

体腔循环热灌注化疗的安全性实验研究*

刘文超 李春宝 王宇 李唯

摘要 目的:观察体腔循环热灌注化疗(Cavity circulatory thermal perfusion, CCTP)中不同温度对实验犬生命体征和腹腔各脏器的影响,明确实验动物CCTP的适宜温度。**方法:**以犬为实验动物,分别于其腹腔温度41、42、43℃时进行指标检测。对每组动物进行CCTP,化疗药物为顺铂,每次流速140 mL/min治疗持续60 min,每隔2 d重复1次,共3次。在每次CCTP前及24 h后抽取外周血备检。CCTP 3次后24 h及2周时每组分别处死2只犬,观察内脏器官形态学改变,进行肝、肾等脏器病理检查。**结果:**41、42℃温度,流速140 mL/min下3次CCTP对犬的生命体征及肝肾功无明显影响;43℃腹腔温度流速140 mL/min行3次CCTP后对犬生命体征及肝肾功有不同程度的影响,肝、肾、脾及肠组织表现出病理损伤。**结论:**42℃、流速140 mL/min以下腹腔温度联合顺铂3次CCTP、每次60 min是安全的,可作为CCTP联合化疗的治疗温度;43℃同条件下对犬的生理功能有损害,不适合作为CCTP联合化疗的治疗温度。

关键词 体腔循环热灌注化疗 安全性 热损伤 热化疗损伤

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.22.006

Experimental Study on the Safety of Abdominal Cavity Circulatory Thermal Perfusion

Wenchao LIU, Chunbao LI, Yu WANG, Wei LI

Correspondence to: Wenchao LIU; Email: xjcancer@fmmu.edu.cn

Department of Oncology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30973437)

Abstract Objective: This work investigated the effect of cavity circulatory thermal perfusion (CCTP) on the vital signs and important organs of the experimental animal dogs at different temperatures. The study likewise aimed to determine the optimal temperature for chemotherapy. **Methods:** Dogs were used as the experimental animal models for CCTP. CCTP was performed with cisplatin using a hyperthermic intraperitoneal treatment system at 41°C, 42°C, and 43°C (one course of clinical treatment). The hepatic and renal functions were detected in preserved blood samples before CCTP and at 24 h after each course of the treatment. The respective morphological and pathological changes of the major abdominal organs were likewise studied at 24 h as well as 2 weeks after the third course of CCTP. **Results:** The three courses of CCTP with a perfusion rate of 140 mL/min at 41 or 42°C did not have any observable negative effects on the hepatic and renal functions of experimental animals. On the other hand, the three courses of CCTP with a perfusion rate of 140 mL/min at 43°C had a significant negative effect on the hepatic and renal functions, with histopathological injuries in the liver, kidney, spleen, and intestines. **Conclusion:** CCTP with a perfusion rate of 140 mL/min combined with cisplatin chemotherapy (three times /60 min) was safe and feasible at 42°C, but could damage visceral organs of experimental animals at 43°C.

Keywords Cavity circulatory thermal perfusion; Safety; Thermal injury; Thermochemotherapy damage

目前对恶性腹水的治疗主要是利尿和反复多次的腹腔穿刺抽出腹水,以及应用化疗药物等方法,但效果有限。随着热疗学的发展,肿瘤热疗在肿瘤治疗中地位越来越重要。体腔恒温循环热灌注化疗(cavity circulatory thermal perfusion, CCTP)在治疗恶性腹水方面显示出良好效果,在温热和微创下进行,配合细胞毒性化疗药物,其安全性备受关注。本研究观察CCTP的安全性以及对犬局部和全身的影响,进一步明确CCTP的适宜温度,为临床应用CCTP治

疗恶性腹水提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用设备:GDPR-2100S型体腔循环热灌注机(西安好博士医疗科技有限公司研制),RM6240多通道生理记录仪(成都仪器厂),AI-5600型数字温度计(厦门宇电自动化有限公司)。

实验动物与分组:成年健康杂种家犬18只,雌雄不限,体重(18±0.5)kg(第四军医大学唐都医院提供

作者单位:第四军医大学西京医院肿瘤中心(西安市710032)

*本文课题受国家自然科学基金项目(编号:30973437)资助

通信作者:刘文超 xjcancer@fmmu.edu.cn

No.12016)。随机分为三组:A组(41℃生理盐水+顺铂组,6只),B组(42℃生理盐水+顺铂组,6只),C组(43℃生理盐水+顺铂组,6只),分笼饲养。

1.2 方法

1.2.1 CCTP治疗 按组别对每只犬进行CCTP治疗实验,每次60 min,每间隔2 d一次,重复3次。用异戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉,在犬腹腔左右两侧分别植入腹腔穿刺针(12#)并固定,两穿刺针分别连接于GDPR-2100S型体腔循环热灌注机治疗管路的人体管和出体管,高精度PT100温度传感器植入出入体穿刺针旁,同时分别在左右上腹植入高精度PT100温度传感器;设定治疗温度分别为41、42、43℃,流速调节到140 mL/min,先选用单路灌注模式,向腹腔灌注生理盐水2 500 mL,灌注时控制入体口温度分别为41、42、43℃,并加入顺铂100 mg/kg;然后选用循环模式,持续恒温循环治疗实验60 min。

1.2.2 观察内容 入体温度和出体温度由热灌注机仪表盘显示读出,左右上腹穿刺点的温度由AI-5600型数字温度计显示读出;监测灌注流速、心率、呼吸、平均动脉压、腹水漂浮物,腹水颜色改变等指标;治疗实验中每10 min记录1次4个测温点温度值;每次治疗实验前和24 h后抽取外周血液备检;治疗实验3次后24 h及2周时每组分别处死2只,观察内脏形态

学变化,切取心、肠、肝、脾、肾组织,用10%甲醛固定,常规石蜡包埋、切片、HE染色,光镜观察其组织形态变化。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,运用SPSS 12.0软件数据包处理,采用方差分析,进行多样本两两比较,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCTP后实验动物生命体征变化

A组41℃进行CCTP 1 h后,犬的平均体温升高约0.2℃,心率为(120±5)次/min,呼吸为(15±5)次/min,平均动脉压125 mmHg。B组42℃进行CCTP 1 h后,平均体温升高约0.5℃,心率(135±5)次/min,呼吸(23±5)次/min,平均动脉压130 mmHg。C组43℃进行CCTP 1 h后,平均体温升高约1.5℃,心率(140±5)次/min,呼吸(30±5)次/min,平均动脉压120 mmHg。

2.2 CCTP后实验动物肝肾功变化

A、B组分别为41℃和42℃腹腔温度下,犬的肝肾功指标变化不大,每次灌注后肝肾功指标只有轻微波动($P>0.05$),2周后基本能恢复正常。C组43℃腹腔温度下对犬的肝肾功有一定损伤,4d时ALT、AST、Cr、UA值明显升高($P<0.05$),且2周后ALT、AST仍未恢复正常($P<0.05$,表1)。

表1 不同温度下顺铂热灌注化疗后肝肾功的变化 $\bar{x}\pm s$

Table 1 Changes in the liver and kidney functions during CCTP with cisplatin at three temperatures

指标	组别	热灌注前	热灌注后			
			2 d	4 d	6 d	14 d
谷丙转氨酶(U/L)	A	37.87 ± 5.14	46.27 ± 5.60	48.12 ± 3.11	42.08 ± 4.01	39.01 ± 5.34
	B	33.87 ± 4.32	38.27 ± 5.63	43.86 ± 6.69	39.56 ± 3.65	35.16 ± 5.03
	C	33.53 ± 5.71	46.54 ± 6.11	73.18 ± 4.63*	68.25 ± 4.37*	59.13 ± 5.49*
谷草转氨酶(U/L)	A	41.43 ± 5.39	45.54 ± 6.51	47.65 ± 4.36	43.26 ± 4.87	42.37 ± 4.53
	B	43.19 ± 5.27	49.12 ± 8.03	50.37 ± 5.75	44.89 ± 5.96	42.96 ± 5.11
	C	41.58 ± 5.04	53.44 ± 6.31	92.06 ± 5.12*	76 ± 4.97*	62.79 ± 6.22*
肌酐值(μmol/L)	A	66.70 ± 6.78	70.89 ± 6.01	74.86 ± 6.11	70.88 ± 4.68	67.69 ± 4.86
	B	70.32 ± 6.12	74.82 ± 8.06	79.88 ± 5.38	73.68 ± 7.91	72.18 ± 5.35
	C	68.45 ± 8.32	74.55 ± 4.78	87.98 ± 6.79*	74.36 ± 4.28	70.95 ± 54.36
尿酸(μmol/L)	A	283.13 ± 9.89	275.54 ± 13.79	289.41 ± 12.08	268.3 ± 13.96	250.28 ± 13.59
	B	266.73 ± 13.89	281.19 ± 13.42	293.06 ± 14.97	282.97 ± 13.52	271.10 ± 14.28
	C	265.19 ± 14.27	282.49 ± 15.18	297.83 ± 15.23*	282.86 ± 17.72	266.36 ± 15.66

*与腹腔热灌注前比较 $P<0.05$ 。A组:41℃;B组:42℃;C组:43℃

2.3 CCTP后实验动物腹腔脏器形态学变化

A、B组CCTP治疗3次后24 h,处死动物剖腹探查,发现肝、肾、脾、肠等内脏器官无明显损伤,2周后腹腔脏器无粘连,内脏器官肉眼观无明显异常;C组

CCTP治疗3次后24 h,处死动物解剖发现腹腔脏器部分区域和大网膜粘连,肠系膜血管充血明显,肝脏有小片淤血区域,肠管有紫褐色的淤血区及出血点,肾脏肉眼观无明显异常,2周后部分肠管仍有小片淤

血区,但脏器粘连缓解(图1)。

2.4 腹腔脏器的病理学改变

A组41℃组肝、小肠、肾和脾 CCTP 治疗3次后

24 h 观察,见各脏器有不同程度轻度充血,并无其他改变。2周后恢复正常,B组和C组的主要病理变化(表2,图2)。

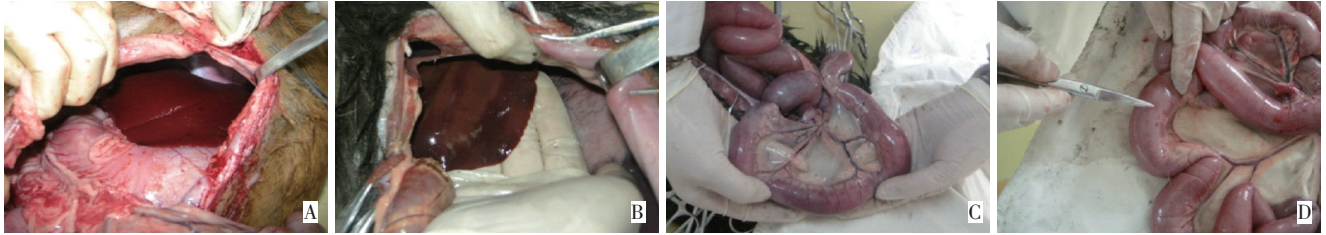


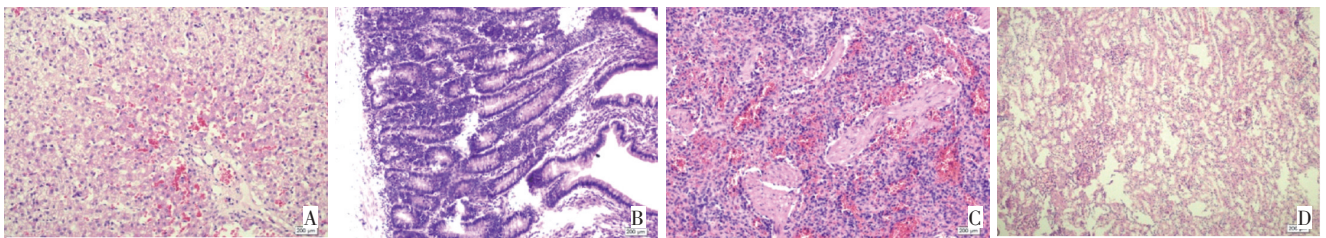
图1 在43℃行CCTP治疗3次后24 h,实验犬腹腔脏器大体形态学改变:肝脏有小片淤血区域(A,B),腹腔脏器部分区域和大网膜粘连(C),肠系膜血管充血较明显,肠管有紫褐色的淤血区及出血点(D),2周后部分肠管仍有小片淤血区,但脏器粘连缓解。

Figure 1 General morphological changes in the abdominal organs at 24 h after three cycles of CCTP at 43°C for 60 min. There was extravasated blood in a small portion of the liver and intestines. The mesenteric vascular vessel was evidently congested, and the omentum adhered to most of the abdominal tissues. Two weeks after CCTP, some bowel regions were still bruised, but abdominal adhesion was relieved

表2 不同温度 CCTP 治疗后腹腔主要脏器的病理组织学变化

Table 2 Pathological changes of abdominal organs after CCTP at various temperatures

部位	42℃组	43℃组
肝脏	24 h肝汇管区中度充血,肝细胞广泛轻度水肿,肝实质细胞点状坏死;2周后肝汇管区仍有轻度充血。	汇管区血管扩张、中重度充血,广泛水样变性,细胞点状坏死;2周后汇管区仍充血,细胞广泛坏死。
肠	24 h小肠绒毛结构正常,但黏膜层及黏膜下层小血管轻度充血,黏膜层中重度炎细胞浸润,黏膜下间质内部分纤维素样变性和玻璃样变;2周后黏膜血管仍有炎性细胞浸润,大肠杯状细胞增生。	肠黏膜及黏膜下层可见大片炎细胞渗出及坏死,淤血充血明显,黏膜下层可见玻璃样变性及大片坏死细胞的碎片,小肠绒毛结构有脱落;2周后黏膜层少量炎细胞浸润,黏膜下层疏松,小血管增生。
脾脏	24 h脾间质大量炎细胞浸润,血管中重充血,脾小梁增宽明显;2周后脾间质轻中度充血及炎性细胞浸润,脾小梁增多。	脾脏淤血严重,细胞水肿严重,细胞核固缩、坏死,可见一些坏死的细胞碎屑,小血管玻璃样变性;2周后脾脏仍淤血,脾小梁增多增宽。
肾脏	24 h肾小球及间质轻度充血,轻度炎性细胞浸润;2周后少量炎性细胞浸润,间质细胞水肿明显。	肾小球毛细血管中度充血,肾小球及肾小管上皮细胞水肿,间质中重度充血淤血,中度炎细胞浸润,肾小管上皮细胞刷状缘脱落;2周后肾小球仍充血明显,中度炎细胞浸润,肾小球及肾小管上皮细胞广泛气球样变性。



A: 肝脏;B: 小肠;C: 脾脏;D: 肾脏

图2 43℃组腹腔脏器的病理学改变(HE×200)

Figure 2 Pathological changes of abdominal organs in the group that was treated at 43°C

3 讨论

腹腔内转移是消化系统特别是胃肠道肿瘤转移的重要途径和主要致死原因,腹腔热化疗是消化系统肿瘤综合治疗的重要技术手段之一。

体腔热灌注分为体外射频腹腔照射加温和腹腔循环加温,前者灌注液不流动,后者灌注液是持续流

动的。研究表明非循环热灌注时相对安全的温度为43℃,时间为30 min,也有离体动物实验证实,温热对各器官组织的临界损伤温度为43℃、40 min^[1],但缺乏持续循环恒温与器官组织损伤的相关性研究。本实验旨在了解腹腔持续恒温循环+化疗药物顺铂共同作用下的安全温度。

本研究选择犬为实验动物,以探寻腹腔 CCTP 的适宜温度。根据动物实验结合临床应用的要求,我们曾分别应用 1 只犬在 45℃ 的温度下进行单纯生理盐水灌注预实验,结果 45℃、流速 140 mL/min CCTP 3 次后第 3 d 死亡。因此推测犬对 CCTP 60 min 可耐受的生理盐水+化疗药的极限温度可能为 43℃ 左右。经过流速 41、42、43℃ 的生理盐水+顺铂的热化疗灌注实验,得出 42℃ 以下是相对安全的治疗温度。

本实验中动物内脏器官的大体改变及病理变化显示:腹腔温度 41℃、流速 140 mL/min 循环 60 min 下 CCTP(生理盐水+顺铂)3 次后,各重要腹腔脏器的正常生理功能未受影响,可以作为 CCTP 的预防性治疗温度。腹腔温度 42℃ 流速 140 mL/min 循环 60 min 下 CCTP(生理盐水+顺铂)3 次后,犬的肝、肾、脾及肠组织均有轻度损伤,肝肾功能也有不同程度的损害,但 2 周后这种急性损伤逐渐恢复,表现为可逆性损伤;建议可作为 CCTP 的治疗温度。43℃ 腹腔温度、流速 140 mL/min 循环 60 min 下 CCTP(生理盐水+顺铂组)3 次后,犬的脾、肝及肠组织均受到较严重的不可逆损伤、坏死,2 周后仍未恢复,故 43℃ 不适合做为 CCTP 的治疗温度。

通常认为对组织细胞发挥最大效应的温度为 42~43℃^[2-4],温度低于 40℃ 对组织器官影响作用小,也无明显疗效,当温度为 43~45℃ 时,组织器官呈现一定损伤,细胞崩解、坏死,未表现逆转耐药效应^[5-6],43℃ 持续 60 min 细胞的病理损伤不可逆。研究发现温热 41~42℃ 对肿瘤组织的损伤机制包括改变肿瘤细胞膜的通透性^[7]、降解细胞外基质^[8]、上调细胞粘附分子结合能力等^[9,13]。此外,热可以促进 DNA 与铂类结合,增加细胞内铂类药物的浓度,抑制顺铂引发的细胞损伤修复机制^[10,14],即化疗药物与温热的协同作用^[11]。本实验(恒温循环热化疗灌注)提示组织的损伤温度低于早先描述的灌注温度^[12],原因可能与加热、测温的技术等条件有关,其次,灌注液循环流动可能带来的对组织流体冲刷损伤(流速 140 mL/min),流速越大损伤越大。再者,化疗药物对组织的直接损伤影响。这些结果提示,在进行循环热灌注化疗时,不能单纯追求高温(43℃ 以上)对肿瘤的直接热杀伤作用,同时也要考虑到灌注液的循环流体动力和药物共同的损伤作用。

目前临床使用的恒温循环热灌注机控温方法、加热方式及灌注模式均不同,故不同机型热损伤亦有差异。我们采用的 GDPR-2100 型 CCTP 机能精确控制和测量温度,腹腔加热快速均匀,温度持续恒定,能够保证热能及药物均匀散布于体腔及脏器间。该研究发现了 3 个关键温度点,即 41℃ 流速

140 mL/min 持续 60 min,无明显损伤变化,42℃ 有可逆性轻度损伤,43℃ 则产生较严重且不可逆损伤。因此,对实验动物犬,CCTP 的安全参数为 42℃、流速 140 mL/min 腹腔灌注 3 次,每次 60 min。

参考文献

- 1 李鼎九,王义善.实用肿瘤热疗学[M].第一版.吉林:吉林科学技术出版社.2006:10-14.
- 2 Agostinelli E, Tempera G, Molinari A, et al. The physiological role of biogenic amines redox reactions in mitochondria. New perspectives in cancer therapy[J]. *Amino Acids*, 2007, 33(2):175-187.
- 3 Wartenberg M, Gronczynska S, Bekhite MM, et al. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular prostate tumor spheroids by hyperthermia and reactive oxygen species[J]. *Int J Cancer*, 2005, 113(2):229-240.
- 4 魏红梅,郭坤元,梅家转,等.热疗联合化疗对 K562/AO2 细胞体外作用的实验研究[J].*中国实验血液学杂志*,2007,15(4):724-728.
- 5 Westermann A, Grosen E, Katschinski D, et al. A pilot study of whole body hyperthermia and carboplatin in platinum-resistant ovarian cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37(9):1111-1117.
- 6 Komdeur R, Plaat BEC, Hoekstra HJ, et al. Expression of P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1, and lung resistance-related protein in human soft tissue sarcomas before and after hyperthermic isolated limb perfusion with tumor necrosis factor- α and melphalan[J]. *Cancer*, 2001, 91(10):1940-1948.
- 7 Sagowski C, Jaehne M, Kehrl W, et al. Tumor oxygenation under combined whole-body-hyperthermia and polychemotherapy in a case of recurrent carcinoma of the oral cavity[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2002, 259(1):27-31.
- 8 Fukao H, Ikeda M, Ichikawa T, et al. Effect of hyperthermia on the viability and the fibrinolytic potential of human cancer cell lines[J]. *Clin Chim Acta*, 2000, 296(1):17-33.
- 9 Sato T, Sawaji Y, Matsui N, et al. Heat shock suppresses membrane type 1-matrix metalloproteinase production and progelatinase A activation in human fibrosarcoma HT-1080 cells and thereby inhibits cellular invasion[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 265(1):189-193.
- 10 Wiedemann GJ, Robins HI, Katschinski DM, et al. Systemic hyperthermia and ICE chemotherapy for sarcoma patients: rationale and clinical status[J]. *Anticancer Res*. 1997, 17(4B):2899-2902.
- 11 马胜利,陈雪琴,牟翰舟,等.高温合并顺铂对人肺癌细胞株 H1299 的协同杀伤作用[J].*临床肿瘤学杂志*,2006,11(6):427-430.
- 12 崔书中,巴明臣,黄狄文,等.BR-TRG-I 型体腔热灌注治疗系统安全性评估的动物实验[J].*中国比较医学杂志*,2009,19(10):27-31.
- 13 Liang H, Li JW, Shi YR, et al. Change in E-cadherin, alpha-, beta- and gamma-catenin expression after hyperthermia of a human colon carcinoma cell line in vitro[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2004, 84(15):1299-1303.
- 14 Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, et al. The cellular and molecular basis of hyperthermia[J]. *Crit Rev Oncol Hemat*, 2002, 43(1):33-56.

(2012-10-02 收稿)

(2012-11-16 修回)

(本文编辑:郑莉)