

冷热交替治疗对肿瘤微循环的损伤及机理研究

沈圆圆, 张爱丽*

上海交通大学生命科学技术学院生物医学工程系生物传热传质实验室, 上海 200240

* 联系人, E-mail: zhangaili@sjtu.edu.cn

2009-03-30 收稿, 2009-07-04 接受

国家自然科学基金(批准号: 50725622)、上海市工程技术研究中心(编号: 08DZ2211201)和国家重点基础研究发展计划(编号: 2009CB930403)资助项目

摘要 肿瘤微循环对肿瘤生长和转移至关重要. 冷热交替治疗已被证实优于以往的单一冷疗或热疗, 其对于肿瘤微循环的损伤程度及机理是肿瘤成功治疗的关键, 但目前该方向的研究甚少. 利用裸鼠脊背皮翼肿瘤视窗模型结合激光共聚焦显微镜技术综合比较了单冷、单热及冷热交替对肿瘤微循环的损伤程度, 并建立了分析肿瘤血管在热物理作用下受力的理论模型. 通过数值计算获得了冷热交替治疗过程中肿瘤微循环血管壁的受力大小. 研究结果发现, 冷热交替造成了肿瘤微循环尤其是肿瘤中央成熟血管严重的结构性损伤. 冷热交替过程中, 血管壁先后受到迅速变化的方向相反的热应力, 有可能在血管壁形成微小裂纹. 随后加热造成的血流快速再灌注对血管壁的作用力存在应力集中现象, 推测血液流动对肿瘤血管壁的快速冲击力很可能是造成血管壁破裂的关键因素, 初步揭示了冷热交替治疗过程中肿瘤血管发生严重损伤的机理.

关键词

冷热交替治疗
肿瘤微循环损伤
热应力
血液流动

肿瘤热物理治疗(如热疗和低温冷冻)通过改变人体内局部目标组织的温度来实现治疗目的, 对人体整体的副作用及伤害性远低于常规的放疗和化疗, 具有微创、副作用小、成本低、病人痛苦小、无剂量限制等多个优点. 但目前单一的冷冻手术及热疗仍然存在一定的局限性. 热疗最明显的不足之处就是其热耐受现象^[1]. 低温手术则存在治疗不彻底而导致肿瘤复发的问题^[2]. 此外, 常规低温手术后, 被冻结组织主要借助于与周围正常未冻结组织间的温度梯度, 缓慢自然复温融化, 手术时间较长^[3].

而近年来, 研究者们尝试突破单一冷冻或热疗的局限, 将两者结合起来探究其治疗效果. 盖奇等人于1982年研究了冷热交替对狗的正常肝组织和脾组织的破坏作用^[4], 发现冷热综合治疗后的组织存在缺血性坏死区域, 并且大量炎症细胞浸润, 是单独冷冻

和加热后病理现象的综合. 俄罗斯一研究小组首次将冷冻治疗与温热疗(42℃)结合用于治疗肿瘤组织, 发现冷热综合治疗后, 小鼠肿瘤的复发率与单一冷疗和热疗相比大大降低^[5]. 奥辛斯基等对移植有Guerin肉瘤的大鼠经过-120℃的低温治疗后再进行温热治疗, 120天后的治愈率高达41%, 而单独冷冻治疗的治愈率仅为14%, 温热治疗的治愈率甚至为0^[6]. Dong等人将冷冻结合温热的方法应用于小鼠4T1扩散型乳腺癌模型中, 进一步对治愈小鼠二次接种发现小鼠对4T1肿瘤产生了免疫抵抗力^[7]. Sun等人数值模拟了冷热治疗过程中的肿瘤传热, 发现冷热交替治疗范围比单冷和单独射频的治疗范围都要大^[8]. 以上研究均显示冷热交替治疗有着单一治疗所不可比拟的优点, 但在其进入临床研究特别是对其治疗方案进行优化之前, 仍然需要对其治疗机理进

引用格式: 沈圆圆, 张爱丽. 0B 冷热交替治疗对肿瘤微循环的损伤及机理研究. 科学通报, 2009, 54: 2590~2596

Shen Y Y, Zhang A L. Study of alternate cooling and heating treatment induced tumor microvasculature injury. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0508-5

行深入的研究。

肿瘤微循环是供应肿瘤生长所需养分和发生转移的重要途径^[9]。肿瘤血管为肿瘤细胞提供生长所必须的氧及营养物质,带走新陈代谢的产物。而肿瘤细胞穿过血管壁进入血液循环是形成转移的一个重要步骤。在热物理治疗的损伤机制中,肿瘤微循环的损伤发挥着重要作用。埃迪的研究表明热疗引起的肿瘤微循环的破坏可导致 48 h 后肿瘤组织的坏死^[10]。霍夫曼等人的研究表明低温冷冻结束后,肿瘤边缘区域的细胞并没有完全坏死,而 3 d 后的肿瘤组织坏死区域大小与冷冻导致的肿瘤微循环损伤区域一致^[11]。这些研究均表明肿瘤微循环遭到损伤后,肿瘤组织会由于缺乏养分供应而坏死。因此研究冷热交替条件下肿瘤微循环响应及机理,对进一步优化治疗方案,揭示肿瘤热物理治疗机理至关重要。

针对这一目的,本文利用裸鼠背部视窗结合激光共聚焦显微镜技术,对肿瘤组织中微血管系统在单冷、单热以及冷热交替条件作用下的响应规律进行了动态实时观察研究,并通过数值计算理论分析了冷热交替过程肿瘤微循环的受力,获得了治疗过程中的热应力分布及加热过程中血液再灌注对血管壁的作用力,初步揭示了肿瘤冷热交替治疗后微循环发生的损伤机理。

1 材料和方法

1.1 裸鼠脊背皮翼视窗模型

鼠源乳腺癌 4T1 裸鼠脊背视窗肿瘤模型,见图 1(a)。采用 6 周龄的清洁级 BALB/c 雌性裸鼠((20±2) g)。将细小 4T1 瘤块接种至裸鼠视窗内。经过 10~12 d 生长,动物生长状态良好,采食量、饮水量正常,接种处无炎症发生,可清晰地观察到肿瘤新生血管的生长,如图 1(b)所示。

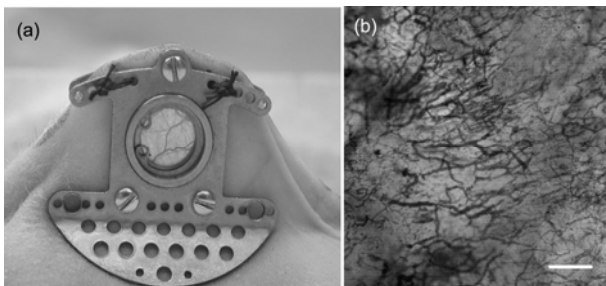


图 1 裸鼠脊背皮翼视窗肿瘤模型

(a) 皮翼视窗; (b) 移植第 10 d 的 4T1 肿瘤血管, 标尺: 200 μm

1.2 激光共聚焦荧光观察方法

本研究利用激光共聚焦显微镜 Zeiss LSM 510META(HeNe 激发光: 543 nm; 发射光: 580 nm), 结合裸鼠脊背皮翼视窗技术, 利用 100 nm 的罗丹明长效脂质体(发荧光) 作为示踪剂对单冷、单热以及冷热交替作用后的肿瘤组织进行三维实时研究。实验中的裸鼠用克他命-塞那嗪麻醉剂(20 mg/mL, 5 μL/g)腹腔注射麻醉。将 200 μL 的罗丹明标记脂质体通过尾静脉注入后, 用激光共聚焦荧光显微镜采集脂质体从微血管渗透到不同深度组织间质随时间变化的系列荧光图像。

1.3 实验分组

实验分为 4 组, 每组包括 6 只实验裸鼠。这 4 组分别为: (1) 单冷(-10 ℃, 1 h); (2) 单热(42 ℃, 1 h); (3) 冷热交替(先-10 ℃冷冻 1/2 h, 接着 42 ℃加热, 1/2 h); (4) 正常组: 34 ℃正常体温。本实验采用自制的适合显微观察和活体冷冻加热的冷热台设备, 在实验过程中, 控制室温为 25 ℃。冷热台置于共聚焦显微镜载物台上, 将热电偶放置于裸鼠视窗内, 实时监测温度。

2 结果及讨论

通过肿瘤新生血管的形态观察, 发现视窗内 4T1 肿瘤中心区域形成具有管状结构的血管, 而在肿瘤边缘则生成了丰富的没有明显管状结构的新生血管芽, 如图 2(a)和(b)所示。图 2(c)~(h)定性地显示了肿瘤微血管在不同热物理条件下的损伤。在-10 ℃条件下单冷 1 h 后, 肿瘤边缘血管的脂质体渗透增强, 同时可以观察到渗透的脂质体包裹在血管周边, 并没有快速扩散到周围间质。而中央区域结构较完整的血管, 出现肿胀, 表明淤血的形成。在 42 ℃加热过程中, 肿瘤中央区域间质内的脂质体渗透增强, 尤其是在肿瘤边缘区域。大量的荧光显示了脂质体在间质内的分布情况。对肿瘤先-10 ℃单冷 1/2 h, 接着 42 ℃单热 1/2 h 后观察肿瘤血管, 无论是肿瘤中央还是边缘区域, 都出现了大范围的高强度荧光, 无法观察到清晰的血管结构。大量的脂质体渗透, 表明此种冷热交替条件造成了较大范围的肿瘤微血管破坏。冷冻结束后对肿瘤加热, 当温度快速升至 0 ℃以上时, 停滞的肿瘤血液循环开始恢复。通过时间序列扫描发现, 当肿瘤温度上升到 18~25 ℃左右时, 脂质体的渗透快速增强, 肿瘤内发生明显出血现象, 视野内出现

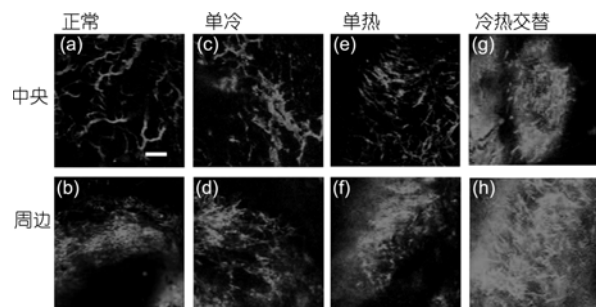


图 2 肿瘤中央和边缘区域微血管在不同热物理条件下的损伤荧光图像

图像取自透射光焦平面对应的光切片荧光通道图像。标尺: 200 μm 。
(a)和(b)正常组; (c)和(d) -10 $^{\circ}\text{C}$ 冷却 1 h 后; (e)和(f) 42 $^{\circ}\text{C}$ 加热 1 h 后;
(g)和(h) -10 /42 $^{\circ}\text{C}$ 冷热交替后

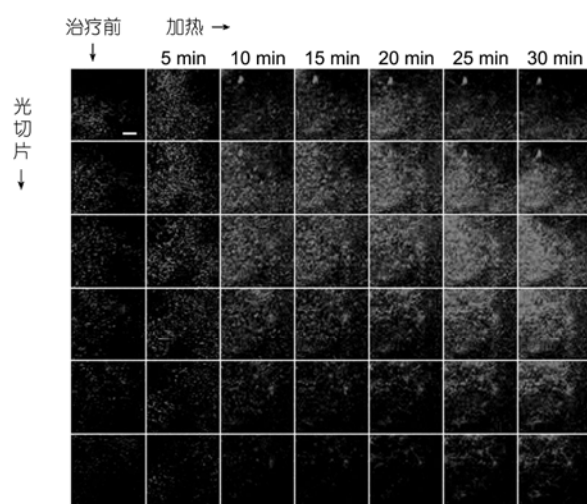


图 3 冷热交替条件的加热过程中肿瘤微循环对 100 nm 罗丹明标记脂质体的渗透随时间变化的荧光图像

标尺: 200 μm

大面积的荧光, 如图 3 所示。

以上结果表明, 肿瘤中央区域的血管对单冷和单热有一定的承受能力, 而周边区域的血管则比较脆弱。这与血管的结构组成相关。Liu 等人发现在肿瘤中心区域, 新生血管有比较完整的管状结构, 其周围被结缔组织包围。而在边缘区域, 新生血管分布凌乱, 血管壁内皮层松散, 结构不完整^[12]。因此肿瘤微血管结构的异质性对其热敏感性具有较大影响。而冷热交替条件下, 无论是中央还是周边区域的血管在升温后较短时间内均出现大面积的破裂出血现象, 血管壁受到结构性的破坏, 很可能与冷热交替对血管壁造成了机械损伤有关。

已有研究表明, 生物组织在冻结过程中因热应

力的存在而出现微小裂纹^[13]。低温保存过的血管融化后也出现裂纹现象^[14], 原因很可能是冷冻复温过程中出现巨大的机械应力。Zhang 等人通过理论分析表明冷冻和融化过程中存在的热应力对血管出现的裂纹起到共同的破坏作用^[15]。本研究实验中发现肿瘤微血管的破裂并不在血液恢复流动时立刻发生。冷热交替时肿瘤中央血管破裂的平均温度为 (23.6 ± 5.4) 。而在许多血管疾病 (例如动脉瘤, 动脉硬化) 的临床病理检测和理论研究发现, 血液流动对管壁的异常力学作用是重要的致病因素之一^[16]。血流压力、血流冲击力等血液动力学因素对于血管壁应力分布有重要影响。此外, 与正常血管不同, 肿瘤血管形状不规则, 成弯曲窦状, 也造成肿瘤血液流动复杂。因此本章利用实验取得的荧光图像, 对肿瘤的微血管进行三维重构, 分析冷热交替的加热造成的血液再灌注对血管壁的应力影响。

3 理论分析

3.1 热应力分析

裸鼠视窗内的肿瘤沿径向生长, 成扁平圆盘形, 根据这一特点, 采用如图 4 所示的物理模型。肿瘤组织半径为 1 mm, 高度为 150 μm 。由于肿瘤周边区域血液灌注丰富而中央血管缺失, 因此将组织分为中央和周边两个区域, 周边区域占三分之一。假设周边区域血液灌注率为 $0.008 \text{ m}^3/(\text{m}^3 \cdot \text{s})$ 而中央区域为零, 肿瘤组织为各向同性的均匀体。

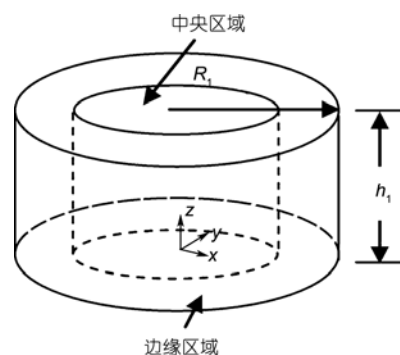


图 4 肿瘤组织热应力模型示意图

首先利用 Pennes 生物传热方程对模型进行传热分析^[17]

$$\rho_t c_{p,t} \frac{\partial T_t}{\partial t} = \nabla \cdot (k_t \nabla T_t) + \rho_b c_{p,b} \omega_b (T_a - T_t) + q_{\text{met}}, \quad (1)$$

其中 ρ , c_p 和 k 分别代表密度, 等效比热容和导热系数。

T 为温度. 下标 a, b 和 t 分别代表动脉血液, 血液和组织. ω_b 为血流灌注率, 定义为单位时间内流过单位体积的血流体积. q_{met} 为新陈代谢产热. 为了简化问题, 本文假设: (1) 相变发生在 $-1 \sim -8$ 之间; (2) 热物性和力学参数在相变区间呈线性变化, 在冻结和未冻结温度区间内定常; (3) 组织冻结后, q_{met} 为零. 本研究采取焓法处理相变问题.

由于肿瘤视窗底部与冷热台表面直接水平接触, 底部温度采用测量得到的温度数据. 肿瘤上表面设置为空气对流条件.

在降温过程中, 组织发生相变, 温度的分布以及力学性质的转变等导致热应力的产生. 选用弹性模型进行冷冻过程中的热应力计算^[15]. 假设组织冻结区与未冻结区没有明显界限. 应变-位移关系为

$$\varepsilon_{ik} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial k} + \frac{\partial u_k}{\partial i} \right), \quad i, k = x, y, z, \quad (2)$$

位移-应力的关系为:

$$\begin{cases} \varepsilon_{ik} = \frac{1+\nu}{E_t} \left(\sigma_{ik} - \frac{\nu}{1+\nu} \Theta_s \delta_{ik} \right) + \varepsilon^T \delta_{ik}, \\ \Theta = \sum_i \sigma_{ii} \end{cases} \quad (i, k = x, y, z). \quad (3)$$

上式中 ν 为位移, σ 为应力, ε 为应变, δ_{ik} 为 Kronecker delta 函数. 下标 i 和 k 代表坐标轴方向. 热应变 ε^T 为

$$\varepsilon^T = \int_{T_R}^T \alpha(T) dT, \quad (4)$$

式中 $\alpha(T)$ 为随温度变化的线性热膨胀系数. T_R 为参考温度(0). 生物组织含水量很高, 其冻结造成的体积膨胀带来的影响不能忽略, 线性膨胀系数是结冰比率 $f(T)$ 的函数, 有

$$\alpha(T) = \begin{cases} \frac{1}{3} F_w \frac{\rho_0}{\rho_{\text{water}}} \varphi \frac{df(T)}{dT} & -8 < T < -1, \\ 5.63 \times 10^{-5} + 2.528 \times 10^{-7} T & -10 \leq T \leq -8. \end{cases} \quad (5)$$

$$f(T) = \begin{cases} 0 & T > -1, \\ 1 - \left(-\frac{0.53}{T} \right) & -8 \leq T \leq -1. \end{cases} \quad (6)$$

其中 φ 为水结冰的体积相对变化值, 取为 0.087^[18]. ρ_0 是未冻结组织的密度, ρ_{water} 是水的密度, F_w 是未冻结生物材料内的水分含量. 计算中所选取的热物性和力学参数如表 1 所示. 正常组织与肿瘤组织含水量和

表 1 组织的热物性参数和力学参数

参数	-8	-3	-1
密度 $\rho_t/\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$	917		999
等效比热 $c_{p,t}/\text{kJ}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$	1.977	39.049	3.689 ^[19]
热传导率 $k_t/\text{W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$	1.56		0.51 ^[19]
杨氏模量 E_t/MPa	1000		1
泊松比 ν	0.33		0.49
对流换热系数 $h/\text{W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{K}^{-1}$	10	环境温度 $T_{\text{air}}/$	25
新陈代谢产热率 $q_{\text{met}}/\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}$	0.17 ^[19] ($T > -1$)	血液灌注率 $\omega_b(\text{m}^3/(\text{m}^3\cdot\text{s}))$	0.008 ^[20]
水的密度 $\rho_{\text{water}}/\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$	999	未冻结组织水分含量 F_w	80%

成分差异较小, 其比热容和热传导率相差不大, 因此本文计算中采用正常组织的值. 但肿瘤细胞新陈代谢产热以及肿瘤组织中血液灌注率则与正常组织差异较大, 因此本文中这两个参数采用的均为文献报道的肿瘤组织的值.

本研究利用通用有限元计算软件 ANSYS(v11sp1) 对冷热交替过程的热应力进行模拟计算. 计算时先进行非线性瞬态热分析, 将温度场结果作为载荷加载在单元节点上, 再进行准稳态静力分析. 因实验中组织底部皮肤固定在冷热台表面, 因此在模型中, 扁平圆柱体底面 z 方向设置为固定面. 其他边界面则为自由面.

3.2 血液流动对血管壁作用力

冷冻造成肿瘤血流停止, 在复温后 0~3 血液开始恢复^[21]. 冷热交替过程中的加热则造成血液灌注的快速恢复, 对血管壁产生作用力, 该力大小可通过血液流动动力学模拟获得. 与正常血管不同, 肿瘤血管形状不规则, 成弯曲囊状, 本文采用的血管模型是根据实验采集的肿瘤血管荧光图像进行重构, 血管厚度取为 2 μm .

微血管内血液流动的雷诺数 < 10 , 假设血液为不可压缩的层流牛顿流体黏性系数为 0.0013 Pa·s, 遵循纳维-斯托克斯方程. 流体采用了如下边界条件: () 管壁无滑移; () 出口压力等同于肿瘤间质压力, 为 11.4 mm Hg; () 由于缺乏血液从停滞至恢复的流速数据, 假设血液变化与温度呈比例关系, 血液正常流速为 1.18 mm/s. 血管壁是线弹性体, 弹性模量为 73 kPa. 采取流固耦合数值计算的方法进行肿瘤微血管壁的受力分析. 使用 ANSYS 的 Multiphysics 和 CFX 求解器进行非线性瞬态流固耦合分析.

4 数值计算结果与讨论

实验中测得的肿瘤底部在冷热交替过程中降温、升温速率以及自然复温过程中的复温速率分别为 -3.2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 5.8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 和 1.4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 将其作为边界条件通过数值求解传热方程(1)式获得了肿瘤组织在冷热交替和单冷治疗过程中的温度瞬态分布. 图5显示了肿瘤中心区域中点1(0, 0, 75 μm) 和边缘组织 midpoint 2 (900, 0, 75 μm) 的温度分布. 图中可以看出, 随着降温的进行, 降温速率慢慢减小, 当加热开始时, 温度快速上升, 升温速率是自然复温速率的3倍以上. 所研究的视窗内肿瘤体积很小, 因此中央组织点1和边缘组织 midpoint 2 的距离较接近(<1 mm), 其温度差异很小(<0.1 $^{\circ}\text{C}$), 图中显示曲线几乎完全重合.

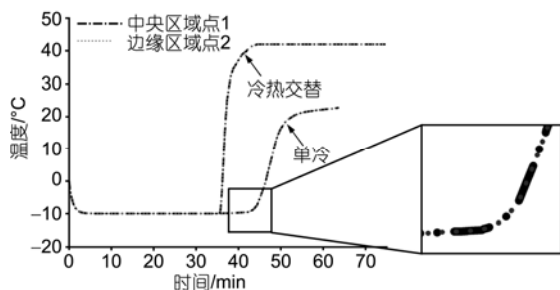


图5 冷热交替和单冷过程肿瘤中央点1和周边区域点2的温度变化计算结果

将计算获得的温度场信息作为体载荷加载到组织内单元节点, 进行热应力的计算. 图6所示为冷热交替和单冷过程中肿瘤中心区域点1所受应力随时间变化规律. 应力为正说明受到张应力, 反之为负则受到压应力. 随着温度的降低, 应力逐渐增大, 并且为正应力, 说明肿瘤组织受到的是张应力, 峰值达到8000 Pa. 计算结果显示在 x 方向应力与 y 方向应力的数值接近. 本文中假设肿瘤组织为各向同性材料, 而温度差异主要发生 z 方向, 因此在 x, y 方向的应力结果较接近. 随着相变过程的结束, 肿瘤内温度分布趋于均匀, 应力也慢慢得到释放.

冷热交替的加热引起的应力与冻结过程中的应力方向相反, 且随着加热迅速增大. 最大值达到5000 Pa. 在这一过程中所受的相反方向作用力显然会加剧对组织特别是肿瘤血管的破坏作用. 而单冷后的自然复温过程中, 应力则是缓慢增大.

与正常血管相比, 肿瘤血管无论在形态上还是结构上都具有不同的特点. 肿瘤血管扭曲扩张, 结构

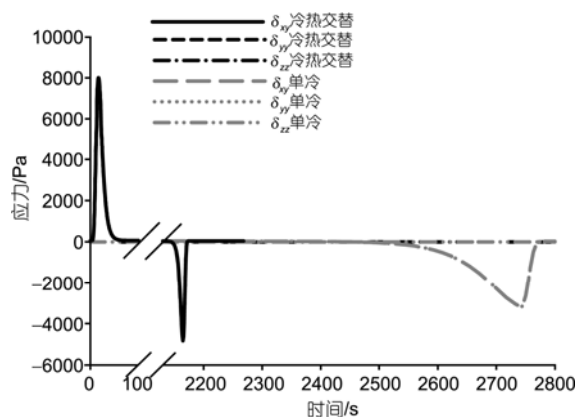


图6 冷热交替和单冷过程中肿瘤中央点1的应力随时间变化计算结果

紊乱; 内皮细胞层连接松散, 存在小孔, 使得血管壁通透性高; 基底膜缺失等等. 正是由于这些不正常的特征, 造成了肿瘤血管的脆弱性以及热较高的敏感性. 因此, 冷冻过程中的热应力极易对肿瘤边缘血管壁结构造成破坏. Shi等人的研究表明, 冰冻土豆在 -10 $^{\circ}\text{C}$ 的断裂强度约为0.7 MPa^[22]. 本研究计算得到的热应力值小于该值, 可能不足以造成血管结构的彻底破坏, 特别是肿瘤中央成熟血管, 但该迅速变化的相反方向的作用力, 可能造成肿瘤边缘不成熟血管的损伤, 也有可能造成肿瘤中央血管的微小裂纹. 单冷实验结果表明复温后边缘血管区出现出血点. 与单冷自然复温不同的是, 冷热交替过程中的加热对组织施加了快速的反方向应力, 因此有可能加剧对中央成熟血管裂纹的扩展. 肿瘤组织内血管与正常组织的血管结构上存在明显差异, 其力学性质(包括其弹性模量与断裂强度)也应有较大区别. 但目前文献中未见肿瘤血管力学性质报道, 因此本文中暂时采取文献报道的正常毛细血管的弹性模量进行计算, 而关于肿瘤血管的力学性质, 特别是其与正常组织中血管的比较则需要进一步研究.

在冷冻后的加热过程中, 血管内血液流动恢复, 血压对血管壁产生作用力, 假设血流恢复速度与温度成正比. 图7(b)所示为加热后入口速度达到正常速度1.18 mm/s时血管壁因血液流动所受的等效应力分布图. 所定义的等效应力为3项主应力的组合

$$\sigma_E = \left\{ \frac{1}{2} [(\sigma_{xx} - \sigma_{yy})^2 + (\sigma_{yy} - \sigma_{zz})^2 + (\sigma_{zz} - \sigma_{xx})^2] + 6(\sigma_{xy}^2 + \sigma_{yz}^2 + \sigma_{zx}^2) \right\}^{\frac{1}{2}}$$

从图中可以看出, 等效应力分布很不均匀, 这是由于肿瘤血管结构的不均匀性造成的. 在肿瘤血管的弯曲段, 存在应力的集中点, 如图中箭头所示. 最大值达到约 40 kPa, 是热应力最大值的 5 倍. 这种应力集中点的存在应是造成血管破坏的重要原因.

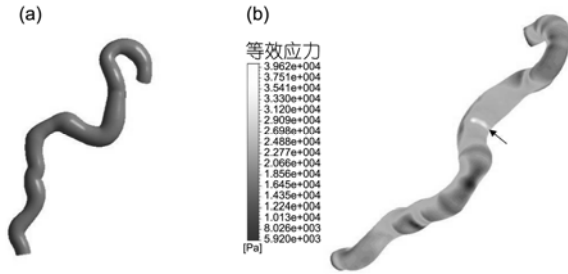


图 7 流固耦合分析血管模型(a)和加热后入口速度为 1.18 mm/s 血管壁的等效应力分布图(b)

图 8 所示为在单冷、冷热交替治疗过程中血管壁应力集中点(图 7 中箭头所指)所受的等效应力比较. 在冷热交替的加热过程中, 应力迅速上升. 单冷后的自然复温过程中, 其应力上升速率比冷热交替的加热过程要小得多. 同时冷热交替过程中血流的再灌注对血管壁造成的应力也比自然复温过程的略大. 根据实验获取的破裂时刻温度, 可得破裂时应力值约为 38 kPa, 这与自然复温过程中最终所受的应力大小相差不大. 因此, 应力上升的速率应是造成血管壁破裂的关键因素.

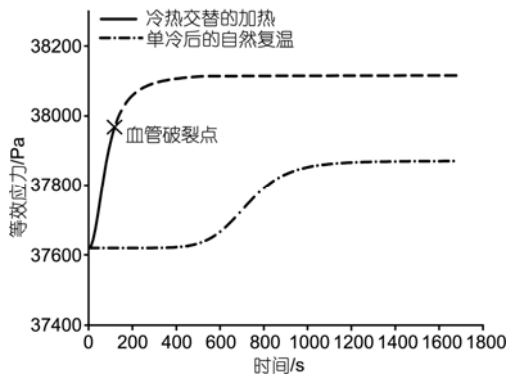


图 8 冷热交替的加热或单冷后的自然复温过程中血管壁的受力曲线图

而我们在实验中发现, 在单热过程中, 肿瘤边缘血管需要加热 30 min 后才会出现破坏, 而肿瘤中心区域的血管则不会破裂. Zhou 等的研究表明内皮细胞肌动蛋白的解聚, 细胞骨架结构变形在加热 20 min 后逐渐发生^[23], 肿瘤边缘微循环的内皮层连接松散,

因而对热更具敏感性, 热对其内皮细胞层的作用是示踪粒子外渗的主要原因. 而肿瘤中央血管壁结构相对成熟, 内皮层连接完整, 且有结缔组织支撑^[12], 在冷热交替过程中所受的机械力应是其发生破坏的主要原因. 冷冻后快速的升温过程, 迅速增加的应力与冷冻时期的热应力共同作用, 很可能是造成肿瘤中央成熟血管破裂的原因.

当然, 除了机械应力对血管壁的破坏, 冷冻过程的冰晶对血管的内皮细胞层也会产生破坏作用. 冷冻可直接导致血管内皮细胞出现损伤. 同时期的研究通过组织切片或者超显微观察表明冰晶会导致微血管基底膜的断裂以及内皮细胞层的破坏^[24]. 在融化后不久, 血管内皮细胞出现剥离甚至脱落现象^[25]. 另外, 在生化层面, 冷热交替的冷冻期间肿瘤血液循环停止, 新陈代谢活动中断造成组织缺氧, 而当血液再灌注恢复组织氧供应后, 产生大量自由基, 如氧自由基、活性氧等^[26]. 产生的自由基会使得内皮细胞生物膜脂质过氧化增强, 破坏膜的正常结构及功能. 此外在缺血再灌注损伤的组织中有中性粒细胞在损伤区域大量聚集和黏附, 通过激活氧化酶释放增加蛋白溶解酶降解细胞外网状结构的所有成分, 造成内皮细胞的破坏. 而内皮层的破坏导致血小板激活, 黏附, 血细胞聚集, 从而形成血栓, 造成血管阻塞. 这些都会对血液循环产生一定的损伤, 甚至血液停止, 但是我们的实验结果发生更严重的血管损伤, 血液从血管中大量漏出, 特别是病理分析显示是血管结构性的破坏^[27], 这些结构性的破损则应主要由机械应力造成.

生物材料的热物性和力学性质参数对于计算结果的正确性具有非常重要的作用. 由于生物组织含有较高比例的水分, 所以大部分研究都将生物组织近似为水或冰的物性. 然而测量离体兔颈动脉血管冷冻时的力学和热学性质参数发现血管壁的性质不相同于冰^[28]. 因此, 在今后的研究中, 有必要考虑到组织、血管壁和血液 3 种不同的性质对应力分布的影响. 同时, 由于缺乏血液恢复的速度曲线数据, 有必要对冷热交替的血液恢复过程进行实验研究.

5 结论

通过实验与理论计算, 本文得出如下结论:

(1) 与单冷和单热相比, 冷热交替条件对肿瘤整个区域的微循环造成更严重的损坏. 特别是对肿瘤中央成熟血管造成了严重的损伤, 切断了供应肿瘤

养分运输的通道和肿瘤发生转移的通路。

(2) 理论研究结果发现冷热交替过程中, 血管壁先后受到迅速变化的方向相反的热应力, 该作用力虽未能造成肿瘤血管的大幅破坏, 但有可能在血管壁形成微小的裂纹。随后加热造成的血流快速再灌注对血管壁的作用力不均匀, 存在应力集中现象, 且

实验观察发现血管壁的破坏正是发生在血流恢复阶段, 推测血液流动对肿瘤血管壁的冲击力很可能是造成血管壁破裂的关键因素。该研究结果初步揭示了冷热交替治疗过程中肿瘤血管发生严重损伤的机理, 为发展新型微创冷热治疗手段, 优化治疗策略提供了实验与理论依据。

参考文献

- Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, et al. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002, 43: 33—56[DOI]
- Seifert J K, Morris D L. Indicators of recurrence following cryotherapy for hepatic metastases from colorectal cancer. *Brit J Surg*, 1999, 86: 234—240[DOI]
- Rubinsky B. Cryosurgery. *Annu Rev Biomed Eng*, 2000, 2: 157—187[DOI]
- Gage A M, Montes M, Gage A A. Destruction of hepatic and splenic tissue by freezing and heating. *Cryobiology*, 1982, 19: 172—179[DOI]
- Kuz'menko A P, Todor I N, Mosienko V S. The effect of the combined use of cryosurgery and hyperthermia on an experimental tumor process. *Eksp Onkol*, 1990, 12: 60—61
- Osinsky S P, Rikberg A B, Bubnovskaja L N, et al. Tumour pH drop after cryotreatment and enhancement of hyperthermia antitumour effect. *Int J Hyperther*, 1993, 9: 297—301[DOI]
- Dong J X, Liu P, Xu L X. Immunologic response induced by synergistic effect of alternating cooling and heating of breast cancer. *Int J Hyperther*, 2009, 25: 25—33[DOI]
- Sun J Q, Zhang A L, Xu L X. Evaluation of alternate cooling and heating for tumor treatment. *Int J Heat Mass Tran*, 2008, 51: 5478—5485[DOI]
- Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol*, 1992, 3: 65—71
- Eddy H A. Alterations in tumor microvasculature during hyperthermia. *Radiology*, 1980, 137: 515—521
- Hoffmann N E, Bischof J C. Cryosurgery of normal and tumor tissue in the dorsal skin flap chamber: Part II-injury response. *J Biomech Eng*, 2001, 123: 310—316[DOI]
- Liu P, Zhang A, Xu Y, et al. Study of non-uniform nanoparticle liposome extravasation in tumour. *Int J Hyperther*, 2005, 21: 259—270[DOI]
- Rabin Y, Olson P, Taylor M J, et al. Gross damage accumulation on frozen rabbit liver due to mechanical stress at cryogenic temperatures. *Cryobiology*, 1997, 34: 394—405[DOI]
- Pegg D E, Wusteman M C, Boylan S. Fractures in cryopreserved elastic arteries. *Cryobiology*, 1997, 34: 183—192[DOI]
- Zhang A, Cheng S, Gao D, et al. Thermal stress study of two different artery cryopreservation methods. *Cryoletters*, 2005, 26: 113—120
- Leung J H, Wright A R, Cheshire N, et al. Fluid structure interaction of patient specific abdominal aortic aneurysms: A comparison with solid stress models. *Biomed Eng Online*, 2006, doi: 10.1186/1475-925x-5-33
- Pennes H H. Analysis of tissue and arterial blood temperatures in the resting forearm. *J Appl Physiol*, 1948, 1: 93—122
- Shi X, Datta A K, Mukherjee Y. Thermal stresses from large volumetric expansion during freezing of biomaterials. *J Biomech Eng*, 1998, 120: 720—726[DOI]
- Zhang A, Xu L X, Sandison G A, et al. A microscale model for prediction of breast cancer cell damage during cryosurgery. *Cryobiology*, 2003, 47: 143—154[DOI]
- Song C W, Rhee J G, Levitt S H. Blood flow in normal tissues and tumors during hyperthermia. *J Natl Cancer Inst*, 1980, 64: 119—124
- Rabb J M, Renaud M L, Brandt P A, et al. Effect of freezing and thawing on the microcirculation and capillary endothelium of the hamster cheek pouch. *Cryobiology*, 1974, 11: 508—518[DOI]
- Shi X, Datta A K, Throop J A. Mechanical property changes during freezing of a biomaterial. *Trans ASAE*, 1998, 41: 1407—1414
- Zhou M J, Zhang A, Lin B, et al. Study of heat shock response of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) using cDNA microarray. *Int J Hyperther*, 2007, 23: 225—258[DOI]
- Bowers W D, Jr Hubbard R W, Daum R C, et al. Ultrastructural studies of muscle cells and vascular endothelium immediately after freeze-thaw injury. *Cryobiology*, 1973, 10: 9—21[DOI]
- Marzella L, Jesudass R R, Manson P N, et al. Morphologic characterization of acute injury to vascular endothelium of skin after frostbite. *Plast Reconstr Surg*, 1989, 83: 67—76
- Hoffmann N E, Bischof J C. The cryobiology of cryosurgical injury. *Urology*, 2002, 60(Suppl. 1): 40—49[DOI]
- Shen Y, Liu P, Zhang A, et al. Study on tumor microvasculature damage induced by alternate cooling and heating. *Ann Biomed Eng*, 2008, 36: 1409—1419[DOI]
- 雷冬, 赵建华, 张爱丽, 等. 家兔颈总动脉血管低温力学性能的实验研究. *实验力学*, 2003, 18: 205—210