

· 基础与实验研究 ·

Selection of lauromacrogol sclerotherapy for hepatic cyst: A factorial design experimental study

LUO Chen, ZHOU Jun*, FU Xue, LI Zhibo, QIN Yanli, WEI li
(Department of Ultrasound, the First College of Clinical Medical Science,
China Three Gorges University & Yichang Central People's Hospital,
Yichang 443003, China)

[Abstract] **Objective** To explore the optimal combination of concentration and action time of lauromacrogol in sclerotherapy of hepatic cyst in vivo rabbit models. **Methods** Two-factor three-level factorial design method was adopted. Fifty-four rabbit models of hepatic cyst established through ligation of cystic duct were randomly divided into 9 groups (each $n=6$). The rabbits were treated with 0.25%, 0.50%, 1.00% lauromacrogol for 5, 10, 20 min, respectively. The maximum transverse diameter of gallbladder was measured before and 1 week after treatment to evaluate the effect of sclerotherapy. Pathological changes of gallbladder tissue were observed after HE staining. **Results** One week after sclerotherapy, the volume of gallbladder reduced in all groups, and the whole wall of gallbladder had varying degrees of degeneration and necrosis. The maximal transverse diameter of gallbladder after treatment was used as the evaluation index for factorial design, and the results showed that there was an interaction between lauromacrogol concentration and action time of sclerotherapy ($P=0.019$). K value of the two-factor factorial design combination was the highest with 0.50% lauromacrogol for 10 min ($K=6.19$). **Conclusion** The best combination of drug concentration and action time of lauromacrogol for in vivo sclerotherapy of hepatic cyst rabbit models was 0.50% and 10 min.

[Keywords] hepatic cysts; lauromacrogol; sclerotherapy; factorial design; rabbits

DOI:10.13929/j.issn.1672-8475.2021.02.011

析因设计动物实验筛选聚桂醇硬化治疗 肝囊肿最佳方案

骆 晨, 周 军*, 付 雪, 李智博, 覃艳丽, 韦 力
(三峡大学第一临床医学院 宜昌市中心人民医院超声科, 湖北 宜昌 443003)

[摘要] **目的** 探讨聚桂醇在体硬化治疗肝囊肿兔模型的最佳药物浓度与作用时间组合方案。**方法** 采用两因素三水平析因设计方法, 将 54 只兔结扎胆总管建成肝囊肿模型, 并随机分为 9 组, 每组 6 只, 分别给予 0.25%、0.50% 及 1.00% 聚桂醇作用 5、10 及 20 min。测量硬化治疗前及治疗后 1 周胆囊最大横径, 评估硬化治疗效果; 采用 HE 染色观察各组胆囊组织病理学变化。**结果** 硬化治疗后 1 周, 各组胆囊体积均缩小, 囊壁全层均有不同程度变性坏死。以各组治疗后胆囊最大横径作为评价指标进行析因设计, 结果显示聚桂醇浓度与作用时间对治疗效果存在交互影响 ($P=0.019$)。两因素析因设计组合中, 0.50% 聚桂醇浓度作用 10 min 时 K 值最大 (6.19)。**结论** 聚桂醇在体硬化治疗肝囊肿兔模型的最佳药物浓度与作用时间组合方案为 0.50%、10 min。

[关键词] 肝囊肿; 聚桂醇; 硬化治疗; 析因设计; 兔

[中图分类号] R-332; R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-8475(2021)02-0109-05

[第一作者] 骆晨(1993—), 女, 湖北咸宁人, 硕士, 医师。研究方向: 超声介入。E-mail: 807182547@qq.com

[通信作者] 周军, 三峡大学第一临床医学院 宜昌市中心人民医院超声科, 443003。E-mail: zjsts8@163.com

[收稿日期] 2020-08-27 **[修回日期]** 2021-01-09

聚桂醇是疗效好且安全性高的硬化剂^[1-2],可用于有效治疗静脉曲张等血管类疾病^[3];随着微创治疗的普及和对药物本身作用机制的探索,其临床应用范围逐渐扩展。介入技术的引入为应用聚桂醇拓宽了途径,并在囊肿性疾病中展示出独特优势。肝囊肿与胆囊壁具有共同的胚胎组织来源、囊壁上皮细胞及分泌特点,故既往常选取兔胆囊进行实验研究^[4-5]。在前期研究^[6]基础上,本研究以兔胆囊模拟肝囊肿,通过析因设计筛选聚桂醇在体硬化治疗肝囊肿兔模型的最佳药物浓度与作用时间组合方案。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 2~3 月龄新西兰大白兔 58 只,雌雄不限,体质量(1.99±0.18)kg,购自湖北逸挚诚生物科技有限公司,动物质量合格证编号:42817300000548;饲养于三峡大学动物实验中心,动物许可证编号:SYXK(鄂)2017-0061。饲养条件:室温 22℃,12 h 昼夜交替,自由饮食饲养 1 周。

1.2 仪器与方法

1.2.1 制备肝囊肿在体模型 以 10%水合氯醛麻醉实验兔并常规保定后,于右上腹肋缘下作长约 7~8 cm 斜切口,充分暴露肝脏及胆囊。观察胆囊管与胆囊血管的解剖关系,结扎胆囊管(避开胆囊动、静脉),测量胆囊最大横径,之后抽尽胆汁记录胆囊容积。58 只兔造模过程中死亡 1 只,3 只因血管变异结扎失败导致胆囊缺血坏死被排除,最终 54 只造模成功(图 1)。

1.2.2 分组及硬化治疗 采用两因素三水平析因设计方法,将 54 只造模成功兔随机分为 9 组,每组 6 只,以 0.25%、0.50%、1.00% 聚桂醇分别作用 5、10、20 min。具体方法:根据分组原则,分别给予兔相应浓度聚桂醇,使胆囊呈充盈状态;达到对应作用时间后抽出硬化剂,旷置胆囊,并以生理盐水冲洗腹腔,用无菌纱布吸尽盐水,之后用 3-0 非吸收性缝线逐层关闭腹腔。继续标准条件下饲养 1 周。

1.3 相关指标观察 1 周后以空气栓塞法处死实验兔,沿原手术切口再次打开腹腔,测量胆囊最大横径,评估硬化效果。取出胆囊,剪去周围肝脏组织,观察胆囊大小、颜色、硬度及血管网等一般情况。以 10% 甲醛溶液固定胆囊组织,行脱水、石蜡包埋,制成切片用于 HE 染色。光镜下观

察各组胆囊壁全层切片病理改变及各层组织破坏程度。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计分析软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以单因素方差分析比较各组动物体质量、胆囊最大横径及胆囊容积。采用两因素析因设计方差分析,按照正交实验有交互作用两因素最优水平取决于其交互作用最优水平的原则^[7],计算聚桂醇浓度与作用时间不同水平组合时交互作用的 K 值,确定两因素交互最优水平。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组一般资料比较 各组兔硬化治疗前体质量、胆囊最大横径及胆囊容积差异均无统计学意义(P 均>0.05),治疗后 1 周胆囊最大横径差异有统计学意义(P=0.033)。见表 1。

2.2 聚桂醇注入前后胆囊变化

2.2.1 大体观 治疗前胆囊充盈良好,壁上血管走行清晰可见。硬化治疗后 1 周,自肝脏剥离的胆囊组织质地稍硬,胆囊体积较硬化前缩小,囊壁轮廓尚正常、形态欠饱满,色灰白,弹性差,未见血管网,部分囊内可见少量分泌物。见图 2。

2.2.2 病理表现

2.2.2.1 0.25% 聚桂醇 硬化治疗后 1 周,5、10 min 亚组胆囊黏膜仍可见单层柱状上皮,上皮结构轮廓清晰、皱襞完整,排列尚整齐,仅见少量上皮细胞倒伏、紊乱、脱落,炎性细胞浸润,肌层未受影响;20 min 亚组少量黏膜皱襞紊乱,黏膜上皮细胞出现坏死、脱落。见图 3。

2.2.2.2 0.50% 聚桂醇 硬化治疗后 1 周,5 min 亚组胆囊黏膜轮廓尚存,上皮细胞大部分仍完整,仅少量上皮细胞坏死脱落;10 min 亚组大部分上皮细胞全层

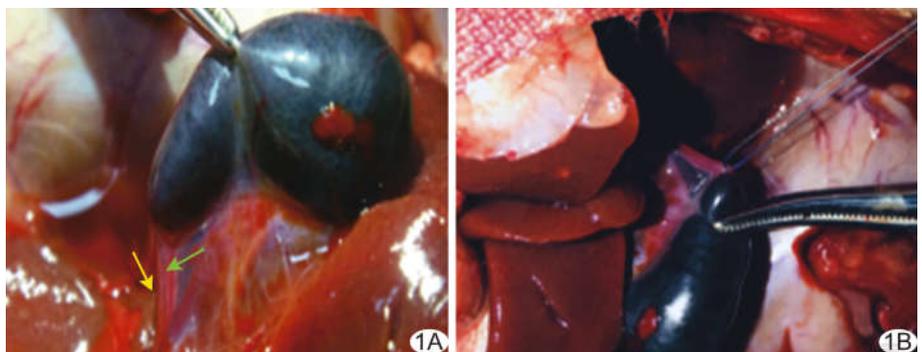


图 1 建立肝囊肿兔模型解剖图 A. 兔胆囊三角区,黄箭指胆囊管,位于红色胆囊血管(绿箭)上方; B. 结扎胆囊管,建成肝囊肿兔模型

破坏,黏膜部分轮廓尚可见;20 min亚组绝大部分黏膜结构破坏,上皮细胞全层坏死、脱落,硬化累及肌层清晰可见。见图 4。

2.2.2.3 1.00%聚桂醇 硬化治疗 1 周后,各亚组均出现不同程度囊壁变性坏死。5 min 亚组局部黏膜上皮细胞全层崩解,残留少数黏膜上皮细胞残影;10 min亚组黏膜上皮结构基本消失,黏膜下肌层见少量出血;20 min亚组上皮细胞完全脱落、坏死,未见正常黏膜结构,黏膜下肌层大量红细胞浸润。见图 5。

2.3 浓度与时间交互作用 以各组治疗后胆囊最大横径作为评价指标进行析因设计,结果显示聚桂醇浓度与作用时间对硬化治疗效果的影响存在交互作用($P=0.019$);分析作用时间的单独效应,不同作用时间胆囊最大横径差异有统计学意义($P=0.001$);分析聚桂醇浓度的单独效应,不同药物浓度间胆囊最大横径差异无统计学意义($P=0.317$)。见表 2。两因素析因设计组合中,0.50%聚桂醇浓度作用 10 min 时 K 值最大(6.19),即硬化治疗效果最好,见表 3。

3 讨论

目前超声引导下聚桂醇硬化已成为治疗囊肿类疾病的理想方案,通过破坏囊壁上皮细胞阻止囊液分泌达到治疗目的,是安全可靠、简便有效的微创介入治疗方法。研究^[8-9]表明聚桂醇用于超声引导下介入治疗囊肿效果显著,能于 80% 患者缓解临床症状,但目前仍处于经验性治疗阶段,对其药物浓度及作用时间等尚无定论。探索硬化治疗有效浓度与硬化作用时间的最佳组合对临床应用聚桂醇意义重大。胆囊横径变化可作为评估胆囊体积变化的指标,常规超声与超声造

表 1 各组兔一般资料比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	体质量(kg)	胆囊最大横径(mm)		胆囊容积(ml)
		治疗前	治疗后 1 周	
0.25%聚桂醇组				
5 min 亚组	2.06±0.20	9.65±1.23	6.68±0.79	1.45±0.22
10 min 亚组	2.02±0.12	9.73±1.07	6.03±1.13	1.37±0.19
20 min 亚组	2.22±0.19	8.53±1.80	5.52±0.58	1.40±0.27
0.50%聚桂醇组				
5 min 亚组	1.93±0.18	9.08±1.50	5.82±1.27	1.46±0.30
10 min 亚组	2.03±0.15	9.60±1.08	4.51±0.76	1.46±0.20
20 min 亚组	2.09±0.15	8.70±2.07	4.62±1.14	1.43±0.25
1.00%聚桂醇组				
5 min 亚组	1.94±0.24	8.41±1.78	4.85±0.98	1.35±0.33
10 min 亚组	2.06±0.21	10.16±1.49	5.27±0.57	1.51±0.23
20 min 亚组	1.94±0.27	9.19±1.73	5.18±0.67	1.42±0.25
F 值	0.775	0.806	2.886	0.231
P 值	0.627	0.601	0.033	0.983



图 2 1.00%聚桂醇 10 min 亚组胆囊大体观 A. 聚桂醇硬化治疗前,胆囊充盈良好,壁上可见血管走行(箭); B. 硬化治疗后 1 周,离体胆囊壁灰白,触之稍硬,未见血管网

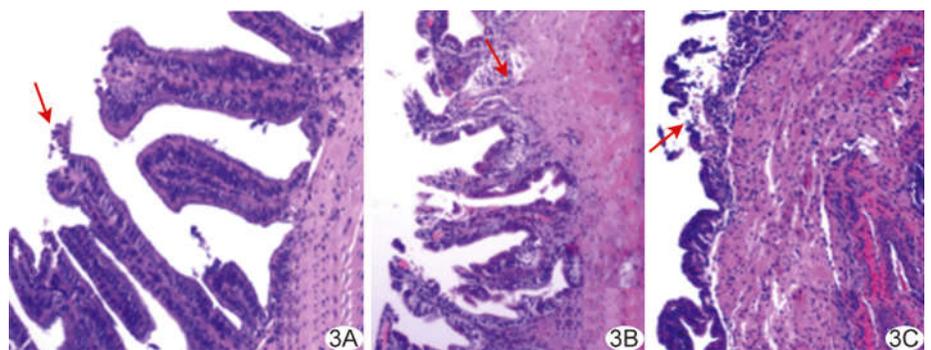


图 3 0.25%聚桂醇各亚组细胞硬化情况(HE,×200) A. 5 min 亚组,黏膜上皮细胞紊乱、尚未明显脱落(箭); B. 10 min 亚组,上皮细胞崩解,炎性细胞浸润(箭); C. 20 min 亚组,上皮细胞脱落、坏死(箭)

影条件下,胆囊横径与胆囊体积均具有良好的相关性。本研究以兔胆囊最大横径为观察指标,评估硬化后胆囊体积变化,分析硬化治疗效果。

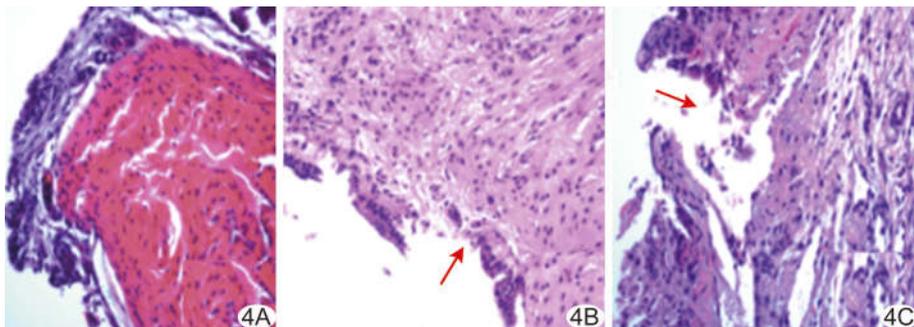


图4 0.50%聚桂醇各亚组细胞硬化情况(HE, ×100) A. 5 min 亚组, 黏膜轮廓尚存, 上皮细胞大部分仍完整, 仅少量上皮细胞出现坏死脱落; B. 10 min 亚组, 黏膜上皮细胞全层坏死、脱落(箭); C. 20 min 亚组, 黏膜层结构被破坏(箭), 肌层硬化

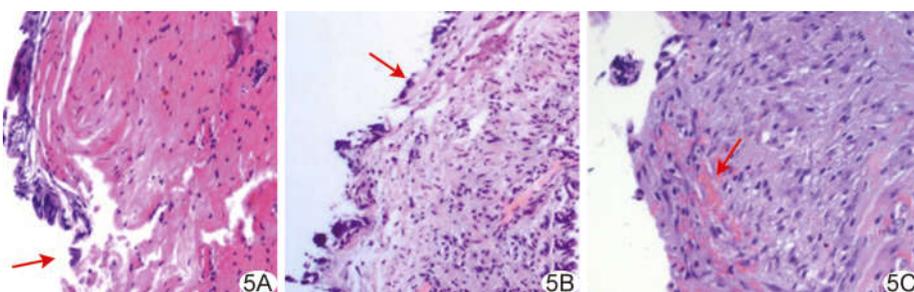


图5 1.00%聚桂醇各亚组细胞硬化情况(HE, ×100) A. 5 min 亚组, 边缘局部上皮细胞裂解(箭); B. 10 min 亚组, 黏膜层轮廓消失(箭), 黏膜下肌层部分见少量红细胞浸润; C. 20 min 亚组, 黏膜下肌层大量出血(箭)

表2 两因素析因设计方差分析结果

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F值	P值
聚桂醇浓度(A)	1.56	2	0.78	1.180	0.317
作用时间(B)	10.53	2	5.27	7.988	0.001
交互(A×B)	8.67	4	2.17	3.288	0.019
误差	29.67	45	0.66	—	—
合计	1535.13	54	—	—	—

表3 两因素析因设计组合K值

聚桂醇浓度(%)	作用时间		
	5 min	10 min	20 min
0.25	5.88	5.57	4.23
0.50	5.74	6.19	4.67
1.00	4.86	5.10	5.18

聚桂醇作用效果具有浓度依赖性。前期研究^[6]证实, 留置浓度0.25%聚桂醇作用10 min后抽出, 对囊肿的治愈率为50%, 留置不抽出治愈率可达87.5%; 而浓度为0.125%时, 即使留置不抽出, 也仅37.5%产生疗效, 提示0.25%聚桂醇可能是囊肿硬化治疗的最低有效浓度。故本实验以0.25%为最低浓度, 观察聚桂醇对模型的硬化疗效。

硬化剂作用时间亦为影响硬化疗效的关键因素。作用时间不足导致柱状上皮细胞残留, 可继续生长而致治疗失败。目前关于聚桂醇作用时间对硬化疗效影响的文献较少。KOBAYASHI等^[10]观察聚桂醇浓度与作用时间对细胞死亡的影响, 以体外培养内皮细胞为研究对象, 发现采用1.5%聚桂醇, 给药后15 s细胞即死亡, 浓度为0.3%时作用15 min后细胞死亡; 稀释至0.003%时, 作用60 min甚至更长时间细胞也不会死亡。高浓度聚桂醇可导致细胞在短时间内死亡, 而在较低浓度下细胞死亡所需时间延长, 甚至增加作用时间亦不能达到硬化治疗效果。本实验中聚桂醇浓度为0.50%、硬化时间5 min时, 仅少量上皮细胞坏死脱落, 大部分黏膜结构仍存在; 0.50%聚桂醇作用10 min亚组上皮细胞完全损伤, 而浓度0.50%、作用时间20 min亚组黏膜下肌层已受到影响, 提示作用时间过长可能损伤囊肿周围正常组织。

与目前医学科研中广泛应用的单因素多水平研究方法相比, 析因设计可同时考察多因素多水平, 在现代医学研究中具有方法学上的重要意义。本研究采用析因设计实验, 不仅能分析影响硬化治疗效果的因素, 还可筛选出最优治疗参数。本研究结果表明, 聚桂醇浓度与作用时间之间存在交互作用。显微镜下可见0.50%聚桂醇作用10 min时黏膜轮廓已破坏, 出现上皮细胞全层脱落坏死, 进一步统计分析结果证实该组硬化疗效最显著, 说明该组合可使上皮细胞发生不可逆坏死, 达到理想治疗效果。聚桂醇浓度为1.00%时对囊壁损伤较大, 黏膜上皮细胞脱落、囊腔碎屑残留、黏膜下层水肿、炎性细胞及红细胞浸润, 纤维组织增生, 致使硬化后胆囊横径值反而增大。

综上所述, 聚桂醇在体硬化治疗肝囊肿兔模型的药物浓度与作用时间最佳组合方案为0.50%、10 min。

[参考文献]

- [1] ESO Y, FURUTA A, TAKAI A, et al. Ultrasound-guided microfoam sclerotherapy with polidocanol for symptomatic giant hepatic cyst: Initial experience[J]. *Hepatol Res*, 2018, 48(12): 1055-1063.
- [2] 包作伟, 张伟民, 邵珍, 等. 超声引导下聚桂醇硬化治疗单纯性肝囊肿疗效及安全性分析[J]. *介入放射学杂志*, 2014, 23(6): 520-522.
- [3] EBRAHIMI S, ENAMZADEH E, BABAEI H. An evidence-based review of off-label uses of polidocanol [J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2017, 12(4):223-230.
- [4] REID-LOMBARDO K M, KHAN S, SCLABAS G. Hepatic cysts and liver abscess[J]. *Surg Clin North Am*, 2010, 90(4): 679-697.
- [5] ABU-WASEL B, WALSH C, KEOUGH V, et al. Pathophysiology, epidemiology, classification and treatment options for polycystic liver diseases [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(35):5775-5786.
- [6] 周军, 常俊杰, 艾婷. 两种留置方式下不同浓度聚桂醇对大鼠子宫内异位囊肿模型的硬化效果[J]. *中华超声影像学杂志*, 2015(4):347-350.
- [7] 徐吉民. 正交法在医药科研中的应用[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1987:500.
- [8] SPARCHEZ Z, RADU P, ZAHARIE F, et al. Percutaneous treatment of symptomatic non-parasitic hepatic cysts. Initial experience with single-session sclerotherapy with polidocanol[J]. *Med Ultrason*, 2014, 16(3):222-228.
- [9] WIJNANDS T F, GORTJES A P, GEVERS T J, et al. Efficacy and safety of aspiration sclerotherapy of simple hepatic cysts: A systematic review[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2017, 208(1):201-207.
- [10] KOBAYASHI S, CROOKS S, ECKMANN D M. Dose- and time-dependent liquid sclerosant effects on endothelial cell death [J]. *Dermatol Surg*, 2006, 32(12):1444-1452.

《中国介入影像与治疗学》投稿要求(二)

8 基金项目 书写格式应为:××基金(编号××)。基金论文投稿时应同时将基金项目批文扫描上传。本刊将优先选登基金论文。

9 第一作者 书写格式为:姓名(出生年—),性别,籍贯,学位,职称,研究方向和 E-mail。尚未毕业者学位写为“在读××”,如“在读硕士”、“在读博士”。投稿时,简介中需注明第一作者联系电话。

10 通信作者 通常为稿件所涉及研究工作的负责人,通信作者简介包括其姓名、单位、邮编和 E-mail。

11 摘要 研究论著和综述性论文均须附中、英文摘要,英文在前,中文在后;经验交流和短篇报道不设摘要。摘要应以第三人称撰写,不宜超过 350 个汉字,不宜使用“我们”、“作者”等词作为主语。研究论著类论文的摘要应按结构式摘要的特征撰写,包括目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)、结论(Conclusion)四项。综述性论文的摘要应按指示性摘要的特征撰写,简要叙述文章内容,无须按“四项式”编写。摘要应具有独立性和自明性,并且拥有与文献同等量的主要信息,在有限的字数内向读者提供尽可能多的定性或定量的信息,充分反映该研究的创新之处。英文摘要在 300 个实词左右,内容和形式要求与中文摘要基本对应。

12 关键词 中文关键词应以《医学主题词注释字顺表(2002 年版)》为准,以标引能表达全文主题概念的叙词 2~5 个,尽量少用自由词。英文关键词应与中文对应,以《医学主题词注释字顺表(2002 年版)》及《Mesh》内所列的主题词为准,每个英文关键词第一个词的首字母大写,各关键词之间用分号隔开。

13 正文标题层次 如:1 资料与方法(或材料与与方法),1.1 资料(或材料),1.2 方法,2 结果,3 讨论,一般不超过三级标题,文内连序号为圈码,如①、②、③……表示。

14 医学名词 应注意规范、标准、前后统一,尽量少用缩略语,原词过长且在文中多次出现(2 次以上)者,可于括号内写出全称并加注简称,以后用简称。医学名词术语,以全国科学技术名词审定委员会审定公布的医学名词为准。