

· 临床研究 ·

消融联合化疗和单纯化疗在Ⅳ期胰腺癌治疗中的临床和实验研究

钱祝银^{1*}, 余建和², 程志³, 陈奕秋⁴, 朱一超⁴

¹南京医科大学第二附属医院胰腺中心, 江苏 南京 210003; ²兴化市人民医院肿瘤内科, 江苏 兴化 225700; ³南京医科大学第二附属医院重症医学科, 江苏 南京 210003; ⁴南京医科大学生理学系, 江苏 南京 211166

[摘要] **目的:**比较术中消融联合化疗和单纯化疗在Ⅳ期胰腺癌治疗中的效果,并初步探讨消融联合化疗的潜在细胞学机制。**方法:**入选南京医科大学第二附属医院收治的Ⅳ期胰腺癌患者,分为单纯化疗组(化疗组, $n=13$)与术中消融联合化疗组(消融组, $n=14$),分析患者临床资料,对比肿瘤指标、血常规指标及术后生存期等。同时,采用Boyden小室建立人胰腺癌细胞渗透性实验模型,探究超低温冷冻对人胰腺癌细胞渗透性的影响。**结果:**消融组治疗后总胆红素(total bilirubin, TB)显著低于化疗组,而白蛋白(albumin, ALB)显著高于化疗组($P < 0.01$)。两组CA19-9在治疗前后均没有显著差异。消融组治疗前后的白细胞数和中性粒细胞百分比均低于化疗组($P < 0.05$)。消融组治疗前血小板数高于化疗组($P < 0.05$)。化疗组治疗后的红细胞数显著低于治疗前($P < 0.01$)。消融组治疗后的中性粒细胞百分比显著高于治疗前($P < 0.01$)。消融组术后的生存期显著优于化疗组($P=0.019$)。经过超低温冷冻的胰腺癌细胞渗透性显著增强($P < 0.01$)。**结论:**术中消融联合化疗较单纯化疗对Ⅳ期胰腺癌的治疗效果更好,患者生存期延长。

[关键词] Ⅳ期胰腺癌; 术中消融; 化疗; 生存期; 渗透性

[中图分类号] R735.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2022)06-849-05

doi:10.7655/NYDXBNS20220613

The clinical and experimental study of ablation therapy combined with chemotherapy or chemotherapy alone in the treatment of stage IV pancreatic cancer

QIAN Zhuoyin^{1*}, YU Jianhe², CHENG Zhi³, CHEN Yiqiu⁴, ZHU Yichao⁴

¹Pancreas Center, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210003; ²Department of Medical Oncology, Xinghua City People's Hospital, Xinghua 225700; ³ICU, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210003; ⁴Department of Physiology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to compare the therapeutic effects of ablation therapy combined with chemotherapy and chemotherapy alone in the treatment of stage IV pancreatic cancer, and to explore the potential cytological mechanism of ablation therapy combined with chemotherapy. **Methods:** Patients with stage IV pancreatic cancer admitted to the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University were divided into two groups: chemotherapy alone group (chemotherapy group, 13 cases) and ablation therapy combined with chemotherapy group (ablation group, 14 cases). The clinical data of patients were analyzed. The tumor indexes, routine blood indexes, and survival rate were compared between these groups. To study the role of ultralow temperature on the permeability of pancreatic cancer cells, the permeability assay of pancreatic cancer cells was set up based on Boyden chambers. **Results:** The postoperative total bilirubin (TB) in ablation group was lower than that in chemotherapy group, while the postoperative albumin (ALB) in ablation group was higher than that in chemotherapy group ($P < 0.01$). The levels of CA19-9 in two groups had no significant difference. The counts of both pre-treatmental and after-treatmental white blood cells and the percentages of neutrophils in ablation group were less than those in chemotherapy group ($P < 0.05$). The count of pre-treatmental platelet in ablation group was more than that in chemotherapy group ($P < 0.05$). In chemotherapy group, the count of after-treatmental red blood cells was less than the

[基金项目] 江苏省卫生健康委员会医学科科研指导性项目(Z2021021)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: qianzhusilver@163.com

count of pre-treatmental red blood cells ($P < 0.01$). In ablation group, the percentage of after-treatmental neutrophils was higher than that of pre-treatmental neutrophils ($P < 0.01$). The survival of patients in ablation group was significantly longer than that in chemotherapy group ($P=0.019$). The permeability of pancreatic cancer cells was increased after the treatment of ultralow temperature.

Conclusion: The patients with stage IV pancreatic cancer have longer survival rates after the treatment of ablation therapy combined with chemotherapy.

[Key words] stage IV pancreatic cancer; cryoablation; chemotherapy; survival; permeability

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(06): 849-853]

胰腺癌是一种常见的消化道肿瘤,发病隐匿,进展迅速,早期转移,在所有癌症中预后最差,发病率呈上升趋势^[1]。确诊时往往已有远处转移,丧失了手术机会。目前,IV期胰腺癌患者首选以吉西他滨为基础的全身化疗,然而传统的单纯化疗效果欠佳,中位生存期不足半年,常伴有严重不良反应^[1]。

自2017年起,本中心尝试用物理消融术治疗不可切除的中晚期胰腺癌,大规模开展了术中胰腺癌冷冻消融技术(intraoperative cryoablation therapy, IOCT)^[2]。随后,本中心创新性地将原有单纯冷冻消融技术与高温热疗相结合,自2019年起开展了胰腺癌冷热复合消融技术(intraoperative combined cryoablation and hyperthermia, ICCH),可在保留冷冻消融精准安全优点的同时,结合热疗优势,使消融效果进一步提升^[3]。

本研究对比分析行术中消融联合化疗的IV期胰腺癌病例与行单纯化疗治疗的IV期胰腺癌病例,旨在进一步探讨消融技术治疗IV期胰腺癌的效果,评估其临床实用价值。同时,在细胞水平初步探讨消融术有效抑制胰腺癌细胞增殖的可能原因,为更多后续研究提供一定参考。

1 对象和方法

1.1 对象

2018年6月—2021年6月在南京医科大学第二附属医院收治的符合纳入排除标准的IV期胰腺癌患者27例,根据美国癌症联合委员会(AJCC)胰腺癌分期标准(8版)确诊为胰腺癌IV期。其中,接受单纯化疗的患者13例,接受消融手术的患者14例。纳入标准:影像学和/或病理结果证实的IV期胰腺癌患者;患者和家属知情同意并签署了知情同意书。排除标准:胰腺囊性肿瘤伴恶变,或胰腺癌伴囊性变或坏死者;严重心肺、肝肾功能不全或其他基础疾病不能耐受全身麻醉及手术者;体能状态评分(performance status, PS) > 2分者。

患者行常规化疗后,在完全知情的情况下自主选择是否采用消融术治疗(图1)。据此将所有病例分为两组:化疗组13例,年龄(58.92 ± 15.09)岁;消融组14例,年龄(61.86 ± 8.13)岁。两组患者肿瘤部位、肿瘤大小及术前合并症等比较,差异无统计学意义。本研究经南京医科大学第二附属医院医学伦理委员会批准(批准号:2018-KY-088)。

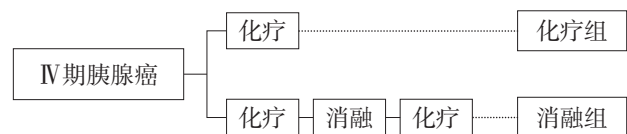


图1 化疗组与消融组治疗策略

Figure 1 The treatment strategies of chemotherapy group and ablation group

1.2 方法

1.2.1 IV期胰腺癌的化疗方案

化疗组患者采用以吉西他滨或白蛋白紫杉醇为基础药物的常规化疗方案。化疗组患者的外周血采集时间为第1轮化疗后第7天。

1.2.2 IV期胰腺癌的消融方案

对患者先行术前化疗,再行消融治疗。术后参照患者体能评分,给予后续化疗(图1)。消融组患者均行开放手术,术中探查确认肿瘤无法手术切除后,再行肿瘤的超声检查。通过超声检查判断肿瘤大小及与周围脏器的毗邻关系,并在超声引导下进行肿瘤穿刺活检。获取病理结果后,先进行IOCT或ICCH治疗,再解除肿瘤所致的胆道或肠道梗阻。消融组患者的外周血采集自消融术后第7天。

IOCT:术中超声引导下将直径为1.7 mm消融探针精准穿刺至瘤体的最远端,通过氩气制冷效应,15 s内将靶区组织冷冻至 $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右,冷冻时间8~15 min,同时用温盐水冲洗保护冰球周围器官,通过氦气的热效应,复温至 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,视为1个周期;再重复1次上述治疗,共2个周期,分段充分复温,拔出探针。

ICCH:术中超声引导下将直径为2.6 mm消融探针精准穿刺至瘤体的最远端,通过液氮制冷效应,将靶区组织冷冻至-196 ℃左右,冷冻时间6~10 min,通过酒精蒸气的热效应,复温至80 ℃,视为1个周期;再重复1次上述治疗,共2个周期,分段充分复温8 min,超声监测冰球融化,拔出探针。

术后胰痿、胃排空延迟、术后出血等并发症的诊断和分级按国际胰腺外科小组(ISGPS)的定义^[4-6],并检测糖类抗原19-9(carbohydrate antigen 19-9, CA19-9)、总胆红素(total bilirubin, TB)、白蛋白(albumin, ALB)、血糖等相关指标。

1.2.3 胰腺癌细胞渗透性实验

MIA PaCa-2人胰腺癌细胞用含有10%胎牛血清和青霉素/链霉素抗性的DMEM培养液在37 ℃ 5% CO₂细胞培养箱中常规培养。胰腺癌细胞经消化、离心后,弃去原培养液,细胞接种于8.0 μm孔径的Boyden小室,小室膜分为上下两室,中间有1层基质胶包被的聚乙烯膜。在小室的下室加入含10%胎牛血清的培养液500 μL,而在上室中加入细胞混悬液200 μL,避免产生气泡,然后继续放于培养箱培养过夜。冷冻组细胞,弃去Boyden小室中的培养液,迅速加入液氮于上室以冷冻细胞,待液氮完全挥发后,加入含10%胎牛血清的培养液;同时,弃去对照组Boyden小室中的培养液,更换新鲜的含10%胎牛血清的培养液。两组细胞均继续培养2 h,弃去Boyden小室中的培养液,加入相同体积的磷酸盐缓冲液(PBS),在上室中加入0.1%结晶紫。分别于加入结晶紫后1、3、5 min收集下室液体,检测590 nm下吸光度值。

1.2.4 细胞活力检测

MIA PaCa-2人胰腺癌细胞使用1.2.3相同方法接种于Boyden小室的上室,冷冻组细胞液氮冷冻3 min,对照组细胞正常培养,迅速加入或更换新鲜的含10%胎牛血清的培养液,置于37 ℃ 5% CO₂细胞培养箱中常规培养48 h。随后,使用CCK-8检测试剂盒(苏州美仑生物)检测细胞活力。弃去原培养基,加入含有10% CCK-8增强液的培养基,继续培养4 h后,分光光度计测定450 nm下吸光度。

1.3 统计学方法

使用SPSS 23.0进行统计学分析,正态分布的定量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析;非正态分布的定量资料用中位数(四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,组间比较采用Mann-Whitney *U*检验。使用GraphPad Prism 9绘制生存曲线,组间比较采用Log-Rank(Mantel-Cox)检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IV期胰腺癌患者化疗与消融的临床指标评价

检测结果显示,消融组治疗后TB显著低于化疗组[14.3(8.9, 18.7) μmol/L vs. 105.9(19.1, 248.0) μmol/L, $Z = -3.106, P = 0.002$],而ALB显著高于化疗组[33.6(30.7, 63.8) μmol/L vs. 29.7(27.1, 31.1) μmol/L, $Z = -2.718, P = 0.007$]。两组CA19-9在治疗前后差异无统计学意义;消融组治疗前后的白细胞数和中性粒细胞百分比均低于化疗组($P < 0.05$);消融组治疗前血小板数高于化疗组($P < 0.05$,表1)。

表1 化疗组与消融组IV期胰腺癌患者治疗前后相关指标比较

Table 1 The comparison of the indexes of patients with stage IV pancreatic cancer between chemotherapy and ablation group before and after treatment [$M(P_{25}, P_{75})$]

指标	化疗组($n=13$)			消融组($n=14$)		
	治疗前	治疗后	<i>P</i> 值	治疗前	治疗后	<i>P</i> 值
CA19-9(U/mL)	1 000.0(717.1, 4 931.3)	1 759.5(107.2, 4 704.3)	1.000	232.3(19.9, 994.7)	237.9(12.6, 777.4)	0.734
白细胞($\times 10^9$ /L)	15.31(10.11, 19.73)	15.26(9.66, 21.81)	0.898	6.81(5.31, 7.78)*	8.72(5.94, 10.94)#	0.225
中性粒细胞(%)	76.99(70.21, 80.00)	81.00(76.12, 87.00)	0.174	60.96(57.66, 63.39)*	72.64(63.43, 80.03)#	0.013
红细胞($\times 10^{12}$ /L)	3.54(3.06, 3.95)	2.73(2.50, 2.99)	0.003	3.20(2.82, 3.50)	2.86(2.15, 3.52)	0.386
血红蛋白(g/L)	95.77(83.00, 103.00)	87.77(72.00, 97.00)	0.174	97.67(87.25, 109.50)	100.83(93.75, 115.25)	0.470
血小板($\times 10^9$ /L)	133.38(105.00, 147.00)	130.85(102.00, 151.00)	0.778	165.25(144.25, 201.00)*	162.25(136.25, 190.75)	0.954
尿素(mmol/L)	6.97(3.67, 8.700)	7.10(3.82, 9.26)	0.939	6.61(4.27, 7.73)	6.69(3.99, 7.89)	0.908
钾(mmol/L)	3.96(3.66, 4.11)	4.00(3.83, 4.08)	0.758	3.85(3.68, 4.06)	3.85(3.68, 3.98)	0.840
丙氨酸氨基转移酶(U/mL)	16.24(9.80, 15.70)	16.30(10.50, 16.15)	0.959	16.38(9.24, 21.27)	17.17(9.75, 22.60)	1.000
天冬氨酸氨基转移酶(U/mL)	27.73(15.20, 37.80)	27.56(13.40, 36.11)	0.939	18.89(13.03, 24.73)	19.33(13.58, 25.18)	0.885

与化疗组治疗前比较,* $P < 0.05$;与化疗组治疗后比较,# $P < 0.05$ 。

此外,我们分别分析化疗组和消融组组内治疗前后血常规指标的差异。化疗组治疗后的红细胞数显著低于治疗前($P < 0.01$),消融组治疗后的中性粒细胞百分比显著高于治疗前($P < 0.01$,表1)。

2.2 IV期胰腺癌患者生存期评估

对IV期胰腺癌患者行生存期分析。消融组患者生存期 > 1年4例, > 6个月但 < 1年3例, < 6个月6例,失访1例;化疗组患者生存期 > 1年1例, > 6个月但 < 1年2例, < 6个月10例。消融组术后的生存期显著优于化疗组($P=0.019$,图2)。

2.3 超低温冷冻提高了胰腺癌细胞的渗透性

消融组治疗效果佳的原因可能与化疗药物在胰腺癌组织中的渗透性有关。为了在细胞水平探究超低温冷冻对胰腺癌细胞渗透性的影响,本研究基于 Boyden 小室构建了胰腺癌细胞渗透性实验模型。比色结果显示,加入结晶紫后 3 min 时,穿过聚乙烯膜的染料明显增多,显著高于 1 min 时 ($P < 0.01$,图3A)。由此,胰腺癌细胞渗透性实验采用 3 min 这个时间点来检测冷冻后的细胞(冷冻组)

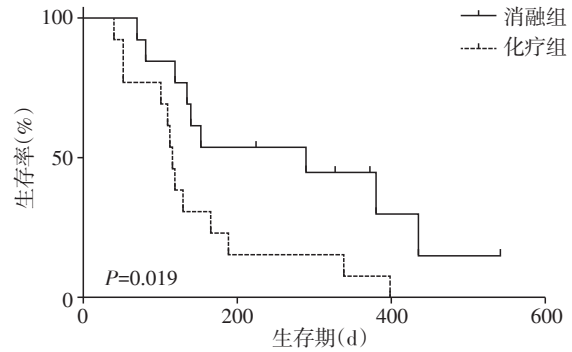
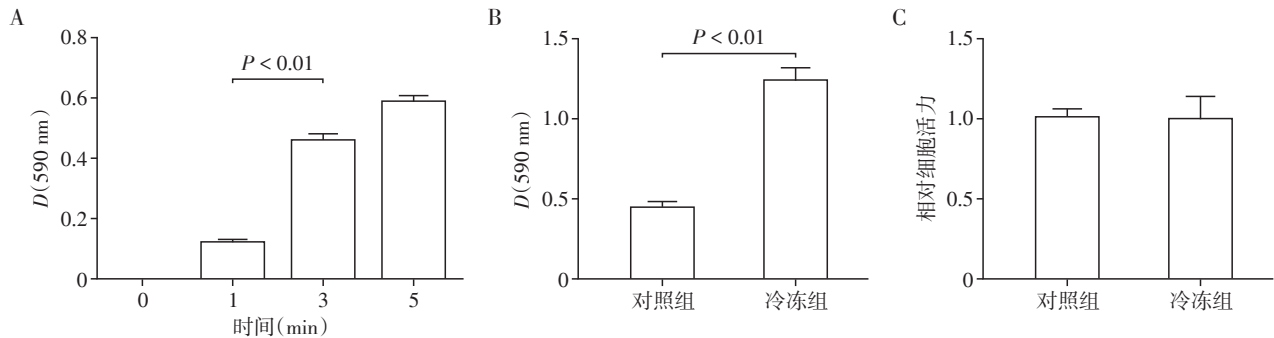


图2 IV期胰腺癌患者生存期分析

Figure 2 The survival rate of patients with stage IV pancreatic cancer

与非冷冻(对照组)细胞之间渗透性的差异。冷冻组吸光值显著高于对照组($P < 0.01$,图3B),提示超低温冷冻后胰腺癌细胞的渗透性显著增强。CCK-8 实验检测细胞活力发现,急速超低温冷冻后胰腺癌细胞的活力没有显著改变($P > 0.05$,图3C)。由此推测,超低温冷冻提高了化疗药物在胰腺癌组织中的渗透性。



A: MIA PaCa-2 人胰腺癌细胞渗透性实验模型的建立; B: 超低温冷冻对胰腺癌细胞渗透性的影响; C: 超低温冷冻后胰腺癌细胞的活力(n=5)。

图3 超低温冷冻提高了胰腺癌细胞的渗透性

Figure 3 The ultralow temperature improves the permeability of pancreatic cancer cells

3 讨论

胰腺癌恶性程度高,预后较差。目前,根治性手术切除是胰腺癌患者获得治愈机会和长期生存的唯一有效方法。由于胰腺特殊的解剖位置及生物学特性,胰腺癌起病隐匿,难以在早期发现,80%的患者确诊时已无手术机会,并且对化疗与放疗敏感性差,暂无针对性的靶向药物。单一的治疗手段疗效并不令人满意,而短期内难以突破。近年来,随着癌症综合治疗理念的普及,多学科诊疗模式在临床逐渐普及,在胰腺癌治疗中成效显著^[7]。在不同疾病阶段合理组合,可在最大化治疗效果的同时规避不良反应,在充分评估患者病情的基础上制订

合理的治疗方案,进一步改善胰腺癌患者的整体预后^[8]。

本研究对于消融组的IV期胰腺癌患者,在术前先进行常规化疗,再行消融治疗,在将原发肿瘤最大程度灭活的同时,解除肿瘤造成的胆道或肠道梗阻。术后参照患者体能评分,给予后续化疗,抑制残余的肿瘤组织,预防术后复发,延长患者生存期。符合多学科综合治疗原则,大大提高了治疗效果,延长了患者的生存时间,改善了患者的生存质量。

目前,对于不可切除的胰腺癌患者多采用全身化疗,一线药物为以吉西他滨为基础的单药或联合用药,其中白蛋白结合紫杉醇与吉西他滨的联合疗

法较为常见。最新研究表明,FOLFIRINOX方案可延长中位生存期至13个月,但这种改善伴随毒性与不良反应的增加,使其只适用于体力状态良好的患者^[9]。多项研究表明,基于氟氯嘧啶的化疗可以改善中位生存期和无病生存期^[10]。然而,因胰腺癌组织由致密的纤维组织构成,可导致血管塌陷,使组织持续处于乏氧、缺血状态^[11],血流较少,化疗药物难以渗透吸收,化疗敏感性极低,治疗效果不佳,且常伴有难以耐受的不良反应。对于晚期胰腺癌,单纯化疗无法满足延长生存期、提高生活质量的治疗需求,需联合多学科综合治疗来取得更好效果。

本研究采用Boyden小室,建立人胰腺癌细胞渗透性实验模型,以探究超低温冷冻对人胰腺癌细胞渗透性的影响。结果显示,经过超低温冷冻的胰腺癌细胞渗透性显著增强。同时我们发现,急速超低温冷冻不影响胰腺癌细胞的活力。液氮冻存细胞已经广泛应用于科研和临床,因此上述细胞活力实验的结果符合科学预期。但是,在本研究中,急速超低温冷冻对组织(尤其是活体组织)是何影响尚没有实验证据说明。消融术中的快速冷冻,可能使后续的化疗药物更易进入肿瘤组织,改善胰腺癌对化疗的低敏感性^[12],并可发挥协同促凋亡效应,符合多学科综合原则。

炎症细胞或可通过对肿瘤微环境的影响,刺激肿瘤细胞的增殖或转移^[13]。在不同类型癌症患者的外周血和肿瘤组织中均可观察到中性粒细胞数量增加。中性粒细胞在肿瘤转移中起着至关重要的作用,可促进血管生成和肿瘤增殖,引发免疫抑制^[14]。此外,中性粒细胞和白细胞水平也与胰腺癌预后相关^[15]。本研究中治疗后的白细胞与中性粒细胞指标,消融组显著低于化疗组,且化疗组水平均高于正常值。消融治疗后,较低的中性粒细胞与白细胞水平或预示着较佳的预后与生存期。

目前,IV期胰腺癌仍缺少有效的化疗药物,且化疗并发症严重。术中消融术辅以后续化疗等综合治疗,在延长患者生存期,提升生活质量方面表现出更好的疗效,值得临床推广。

[参考文献]

[1] 曹毛毛,陈万青. 中国恶性肿瘤流行情况及防控现状[J]. 中国肿瘤临床,2019,46(3):145-149
[2] 张彬,杨晓俊,顾玉青,等. 术中冷冻消融在局部进展期胰腺癌治疗中的应用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(5):163-169

[3] 钱祝银,张彬,陈奕秋,等. 术中冷冻消融和冷热复合消融治疗不可切除胰腺癌的临床研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2021,41(8):1203-1207
[4] BASSI C, MARCHEGIANI G, DERVENIS C, et al. The 2016 update of the international study group (ISGPS) definition and grading of postoperative pancreatic fistula: 11 years after[J]. *Surgery*, 2017, 161(3):584-591
[5] WENTE M N, VEIT J A, BASSI C, et al. Postpancreatectomy hemorrhage (PPH): an international study group of pancreatic surgery (ISGPS) definition[J]. *Surgery*, 2007, 142(1):20-25
[6] WENTE M N, BASSI C, DERVENIS C, et al. Delayed gastric emptying (DGE) after pancreatic surgery: a suggested definition by the international study group of pancreatic surgery (ISGPS)[J]. *Surgery*, 2007, 142(5):761-768
[7] 王成锋,杨尹默,傅德良. 中国胰腺癌多学科综合治疗模式专家共识(2020版)[J]. 临床肝胆病杂志,2020,36(9):1947-1951
[8] STROBEL O, NEOPTOLEMOS J, JAGER D, et al. Optimizing the outcomes of pancreatic cancer surgery[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(1):11-26
[9] GROSSBERG A J, CHU L C, DEIG C R, et al. Multidisciplinary standards of care and recent progress in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(5):375-403
[10] FOGEL E L, SHAHDA S, SANDRASEGARAN K, et al. A multidisciplinary approach to pancreas cancer in 2016: a review[J]. *Am J Gastroenterol*, 2017, 112(4):537-554
[11] LONGO V, BRUNETTI O, GNONI A, et al. Angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinoma: a controversial issue[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(36):58649-58658
[12] GAGE A A, BAUST J M, BAUST J G. Experimental cryosurgery investigations *in vivo* [J]. *Cryobiology*, 2009, 59(3):229-243
[13] RAPOPROT B L, STEEL H C, THERON A J, et al. Role of the neutrophil in the pathogenesis of advanced cancer and impaired responsiveness to therapy [J]. *Molecules*, 2020, 25(7):1618
[14] ZHOU B, DENG J, CHEN L, et al. Preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio and tumor-related factors to predict lymph node metastasis in nonfunctioning pancreatic neuroendocrine tumors[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):17506
[15] DENG G C, YAN H, GUO Z P, et al. Correlation between baseline serum tumor markers and clinical characteristic factors in patients with advanced pancreatic cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13:11151-11163

[收稿日期] 2022-01-09

(本文编辑:蒋莉)