

·临床研究·

电离辐射杀灭肝癌手术回收血中癌细胞的实验研究

李艳萍¹, 王旭东², 钟亮¹, 彭书峻¹

(中山大学 1. 附属第二医院麻醉科, 广东 广州 510120; 2. 肿瘤医院麻醉科, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】探讨放射线照射杀灭 HCC 患者术中回收血中肝癌细胞的可行性。【方法】23 例行手术治疗的 HCC 患者, 用全自动血液回收仪回收术中出血, 经过滤得到过滤后回收血, 进一步离心、洗涤得到洗涤后浓缩红细胞, 用 50 Gy 的电离辐射线照射其中 15 例洗涤后浓缩红细胞, 得到照射后洗涤红细胞。以 RT-PCR 技术分别检测过滤后、洗涤后及照射后的标本的 AFPmRNA, 确定放射线照射杀灭回收血中肝癌细胞的有效性。【结果】23 个过滤后及洗涤后的回收血标本, AFPmRNA 检测均阳性; 15 个照射后的回收血标本 AFPmRNA 检测均阴性。【结论】①HCC 患者手术过程中回收的自体血中含有肝癌细胞; 全自动血液回收机并不能去除回收血中的肝癌细胞; ②剂量 50 Gy 的电离辐射可有效去除 HCC 患者回收的自体血中的肝癌细胞。

关键词: 血液回收; 肝细胞癌; 放射线照射; 逆转录聚合酶链反应

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)5S-0034-02

术中回收式自体输血(IAT), 即回收术野出血, 经过滤、离心、清洗、浓缩, 得到浓缩红细胞, 再回输给病人。此法用于非恶性肿瘤手术已成功减少异体输血, 有效地节约了许多手术过程中的用血。由于担心恶性肿瘤细胞全身扩散的危险性, 自体输血通常禁用于恶性肿瘤手术患者。这种方法对于恶性肿瘤的复发率、肿瘤转移的危险性和术后无瘤生存期影响的程度仍未知。作者以手术治疗的原发性肝细胞癌(HCC)患者为研究对象, 用直线加速器以 50 Gy 的电离辐射线照射洗涤后浓缩红细胞。用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)分别检测过滤后、洗涤后及电离辐射后回收血中微量肝癌细胞, 研究电离辐射杀灭回收血中肝癌细胞的可行性。

1 资料与方法

1.1 病例选择

HCC 患者 23 例, 其中男性 19 例, 女性 4 例。平均年龄 53 岁。入选病例均为原发性肝细胞癌患者, 初发病例, 并经病理证实, 没有合并生殖腺胚胎瘤, 拟行肝癌切除根治术患者。

1.2 实验方法

①麻醉方法: 采用气管内插管全麻复合硬膜外阻滞; ②血液回收: 用 Medtronic Sequestra 1000 全自动血液回收仪回收 23 例患者术中出血。回收血经过滤达到 600 mL 即进行离心、洗涤处理, 得到洗涤后的浓缩红细胞 125 mL。其 HCT 为(45±3)%; ③放射线照射: 随机抽取 15 例洗涤后的浓缩红细胞送到放疗科, 用直线加速器以 50 Gy 的电离辐射线照射; ④标本抽取: 分别取贮血器中经过滤的术野出血(过滤后)、经离心洗涤的浓缩红细胞(洗涤后)及电离辐射后的浓缩红细胞(照射后)3 种标本, 每个标本 5 mL; ⑤肝癌细胞的检测: 用 RT-PCR 方法检测过滤后、洗涤后及电离辐射后回收血中微量肝癌细胞。同时以 HepG₂ RNA 为模板作为阳性对照, 水作为阴性对照, 排除假阳性以及假阴性的情况。以 β-actin 的 mRNA 作为内参照同时扩增。

1.3 统计方法

应用“SPSS”软件进行统计分析。处理前后自身对照, 主要用 Fisher 精确四格表法进行比较。检验水准 α=0.05。

2 结果

AFPmRNA 的检测结果: 各 23 个过滤后及洗涤后的回收血标本, AFPmRNA 检测均阳性; 15 个照射后的标本 AFPmRNA 检测均阴性。

表 1 回收自体血 AFPmRNA 检测结果

| | 过滤后 | 洗涤后 | 照射后 |
|----|-----|-----|-----|
| + | 23 | 23 | 0 |
| - | 0 | 0 | 15 |
| 合计 | 23 | 23 | 15 |

P=0.00

3 讨论

自体输血可减少术后感染的发生, 提高机体免疫力, 增加肿瘤病人的无瘤生存期, 降低复发率, 提高生存率^[1], 并从预防角度根除肝炎、爱滋病等血源性疾病的传播。研究表明 93% 的肿瘤病人术中出血中可检测到肿瘤细胞^[2]。这些肿瘤细胞经克隆后接种到裸鼠身上能引起肿瘤生长。理论上 IAT 可能引起肿瘤的血行播散。所以传统认为恶性肿瘤是 IAT 的禁忌症。只有找到有效的彻底去除恶性肿瘤细胞的方法才能将术中自体输血应用于恶性肿瘤手术。

目前公认的能有效杀灭回收血中癌细胞的方法是电离辐射^[3]。并已有应用于临床病人的报道^[4]。电离辐射能造成不同起源的癌细胞中 DNA 结构的破坏, 从而导致细胞丧失分裂增殖能力而死亡。电离辐射更容易杀灭富氧的肿瘤细胞。术中回收的自体血中混有的肿瘤细胞是以单个细胞形式悬浮着。经测定, 洗涤的浓缩红细胞氧分压达(180±17) mmHg, 远远高于富氧组织的临界氧分压值 30 mmHg。

收稿日期: 2002-04-25

基金项目: 广东省医学科研基金资助项目(A2002199)

作者简介: 李艳萍(1965-), 女, 河南开封人, 硕士, 主治医师

所以理论上电离辐射可有效地杀灭回收血中的肿瘤细胞。

肿瘤细胞对放射线的敏感性用 D_0 表示。放射生物学经过多年的研究确定了数千种不同起源的肿瘤细胞的 D_0 值位于 $1 \sim 2.2 \text{ Gy}$ 范围内^[5]。细胞存活率随照射剂量增加呈指数性下降。其公式表达为 $n = n_0 \times \exp(-D/D_0)$ 。其意义为,对于某种细胞来讲,其 D_0 已确定。若给予 D_0 剂量照射有 n_0 个细胞存活,即具有分裂增殖能力,当给予 D 剂量时,细胞存活的数量为 n 。我们做最坏的设想,回收血中含有肿瘤细胞达 10^9 数量级,即表示分布于血中的肿瘤细胞累加达到一个重 1 g 的团块。这一估计值比实验测得的回收血中实际的肿瘤细胞含量的最高值还要高出 100 倍^[2]。这样的话,如果能将肿瘤细胞减少 10^{11} 数量级,只有一个细胞的 1% 存留,足以杀灭所有的肿瘤细胞。在 10^9 个细胞中,大概只有 $10^6 \sim 10^7$ 个增殖细胞,根据 Poisson 分布可以推算出无细胞存活的概率 P :

$$P = \exp\{-[n \times \exp(-D/D_0)]\}^{[3]}$$

当有 10^7 个具有增殖能力的细胞存在,以 $D_0 = 50 \text{ Gy}$ 的剂量照射。则

$$P = \exp\{-[10^7 \times \exp(-50/2.2)]\} = 99.86\%$$

故 50 Gy 的剂量可以安全地杀灭所有的恶性肿瘤细胞。

电离辐射所致细胞死亡的靶目标是在核内,即杀伤细胞核中的 DNA,红细胞由于无细胞核,所以具有抗射线能力。实验证明红细胞经 100 Gy 的放射剂量照射仍能保持原有的流变学特性,2,3-DPG 和 ATP 含量不变,不会引起溶血^[6]。甚至经 500 Gy 放射剂量照射的红细胞回输后 24 小时存活率仍高于 80% ^[3],仍高于库存期限末期库血中的红细胞存活率(75%)。

人类甲胎蛋白(AFP)是一种癌胚蛋白,血清 AFP 浓度

增高是原发性肝癌(HCC)的标志之一。作为肝癌细胞的特异性标志物,AFP mRNA 是目前研究较多的用于检测微量肝癌细胞的一个指标。用 RT-PCR 的方法检测外周血中特异性 mRNA,来发现表达这种特异性 mRNA 的肿瘤细胞的存在,是目前公认有效的检测方法。由于 HepG2 细胞株是已知的能合成 AFP 的细胞株,在本次实验过程中将其作为阳性对照,水作为阴性对照,与标本同时进行 RT-PCR 扩增,排除假阴性和假阳性的出现,并且以恒定表达的 β 肌动蛋白作为内参照来检测提取的 mRNA 的完整性和可扩增性。

参考文献:

[1] Peller S, Sayfan J, Levy Y, et al. Immunological profile changes following perioperative autologous vs homologous blood transfusion in oncologic patients[J]. J Surg Oncol, 1994, 56(2):98.
 [2] Hansen E, Wolff N, Knuechel R, et al. Tumor cells in blood shed from the surgical field[J]. Arch Surg, 1995, 130(4):387.
 [3] Hansen E, Knuechel R, Altmeyen J, et al. Blood irradiation for intraoperative autotransfusion in cancer surgery: demonstration of efficient elimination of contaminating tumor cells[J]. Transfusion, 1999, 39(6):608.
 [4] Hansen E, Altmeyen J, Kutz N, et al. Intraoperative autotransfusion in tumor surgery (abstract)[J]. Anesthesiology, 1996, 85 (Suppl 3a):58.
 [5] Weichselbaum R R, Rotmensch J, Ahmed-Swan S, et al. Radiobiological characterization of 53 human tumor cell lines[J]. Int J Radiat Biol, 1989, 56(5):553.
 [6] Suda B A, Leitman S F, Davey R J. Characteristics of red cells irradiated and subsequently frozen for long-term storage[J]. Transfusion, 1993, 33(5):389.

(编辑 张思健)

血液肿瘤病患者 CDC 交叉配型相合的血小板输注疗效

陈澍英¹, 肖露露², 邹小立¹, 林伟¹, 叶欣², 余妙容¹, 黄梓伦¹

(1. 广东省人民医院血液科, 广东广州 510080; 2. 广州血液中心, 广东广州 510095)

摘要:【目的】解决临床上血小板输注无效的途径,改善血小板输注效果。【方法】选择淋巴细胞毒试验(LCT)阳性,血小板输注无效的患者 20 例,给予作补体依赖交叉试验(CDC),从随意献血者中选出配型相合的血小板输注。【结果】所有患者从血小板输注无效转为有效,LCT 阳性率也逐渐下降至消失,使血小板输注获得良好的效果。【结论】CDC 交叉配型相合的血小板输注逆转了血小板输注无效的状况。

关键词:血小板输注;淋巴细胞毒试验;补体依赖交叉试验

中图分类号:R558.2 文献标识码:A 文章编号:1000-257X(2002)5S-0035-03

血液肿瘤病人在接受化疗、放疗后常常出现血小板减少,必须接受血小板输注,但反复输注血小板容易产生同种免疫,导致血小板输注无效。我们在 1995 年~2001 年间研究了 312 例反复输注血小板的血液肿瘤病患者,证实了血小板输注疗效与淋巴细胞毒试验阳性有密切关联^[1]。我们从淋巴细胞毒试验阳性血小板输注无效的患者中选择 20 例患者,给予输注随意献血者补体依赖交叉配型相合的血小板,

收到良好的效果,现报告如下。

1 资料和方法

1.1 病例选择

1995 年 2 月至 2001 年 8 月住院的血液肿瘤病人共 312 例,血小板输注无效 133 例(42.7%),其中淋巴细胞毒试验阳性 83 例(62.4%)。从淋巴细胞毒试验阳性血小板输注无

收稿日期:2002-04-20

基金项目:广东省重点攻关科研基金资助项目(1997-114-19)

作者简介:陈澍英(1951-),女,广东潮安人,主任医师。