not significantly different from that of the group D ($P > 0.01$). In group C, the mean tumor cell apoptosis rates at the sites 10, 15 and 20 mm away from tumor's center were $(67.74 \pm 3.33)\%$, $(56.36 \pm 3.63)\%$ and $(20.71 \pm 1.11)\%$ respectively, and the differences between group C and groups B and D were statistically significant ($P < 0.01$), but the difference between group C and group A was not statistically significant ($P > 0.01$). **Conclusion** Both RFA and PMMA injection can promote tumor cell apoptosis, and the tumor-killing extent of RFA is larger. The killing effect on paravertebral VX2 tumor of rabbits is not obviously enhanced by combination use of RFA and PMMA injection. (J Intervent Radiol, 2016, 25: 519-523)

【Key words】 polymethylmethacrylate; radiofrequency ablation; rabbit; VX2 carcinoma; apoptosis

经皮椎体成形术(PVP)通过经皮穿刺向肿瘤破坏区注入聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA,骨水泥)可迅速缓解疼痛、加固病变椎体并对局部肿瘤有一定杀伤作用,已成为脊柱转移性肿瘤重要治疗手段。近年有学者采用射频消融(RFA)联合PVP治疗恶性骨肿瘤获得较好临床疗效^[1-2],但联合治疗是否优于单纯PVP尚未得到充分验证。本实验构建兔VX2腰椎旁移植瘤模型并施行CT导引下RFA联合骨水泥注入,以探究对肿瘤细胞的杀伤作用。

1 材料与方法

1.1 实验器材

实验器材包括新西兰大白兔 62 只(3~4 个月龄,体重 2.5~3.5 kg,雌雄不限,东南大学动物实验中心提供,实验动物许可证号:SYXK 苏 2010-0004)、VX2 肿瘤株(东南大学分子影像与功能影像实验室提供)、18 G 血管穿刺针及平头探子等附件(美国 Cook 公司)、3.0 T Verio MRI 机(德国 Siemens 公司)、螺旋 CT 机(美国通用公司)、1500X 型射频消融系统及 10 cm 长单极电极针(有效消融范围为 2 cm,美国 RITA 医疗系统公司)、骨水泥(意大利 Tecres SPA 公司)、苏木精-伊红(HE,上海碧云天生物技术有限公司)、4%甲醛溶液(东南大学附属中大医院病理科)及脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)原位细胞凋亡检测试剂盒(瑞士 Roche 公司)。

1.2 兔 VX2 腰椎旁肿瘤模型构建

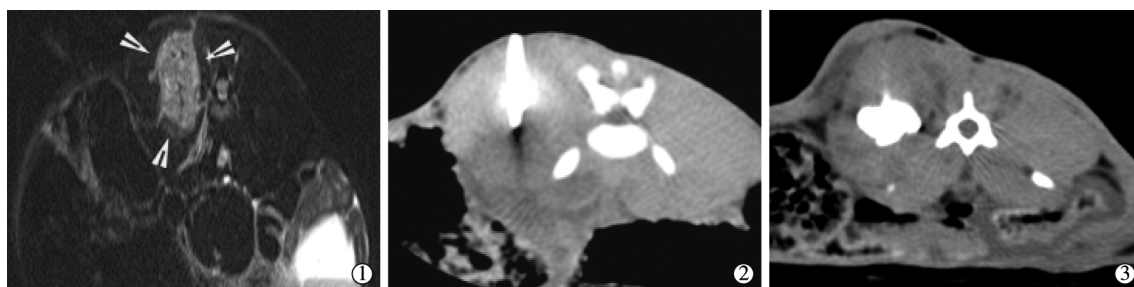
VX2 肿瘤株经兔大腿部肌肉成瘤传代,待荷瘤

兔瘤体长至 2.0~3.0 cm 后以外科无菌方法剥离出肿瘤,去除瘤周组织,取靠近中心鱼肉样组织剪成约 1 mm³大小碎块,置于 4℃ 生理盐水中备用;1%戊巴比妥钠(3 ml/kg)经耳缘静脉麻醉实验兔,CT 平扫选取腰2或腰3椎旁竖脊肌中心作为目标穿刺层面,穿刺点周围皮肤消毒后 18 G 穿刺针穿刺入竖脊肌中心,CT 确认后用平头探子推送入瘤块 2 块,并用 1 cm 长明胶海绵条封堵针道。术后第 2、3、4 周分别作 MRI 检测,肿瘤生长至 2.0~3.0 cm 大小为建模成功(图 1①)。

1.3 手术步骤与评价

共计 48 只兔 VX2 腰椎旁肿瘤模型构建成功,随机分为 A 组(骨水泥联合 RFA)、B 组(单纯骨水泥)、C 组(单纯 RFA)、D 组(生理盐水,对照组),每组 12 只。1%戊巴比妥钠(3 ml/kg)经耳缘静脉麻醉兔模型并固定下腰部,CT 导引下将射频电极针刺至 A 组、C 组兔模型瘤灶中心(图 1②),连接射频发生仪,输出功率由 1 W 开始序贯增加至 35 W,检测到针尖温度达 95℃ 时开始计时,持续 5 min 后停止射频;A 组消融后随即向瘤灶中心注入骨水泥 0.5 ml(图 1③)。B 组麻醉后单纯注入骨水泥 0.5 ml,D 组仅注射生理盐水 0.5 ml。骨水泥按临床常用比例调配后约 2 min 开始注入^[3]。

术后 24 h 处死全部 4 组模型兔,分别在瘤灶中心或骨水泥边缘 5、10、15、20 mm 处不同方向各取 2 mm 大小组织块 4 块,4%甲醛固定后分别作 HE 染色及 TUNEL 染色,检测肿瘤细胞凋亡指数(AI)。



①模型建构后 MR T2 加权像示椎旁肌内约 3 cm 软组织实体肿瘤,中心尚未见明显坏死形成;②RFA 针(单极针)穿刺入瘤灶中心,并按预定参数作消融;③A 组兔模型 RFA 后立即注入骨水泥 0.5 ml,骨水泥浓聚于瘤灶中心,未见明显皮下及针道外溢

图 1 兔 VX2 腰椎旁肿瘤模型构建及 RFA、骨水泥实验影像

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。B 组与 D 组间 5 mm 观测点处肿瘤细胞凋亡率差异用独立样本 t 检验,余观测点各组间总体差异用方差分析,组间两两比较用最小显著性差异(LSD)法,手术成功率比较用 Fisher 精确检验, $P<0.01$ 认为差异有显著统计学意义。

2 结果

62 只实验兔中 48 只于植入 VX2 瘤块后 4 周成功构建 VX2 腰椎旁肿瘤模型,建模成功率为 77.4%,均无后肢瘫痪发生。MRI 测得兔模型瘤体长径为(2.75 ± 0.28) cm,短径为(2.43 ± 0.24) cm。穿刺 48 只模型腰椎旁瘤体中心均获成功, A、B 两组分别注入骨水泥 0.5 ml,均凝聚于瘤体内,无外渗。48 只模型兔存活至观测终点共 45 只,均无后肢瘫痪发生。A、B、C 组术中麻醉各死亡 1 只,手术成功率均为 91.7%(11/12), D 组手术成功率 100%(12/12), A、B、C 组与 D 组手术成功率差异无统计学意义($P=0.563$)。

术后 24 h 处死各组模型兔,分别取肿瘤标本。组织 HE 染色检查显示, A、C 组瘤灶中心半径 10 mm 范围内肿瘤细胞呈大片状凝固性坏死,细胞形态消失,几乎检测不出凋亡存在(图 2); B 组瘤灶近中心区域呈凝固坏死,混合有肿瘤细胞形态(图 3)。TUNEL 荧光染色检查显示见图 4,不同观测点处肿瘤细胞凋亡率见表 1。数据统计结果显示, A 组距骨水泥边缘 10、15、20 mm 处平均肿瘤细胞凋亡率分别为(69.48 ± 1.27)%、(59.05 ± 3.02)%、(21.03 ± 2.20)%,与对照组(10.25 ± 0.79)%相比差异均有统计学意义($P<0.01$); B 组距骨水泥边缘 5、10、15 mm 处平均肿瘤细胞凋亡率分别为(62.52 ± 2.07)%、(45.07 ± 3.14)%、(17.41 ± 1.12)%,与对照组相比差异均有统计学意义($P<0.01$),而 20 mm 处平均肿瘤细胞凋亡率为(11.15 ± 0.97)%,与对照组相比差异无统计学意义($P>0.01$); C 组距瘤灶中心 10、15、20 mm 处平均肿瘤细胞凋亡率分别为(67.74 ± 3.33)%、(56.36 ± 3.63)%、(20.71 ± 1.11)%,与 B 组、D 组相比差异有统计学意义($P<0.01$),与 A 组相比差异无统计学意义($P>0.01$)。

表 1 4 组兔模型瘤体内不同观测点处肿瘤细胞凋亡率

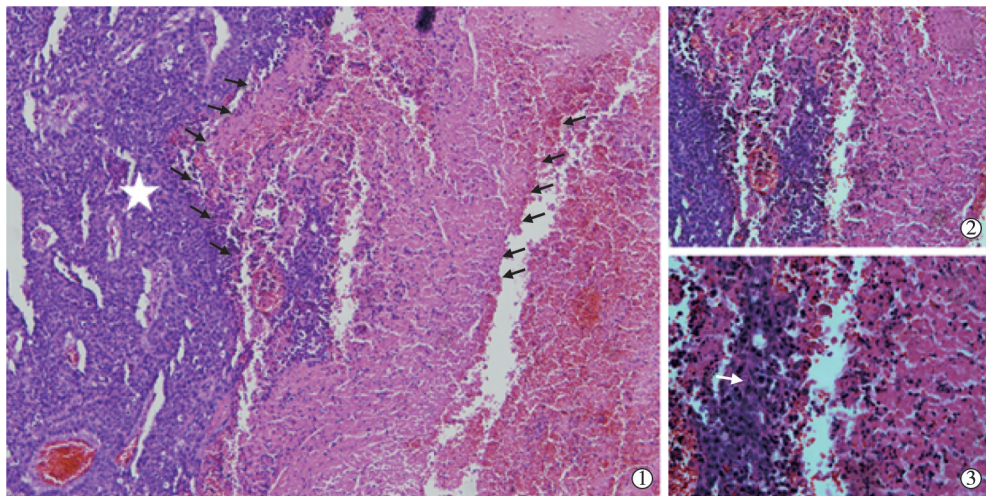
观测点	肿瘤细胞凋亡率(%)				A 组与 B 组		A 组与 C 组		A 组与 D 组		B 组与 C 组		B 组与 D 组		C 组与 D 组		F 值
	A 组	B 组	C 组	D 组	P 值	P 值	P 值	P 值	P 值	P 值	P 值	P 值	P 值	P 值	P 值	P 值	
5 mm	凝固坏死	62.52 ± 2.07	凝固坏死													0.005	
10 mm	69.48 ± 1.27	45.07 ± 3.14	67.74 ± 3.33	10.25 ± 0.79	<0.01	0.094	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	1556.55	
15 mm	59.05 ± 3.02	17.41 ± 1.12	56.36 ± 3.63		<0.01	0.013	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	1244.52	
20 mm	21.03 ± 2.20	11.15 ± 0.97	20.71 ± 1.11		<0.01	0.591	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.123	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	207.96	

3 讨论

3.1 选择兔 VX2 腰椎旁肿瘤模型的原因

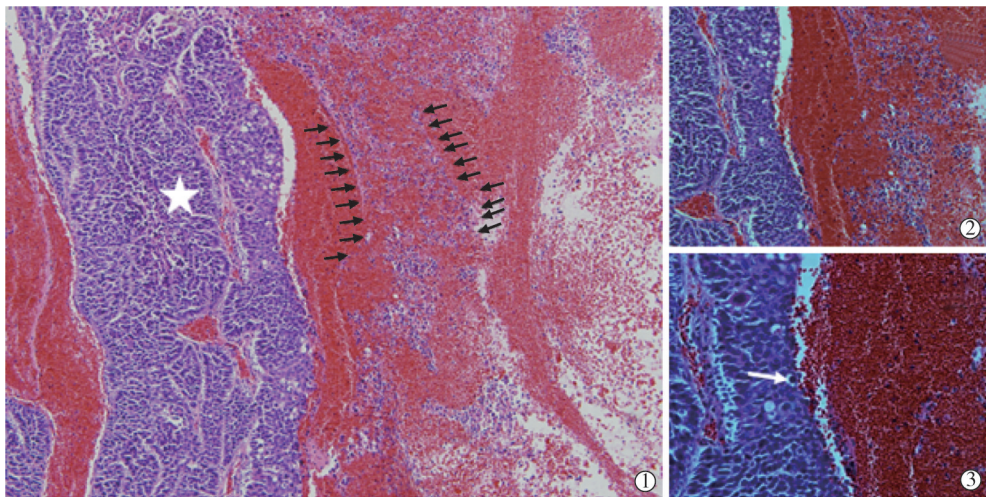
凌龙等^[4]报道通过腰椎体侧后缘与椎弓根交界处穿刺植入 VX2 肿瘤组织块构建脊椎肿瘤模型,成功率可达 76%,但出现后肢瘫痪平均时间仅为 22 d;

黄昊等^[5]采用前述方法成功构建兔 VX2 脊椎肿瘤模型 18 只,15 只出现后肢瘫痪。陈珑等^[6]研究兔 VX2 脊柱肿瘤模型经 RFA 后温度变化,术后 8 只模型兔尚未苏醒即死亡 2 只,6 只均出现后肢功能障碍。本实验若继续沿用兔椎体内移植肿瘤模型,多



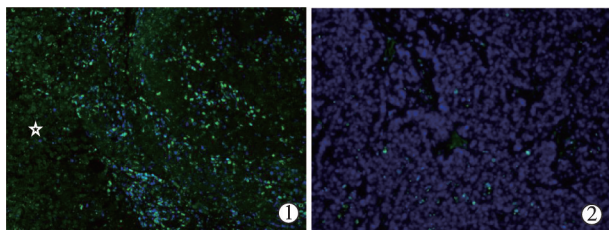
①HE 染色($\times 100$)示中心区域肿瘤细胞大片坏死(黑箭头),细胞形态难以辨认,外围为肿瘤细胞活跃区域(白星);②HE 染色($\times 200$)示临界区肿瘤细胞坏死与肿瘤细胞活跃相互交错,边界不清;③HE 染色($\times 400$)示坏死区边缘肿瘤细胞内存在大量小圆形染色较深的凋亡小体(白箭头)。注:C 组标本 HE 染色所示与 A 组大致相仿

图 2 A 组(RFA 联合骨水泥)兔模型组织病理学检查图像



①HE 染色($\times 100$)示充血区域中有尚存细胞形态的凝固性坏死(黑箭头)和肿瘤细胞活跃区域(白星);②HE 染色($\times 200$)示坏死区域与肿瘤细胞活跃区边界清晰;③HE 染色($\times 400$)示肿瘤细胞边缘坏死细胞内散在凋亡小体(白箭头)

图 3 B 组(单纯骨水泥)兔模型组织病理学检查图像



①A 组距瘤灶中心 10 mm 范围内可见细胞数目较少,但仍可见由中心向外(白星)逐渐增多的 TUNEL 染色阳性凋亡细胞(绿色);②D 组可见散在少量凋亡染色阳性细胞

图 4 VX2 瘤体标本 TUNEL 染色镜下表现($\times 200$)

数模型兔实验前出现后肢瘫痪就难以评价 RFA 对脊神经影响,而 RFA 针消融范围为 2 cm 必定损伤脊神经。为此,我们采用 CT 导引下经皮穿刺椎旁肌植入 VX2 瘤块构建兔 VX2 椎旁肿瘤模型,建模成

功率达 77.4%,48 只模型兔后肢均未发生瘫痪,便于观察评价椎旁肌内肿瘤 RFA 对脊神经的影响。

既往凌龙等^[4]、黄昊等^[5]、黄权等^[7]报道的椎体肿瘤模型在影像学上均未能确切地测得瘤体大小,4 周时瘤体大小也不稳定。苏静等^[8]研究发现兔肌内植入 VX2 瘤粒约 28 d 时瘤体大小约为 2.5 cm,本实验 48 只兔腰椎旁植入 VX2 瘤块后 28 d MRI 显示瘤体稳定在 2~3 cm,适合所选用射频针有效消融范围 2 cm 的要求。Wang 等^[9]研究表明 VX2 肿瘤自然生长 4 周内无明显坏死(即细胞自然凋亡作用较小),故将 28 d 时模型兔设置为对照组,可避免肿瘤自然凋亡干扰。

3.2 RFA 联合骨水泥对 VX2 肿瘤的杀伤作用

黄昊等^[5]在兔腰椎肿瘤破坏区内注入骨水泥 0.3 ml, 渗漏发生率高达 40% (4/10), 可能与瘤体偏小有关, 故建议兔 VX2 脊椎肿瘤内骨水泥注入量不宜超过 0.3 ml, 注入骨水泥 0.1 ml 对 VX2 肿瘤细胞杀伤范围为 5~10 mm, 注入 0.3 ml 则为 10~15 mm, 提示一定范围内增加骨水泥注射量可增加肿瘤细胞杀伤范围。本实验 A、B 两组注入骨水泥 0.5 ml 均未发现骨水泥渗漏发生, 可能与瘤体较大 (2~3 cm) 有关; 对 VX2 肿瘤细胞杀伤范围为 10~20 mm, 亦支持增加骨水泥注射量可提高肿瘤细胞杀伤作用的观点。

RFA 热效应可使肿瘤组织凝固坏死, 促进肿瘤细胞凋亡^[10]。多数学者认为 RFA 联合骨水泥既扩大肿瘤杀伤范围, 又兼顾骨水泥加固作用^[1, 11-12]。但联合应用对肿瘤杀伤作用是否优于单纯骨水泥, 迄今尚未得到充分验证。另外, RFA 治疗脊椎肿瘤发生脊神经损伤风险较高, 尤其是对伴发椎体附件转移患者无法实施 RFA^[12-13]。Nakatsuka 等^[1]报道采用骨水泥联合 RFA 治疗 17 例脊椎肿瘤患者, 术后 4 例出现不全瘫痪, 均为椎体后缘或椎弓根遭破坏者。Dupuy 等^[14]研究发现 RFA 治疗椎体时椎管组织温度接近 45℃, 可造成脊髓和神经细胞毒性损害。Zheng 等^[15]则认为 RFA 治疗椎体时应将椎管内温度严格控制于 42℃ 以下。目前临床上对椎体转移瘤 RFA 多控制温度于 95℃ 左右, 持续时间 4~6 min。本实验射频针有效消融范围为 2 cm, 温度控制于 95℃, 时间为 5 min, 对兔 VX2 腰椎旁肿瘤模型 RFA 治疗结果显示中心半径 10 mm 区域内肿瘤几乎完全坏死, 距瘤灶中心半径 10、15、20 mm 处肿瘤细胞凋亡率均显著高于单纯骨水泥注入, 提示 RFA 可有效增加骨水泥对肿瘤的杀伤范围。本实验 22 只兔 VX2 腰椎旁肿瘤模型经 RFA 均无后肢瘫痪发生, 提示 RFA 治疗脊椎骨性结构以外软组织肿瘤引起脊神经损伤的风险较低。

总之, RFA 和骨水泥注入均可促进肿瘤细胞凋亡, 射频消融杀伤肿瘤范围更大, RFA 联合骨水泥对肿瘤杀伤作用无明显增强。

[参考文献]

- [1] Nakatsuka A, Yamakado K, Maeda M, et al. Radiofrequency ablation combined with bone cement injection for the treatment of bone malignancies[J]. J Vasc Interv Radiol, 2004, 15: 707-712.
- [2] Schaefer O, Lohmann C, Herling M, et al. Combined radiofrequency thermal ablation and percutaneous cementoplasty treatment of a pathologic fracture[J]. J Vasc Interv Radiol, 2002, 13: 1047-1050.
- [3] 何仕诚, 滕皋军, 方文, 等. PVP 联合动脉栓塞化治疗复杂性脊柱转移肿瘤[J]. 中华医学杂志, 2011, 91: 175-179.
- [4] 凌龙, 何仕诚, 黄昊, 等. 影像学对经皮穿刺兔脊柱 VX2 肿瘤模型的检测价值探讨[J]. 中华医学杂志, 2013, 93: 3131-3134.
- [5] 黄昊, 何仕诚, 冯国栋, 等. 骨水泥对兔脊柱 VX2 肿瘤转移模型的作用研究[J]. 介入放射学杂志, 2015, 24: 520-523.
- [6] 陈珑, 倪才方, 王艳伟, 等. 经皮射频消融术治疗椎体肿瘤术中温度变化的活体实验研究[J]. 介入放射学杂志, 2014, 23: 427-430.
- [7] 黄权, 杨兴海, 肖建如, 等. 兔 VX2 瘤脊柱转移动物模型的实验研究[J]. 脊柱外科杂志, 2011, 9: 117-120.
- [8] 苏静, 陈文直, 王嫣, 等. 兔 VX2 肌肉肿瘤模型的建立及生物学特性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12: 2129-2132.
- [9] Wang L, Yao Q, Wang J, et al. MRI and hybrid PET/CT for monitoring tumour metastasis in a metastatic breast cancer model in rabbit[J]. Nucl Med Commun, 2008, 29: 137-143.
- [10] Rai R, Richardson C, Flecknell P, et al. Study of apoptosis and heat shock protein (HSP) expression in hepatocytes following radiofrequency ablation (RFA)[J]. J Surg Res, 2005, 129: 147-151.
- [11] Munk PL, Murphy KJ, Gangi A, et al. Fire and ice: percutaneous ablative therapies and cement injection in management of metastatic disease of the spine[J]. Semin Musculoskeletal Radiol, 2011, 15: 125-134.
- [12] Gronemeyer DH, Schirp S, Gevargiz A. Image-guided radiofrequency ablation of spinal tumors: preliminary experience with an expandable array electrode[J]. Cancer J, 2002, 8: 33-39.
- [13] Callstrom MR, Charboneau JW, Goetz MP, et al. Image-guided ablation of painful metastatic bone tumors: a new and effective approach to a difficult problem[J]. Skeletal Radiol, 2006, 35: 1-15.
- [14] Dupuy DE, Hong R, Oliver B, et al. Radiofrequency ablation of spinal tumors: temperature distribution in the spinal canal[J]. AJR Am J Roentgenol, 2000, 175: 1263-1266.
- [15] Zheng L, Chen Z, Sun M, et al. A preliminary study of the safety and efficacy of radiofrequency ablation with percutaneous kyphoplasty for thoracolumbar vertebral metastatic tumor treatment[J]. Med Sci Monit, 2014, 20: 556-563.

(收稿日期: 2015-12-27)

(本文编辑: 边 伟)