

### 【基础研究】

通信作者:李文涛(1973-),男,河南信阳人,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:乳腺肿瘤的微创治疗;E-mail:18037505705@163.com

ment group was significantly shorter than that in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The peritumoral isolation band can significantly reduce the skin burns caused by radiofrequency ablation. The MCF-7 tumor-bearing nude mouse model with a peritumoral isolation band can be used for the study of radiofrequency ablation for breast cancer.

**Key words:** peritumoral isolation band; radiofrequency ablation; breast cancer; nude mice

近年来,射频消融治疗早期乳腺癌的可行性和安全性逐渐被认可,GROTENHUIS 等<sup>[1]</sup>研究显示,射频消融治疗早期乳腺癌的肿瘤完全消融率为 80% ~ 100%。然而,术中不能监测消融周围组织温度,易造成皮肤烧伤。皮肤烧伤是射频消融治疗早期乳腺癌最常见的并发症,发生率约为 5%<sup>[1]</sup>。本研究建立了乳腺癌 MCF-7 细胞荷瘤裸鼠模型,通过瘤体周围注射生理盐水建立瘤周隔离带,将皮肤与肿瘤隔离,由于水的比热容较大,能够吸收射频消融产生的大部热量,从而减少瘤体周围正常组织及皮肤的热量吸收,减轻皮肤烧伤。本研究为临床上减轻射频消融导致的皮肤烧伤提供了新思路及动物实验基础。

1 材料与方法

**1.1 实验动物** 5 周龄无特定病原体级 BALB/c 雌性裸鼠 30 只,体质量( $14.0 \pm 3.0$ )g,购自北京维通丽华实验动物技术有限公司。裸鼠于三级层流室饲养,每日按正常昼夜节律给予光照,自由饮食。

**1.2 主要试剂与仪器** 人乳腺癌细胞 MCF-7(美国 ATCC 细胞库),RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);BT100-2J 精密蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司),21-843671 射频消融电极、S-1500 射频治疗仪(迈德医疗科技上海有限公司),佳能 IXUS 860IS 型数码相机(日本佳能公司),GLFT-1 红外线敏感温度计(美国格朗电子集团)。

**1.3 MCF-7 细胞移植瘤模型建立** 取 MCF-7 细胞,使用含有抗生素(庆大霉素、两性霉素、支原体预防试剂 Plasmocin™ prophylactic)和体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,在恒温 37 ℃、饱和湿度、体积分数 95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养,每 2 d 换液 1 次,用含乙二胺四乙酸的 2.5 g · L<sup>-1</sup> 胰蛋白酶进行消化传代培养。取对数生长期的 MCF-7 细胞,磷酸盐缓冲液冲洗 2 遍,2.5 g · L<sup>-1</sup> 胰蛋白酶消化,以 1 × 10<sup>10</sup> L<sup>-1</sup> 重悬于 RPMI-1640 培养基(不含血清),显微镜下观察活细胞比例 > 95%。在无菌条件下,于每只裸鼠后背部右前肢与背部交界处皮下注射 0.2 mL MCF-7 细胞悬液,建立 MCF-7 细胞的荷瘤裸鼠。每隔 2 ~ 3 d 用游标卡尺测量 1 次肿瘤直径(mm),包括纵径及与之垂直的横径,待纵径和横径达到 8 ~ 12 mm 时为模型建立成功,记录每只裸鼠的体质量和肿瘤直径,计算肿瘤体积。肿

瘤体积计算公式<sup>[2]</sup>:肿瘤体积 = 纵径 × 横径<sup>2</sup>/2。

**1.4 裸鼠移植瘤的射频消融治疗** 30 只荷瘤裸鼠随机分为实验组和对照组,每组 15 只,行射频消融治疗。具体步骤:消毒腹部皮肤,麻醉穿刺点选择在腹部下 1/3 稍外侧,针头进入腹腔后先抽吸,以避免刺入脏器和大血管,注射 20 g · L<sup>-1</sup> 水合氯醛(0.01 mL · g<sup>-1</sup>)。待裸鼠步态不稳后,将其置于俯卧位,四肢伸展,胶带固定于操作台上,使背部平坦。术区消毒,实验组裸鼠于肿块周围注射 3 ~ 4 mL 生理盐水,形成瘤周隔离带(图 1),对照组裸鼠未做此处理。在超声探头引导下经皮穿刺,将射频消融针定位到肿块中心(图 2);设置 S-1500 射频治疗仪功率为 15 W,在此功率模式下,当肿瘤组织的阻抗达到系统设定阈值时,射频治疗仪将自动停止工作,固定操作时间为 1 min。当彩色超声下显示整个肿瘤出现均匀高回声且范围不再增大时,提示消融完全,操作结束,关闭开关,记录射频消融时间。

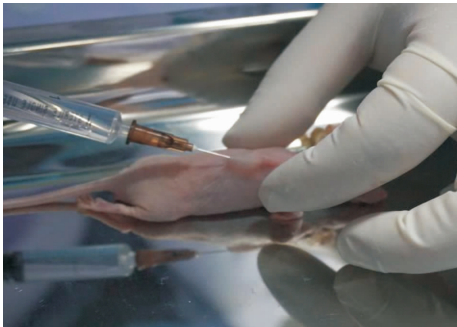


图 1 实验组裸鼠射频消融术前注射瘤周隔离带  
Fig. 1 Peritumoral isolation band created by subcutaneously injecting sterile normal saline with nude mice of experience group

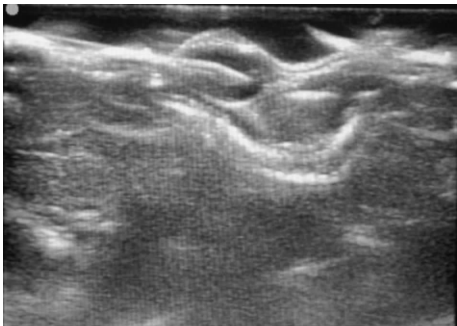


图 2 彩色超声引导下将射频针定位到肿块中心  
Fig. 2 Tip of electrically insulated electrode was placed at the centre of the tumor with guidance of real time ultrasound

1.5 观测指标

1.5.1 皮肤创面面积 小鼠背部皮肤烧伤后,皮肤即刻呈现不同程度的水肿及色泽发白,边界清楚,面积恒定,易于肉眼观察。在烧伤的皮肤旁放置 1 枚 1 元硬币为参照,用数码相机拍下烧伤创面。将图像导入计算机,通过 Photoshop CS 8.0 软件(美国 Adobe 公司)选取图像中的创面边缘,利用参照物的像素值间接测算创面面积<sup>[2]</sup>。

1.5.2 皮肤创面温度 射频消融操作结束,使用 GLFT-1 红外线敏感温度计在距离创面约 2 cm 高度测量创面温度并记录。

1.5.3 皮肤创面愈合时间 每日观察 1 次裸鼠烧伤创面的愈合情况,当烧伤创面的焦痂开始与周围正常皮肤分离(自溶脱痂)时,记为创面愈合的记录终点,记下历时时间。

1.5.4 裸鼠存活率 以射频消融术为时间起点,以创面愈合(自溶脱痂)为时间终点,记录各组裸鼠死亡数量,计算各组裸鼠存活率。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。正态分布的计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用独立样本  $t$  检验;因样本量不足,二分类资料比较采用 Fisher 确切概率法; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组裸鼠体质量、肿瘤体积及射频消融时间比较 结果见表 1。2 组裸鼠体质量、肿瘤体积和射频消融时间比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 2 组裸鼠体质量、肿瘤体积及射频消融时间比较  
Tab.1 Comparison of the body mass, tumor volume and radiofrequency ablation time between the two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	体质量/g	肿瘤体积/mm <sup>3</sup>	射频消融时间/s
对照组	15	18.01 ± 0.76	482.30 ± 90.03	51.33 ± 3.42
实验组	15	18.26 ± 0.67	514.41 ± 83.85	52.53 ± 3.60
<i>t</i>		0.967	1.011	0.936
<i>P</i>		0.342	0.321	0.357

2.2 2 组裸鼠存活率比较 射频消融术后,实验组未出现死亡裸鼠,对照组 5 只裸鼠于术后 3 ~ 5 d 死亡。实验组和对照组裸鼠存活率分别为 100.0% (15/15)、66.7% (10/15),实验组裸鼠存活率显著高于对照组,差异有统计学意义(Fisher 确切概率法, $P < 0.05$ )。

2.3 2 组裸鼠皮肤创面面积及创面温度比较 结果见表 2。实验组裸鼠皮肤创面面积显著小于对照组,皮肤创面温度显著低于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 2 2 组裸鼠皮肤创面面积及创面温度比较  
Tab.2 Comparison of the wound surface area and wound surface temperature between the two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	创面面积/mm <sup>2</sup>	创面温度/℃
对照组	15	188.02 ± 9.05	39.0 ± 0.3
实验组	15	97.91 ± 8.74	38.1 ± 0.2
<i>t</i>		27.747	9.369
<i>P</i>		< 0.05	< 0.05

2.4 2 组裸鼠皮肤创面愈合时间比较 实验组和对照组裸鼠皮肤创面愈合时间分别为(11.40 ± 1.64)、(17.50 ± 1.58)d,实验组裸鼠皮肤创面愈合时间显著短于对照组,差异有统计学意义( $t = 9.905, P < 0.05$ )。

3 讨论

射频消融术治疗早期乳腺癌具有微创、美观、并发症少等优点,具有较好的应用前景<sup>[3]</sup>。近年来,在欧美国家,射频消融术治疗早期乳腺癌的安全性和有效性逐渐被认可<sup>[4-8]</sup>,但临床上还存在一些亟待解决的问题,如判断肿瘤细胞活性的组织学染色方法、评估消融是否完全的影像学检查方法等。因为射频消融术尚未纳入乳腺肿瘤治疗规范,缺乏大样本的临床研究,限制了相关领域的经验积累,所以,建立一种用于射频消融研究的乳腺癌动物模型十分必要。

目前,研究乳腺肿瘤射频消融常见的动物模型有 Fisher 大鼠、FVBN202 转基因大鼠、BALB/c 小鼠、新西兰白兔等,这些动物免疫系统健全,建立的均是同源性肿瘤模型,例如:给 Fisher344 大鼠移植大鼠乳腺癌 MatB Ⅲ细胞<sup>[9]</sup>、BALB/c 小鼠移植鼠源性 4T1 乳腺癌细胞<sup>[10]</sup>、FVBN202 转基因大鼠移植 MMC 细胞系<sup>[10]</sup>、新西兰白兔移植兔直肠癌 VX2 细胞<sup>[11]</sup>等,建立的均不是人乳腺癌动物模型,不能模拟人乳腺癌细胞的生物学行为。细胞源性异种移植(cell-line-derived xenografts, CDX)是将人某种表型的肿瘤细胞经过体外传代、培养,建立稳定的细胞系,移植到免疫缺陷的动物身上,数周内即可长成符合要求的肿瘤组织。CDX 是最简单、最常见的动物模型,对于研究肿瘤的发生、生物学过程和临床治疗效果极有帮助<sup>[12]</sup>。YUKUMI 等<sup>[13]</sup>通过建立人乳腺癌 BT474 细胞荷瘤裸鼠模型,研究烧结 MgFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 针感应生热微创治疗乳腺癌的可行性。本研究拟建立人乳腺癌 MCF-7 细胞荷瘤裸鼠模型,以供乳腺癌射频消融的相关研究。但是,在预实验中发现,对荷瘤裸鼠进行射频消融时,皮肤烧伤严重,甚至导致裸鼠死亡,限制了在其身上进行射频消融的相关研究。在早期的人乳腺癌射频消融可行性研究中,有人提出

皮下注射无菌生理盐水不仅可以阻止热量向皮肤传导,而且将肿瘤与皮肤隔离,可以有效降低皮肤烧伤的发生概率<sup>[1,14]</sup>。水的比热容较大,能够吸收射频针产生的大部热量,从而降低瘤周正常组织及皮肤的热量吸收,减轻热损伤。因此,本研究设置实验组和对照组,实验组裸鼠肿瘤组织周围注射生理盐水,形成瘤周隔离带,对照组未做此处理,结果显示,实验组裸鼠存活率显著高于对照组,使得在该模型上进行射频消融相关研究更加可靠。

本研究结果显示,2 组裸鼠体质量、肿瘤体积和消融时间比较差异均无统计学意义,排除了这些因素对结果可能存在的影响。小鼠背部皮肤烧伤后,不形成肉眼可见的水泡,只是创面呈现不同程度的水肿及色泽发白,以后创面颜色逐渐加深,48 ~ 72 h 形成痂皮样物,痂皮色泽逐渐加深,并逐渐变厚、变干,烧伤后 1 ~ 3 周,痂皮逐渐从周边顶起、脱落。由于烧伤后创缘清晰,创面面积恒定,后期形成与之大小相同的痂,且烧伤程度越重,创面面积越大,因此,测量射频消融后即刻创面面积可以作为评定烧伤程度的指标。烧伤严重程度往往与温度成正比,所以,测定烧伤创面的温度可以作为评定烧伤程度的指标<sup>[15]</sup>。烧伤创面的修复过程于伤后不久即开始,烧伤程度越轻,创面炎症越轻,修复越早、越快<sup>[15]</sup>。因此,测定创面愈合的时间可以作为评定烧伤程度的指标。本研究结果显示,实验组裸鼠皮肤创面面积显著小于对照组,创面温度显著低于对照组,创面愈合时间显著短于对照组,说明瘤周隔离带能够有效减轻射频消融导致的皮肤烧伤。

综上所述,瘤周隔离带可以显著减轻射频消融所致皮肤烧伤,该注射有瘤周隔离带的乳腺癌 MCF-7 细胞荷瘤裸鼠模型可用于乳腺癌射频消融治疗的研究。

# 参考文献:

- [1] GROTENHUIS B A, VRIJLAND W W, KLEM T M. Radiofrequency ablation for early-stage breast cancer: treatment outcomes and practical considerations [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2013, 39 (12): 1317-1324.
- [2] 李栋梁,李庆霞,彭代智. 数码照相结合 Photoshop 软件测量平面创面面积 [J]. *中华烧伤杂志*, 2010, 26 (1): 48.
- [3] ZHAO Z, WU F. Minimally-invasive thermal ablation of early-stage

- breast cancer: a systemic review [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2010, 36 (12): 1149-1155.
- [4] NOGUCHI M, MOTOYOSHI A, EARASHI M, et al. Long-term outcome of breast cancer patients treated with radiofrequency ablation [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2012, 38 (11): 1036-1042.
- [5] SCHÄSSBURGER K U, LÖFGREN L, LAGERSTEDT U, et al. Minimally-invasive treatment of early stage breast cancer: a feasibility study using radiofrequency ablation under local anesthesia [J]. *Breast*, 2014, 23 (2): 152-158.
- [6] YOSHINAGA Y, ENOMOTO Y, FUJIMITSU R, et al. Image and pathological changes after radiofrequency ablation of invasive breast cancer: a pilot study of nonsurgical therapy of early breast cancer [J]. *World J Surg*, 2013, 37 (2): 356-363.
- [7] KREB D L, LOOIJ B G, ERNST M F, et al. Ultrasound-guided radiofrequency ablation of early breast cancer in a resection specimen: lessons for further research [J]. *Breast*, 2013, 22 (4): 543-547.
- [8] NAGASHIMA T, SAKAKIBARA M, SANGAI T, et al. Long-term outcome of radiofrequency ablation therapy for breast cancer [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2015, 42 (12): 1788-1790.
- [9] TODOROVA V K, KLIMBERG V S, HENNINGS L, et al. Immunomodulatory effects of radiofrequency ablation in a breast cancer model [J]. *Immunol Invest*, 2010, 39 (1): 74-92.
- [10] HABIBI M, KMIECIAK M, GRAHAM L, et al. Radiofrequency thermal ablation of breast tumors combined with intralesional administration of IL-7 and IL-15 augments anti-tumor immune responses and inhibits tumor development and metastasis [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 114 (3): 423-431.
- [11] BOEHM T, MALICH A, NAHUM-GOLDBERG S, et al. Vacuum-assisted resection of malignant tumors with and without subsequent radiofrequency ablation: feasibility of complete tumor treatment tested in an animal model [J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2001, 12 (9): 1086-1093.
- [12] HOLEN I, SPEIRS V, MORRISSEY B, et al. In vivo models in breast cancer research: progress, challenges and future directions [J]. *Dis Model Mech*, 2017, 10 (4): 359-371.
- [13] YUKUMI S, WATANABE Y, HORIUCHI A, et al. Feasibility of induction heating using a sintered MgFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> needle for minimally invasive breast cancer therapy [J]. *Anticancer Res*, 2008, 28 (1A): 69-74.
- [14] KINOSHITA T, IWAMOTO E, TSUDA H, et al. Radiofrequency ablation as local therapy for early breast carcinomas [J]. *Breast Cancer*, 2011, 18 (1): 10-17.
- [15] 黄跃生. 烧伤外科学 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2010: 12.

( 本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超 )