

冷冻消融治疗对肺腺癌细胞凋亡的影响

林事成^{1*}, 刘殿娜^{1*}, 庄垚雪¹, 梁天宇¹, 王潇凡¹, 胡凯文², 李泉旺²

摘要 目的 探究冷冻消融治疗对肺腺癌细胞凋亡的影响。方法 根据冷冻消融术后肿瘤组织局部变化,在细胞水平上建立肺癌冷冻消融模型。传代培养人肺癌 H1299 细胞株,将细胞分为 4 组:A 组,未处理细胞,为对照组;B 组,未处理细胞培养液中加入坏死液(将细胞悬液放入液氮罐中冷冻 5 min,37 °C 复温后离心取上清液,得到坏死液);C 组,亚致死细胞(细胞在 -80 °C 环境中冷冻 7 min,模拟亚致死状态);D 组,亚致死细胞培养液中加入坏死液。24 h 后用流式细胞术检查冷冻消融对肺癌细胞凋亡的影响,qRT-PCR 和 Western blot 检测冷冻消融对凋亡相关分子 B 细胞淋巴瘤基因-2 (Bcl-2)及 Bcl-2 相关 x 蛋白(Bax)表达的影响。采用 Lewis 肺腺癌细胞株建立 C57BL/6 小鼠皮下移植瘤模型,造模成功的小鼠随机分成 2 组,假手术组和冷冻消融组,每组 4 只,氩氦刀冷冻 14 d 后,取肿瘤组织,通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测冷冻消融对凋亡相关分子 Bax 及 Bcl-2 表达的影响。结果 细胞冷冻模型中与对照组 A 组相比,B、C、D 组均能促进细胞凋亡($P < 0.05$),且 D 组细胞凋亡率最高,高于其他组($P < 0.05$),体外和体内实验均显示冷冻消融能提高 Bax mRNA 和蛋白的表达($P < 0.05$),体内实验中 Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达均下降($P < 0.05$),在体外细胞冷冻模型中差异无统计学意义。结论 冷冻消融通过细胞凋亡机制达到有效消融目的,其作用机制可能与降低 Bcl-2/Bax 相关。

关键词 冷冻消融;肺腺癌;细胞凋亡;小鼠

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0963-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.022

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,中国的发病率和病死率均排在第一^[1],由于早期的肺癌症状不明显,多数病人发现时就已经是晚期,无法进行手术根

治。冷冻消融是新兴的肿瘤微创治疗手段,安全有效,不良事件发生率低。已在前列腺癌、肺癌、肝癌等多种实体肿瘤上取得良好临床治疗效果。冷冻消融治疗过程中,在最大限度消灭肿瘤的同时又要保护正常组织,很难保证所有癌组织都能达到致死温度,将会形成一圈亚致死区。冷冻消融后残存肿瘤细胞及肿瘤微环境与肿瘤的复发、转移密切相关。冷冻消融后对残留肿瘤细胞存在的后续杀伤作用及其具体机制尚不明确。该课题将利用细胞实验和动物实验验证冷冻消融对肺癌细胞凋亡的影响,并初步探索其作用机制,以期冷冻消融的临床应用提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人肺癌 H1299 细胞株(武汉普诺赛生命科技有限公司);小鼠肺癌 Lewis 细胞株(江苏凯基生物技术股份有限公司);SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠共 8 只(北京斯贝福生物技术有限公司),6 周龄,体质量(20 ± 2)g,许可证号:SCXK(京)2019-0010;氩氦刀冷冻治疗系统及 1.2 mm 冷冻刀头(美国 Endocare 公司);RPMI-1640 培养基、DMEM 高糖培养基(美国 Hyclon 公司);胎牛血清(美国 Merck 公司);Annexin V-Fitc/PI 双染试剂盒(江苏凯基生物公司);Reveraid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司);SYBR qPCR Super-Mix Plus 试剂盒(苏州近岸蛋白公司);Bax 及 Bcl-2 多克隆抗体及山羊抗兔(鼠) IgG 二抗(武汉 Proteintech 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 RPMI-1640 完全培养基(RPMI-1640 + 10% 胎牛血清 + 1% 双抗)培养 H1299 细胞,DMEM 高糖培养基(DMEM 高糖 + 10% 胎牛血清 + 1% 双抗)培养 Lewis 细胞,均置于恒温细胞孵育箱中培养,待细胞生长至 70% 时进行传代,约 2 ~ 3 d 传代 1 次。

1.2.2 细胞冷冻模型建立及分组 收集对数生长期的 H1299 细胞,调整细胞浓度 5×10^5 个/ml,取 5 ml 装入冻存管中,将其放入 -80 °C 冰箱中冷冻 7

2022-03-21 接收

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助北京中医药大学重点攻关项目(编号:2020-JYB-ZDGG-127);国家重点研发计划资助项目(编号:2018YFC1705102);首都卫生发展科研专项项目(编号:2018-1-4201)

作者单位:¹ 北京中医药大学第二临床医学院,北京 100029

² 北京中医药大学东方医院肿瘤科,北京 100078

作者简介:林事成,男,硕士研究生;

李泉旺,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:quanwangli@126.com

* 对本文具有同等贡献

min, 37 ℃水浴复温, 模拟亚致死区细胞; 另外取 5 ml 细胞悬液装入冻存管中, 将其放入液氮冷冻 5 min, 37 ℃水浴复温, 模拟坏死细胞, 离心收集细胞上清液, 可得细胞坏死液。实验分组 A 组: 正常细胞 + 完全培养基 (未冷冻区域); B 组: 正常细胞 + 坏死液培养, 完全培养基 2 : 1 (接近冷冻区域正常细胞); C 组: 亚致死细胞 + 完全培养基 (远离坏死的亚致死区); D 组: 亚致死细胞加坏死液培养, 完全培养基 2 : 1 (接近坏死的亚致死区)。各组以每孔 5×10^5 个细胞加入 6 孔板培养 24 h 后按上述分组加入不同培养液, 继续培养 24 h, 收集细胞进行下一步实验。

1.2.3 流式细胞术 各组细胞干预培养 24 h 后, PBS 洗涤 2 次, 离心并计数调整细胞数目为 5×10^5 个, 加入 500 μ l 的 Binding Buffer 重悬, 再加入 5 μ l Annexin V-FITC 混匀后, 最后加 5 μ l Propidium Iodide, 振荡混匀, 室温, 避光反应 15 min, 用流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

1.2.4 Western blot 实验 各组细胞经 PBS 洗涤 3 遍, 加入 RIPA 裂解液 150 μ l, 冰上裂解 30 min, 离心取上清液, BCA 法进行蛋白定量, 样品 100 ℃变性, 每组蛋白上样 30 μ g, 120 V 恒压电泳, 100 V 恒压转膜, 10% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入兔多克隆蛋白一抗工作液 Bax (1 : 8 000)、Bcl-2 (1 : 1 000)、GAPDH (1 : 50 000) 室温孵育 1.5 h 或 4 ℃过夜, 加入兔二抗 (1 : 10 000) 室温孵育 1 h, 超敏 ECL 发光检测, 使用 Image J 软件测量不同条带灰度值。

1.2.5 荧光定量 PCR 技术检测 Bax 和 Bcl-2 基因的转录水平 根据厂家说明书使用 Nucleozol 试剂提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, qRT-PCR 法检测 Bax 和 Bcl-2 mRNA 的表达, 内参基因为 β -actin, 设定仪器运行程序为: 95 ℃、1 min, 95 ℃、20 s, 60 ℃、1 min, 共 40 个循环。引物序列 Bax 上游: 5'-CGAACTGGACAGTAACATGGAG-3', 下游: 5'-CAGT TTGCTGGCAAAGTAGAAA-3'; Bcl-2 上游: 5'-GACT TCGCCGAGATGTCCAG-3', 下游: 5'-GAACTCAA GAAGGCCACAATC-3'; β -actin 上游: 5'-CCTGGCAC CCAGACAAT-3', 下游: 5'-GGGCCGACTCGTCAT AC-3'。按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 Bax 和 Bcl-2 mRNA 的相对表达量。

1.2.6 Lewis 肺癌小鼠皮下移植瘤模型的建立 取对数生长期 Lewis 细胞, 胰酶消化, DMEM 基础培养基重悬, 计数并调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml, 每只小鼠于右腿内侧皮下接种 0.2 ml, 约 10 d, 小鼠种植瘤

瘤径可长至 10 mm \times 10 mm, 造模成功, 开始实验。

1.2.7 小鼠冷冻方案及分组 将实验小鼠通过随机数字法分为假手术组和冷冻组, 每组各 4 只, 冷冻组小鼠进行腹腔注射麻醉, 固定于操作台, 备皮, 消毒, 划开皮肤, 暴露肿瘤组织, 将 1.2 mm 冷冻刀头植入肿瘤中心。启动仪器, 使肿瘤中心温度迅速降低至 -120 ℃冷冻 10 s, 复温至 15 ℃, 继续上述冷冻过程 1 次。假手术组仅麻醉后划开皮肤, 未做任何处理, 直接缝合。每 2 d 消毒伤口, 术后 14 d, 处死小鼠, 完整剥离肿瘤组织。

1.2.8 Western blot 检测肿瘤组织中 Bax 和 Bcl-2 蛋白的相对表达水平 取 50 mg 组织加入强效 RIPA 裂解液 500 μ l, 使用低温冷冻研磨仪充分研磨组织, 离心取上清液, BCA 法进行蛋白定量, 样品 100 ℃变性, 每组蛋白上样 30 μ g, 120 V 恒压电泳, 100 V 恒压转膜, 10% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入兔多克隆蛋白一抗工作液 Bax (1 : 8 000)、Bcl-2 (1 : 1 000)、GAPDH (1 : 50 000) 室温孵育 1.5 h, 加入兔二抗 (1 : 10 000) 室温孵育 1 h 或 4 ℃过夜, 超敏 ECL 发光检测, 使用 Image J 软件测量不同条带灰度值。

1.2.9 qRT-PCR 检测肿瘤组织 Bax 和 Bcl-2 基因的转录水平 根据厂家说明书使用 Nucleozol 试剂提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, qRT-PCR 法检测 Bax 和 Bcl-2 mRNA 的表达, 内参基因为 β -actin, 反应程序为: 95 ℃、60 s, 95 ℃、20 s, 60 ℃、60 s, 共 40 个循环。Bax 上游: 5'-TTGCCCTCTTCTACTTTGCTAG-3', 下游: 5'-CCATGATGTTCTGATCAGCTC-3'; Bcl-2 上游: 5'-GATGACTTCTCTCGTCGCTAC-3', 下游: 5'-GAACTCAAAGAAGGCCACAATC-3'; β -actin 上游: 5'-CTACCTCATGAAGATCCTGACC-3', 下游: 5'-CAGCTTCTCTTTGATGTCAC-3'。运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 Bax 和 Bcl-2 mRNA 的相对表达量。

1.3 统计学处理 统计数据选用 SPSS 22.0 及图形处理使用 GraphPad Prism 8.0 构建, 正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 正态分布且方差齐的两组样本比较用两独立样本 *t* 检验, 若方差不齐则用校正 *t* 检验, 多组样本比较用单因素方差分析检验, 组间两两比较用 LSD-*t* 检验, 若数据不满足正态分布, 采用非参数检验, 方差不齐的采用 Welch 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冷冻对 H1299 细胞凋亡的影响 结果显示, 肺癌细胞冷冻模型中 B、C、D 组的细胞凋亡率分别

为(23.97 ± 1.007)、(26.37 ± 1.258)、(39.80 ± 1.044)均高于对照组 A 组(15.70 ± 4.355),且 D 组细胞凋亡率最高,高于其他组($F = 52.957, P < 0.05$)。见图 1。这说明冷冻细胞坏死后,坏死液可以促进残余肿瘤细胞凋亡,且越接近冷冻区域,对细胞的影响越大。

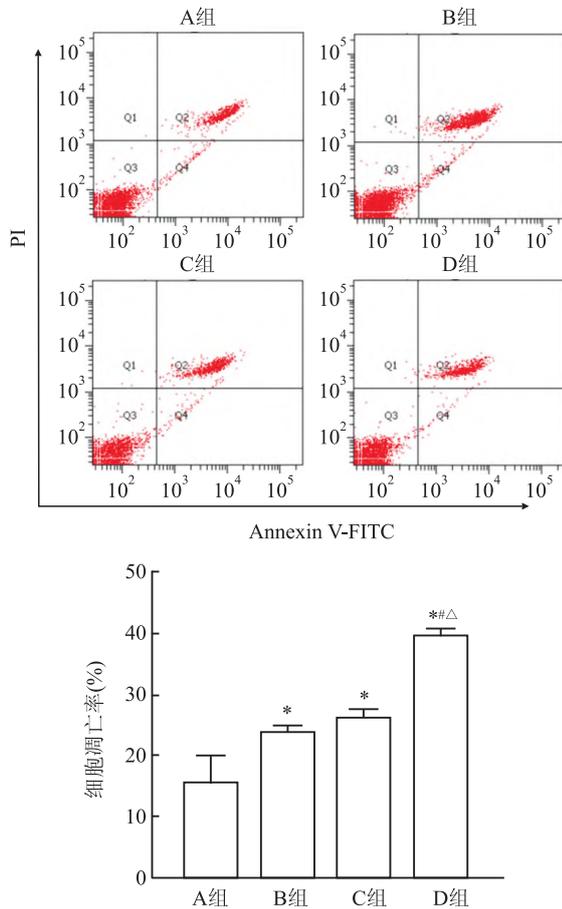


图 1 细胞冷冻消融模型中各组 H1299 肺癌细胞凋亡情况(n=3)

A 组:正常细胞 + 完全培养基;B 组:正常细胞 + 坏死液培养,完全培养基 2 : 1;C 组:亚致死细胞 + 完全培养基;D 组:亚致死细胞加坏死液培养,完全培养基 2 : 1;与 A 组比较: * $P < 0.05$;与 B 组比较: # $P < 0.05$;与 C 组比较: $\Delta P < 0.05$

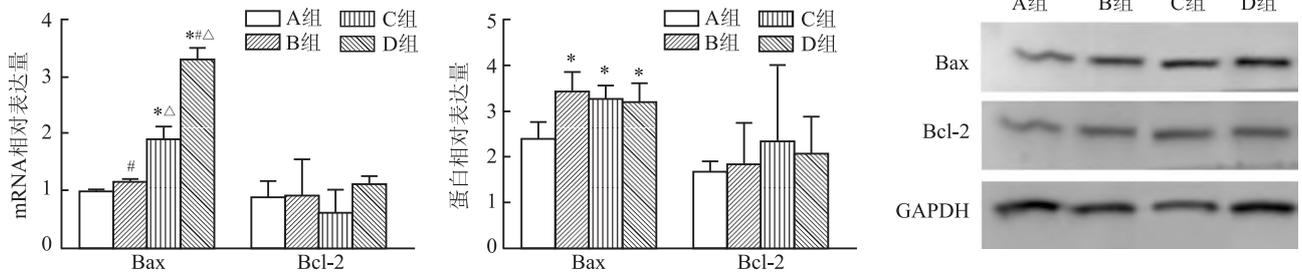


图 2 各组 H1299 细胞凋亡相关分子 mRNA 及蛋白相对表达情况(n=3)

A 组:正常细胞 + 完全培养基;B 组:正常细胞 + 坏死液培养,完全培养基 2 : 1;C 组:亚致死细胞 + 完全培养基;D 组:亚致死细胞加坏死液培养,完全培养基 2 : 1;与 A 组比较: * $P < 0.05$;与 B 组比较: $\Delta P < 0.05$;与 C 组比较: # $P < 0.05$

2.2 冷冻对 H1299 细胞 Bax 和 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达的影响 Western blot 和 qRT-PCR 实验结果表明,在 H1299 肺癌细胞冷冻模型中,与 A 组相比,B、C、D 组能够促进 Bax mRNA 和蛋白的表达,且在 mRNA 水平上,C、D 组 Bax 表达量高于 A、B 组,差异有统计学意义($F = 162.165, P < 0.05$),Western blot 结果显示 B、C、D 组 Bax 蛋白的含量高于 A 组,差异有统计学意义($F = 4.906, P < 0.05$)。而 Bcl-2 的检测结果显示,mRNA 相对表达量和蛋白表达量各组间差异均无统计学意义($F = 0.242, P > 0.05$)。见图 2。提示冷冻引起的 H1299 人肺腺癌细胞凋亡可能与 Bax 的调节密切相关。

2.3 冷冻消融对小鼠肿瘤凋亡相关分子表达的影响 Western blot 和 qRT-PCR 结果表明,与假手术组小鼠相比,经氩氦刀冷冻消融后小鼠肿瘤组织中 Bax 蛋白及 mRNA 表达水平均升高($t_{蛋白} = 5.253, P_{蛋白} < 0.05; t_{mRNA} = 4.889, P_{mRNA} < 0.05$),而 Bcl-2 蛋白和 mRNA 表达水平均降低($t_{蛋白} = 3.3, P_{蛋白} < 0.05; t_{mRNA} = 3.388, P_{mRNA} < 0.05$)。见图 3。

3 讨论

冷冻消融技术是一种微创超低温消融肿瘤技术,在肺癌的临床治疗中取得理想疗效,尤其是对中晚期患者提高了生活质量,减轻病痛,延长生存期^[2-6]。美国国家综合癌症(NCCN)指南将其收入非小细胞肺癌治疗方案,作为部分无法被外科手术切除的肺癌患者的替代疗法。冷冻消融通常以氩气或液氮为冷冻媒介,通过短时间在肿瘤区形成 -140 ~ -160 °C 的冷冻冰球,再逐渐复温,从而达到在冷冻冰球区域裂解坏死肿瘤细胞的目的^[3]。但随着肿瘤组织与刀尖距离的增加,温度将会不断上升,形成部分低温亚致死细胞及部分残留肿瘤细胞。该研

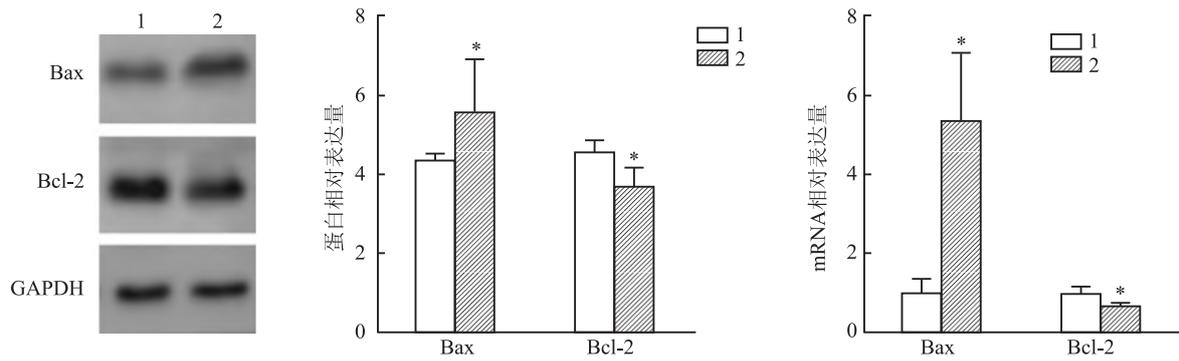


图3 氩氦刀冷冻消融对小鼠 Bax、Bcl-2 表达情况的影响($n=4$)

1:假手术组;2:冷冻消融组;与假手术组比较; * $P < 0.05$

究利用基础实验观察中心区域细胞裂解坏死液对残余肿瘤及亚致死肿瘤的迟发凋亡反应,对临床手术方案的设计,尤其是晚期减瘤姑息治疗中残留组织的解决有重大意义。

该研究利用不同温度干预的 H1299 肺癌细胞模拟体内冷冻冰球不同区域内细胞状态,同时 B 组和 C 组加入细胞坏死液验证细胞冷冻坏死产物对不同状态细胞凋亡情况的影响。实验结果表明冷冻消融后能通过细胞凋亡作用继续对残余肿瘤细胞造成杀伤作用,并且受低温损伤的肿瘤细胞凋亡效果更显著。

该实验进一步探讨了冷冻消融后引起肿瘤细胞凋亡的具体作用机制。研究表明 Bcl-2 家族在其中发挥着关键作用。Bcl-2 家族是调控细胞凋亡的重要蛋白,与恶性肿瘤的发生发展密切相关。Bcl-2 家族可以被分为抗凋亡因子及促凋亡因子两大类,其中抗凋亡因子 Bcl-2 和亲凋亡因子 Bax 是线粒体凋亡的两个关键调节器。当 Bax 被激活,大量的 Bax 同源二聚体占主导地位,转位至线粒体外膜上,诱导线粒体外膜的通透性,细胞容易发生程序性坏死^[7]。Bcl-2 在多种肿瘤中高表达,是主要的抗凋亡蛋白,可通过调节细胞氧化反应,抑制氧化作用对细胞的破坏,并且通过抑制 Bax 的细胞凋亡作用,促进肿瘤细胞的增殖^[8]。目前认为 Bcl-2/Bax 的比值与细胞凋亡作用具有重要关系。该次细胞冷冻模型的实验结果表明冷冻消融可以有效的促进 Bax 表达的上调,且相对表达量变化的规律与流式凋亡检测结果大致相仿,Lewis 小鼠冷冻实验的结果进一步验证了冷冻消融后凋亡与 Bax 表达上调密切相关;而 Bcl-2 表达在细胞水平上未见差异,在 Lewis 小鼠肿瘤组织中发现冷冻消融组较假手术组 Bcl-2 在 mRNA 及蛋白水平的表达均降低,这可能与小鼠体

内肿瘤微环境中相互作用相关,有研究^[9-10]表明内皮细胞、成纤维细胞分泌的细胞因子能调节 Bcl-2 表达,而微环境中炎症相关因素也能影响 Bcl-2 的表达^[11-12],因此,体内可能存在其他途径受冷冻消融影响抑制了 Bcl-2,进一步降低 Bcl-2/Bax 比值,需要深入探索挖掘。

综上所述,冷冻消融肺癌组织后,低温引起肺癌组织发生细胞凋亡。冷冻后低温损伤及中心细胞坏死裂解液的浸润可能通过调节 Bcl-2/Bax 表达进一步影响残余肺癌细胞的凋亡。因此,在临床冷冻消融治疗施行过程中应尽量使冰球周围温度降低并维持一定的时间,冷冻消融手术后有必要通过中医药、放化疗等治疗手段巩固甚至促进残留肿瘤细胞的凋亡,提高冷冻治疗的效果,减少肿瘤的复发。

参考文献

- [1] Cao W, Chen H D, Yu Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. 中华医学杂志英文版, 2021, 134 (7): 783-91.
- [2] 吴峰,徐红卫,郭辉,等. CT 引导下氩氦刀联合放射性粒子植入治疗非小细胞肺癌的临床疗效 [J]. 中华老年医学杂志, 2021, 40(2): 197-202.
- [3] 智雅婧,郑妮,那顺孟和. 氩氦刀冷冻消融靶向治疗中晚期恶性肿瘤的应用进展 [J]. 当代医学, 2021, 27(15): 191-4.
- [4] Ismail D. Cryosurgery for advanced stages of non small cell lung cancer (5 years experience) [J]. J Thorac Oncol, 2016, 11(4): s111.
- [5] 陈军,邓爱兵,李绚梅,等. 氩氦刀冷冻消融联合 TP 化疗方案治疗肺癌对血清肿瘤标志物水平及预后的影响 [J]. 中国医学装备, 2020, 17(9): 94-8.
- [6] Lin M, Liang S Z, Wang X H, et al. Clinical efficacy of percutaneous cryoablation combined with allogeneic NK cell immunotherapy for advanced non-small cell Lung cancer [J]. Immunol Res, 2017,

- 65(4):880-7.
- [7] Sharifi S, Barar J, Hejazi M S, et al. Doxorubicin changes Bax / Bcl-xL ratio, Caspase-8 and 9 in breast cancer cells [J]. *Adv Pharm Bull*, 2015, 5(3):351-9.
- [8] 王 坤, 钱金权, 年建泽, 等. 放疗剂量对 T₄ 期乳腺癌改良根治术后患者血清 Ki-67、Bax 及 Bcl-2 水平的影响 [J]. *医学综述*, 2021, 27(11): 2279-83, 2288.
- [9] 刘 赛, 陈少芬, 李文林, 等. 乳腺癌微环境成纤维细胞对乳腺癌细胞表达 TIGAR 和 Bcl-2 的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(2): 177-82.
- [10] Kaneko T, Zhang Z, Mantellini M G, et al. Bcl-2 orchestrates a cross-talk between endothelial and tumor cells that promotes tumor growth [J]. *Cancer Sci*, 2007, 67(20): 9685-93.
- [11] Wang K, Zhu X, Zhang K, et al. Interleukin-6 contributes to chemoresistance in Mda-mb-231 cells *via* targeting Hif-1 α [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2018, 32(3): e22039.
- [12] Li R, Zou X, Zhu T, et al. Destruction of neutrophil extracellular traps promotes the apoptosis and inhibits the invasion of gastric cancer cells by regulating the expression of Bcl-2, Bax and NF- κ B [J]. *Oncotargets Ther*, 2020, 13:5271-81.

Effect of cryotherapy on apoptosis of lung adenocarcinoma cells

Lin Shicheng¹, Liu Dianna¹, Zhuang Yaoxue¹, Liang Tianyu¹, Wang Xiaofan¹, Hu Kaiwen², Li Quanwang²
(¹The Second Clinical School of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029; ²Dept of Oncology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078)

Abstract Objective To explore the effect of cryoablation on apoptosis of lung adenocarcinoma cells. **Methods** According to the district in the tumor following cryoablation, human lung adenocarcinoma H1299 cells were divided into four groups to construct the freezing model of lung cancer in cell level: group A, untreated cells, as the control group. In group B, the necrotic solution was added to the untreated cell culture medium (the cell suspension was frozen in a liquid nitrogen tank for 5 min, and centrifuged to obtain the supernatant after rewarming at 37 °C). Group C, sublethal cells (cells were frozen at -80 °C for 7 min to mimic sublethal state). In group D, necrotic solution was added into sublethal cell culture medium. Cell apoptosis was observed by flow cytometry analysis 24 h later. The expression of apoptosis related molecules Bax and Bcl-2 was detected by qRT-PCR and Western blot. Lewis lung adenocarcinoma cell line was used to establish subcutaneous transplanted tumor model of C57BL/6 mice. The successful model mice were randomly divided into two groups: sham operation group and argon-helium cryoablation group, with 4 mice in each group. After argon-helium cryoablation for 14 days, the tumor tissues were taken. The expression of apoptosis-related molecules Bax and Bcl-2 was detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** In the cell freezing model, compared with group A in the control group B, C and D groups could promote cell apoptosis ($P < 0.05$), and group D had the highest apoptosis rate, which was significantly higher than other groups ($P < 0.05$). Both *in vitro* and *in vivo* experiments showed that cryoablation could increase the expression of Bax mRNA and protein ($P < 0.05$). Bcl-2 mRNA and protein expression decreased *in vivo* ($P < 0.05$). There was no significant change in the in cell freezing model. **Conclusion** Cryoablation can achieve effective ablation through cell apoptosis mechanism, which may be related to the reduction of Bcl-2/Bax.

Key words cryotherapy; lung adenocarcinoma; apoptosis; mice