肝癌行射频消融术后残癌侵袭转移潜能及机体免疫功能变化的相关研究

张 宁 王 鲁 汤钊猷

近年来,射频消融术(radiofrequency ablation, RFA)在原发性肝癌(主要为肝细胞癌,以下简称肝癌)的局部治疗中得到越来越广泛的应用,针对小肝癌,可取得与手术切除相近的效果,特别是对于肝功能较差导致手术风险极大的小肝癌患者,更是作为一种理想的根治性治疗手段^[1,2]。另外对于RFA术后肝癌的复发及残癌的侵袭及转移性的研究工作也在大量进行,本文就RFA治疗后机体免疫功能改变以及肝癌行RFA治疗术后残癌的生物特性作一综述。

一、肝癌 RFA 治疗现状

自从1995年首次报道RFA应用于小肝癌治疗后,经过10多年的发展,RFA目前已成为治疗肝癌的重要手段,其应用得到广泛的普及。有168例小肝癌患者(肿瘤直径 $<4\text{cm}$,肿瘤数目 ≤ 2 个)参与的随机临床试验中,手术切除组3年总生存率为74.8%,而在RFA组为67.2%,两组差异无统计学意义,同时两组在术后无复发生存率方面亦无明显差异^[1]。Wang等^[2]报道,将BCLC分期为早期的605例肝癌患者参与的研究中,RFA治疗组5年的总体生存率及无复发生存率分别为72.0%、29.3%,手术切除组分别为91.5%、40.7%。统计结果显示两组病人的总体生存率无显著统计学差异,但在无复发生存率方面,手术切除优于RFA。Waki等^[3]报道,88例小肝癌患者(肿瘤数目 ≤ 3 个,单个肿瘤最大直径 $\leq 3\text{cm}$)行RFA治疗5年的总生存率为70.0%,5年的无复发生存率为24.0%。Peng等^[4]在一项关于比较微小肝癌(肿瘤直径 $\leq 2\text{cm}$)RFA治疗与外科手术切除疗效的回顾性研究中报道,RFA组5年的总体生存率为71.9%,与之对应的手术组为62.1%,结果统计显示对于直径2cm甚至更小的肿瘤,RFA治疗可以取

得与手术切除相同的效果。Law等^[5]应用RFA治疗298例小肝癌(肿瘤直径 $<5\text{cm}$)患者,其中273例获得完全消融(91.6%),完全消融者术后5年总生存率为38%。Lai等^[6]近期进行的一项符合米兰标准的肝癌患者的非随机对照试验,共有111例患者入组,其中RFA组为31例,手术切除组为80例,结果提示RFA组5年无复发生存率及总体生存率分别为40%、84%,对应的手术切除组分别为60%、71%,两组在总体生存率方面并无显著差异,而且RFA治疗在微创及住院时间方面更具优势。RFA不仅在小肝癌治疗方面发挥重要作用,对于大肝癌、肝移植术后复发等病例也体现出很好的临床应用价值。江涛等^[7]报道,应用肝动脉球囊阻断下单次RFA治疗大肝癌(肿瘤直径4~8cm)取得了较为满意的疗效,肿瘤结节完全消融率为91.7%,局部复发率为9.1%,消融后未见严重并发症,肝功能指标在2周内均恢复术前水平。另有学者比较了RFA与外科手术治疗肝移植术后复发病例的疗效,RFA组和手术组的中位生存时间分别为13个月、10个月,两组的中位生存时间比较,差异有统计学意义,结果提示RFA治疗肝移植术后肝癌肝内复发疗效较好,且并发症少、患者耐受良好^[8]。

二、RFA 对肝癌侵袭转移性的影响

RFA对于肝癌尤其是小肝癌的治疗效果显著,创伤小,安全性高,但也存在肿瘤残存及复发率较高等问题。近来相关研究表明,肝癌行RFA特别是单次RFA治疗后,局部肿瘤进展发生率较高,并且是影响中远期预后的重要因素。单次RFA后不完全消融的现象比较常见(发生率3%~52%),而对于不完全消融率波动较大的原因可部分归结为肿瘤的体积,相关研究显示,当肿瘤直径 $\leq 3\text{cm}$ 时,行RFA后出现肿瘤不完全消融的比率 $<10\%$,因此很多机构将肿瘤直径 $\leq 3\text{cm}$ 作为射频应用的指征,近年来也有将RFA治疗应用于肿瘤直径 $>3\text{cm}$ 的报道,但相关结果显示肿瘤完全消融率仍欠理想,对于直径在3~5cm之间

基金项目:上海市自然科学基金青年项目(12ZR1442300)

作者单位:200032 上海,复旦大学肝癌研究所,复旦大学附属中山医院肝外科

通讯作者:汤钊猷,中国工程院院士,电子信箱:zytang88@163.com

的肿瘤,其完全消融率在 61.3% ~ 82.5%,而直径 > 5cm 的肿瘤的完全消融率降至 23.9% ~ 50.0%,可见随着肿瘤体积的增大,有消融效果变差的趋势^[5]。不完全消融必然导致肿瘤残留,这几乎使术后出现局部肿瘤进展或成为必然,相关临床研究资料显示,肝癌患者行 RFA 后出现局部肿瘤进展率为 1.7% ~ 40.0%^[9]。局部肿瘤进展与肿瘤的不完全消融相关,对于一个体积较大的肿瘤在三维空间上都取得满意的消融安全边界是存有难度的。

相关的基础研究也在同时进行,Nikfarjm 等^[10]研究了 RFA 后残癌组织的增殖性能,发现 RFA 术后 12h 射频区域的残癌增殖能力较对照组增强,且在术后 72h 达到高峰,并且能够持续到术后第 21 天,其中可能的机制在于残癌中的 FGF-2 和 VEGF 等因子的表达增加。Kroeze 等^[11]报道,在动物模型上发现肾细胞癌行 RFA 术后,残癌的增殖潜能增加,且凋亡减少,可能的机制在于缺氧、热休克蛋白和炎症细胞等因素促进了 RFA 术后残癌的复发。Ke 等^[12]研究了 RFA 时温度不足导致的残癌侵袭性,他们使用 VX2 肿瘤细胞成瘤,原位接种于兔肝之上建立移植瘤模型,行 RFA 术后发现残余肿瘤的侵袭性增强,其中肺转移率较对照组显著增加,另外一些促血管生成因子、肿瘤侵袭相关因子如 PCNA、MMP-9、VEGF、HFG 和 IL-6 等表达相应上调。Kong 等^[13]经动物实验证实肝癌行 RFA 治疗后,残癌的增殖性增加,其机制可能在于 RFA 产生的热效应使残癌 VEGF 及 HIF-1 α 的表达上调,并进一步影响 PI₃K/Akt/HIF-1 α /VEGFA 信号通路,促进新生血管生成。

三、RFA 对机体免疫功能的影响

Zerbini 等^[14]报道 RFA 治疗后可使血循环中的 NK 细胞数量增加,尤其是表达 CD3⁻CD56^{dim}的亚群,同时上调其活化受体的数目,下调其抑制性受体的数目,同时 RFA 治疗后 4 周左右的时间,可观察到增强的 NK 细胞介导的抗体依赖细胞毒作用(ADCC),另外还可促进 NK 细胞分泌 IFN- γ 等。Mizukoshi 等^[15]报道,RFA 能够增强肿瘤相关抗原特异性 T 细胞反应,该反应与 RFA 术后患者的无复发生存率是相关的,同时还证明,髓源性抑制细胞(MDSCs)对于肿瘤相关抗原特异性免疫反应起负性调节作用,肿瘤患者中的 MDSCs 可以抑制 T 淋巴细胞反应,而 RFA 可以抑制 MDSCs 的功能进而达到增强肿瘤相关抗原特异性免疫反应的作用,另外 RFA 术后 24 周,大多数患者的肿瘤相关抗原特异性 T 细胞的频率是下降

的,表明 RFA 治疗并不能诱导 T 细胞的长期存活,这也为 RFA 诱导的肿瘤特异性免疫反应不能有效控制术后复发提供了解释。Nobuoka 等^[16]报道 RFA 治疗肝癌可以诱导磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(GPC3)多肽特异性细胞毒性 T 淋巴细胞的产生,将患者外周血单核细胞(PBMCs)的 GPC3 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞的频率作为检测目标,发现与手术切除相比,RFA 治疗后 GPC3 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞的频率是增高的。Napoleatano 等^[17]报道,RFA 能够调节结肠癌肝转移患者免疫系统功能及其抗肿瘤免疫反应,研究发现结肠癌肝转移患者行 RFA 术后 7 天,循环血中 CD62L-T 细胞的初始亚群数目增加,并调节外周血中增殖性 T 细胞反应及增强抗 MUC1 细胞反应,另外 RFA 也可诱导结肠癌肝转移患者循环中 B 细胞亚群增加,并且在术后 48h 效用达到最大,而在肝癌患者中未发现该现象。Haen 等^[18]检测 22 例患有肝癌或肾癌等患者行 RFA 术后血清热休克蛋白 70(HSP70)的水平,与仅行肝穿刺活检的对照组相比,术后 1 天 RFA 组显著提高,其中 9 例升高水平达 2 倍以上,而可能原因在于 RFA 可导致 HSP70 释放进入血清。

四、RFA 联合其他治疗手段以提高疗效

1. 联合经肝动脉化疗栓塞术(TACE):TACE 治疗能有效降低肿瘤组织耐氧力,可提高热疗肿瘤组织坏死率,同时可有效杀伤癌细胞和阻断肿瘤血液供应,缩小瘤体,使肿瘤组织可完全纳入有效消融范围,得到彻底灭活,同时 TACE 栓塞肿瘤供血血管时,减少肿瘤内血液流动,降低“热沉积(heat sink)”效应,避免快速的血流将射频的热量带走而减弱毁损效率而导致的病灶残留^[19]。Peng 等^[20]进行的一组随机临床试验证实,RFA 联合 TACE 对于直径 < 7cm 的肝癌治疗效果优于单纯 RFA 治疗,可获得更好的总体生存率及无复发生存率。

2. 联合无水乙醇瘤内注射(PEI):RFA 术前应用 PEI,可减少肿瘤局部血流,减少热沉积效应,利于行 RFA 时局部温度的升高,而注入的无水乙醇可以弥散到 RFA 漏空部位,或者 RFA 不能够有效治疗的部位,如大血管旁或其他器官旁,这样可提高完全消融率,减少局部复发。另外无水乙醇可以弥散到消融范围的外周,达到一个有效的“消融安全边界”。在一项随机临床试验中,将 133 例肝癌患者随机分为 PEI 联合 RFA 治疗组和单纯 RFA 治疗组,结果提示联合治疗组 5 年生存率(49.3%)要好于单纯 RFA 组(35.9%)。

与此同时,相关的基础研究也在积极探索提高

RFA 疗效的方法。Xu 等在动物模型上发现,多种激酶抑制剂索拉非尼可以抑制不完全消融导致的残癌快速进展,其机制在于索拉非尼能够显著下调残癌组织中 HIF-1 α 和 VEGFA 的表达,并抑制残癌组织新生血管生成。Hakime 等在裸鼠肾癌模型上研究发现,RFA 联合索拉非尼能降低残癌组织的微血管密度(MVD),且能扩大 RFA 导致的凝固性坏死的面积。Mertens 等报道,同单纯 RFA 干预相比,索拉非尼联合 RFA 干预的大鼠肝脏组织,消融区域边缘正常肝组织的微血管密度下降,细胞增殖受到抑制,在干预后第 3 天差异最为显著,随后差异逐渐变小,该研究小组进一步发现一些促生长因子,如 HGF、EGF、VEGF 等因子的 mRNA 表达却是上调的,可能的原因在于索拉非尼抑制增殖的作用为一过性的,其主要作用可能是激活促生长信号通路。Govaert 等在裸鼠结肠癌肝转移模型上发现,放化疗增敏剂替拉扎明(tirapazamine)能够诱导结肠癌细胞的凋亡从而抑制不完全 RFA 导致的残癌缺氧相关性生长。

RFA 作为近 20 年发展起来的一项新技术,因微创、可重复、安全性高及疗效确切等特点,其在肝癌治疗中发挥越来越重要的作用,尤其对于小肝癌的治疗,甚至可以获得与外科手术相媲美的效果,而对于病灶较多、瘤体较大的病例,尽管有关学者采取与其他治疗手段联合使用的方法来提高疗效,但仍然难以避免术后肿瘤残留及复发率高等问题。目前对于肝癌行 RFA 治疗后残癌侵袭与转移等生物学行为的变化仍然了解较少,这也是我们下一步工作的重点,继续对导致 RFA 术后出现残癌的因素、机制及相关的干预措施进行深入的研究。

参考文献

- Feng K., Yan J, Li XW, *et al.* A randomized controlled trial of radiofrequency ablation and surgical resection in the treatment of small hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2012, 57(4): 794 - 802
- Wang JH, Wang CC, Hung CH, *et al.* Survival comparison between surgical resection and radiofrequency ablation for patients in BCLC very early/early stage hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2012, 56(2): 412 - 418
- Waki K, Aikata H, Katamura Y, *et al.* Percutaneous radiofrequency ablation as first - line treatment for small hepatocellular carcinoma: results and prognostic factors on long - term follow up[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25(3): 597 - 604
- Peng ZW, Lin XJ, Zhang YJ, *et al.* Radiofrequency ablation versus hepatic resection for the treatment of hepatocellular carcinomas 2 cm or smaller: a retrospective comparative study[J]. *Radiology*, 2012, 262(3): 1022 - 1033
- Lam VW, Ng KK, ChoK KS, *et al.* Incomplete ablation after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: analysis of risk factors and prognostic factors[J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(3): 782 - 790
- Lai EC, Tang CN. Radiofrequency ablation versus hepatic resection for hepatocellular carcinoma within the Milan criteria - A comparative study[J]. *Int J Surg*, 2013, 11(1): 77 - 80
- 江涛, 王轩, 陆雷, 等. 肝动脉球囊阻断下单次射频消融治疗中大肝癌的初步临床应用[J]. *肝胆外科杂志*, 2011, 19(2): 99 - 101
- 陈颖华, 陆敏强, 张彤, 等. 射频消融治疗肝癌肝移植术后肿瘤肝内复发的临床分析[J]. *器官移植*, 2010, 1(2): 84 - 87
- Ng KK, Poon RT, Lo CM, *et al.* Analysis of recurrence pattern and its influence on survival outcome after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastrointest Surg*, 2008, 12(1): 183 - 191
- Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. Altered growth patterns of colorectal liver metastases after thermal ablation [J]. *Surgery*, 2006, 139(1): 73 - 81
- Kroeze SG, van Melick HH, Nijkamp MW, *et al.* Incomplete thermal ablation stimulates proliferation of residual renal carcinoma cells in a translational murine model[J]. *BJU Int*, 2012, 110(6 Pt B): E281 - 286
- Ke S, Ding XM, Kong J, *et al.* Low temperature of radiofrequency ablation at the target sites can facilitate rapid progression of residual hepatic VX2 carcinoma[J]. *J Transl Med*, 2010, 29(8): 73
- Kong J, Pan B, Ke S, *et al.* Insufficient radiofrequency ablation promotes angiogenesis of residual hepatocellular carcinoma via HIF - 1 α /VEGFA[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37266
- Zerbini A, Pilli M, Laccabue D, *et al.* Radiofrequency thermal ablation for hepatocellular carcinoma stimulates autologous NK - cell response[J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(5): 1931 - 1942
- Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, *et al.* Enhancement of tumor - associated antigen - specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2012, Nov 23. doi:10.1002
- Nobuoka D, Motomura Y, Shirakawa H, *et al.* Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma induces glypican - 3 peptide - specific cytotoxic T lymphocytes[J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(1): 63 - 70
- Nopoleto C, Taurino F, Biffoni M, *et al.* RFA strongly modulates the immune system and anti - tumor immune responses in metastatic liver patient[J]. *Int J Oncol*, 2008, 32(2): 481 - 490
- Haen SP, Gouttefanqes C, Schmidt D, *et al.* Elevated serum levels of heat shock protein 70 can be detected after radiofrequency ablation [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2011, 16(5): 495 - 504
- Hou YB, Chen MH, Yan K, *et al.* Adjuvant percutaneous radiofrequency ablation of feeding artery of hepatocellular carcinoma before treatment[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2009, 15(21): 2638 - 2643
- Peng ZW, Zhang YJ, Chen MS, *et al.* Radiofrequency ablation with or without transcatheter arterial chemoembolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: a prospective randomized trial[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(4): 426 - 432

(收稿日期:2013 - 03 - 26)

(修回日期:2013 - 04 - 08)