

射频消融对复发性肝细胞癌外周血循环肿瘤细胞的影响

池达智, 张刚庆, 王红兵, 高鹏, 郑权, 方驰华, 陈规划

池达智, 南方医科大学珠江医院急诊外科 广东省广州市 510282

张刚庆, 王红兵, 高鹏, 中山大学博士后科研基地-广东省第二人民医院普外科 广东省广州市 510317

方驰华, 南方医科大学珠江医院肝胆外科 广东省广州市 510282

陈规划, 中山大学附属第三临床医学院器官移植科 广东省广州市 510000

作者贡献分布: 池达智与张刚庆对此文所作贡献均等; 此课题由张刚庆, 方驰华及陈规划设计; 研究过程由张刚庆, 池达智, 王红兵, 高鹏, 郑权及方驰华操作完成; 研究所用试剂及实验材料由张刚庆提供; 数据分析由池达智, 张刚庆及王红兵完成; 本论文写作由池达智, 张刚庆及王红兵完成。

通讯作者: 张刚庆, 510317, 广东省广州市石榴岗路1号大院, 广州中山大学博士后科研基地-广东省第二人民医院普外科。zhanggq@hotmail.com

电话: 020-89168084 传真: 020-89168084

收稿日期: 2007-11-23 修回日期: 2008-03-16

Effect of radiofrequency ablation on the circulating hepatic carcinoma cells in peripheral blood of patients with recurrent hepatocellular carcinoma

Da-Zhi Chi, Gang-Qing Zhang, Hong-Bing Wang, Peng Gao, Quan Zheng, Chi-Hua Fang, Gui-Hua Chen

Da-Zhi Chi, Department of Emergency Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Gang-Qing Zhang, Hong-Bing Wang, Peng Gao, Quan Zheng, Department of General Surgery, the Second People's Hospital of Guangdong Province; Postdoctoral Workstation of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510317, Guangdong Province, China

Chi-Hua Fang, Department of Organ Transplantation, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Gui-Hua Chen, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Third Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China

Correspondence to: Dr. Gang-Qing Zhang, Department of General Surgery, the Second People's Hospital of Guangdong Province; Postdoctoral Workstation of Sun Yat-sen University, 1 Shiliugang Road, Guangzhou 510317, Guangdong Province, China. zhanggq@hotmail.com

Received: 2007-11-23 Revised: 2008-03-16

Abstract

AIM: To observe the change of hepatoma carcinoma cells (HCC) in the peripheral blood of recurrent hepatocellular carcinoma patients undergoing radiofrequency ablation.

METHODS: Peripheral blood samples were collected from 23 patients with recurrent hepatocellular carcinoma before and 1 and 3 d after radiofrequency ablation and 5 healthy volunteers. Circulating hepatic carcinoma cells were separated by immunomagnetic beads (IMB) technique and identified by conventional pathology and immunocytochemistry.

RESULTS: Before radiofrequency ablation, 15 (65.22%) out of the 23 patients with recurrent hepatocellular carcinoma were positive for hepatic carcinoma cells in peripheral blood. One and 3 d after radiofrequency ablation, 13 (56.52%) and 6 (26.09%) out of the 23 patients with recurrent hepatocellular carcinoma were positive hepatic carcinoma cells in peripheral blood respectively. There was no significant difference in the positive rates before and 1 d after radiofrequency ablation. The positive rates were significantly different before and 3 days after radiofrequency ablation ($P < 0.05$). There was also a significant difference in the positive rates 1 and 3 d after radiofrequency ablation ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Radiofrequency ablation may effectively prevent hematogenous dissemination of hepatocellular carcinoma cells in peripheral blood.

Key Words: Recurrent hepatocellular carcinoma; Radiofrequency ablation; Immunomagnetic bead; Circulated carcinoma cell

Chi DZ, Zhang GQ, Wang HB, Gao P, Zheng Q, Fang CH, Chen GH. Effect of radiofrequency ablation on the circulating hepatoma carcinoma cells in peripheral blood of patients with recurrent hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(14): 1581-1584

摘要

目的: 探讨射频消融术治疗复发性肝细胞癌对外周血肝癌细胞的影响。

方法: 分别采集23例复发性肝细胞癌患者射频消融治疗前、后和5位健康对照者外周血, 免疫磁珠技术分离血中游离肝癌细胞, 常规病理和AFP免疫组化染色验证分离到的肝癌细胞。

■背景资料

原发性肝细胞癌术后复发率高, 其主要原因就在于肝癌具有血行性转移的特点, 肿瘤细胞脱落进入血液循环系统中, 导致转移和复发, 检测血液中的循环肿瘤细胞存在情况, 了解其与术后复发转移的关系, 可为防止肝癌的血行播散提供理论依据和方法。

■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

■创新盘点

本研究从外周血肿瘤细胞的变化来研究射频消融治疗复发性肝癌的作用和机制,发现射频消融可以减少患者外周血肿瘤细胞数量。

结果: 23例复发性肝癌患者,术前外周血肝癌细胞阳性15例(65.22%),射频消融治疗1次后第1、3天,外周血肝癌细胞阳性分别为13例(56.52%)和6例(26.09%)。射频消融治疗前和治疗后1 d的阳性率比较,差异无统计学意义;而治疗前和治疗后3 d、治疗后1 d和3 d的阳性率比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

结论: 射频消融治疗复发性肝癌可以有效地预防或阻止肝癌血行播散。

关键词: 复发性肝癌; 射频消融; 免疫磁珠; 循环肿瘤细胞

池达智, 张刚庆, 王红兵, 高鹏, 郑权, 方驰华, 陈规划. 射频消融对复发性肝细胞癌外周血循环肿瘤细胞的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(14): 1581-1584

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1581.asp>

0 引言

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见恶性肿瘤之一,占我国恶性肿瘤死亡率第2位。手术切除后5年复发率54.1%-61.5%^[1-2],尽管近年来由于各种微创穿刺局部疗法如经皮无水酒精注射(percutaneous ethanol injection, PEI)、激光、微波、冷冻、高强度超声聚焦、射频消融(radiofrequency ablation, RFA)^[3]及经皮肝动脉化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)等治疗方法的进步,可使部分术后复发、转移的患者接受再次治疗,缓解病情,但其疗效有限,再次复发转移仍严重影响患者的生存,疗效不佳的主要原因就在于肝癌具有血行性转移的特点,肿瘤细胞脱落进入血液循环系统中,导致转移和复发^[4]。本研究拟利用免疫磁珠细胞分选技术,检测射频消融术治疗复发性肝癌前后血液中的循环肿瘤细胞存在情况,了解其术后复发转移的发生机制,为防止肝癌的血行播散提供理论依据和方法。

1 材料和方法

1.1 材料 包被羊抗鼠IgG的免疫磁珠M450,挪威Dyna公司生产;磁性细胞分离器、温控式WE27568多极射频肿瘤消融仪为北京为尔福电子产品;Toshiba 240二维灰阶超声诊断仪、彩色多普勒超声诊断仪,日本东芝公司出品。

1.2 方法 静脉注射镇痛剂和局部麻醉下由超声导向穿刺将电极插入肿瘤内,按消融范围必须覆盖病灶周边5-10 mm非瘤肝组织的原则,适度推出子针开始消融。设定初始温度为70℃,最终

温度为95℃,功率输出时间10 min。单针单点穿刺用于 ≤ 3 cm的肿瘤,对直径超过3 cm者行多针多点穿刺,一次功率输出结束后必要时将电极退出1.5 cm,再作另一次消融。治疗过程中观测温度曲线,记录达到初始温度的所需时间(升温时间)以及达到初始温度后持续至少5 min的温度(治疗温度)。

1.2.1 标本采集和处理: 术前在未经过任何治疗前和在手术结束送病房后1、3 d,分别抽取肝细胞癌患者外周静脉血5.0 mL于抗凝管中,充分接触抗凝试剂后,将抗凝血移入试管中,加入60 mL/L HES 200/0.5 mL,在4℃冰箱中静置60 min,沉淀红细胞,取上清,移入另一试管中备用。

1.2.2 免疫磁性微珠的制备、标记和分离: 磁珠经⁶⁰Co照射灭菌,用0.05 mol/L pH3.6 HAc-Nac缓冲液洗2遍后,按每毫克磁珠加入10 mg碳二亚胺混匀,加鼠抗人肝癌的单抗HAbl8(抗体:磁珠=50 μ g:1 mg),室温下缓慢摇动4 h,磁场中去上清,除去未结合的单抗,用0.01 mol/L pH7.4 PBS洗涤2次,再加入含5 g/L BSA(牛血清白蛋白)的PBS封闭磁珠表面未被结合的活性基因,即得免疫磁珠,4℃保存备用。按照每10 mL血标本加入300 μ L免疫磁珠的比例,将分离所得的单个核细胞与磁珠混匀,4℃孵育30 min,用分离Buffer离心洗涤2次,再用分离Buffer溶成1 mL细胞悬液备用。将磁性分离柱置于磁珠细胞分离仪的磁场中,用500 μ L已排过气的分离Buffer冲洗柱子;将磁场标记的细胞悬液通过磁性分离柱,用缓冲液冲洗柱子2遍;将磁性分离柱从磁场中移开,置于1.5 mL Eppendorf管中,用稀释缓冲液洗脱柱内细胞,将收集的肿瘤细胞液离心后加入缓冲液,进行细胞计数,显微镜下观察,继续培养传代后,收集细胞丙酮固定,采用HE染色、免疫组化染色,镜下观察。

统计学处理 运用SPSS11.5 软件进行 χ^2 检验, $P<0.05$ 为比较有显著意义。

2 结果

甲胎蛋白(AFP)mAb免疫磁珠分离富集的细胞,传代培养后,具有肝细胞癌的形态学特点,经AFP免疫组化染色阳性,证实为肝癌细胞。23例复发性肝癌患者,鼠抗人肝癌的单抗HAbl8免疫磁珠分离检测术前外周血,肝癌细胞阳性15例(65.22%),射频消融治疗1次后,1 d外周血肝癌细胞阳性13例(56.52%),术后3 d外周血,肝癌细胞阳性6例(26.09%)。术前和术后1 d的阳性率比较,

差异无统计学意义; 而术前和术后3 d, 阳性率比较差异有统计学意义($P<0.05$)。术后1 d和术后3 d的阳性率比较差异有统计学意义($P<0.05$, 表1)。健康对照外周血未检测到AFP阳性细胞。

3 讨论

肝细胞癌在肝切除术后和肝移植术后再发率仍达50%以上^[1-2], 远期疗效并不理想。因此, 当前提高肝癌治疗总体效果的关键在于对术后复发的预防和治疗以及选择合理的综合治疗。

目前治疗复发性肝癌常用的有以下几种方式^[5-6]: (1)复发肝癌再切除; (2)经肝动脉插管化学药物栓塞术; (3)B型超声引导下无水酒精局部注射术; (4)射频消融; (5)全植入式药物输注装置定期化学治疗与肿瘤浸润淋巴细胞治疗, 此外还有生物治疗, 冷冻治疗, 微波治疗, 激光治疗以及肝脏移植等治疗。RFA是利用射频波(450-500 kHz)震动电极周围组织产热(50-100℃), 使其凝固坏死。目前常用的RFA方法是B超引导下经皮穿刺射频消融、剖腹手术或腹腔镜手术中B超引导行RFA^[7]。

影响术后复发的相关性因素很多, 如多发瘤、切面较大血管分支瘤栓、腹水、多结节性无包膜、主瘤旁子灶、镜下瘤栓、术后腹水和术前术后是否作综合治疗等^[8-9]。多数学者认为肝癌细胞的血源性播散是肝癌肝外转移的主要方式。由于肝癌组织细胞间黏附作用较正常组织下降, 肿瘤细胞之间黏附因子缺乏, 肿瘤细胞直接进入外周血; 手术过程肝癌组织和正常肝组织的挤压而造成的直接损伤, 导致肿瘤细胞入血; 肿瘤的新生血管异常及动静脉瘘的发生, 手术外力促进肿瘤细胞入血; 手术使机体免疫力下降, 使本身具有免疫逃避功能的肿瘤细胞得以在外周血液中存活^[10-11]。外周血液或骨髓中存在的循环肿瘤细胞, 是导致肿瘤切除或肝移植术后复发转移的关键; 也有学者推测可能是手术过程导致了肝癌的细胞播散而导致术后复发转移。所以在手术前后检测外周血中是否存在肝癌细胞, 可作为患者肿瘤复发、转移和预后的重要指标。

免疫磁珠(immunomagnetic bead, IMB)技术是近年来发展起来的一项新的免疫学技术, 其被公认为简便易行、分离纯度高和同时保留细胞活性的优点。利用免疫磁珠细胞分离技术检测肿瘤患者外周血液或骨髓中的转移癌细胞, 他能在100万个单核细胞中分离检测出一个肿

表 1 不同时间外周血肝癌细胞检测结果(n)

	阳性数	阴性数	合计	阳性率(%)
术前	15	8	23	65.22
术后1 d	13	10	23	56.52
术后3 d	6	17	23	26.09
健康对照	0	23	23	0

瘤细胞, Waguri *et al*^[16-18]运用该技术富集血中癌细胞, 发现其可在每2 mL血中检测出1-10个癌细胞, 其敏感性与RT-PCR方法相同, 假阳性率却比RT-PCT明显降低。同时, 免疫磁珠细胞分离技术同时保留细胞活性, 可传代和克隆培养, 研究其生物学特性, 将有助于深入了解肝癌细胞的生物学本质及其引起血源性复发转移的发生机制, 为阻断原发性肝癌的血液转移提供理论依据和方法。

本研究结果提示, 射频消融前, 复发肝癌患者的外周血中肝癌细胞阳性率65.22%, 射频消融1次后1 d, 外周血中肝癌细胞阳性率56.52%, 射频消融后3 d, 其阳性率26.09%。健康对照外周血未检测到阳性细胞。说明射频可以有效的杀灭肝癌细胞, 减少和阻止肝癌细胞入血, 降低外周血中游离肝癌细胞, 减少肝癌的血行播散。但研究中发现, 有3例多灶性复发癌患者, 其射频消融前、后外周血游离癌细胞无变化, 经流式细胞检测, 其在分离得到的肝癌细胞数量上甚至多于术前, 其机制尚不清楚, 有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 汤钊猷. 肝癌研究进展. 中国肿瘤 2001; 10: 37-40
- 2 吴孟超. 原发性肝癌治疗的进展及展望. 第二军医大学学报 2002; 23: 1-4
- 3 Lau WY, Leung TW, Yu SC, Ho SK. Percutaneous local ablative therapy for hepatocellular carcinoma: a review and look into the future. *Ann Surg* 2003; 237: 171-179
- 4 Lin CH, Chou SJ, Wu HS, Yu JC, Chuang CH, Shih ML. Education and imaging. Gastrointestinal: retroperitoneal abscess caused by appendicitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 278
- 5 Okano H, Shiraki K, Inoue H, Kawakita T, Deguchi M, Sugimoto K, Sakai T, Ohmori S, Murata K, Nakano T. Laparoscopic microwave coagulation therapy for small hepatocellular carcinoma on the liver surface. *Oncol Rep* 2002; 9: 1001-1004
- 6 Okano H, Shiraki K, Inoue H, Yamanaka T, Deguchi M, Sugimoto K, Sakai T, Ohmori S, Murata K, Nakano T. Laparoscopic ethanol injection therapy for hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2002; 20: 267-271
- 7 Tranberg KG. Percutaneous ablation of liver tumours. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 125-145
- 8 Nordlinger B, Rougier P. Nonsurgical methods

■应用要点

利用免疫磁珠细胞分离技术, 检测射频消融术治疗复发性肝癌前后血液中的循环肿瘤细胞存在情况, 了解射频消融术治疗复发性肝癌效果, 为评估不同方法治疗肝癌及治疗后复发转移的预测提供了方法和依据。

■同行评价

本研究方法和技
术有部分改进,实
验对照设计合理,
统计学处理恰当,
结论较明确,实验
证据较充足,讨论
条理分明,具有一
定的创新性和可
读性。

- for liver metastases including cryotherapy, radiofrequency ablation, and infusional treatment: what's new in 2001? *Curr Opin Oncol* 2002; 14: 420-423
- 9 Chen MS, Li JQ, Zheng Y, Guo RP, Liang HH, Zhang YQ, Lin XJ, Lau WY. A prospective randomized trial comparing percutaneous local ablative therapy and partial hepatectomy for small hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2006; 243: 321-328
- 10 Tacke J, Mahnken A, Roggan A, Gunther RW. Multipolar radiofrequency ablation: first clinical results. *Rof* 2004; 176: 324-329
- 11 Curley SA, Marra P, Beaty K, Ellis LM, Vauthey JN, Abdalla EK, Scaife C, Raut C, Wolff R, Choi H, Loyer E, Vallone P, Fiore F, Scordino F, De Rosa V, Orlando R, Pignata S, Daniele B, Izzo F. Early and late complications after radiofrequency ablation of malignant liver tumors in 608 patients. *Ann Surg* 2004; 239: 450-458
- 12 Baker M, Gillanders WE, Mikhitarian K, Mitas M, Cole DJ. The molecular detection of micrometastatic breast cancer. *Am J Surg* 2003; 186: 351-358
- 13 Ijichi M, Takayama T, Matsumura M, Shiratori Y, Omata M, Makuuchi M. alpha-Fetoprotein mRNA in the circulation as a predictor of postsurgical recurrence of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Hepatology* 2002; 35: 853-860
- 14 刘迎娣, 杨德利, 梁敏, 梁浩, 孙晓华, 程留芳, 汪鸿志. 原发性肝癌患者手术前后外周血AFPmRNA测定的意义. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 925
- 15 Yao F, Guo JM, Xu CF, Lou YL, Xiao BX, Zhou WH, Chen J, Hu YR, Liu Z, Hong GF. Detecting AFP mRNA in peripheral blood of the patients with hepatocellular carcinoma, liver cirrhosis and hepatitis. *Clin Chim Acta* 2005; 361: 119-127
- 16 Waguri N, Suda T, Nomoto M, Kawai H, Mita Y, Kuroiwa T, Igarashi M, Kobayashi M, Fukuhara Y, Aoyagi Y. Sensitive and specific detection of circulating cancer cells in patients with hepato-cellular carcinoma; detection of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA after immunomagnetic separation. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3004-3011
- 17 Sabile A, Louha M, Bonte E, Poussin K, Vona G, Mejean A, Chretien Y, Bougas L, Lacour B, Capron F, Roseto A, Brechot C, Paterlini-Brechot P. Efficiency of Ber-EP4 antibody for isolating circulating epithelial tumor cells before RT-PCR detection. *Am J Clin Pathol* 1999; 112: 171-178
- 18 Guo J, Xiao B, Zhang X, Jin Z, Chen J, Qin L, Mao X, Shen G, Chen H, Liu Z. Combined use of positive and negative immunomagnetic isolation followed by real-time RT-PCR for detection of the circulating tumor cells in patients with colorectal cancers. *J Mol Med* 2004; 82: 768-774

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密密度。任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean \pm SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义。又如8.4 \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的, 应该舍。末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成, 不得多次完成。例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24。年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定: 分母 \leq 100, 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 \leq 1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推。小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行! (常务副总编辑: 张海宁 2008-05-18)