

改良穿刺法改善针道肿瘤细胞转移情况的研究

曹海营¹, 金宇², 冯震², 王瑜², 孔庆柱², 于涛¹

1. 承德医学院研究生院, 河北 承德 067000; 2. 承德医学院附属医院创伤小儿骨科, 河北 承德 067000

摘要: **目的** 探讨改良穿刺活检技术改善骨肿瘤穿刺针道肿瘤细胞转移情况。**方法** 将新鲜的 VX2 肿瘤组织制成细胞悬液, 植入 22 只成年家兔双侧胫骨内制成兔 VX2 骨肿瘤模型。将其中 20 只兔左胫骨设为左侧组, 采用自行设计的器械及改良穿刺活检技术取材, 并通过套管植入密封栓封堵穿刺孔; 右胫骨设为右侧组, 采用常规穿刺活检法, 穿刺后对穿刺孔不封堵。7 d 后处死两组家兔, 取两种穿刺法兔穿刺针道软组织行病理学检查。剩余 2 只肿瘤兔不穿刺, 作为对照组, 于肿瘤组织植入第 2 周、3 周分别处死取肿瘤外正常软组织行病理学检查。根据病理学 HE 染色结果对比 3 组瘤细胞转移情况。**结果** 左侧组针道软组织瘤细胞浸润 5 只 (25.0%), 右侧组针道软组织瘤细胞浸润 14 只 (70.0%), 两组穿刺针道瘤细胞转移率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。其余 2 只家兔肿瘤外软组织均未见瘤细胞。**结论** 改良穿刺活检技术可改善兔 VX2 骨肿瘤穿刺针道肿瘤细胞转移情况。

关键词: VX2 肿瘤; 骨肿瘤; 活检技术, 改良; 密封栓; 封堵; 针道转移

中图分类号: R 73-35 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2016)01-0040-04

Study on modified puncture biopsy method for improving needle track implantation metastasis of tumor cells in rabbits with bone tumor

CAO Hai-ying*, JIN Yu, FENG Zhen, WANG Yu, KONG Qing-zhu, YU Tao

* Graduate school of Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China

Corresponding author: JIN Yu, E-mail: 792027135@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the efficacy of modified puncture biopsy method for improving needle track implantation metastasis of tumor cells. **Methods** The fresh VX2 tumor tissues were made into cell suspension which was transplanted into bilateral tibias of 22 adult rabbits to establish the rabbit model of VX2 bone tumor. In 20 out of 22 rabbits, the left tibias were designed to left side group, and the right tibias were designed to right side group. The remaining 2 rabbits were served as control group. In left side group, the samples were drawn from left tibias using modified puncture biopsy method, and the puncture holes were plugged by implanting sealing bolt through annular tubes. In right side group, the samples were drawn from right tibias using traditional puncture biopsy technique, and the puncture holes were not plugged. In left side and right side groups, the rabbits were killed seven days after puncture, and the soft tissues in needle track were taken to perform pathological examination. In control group, the puncture was not done, and the rabbits were killed at 2- and 3-week after implanting tumor tissue, and the normal tissues outside the tumor were taken to perform pathological examination. According to pathological HE staining results, the metastatic conditions of tumor cells were compared among three groups. **Results** There were 5 rabbits with tumor cells infiltration in soft tissues of needle track in left side group and 14 rabbits with tumor cells infiltration in soft tissues of needle track in right side group, and there was significant difference in needle track tumor cells metastasis rates between two groups (25.0% vs 70.0%, $P < 0.05$). No tumor cells were found in soft tissues outside the tumor before and after puncture in control group. **Conclusion** The modified puncture biopsy technique can reduce tumor cells implantation metastasis of needle tract.

Key words: VX2 tumor; Bone tumor; Biopsy technique, modified; Sealing bolt; Plug; Needle track metastasis

随着人们生活方式的改变, 骨肿瘤特别是恶性肿瘤的发病率呈逐年升高趋势。尽管影像技术的发展

可为肿瘤的诊断提供大部分信息, 但组织活检依然是决定肿瘤诊断的金标准。目前穿刺活检是比较常用的一种活检手段, 它具有创伤小、出血少、术后不易感染等优点。虽然目前穿刺活检方式及器械在不断改进, 但克服穿刺孔出血及肿瘤细胞经针道转移等问题依然无法得到解决。本实验应用自行设计的改良穿

刺活检技术及器械对 20 只兔 VX2 骨肿瘤模型进行穿刺,应用封闭栓对穿刺孔进行封堵后,取穿刺针道组织行病理检查,明确是否有瘤细胞浸润。本实验意在发明一种减少穿刺并发症的穿刺器械。

1 材料与方法

1.1 实验动物 22 只新西兰成年家兔,月龄 4 个月,体重 2~3 kg,雌雄不限,由天津市津南区春乐实验动物养殖场提供,所有动物进行标准兔舍圈养,卫生水及标准兔饲料喂养。本实验遵循承德医学院实验动物保护及使用规定,遵循医学伦理学要求。

1.2 实验器材及仪器 光学显微镜:OLYMPUS-BX53,新的穿刺活检器械及密封栓:自行设计制作(专利号:201310050606.1)。VX2 肿瘤株由广州吉妮欧生物试剂公司提供。

1.3 兔 VX2 骨肿瘤模型制备

1.3.1 肿瘤细胞悬液的制备 将冻存的 VX2 肿瘤组织在 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下复苏,在无菌条件下将肿瘤组织剪成 1 mm^3 大小的碎组织块,并置入生理盐水中,注入兔后肢股外侧肌内,制成荷瘤兔模型,3 周后处死家兔,无菌手术切除肌肉肿瘤,去除肿瘤中心坏死组织及其周围纤维组织,将新鲜鱼肉状肿瘤组织剪成 1 mm^3 大小的碎块,离心 5 min (800 r/min),去除上清液,加入 PBS 液再离心 5 min ,去除上清液并搅拌均匀,用台盼蓝排除法计算细胞成活率,并制成 $10^6/\text{ml}$ 的肿瘤细胞悬液。

1.3.2 骨肿瘤模型制备 经耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠(1 ml/kg)麻醉后,分别给予所有家兔后肢毛发去除,俯卧位固定于操作台上,常规碘伏消毒,铺无菌孔单。于胫骨干骺端内侧较平坦处作 1 cm 长皮肤切口,分离皮下组织暴露胫骨后,用 1.6 mm 克氏针经胫骨近端关节面穿刺,克氏针与胫骨长轴平行,将克氏针送入胫骨上段髓腔 2 cm 左右,注入 0.3 ml 肿瘤细胞悬液,骨蜡封闭穿刺孔,逐层缝合。

1.3.3 实验对象的选取 肿瘤细胞悬液注入后,每 7 天行双侧胫骨 X 线检查,明确肿瘤生长情况。1 周时见胫骨上段髓内轻度溶骨破坏区,骨皮质未受累;2 周时,髓内破坏区逐渐增大,约 $1\text{ cm} \times 0.8\text{ cm}$ 大小,皮质无明显受累;3 周时,髓腔内破坏区增大明显,胫骨上段皮质轻度受累,周围软组织未见明显包块(图 1)。本实验选取肿瘤悬液植入 2 周的骨肿瘤模型为实验对象。

1.4 穿刺方法 将 20 只家兔麻醉备皮后,仰卧位固定在操作台上,常规碘伏消毒,铺无菌孔单。将 20 只

家兔左胫骨 VX2 骨肿瘤(左侧组)采用改良穿刺活检技术进行穿刺,当穿刺针到达肿瘤内时,拔出针芯,套管针保持位置不动,插入病理针,旋转采取少量肿瘤组织;保持套管不动,密封栓从针尾放进套管,用针芯顺套管将密封栓顶置肿瘤浅层穿刺孔内,进行封堵。右胫骨 VX2 骨肿瘤(右侧组)采用传统穿刺活检技术,对穿刺孔不封堵(图 2),然后缝合。

1.5 术后评定 穿刺 7 d 后,处死已行肿瘤穿刺的 20 只家兔,取肿瘤外穿刺针道软组织,同时于肿瘤组织植入第 2 周、3 周分别处死剩余 2 只家兔,不穿刺,取肿瘤外正常软组织。将所取组织浸泡于 4% 甲醛溶液中固定,然后进行石蜡包埋,切片并进行 HE 染色,与病理学医师共同探讨镜下结果,将左侧组、右侧组及对照组病理结果进行对比分析。

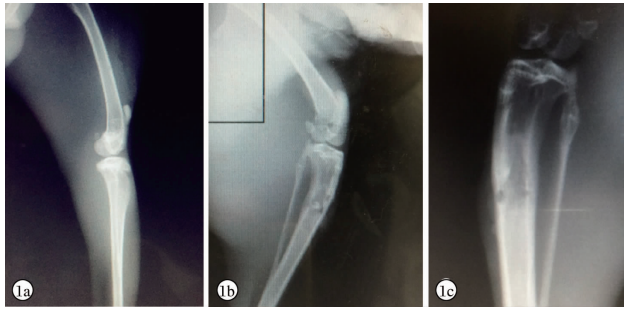
1.6 统计学分析 采用 Excel 表录入数据并进行统计学处理,对左、右侧组肿瘤细胞针道转移率进行 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

穿刺 7 d 后,左侧组可见一次性密封栓全部封堵于穿刺孔内,固定牢固。取左、右侧组肿瘤外穿刺针道软组织,行 HE 染色,病理观察示左侧组中有 5 只家兔针道软组织中发现瘤细胞,未发现瘤细胞有 15 只,而右侧组有 14 只家兔针道软组织中发现瘤细胞,未发现瘤细胞 6 只。其他 2 只家兔于肿瘤植入第 2 周、3 周时病理检查示肿瘤周围正常软组织均未发现瘤细胞侵犯。左侧组与右侧组穿刺孔针道肿瘤细胞转移率比较差异有统计学意义($\chi^2 = 8.12, P < 0.05$),即改良穿刺技术肿瘤外穿刺孔针道软组织肿瘤细胞转移率低于传统穿刺活检技术。见表 1。镜下病理所见:高倍镜下未行穿刺的肿瘤兔,于肿瘤组织植入胫骨 3 周后,肿瘤周围组织可见正常肌纤维细胞,排列整齐,未见瘤细胞侵犯(图 3a);高倍镜下改良穿刺活检法针道周围软组织肌纤维排列整齐,未见瘤细胞转移(图 3b);传统方法穿刺活检,针道周围软组织可见肌肉组织中含核大深染的肿瘤细胞,部分胞质量少,核仁明显,有较多核分裂相,细胞异型性大(图 3c)。

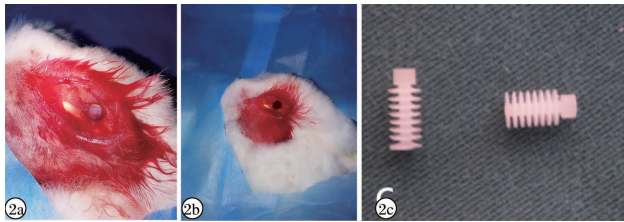
表 1 左侧组与右侧组 VX2 骨肿瘤穿刺针道肿瘤细胞转移率的比较 例(%)

组别	例数	肿瘤细胞转移		χ^2 值	P 值
		有	无		
左侧组	20	5(25.0)	15(75.0)	8.12	<0.05
右侧组	20	14(70.0)	6(30.0)		



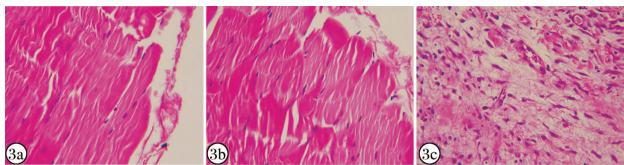
注:1a: VX2 肿瘤细胞悬液植入 1 周时见胫骨上段髓内轻度溶骨破坏区,骨皮质未被受累;1b:2 周时,髓内破坏区逐渐增大,皮质未见明显受累;1c:3 周时,髓腔内破坏区增大明显,胫骨上段皮质轻度受累,周围软组织未见明显包块。

图 1 肿瘤细胞植入兔胫骨后随时间变化 X 线图片



注:2a:应用改良法穿刺并用一次性密封栓封堵骨肿瘤穿刺孔,其周围未见明显出血;2b:穿刺后骨穿孔未行封堵,可见穿刺孔出血;2c:实验中自行设计的一次性密封栓。

图 2 两种穿刺术出血情况和自行设计的密封栓



注:3a:未行穿刺的肿瘤组织植入胫骨 3 周后肿瘤周围软组织未见瘤细胞侵犯($\times 40$);3b:改良穿刺活检术针道周围软组织未见瘤细胞转移($\times 40$);3c:传统方法穿刺活检术针道周围软组织见含核大深染的肿瘤细胞($\times 40$)。

图 3 未穿刺、改良穿刺、传统穿刺肿瘤兔的病理图(HE 染色)

3 讨论

近年骨肿瘤的发病率也呈逐年升高趋势。肿瘤的早期发现,正确诊断,对预后有着重要影响^[1]。骨肿瘤病变较为复杂,尽管影像技术的发展提供了肿瘤的大部分信息,但很多肿瘤无明显影像学差异,正确的诊断需要临床、影像及病理三者相结合,其中活体组织检查是诊断肌肉和骨骼病变的金标准^[2],而术前的组织学检查是制定手术方案的重要依据。

目前肿瘤活检方式分为闭合活检、切开活检及切除活检。切开活检获取组织较多,具有较高的整体诊断准确率^[3],但缺点是出血多、肿瘤细胞特别是恶性肿瘤细胞容易局部扩散。闭合活检多为针吸活检和穿刺活检,其中穿刺活检是获取病理诊断的主要途径,其优点是创伤小,出血少,操作方便,准确率较

高^[4]。且穿刺孔对下次手术治疗方案影响较小,但缺点是取材较少,准确率较切开活检相对较低。目前任何活检技术在活检过程中均破坏了肿瘤的自然间隔,由于人体肿瘤内压力与外界不同,肿瘤内组织会渗透到肿瘤外形成血肿,发生肿瘤细胞经针道转移等并发症^[5-6]。研究人员不断对穿刺活检器械进行改良,但始终不能解决或减少穿刺后并发症的发生。本实验通过自行设计并已经申报国家专利的穿刺活检器械及密封栓,对兔 VX2 骨肿瘤进行穿刺活检,该器械的套管进入穿刺孔同时,对其进行了物理隔离^[7],病理组织提取完毕后,用密封栓对穿刺孔进行封堵,整个操作过程中保证了穿刺孔内组织液不会外渗,从而改善穿刺孔出血及肿瘤细胞经针道转移情况。

本实验应用兔 VX2 骨肿瘤模型作为实验对象, VX2 肿瘤是一种可移植的恶性乳头状瘤,可接种在兔的肌肉、骨骼等处,所建立的肿瘤模型具有较高的生物学特性^[8-10],同时 VX2 肿瘤对骨质有局限性侵犯作用,应用其模仿人体溶骨性转移瘤^[11]。目前国内许多实验广泛应用兔 VX2 骨肿瘤模型,张小玲等^[8]应用改良法建立骨肿瘤模型,通过胫骨近段关节面钻孔植入肿瘤细胞,最大程度的保护了骨质及骨膜的完整,造模成功率较传统经胫骨干皮质穿刺植入肿瘤的方法大幅提高^[12-14],同时行影像检查,当 VX2 肿瘤细胞悬液注入兔胫骨 5~20 d 时, X 线表现髓腔内容骨性破坏区逐渐增大,骨皮质及周围软组织未见受累,而核磁共振肿瘤的进展变化同 X 线相同。同时,对肿瘤行病理观察,肿瘤种植前 15 d 内,胫骨髓腔内正常骨髓结构被肿瘤细胞破坏,骨皮质未见肿瘤细胞,病理结果同影像观察结果一致。综上,选取肿瘤细胞植入胫骨髓内 2 周时的家兔作为穿刺研究对象较为理想。

本实验将 20 只 VX2 骨肿瘤模型兔的左下肢设为实验组,应用改良穿刺法对肿瘤穿刺后,并用密封栓封堵穿刺孔;右下肢作为穿刺对照组,应用传统方法进行穿刺,对穿刺孔不进行封堵。7 d 后,左侧组所有密封栓均牢固固定于穿刺孔内,取穿刺针道软组织行 HE 染色,病理观察示左侧组针道软组织发现瘤细胞浸润 5 只,右侧组发现瘤细胞浸润 14 只。未行穿刺的 2 只家兔于肿瘤组织植入第 2、3 周处死,取肿瘤外组织行病理检查均未发现瘤细胞浸润。本研究设置对照组排除肿瘤自身对周围软组织干扰,从而使左、右侧组结论更加可靠。对左右侧组穿刺针道肿瘤细胞转移率行 χ^2 检验,差异有统计学意义,说明改良穿刺法可改善穿刺针道肿瘤细胞情况。

(下转第 45 页)

参考文献

- [1] 王松云, 鲁志兵, 赵劲波, 等. 肾动脉交感神经射频消融术的临床研究进展[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(11): 1874-1876.
- [2] 王皓, 刘洁琳, 温绍君. 经皮经导管射频消融去肾交感神经术治疗难治性高血压的研究进展[J]. 中华高血压杂志, 2013, 21(5): 483-487.
- [3] Schmieder RE, Redon J, Grassi G, et al. ESH position paper: renal denervation-an interventional therapy of resistant hypertension[J]. J Hypertens, 2012, 30(5): 837-841.
- [4] 廖康腊. 经导管射频消融去肾交感神经术的现状[J]. 心血管病学进展, 2013, 34(1): 90-93.
- [5] 李浪, 黄江南, 霍勇, 等. 经导管去肾交感神经治疗顽固性高血压——附两例报告[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2012, 20(2): 63-66.
- [6] 余航, 李慧杰, 叶明. 肾脏交感神经射频消融术治疗顽固性高血压的研究现状与展望[J]. 心血管病学进展, 2012, 33(3): 357-359.
- [7] 徐晓丹. 经皮肾交感神经射频消融术治疗高血压研究的进展[J]. 心血管康复医学杂志, 2014, 23(2): 227-230.
- [8] Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, et al. Heart disease and stroke statistics——2009 update: a report from the American Heart

Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee [J]. Circulation, 2009, 119(3): 480-486.

- [9] 胡法国, 杨晓梅, 杨麦广. 经导管射频消融去肾交感神经支配术对难治性高血压患者晨峰的影响[J]. 中国现代药物应用, 2015, 9(1): 1-2.
- [10] 王茂林. 经皮导管肾脏交感神经射频消融术治疗顽固性高血压的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(21): 3921-3923.
- [11] 吴樱, 于汇民. 经导管肾交感神经射频消融术治疗顽固性高血压的成本效益及临床疗效分析[J]. 循证医学, 2012, 12(6): 345-347.
- [12] 李俊峡, 吴龙梅, 刘建国. 经导管肾去交感神经射频消融术[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2014, 6(1): 1-2.
- [13] 邓锡伟, 谭健敏, 牛云茜, 等. 经导管肾交感神经射频消融术治疗老年顽固性高血压病的临床观察研究[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(4): 1586-1590.
- [14] 杜秋波, 赵友民, 柴建文, 等. 去肾交感神经射频消融术治疗顽固性高血压患者的疗效观察[J]. 中外医疗, 2012, 32(22): 78, 80.
- [15] 臧红云, 曲乐天, 姜胜刚, 等. 经导管去肾交感神经射频消融术治疗顽固性高血压 1 例报告[J]. 中国实用内科杂志, 2012, 32(10): 807-809.

收稿日期: 2015-09-15 编辑: 周永彬

(上接第 42 页)

该密封栓由医用高分子聚合物材料制成, 可植入体内, 密度较骨质低, 其环状翘片的直径, 成对凸起和成对倒钩的间距均大于套管通孔的内径, 可有效固定并封堵穿刺孔, 该改良穿刺法及器械的优点在于套管进入穿刺孔时, 不但对穿刺孔进行了物理隔离, 还对穿刺孔进行了封堵, 不但避免穿刺孔出血, 而且避免了穿刺孔的渗漏所造成恶性肿瘤转移。前期的研究证明, 此改良穿刺方法明显改善骨穿孔出血情况^[7], 而对于骨肿瘤穿刺孔的封堵研究, 目前国内外报道较少。随着对本改良穿刺活检技术及器械的不断改进, 相信本技术可以在以后的骨及软组织肿瘤穿刺动物实验研究中得到更好的验证, 为本项技术早日应用临床奠定良好的基础。

参考文献

- [1] 刘文生, 李远, 王涛, 等. 骨及软组织肿瘤穿刺活检技术[J]. 中国骨肿瘤骨病, 2006, 5(5): 262-265.
- [2] Welker JA, Henshaw RM, Jelinek J, et al. The percutaneous needle biopsy is safe and recommended in the diagnosis of musculoskeletal masses[J]. Cancer, 2000, 89(12): 2677-2686.
- [3] Boriani S, Ruggieri P, Sudanese A. Biopsy: considerations on surgical technique derived from a study of 749 cases of bone tumour[J]. Ital Orthop Traumatol, 1984, 10(4): 489-499.
- [4] 杨乐晋, 龙成, 刘跃洪, 等. 穿刺活检在骨肿瘤诊断中的价值

[J]. 医药论坛杂志, 2010, 31(23): 115-116.

- [5] 尹军强, 沈靖楠, 黄纲, 等. 一种新型穿刺活检针在骨与软组织肿瘤诊断中的临床应用[J]. 中华关节外科杂志, 2012, 6(3): 361-365.
- [6] 凌强, 徐聪. 四肢骨肿瘤经皮穿刺活检 36 例[J]. 现代诊断与治疗, 2010, 21(4): 244-245.
- [7] 赵景新, 金宇, 王瑜, 等. 改良穿刺活检技术改善穿刺孔出血情况研究[J]. 中国全科医学, 2014, 17(9): 1040-1044.
- [8] 张小玲, 孟俊非, 张朝晖, 等. 改良兔 VX2 骨肿瘤模型的病理学与影像学观察[J]. 中国骨肿瘤骨病, 2007, 6(2): 89-92.
- [9] 石毅, 庄永志, 李云. 家兔 VX2 肺癌模型的建立及生物学特性观察[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(8): S60.
- [10] 康立清, 张云亭, 孙世梅. 兔 VX2 脑瘤的模型建立及病理学、影像学初步研究[J]. 中华放射学杂志, 2005, 39(3): 306-309.
- [11] Lin YC, Chen JH, Han KW, et al. Ablation of liver tumor by injection of hypertonic saline[J]. AJR, 2005, 184(1): 212-219.
- [12] 陈文直, 王智彪, 白晋, 等. VX2 兔恶性骨肿瘤模型的建立及其生物学特性观察[J]. 重庆医科大学学报, 2002, 27(3): 286-288.
- [13] 方挺松, 许乙凯, 黄信华, 等. 兔 VX2 骨肿瘤模型及综合影像评价[J]. 临床放射学杂志, 2004, 23(9): 812-815.
- [14] Tsuda N, Tsuji T, Kato N, et al. Potential of superparamagnetic iron oxide in the differential diagnosis of metastasis and inflammation in bone marrow[J]. Invest Radiol, 2005, 40(10): 676-681.

收稿日期: 2015-07-22 修回日期: 2015-08-16 编辑: 石嘉莹