

冷冻消融术治疗 Lewis 肺癌小鼠移植瘤侵袭转移的实验研究

孙满强¹ 胡凯文¹ 陈琪² 何乐毅³ 庞皓玥¹ 李龙宇³ 周天¹

摘要 目的 研究冷冻消融术后冰球不同复温温度对小鼠残存瘤侵袭转移的影响。方法 45 只 C57BL 小鼠随机分为 3 组, 每组 15 只, 分别是对照组(未加任何干预)、T0 组(术后复温至 0℃)、T40 组(术后复温至 40℃)。实验组小鼠采用单循环冷冻—复温消融手术, 当冰球覆盖至肿瘤边缘时, 停止降温, 分别复温至 0℃ 和 40℃。冷冻消融术后第 14 天, 对小鼠进行处死、取材, 称量小鼠的体质量和肿瘤的质量, 采用免疫组化的方法测量肿瘤组织中碱性—环—螺旋蛋白(Twist)、钙黏附蛋白 E(E-Cadherin)、血管内皮生长因子 A(VEGF-A)、VEGF-C 的表达。结果 比较冷冻手术干预前各组小鼠体质量, 差异无统计学意义, 术后 14 d 内 T0 组和 T40 组体质量均小于对照组($P < 0.05$)。术后第 14 天 T0 组和 T40 组肿瘤质量均低于对照组($P < 0.05$)。免疫组化结果显示 T0 组和 T40 组 Twist、VEGF-A、VEGF-C 蛋白表达量均低于对照组($P < 0.05$), T0 组和 T40 组 E-Cadherin 蛋白表达均高于对照组($P < 0.05$)。结论 冷冻消融术对于残存瘤侵袭转移有抑制作用, 其机制可能与抑制上皮—间充质细胞转化(EMT)和减少血管新生有关, 相较于 40℃ 复温, 0℃ 在这一机制方面具有更好的抑制效果。

关键词 冷冻消融术; 0℃ 复温; 40℃ 复温; 免疫组化; 侵袭转移

中图分类号 R 73-3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)11-1746-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.11.017

冷冻消融术作为一种新兴的微创治疗技术具有低损伤、可重复的优点, 目前冷冻消融术复温常采用两种复温范围, 分别是 20℃~40℃ 和 0℃~15℃, 术者在复温选择时常常依据经验和习惯。当前关于冷冻消融机制的研究多体现在免疫方面, 冷冻消融术不具有扩大手术的特性, 关于术后不同复温温

度对残存瘤的侵袭性和转移性影响的实验研究较少。碱性—环—螺旋蛋白(Twist)是编码位于常染色体的碱性—环—螺旋 DNA 结合转录因子, 在正常胚胎发育中调控细胞运动及组织重组, 因其被发现于肿瘤转移过程中起关键调控作用而备受关注, 可调控上皮—间充质细胞转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)和血管新生^[1]。该实验采用免疫组化法检测 Twist、钙黏附蛋白 E(E-Cadherin)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白的表达, 探究冷冻消融术后冰球复温温度与残存瘤侵袭转移能力的关系。

1 材料与方法

1.1 动物和瘤株 45 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠, 4~5 周龄, 购自北京华阜康生物科技有限公司, 动物许可证号: SCXK(京)2014-0004。Lewis 肺癌小鼠细胞(lewis lung cancer, LLC)购自美国 CA 公司。LLC 细胞用含 10% FBS(英国 Biochrom 公司)的 RPMI1640 培养基(美国 Corning 公司)进行培养, 放置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中。待细胞生长状态最佳时进行收集, 用完全培养基将细胞浓度调整为 1×10^7 /ml, 对小鼠进行皮下注射造模。

1.2 主要仪器和试剂 冷冻消融术采用海杰亚 CHS 800001 手术系统, 购自北京海杰亚医疗器械有限公司; Leica2135 石蜡病理切片机、Leica 病理组织包埋机购自德国 Leica 公司; 显微镜购自日本 Olympus 公司; Anti-Twist 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司; Anti-E-Cadherin 单克隆抗体、Anti-VEGF-A 单克隆抗体、Anti-VEGF-C 单克隆抗体、羊抗兔/鼠 IgG H+L 抗体(二抗)购自美国 Proteintech 公司。

1.3 造模 取 100 μ l 细胞悬液(10^6 个细胞)皮下注射于 45 只小鼠右侧背部。密切观察小鼠生长状况。

1.4 超低温冷冻消融术 造模 24 d 后, 将 45 只荷瘤小鼠随机分为 3 组, 分别为对照组、复温至 0℃ 组(T0 组)、复温至 40℃ 组(T40 组), 每组 15 只。对照组未予任何干预, T0 组予 100 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠, 固定后, 备皮、消毒, 采用海杰亚

2019-06-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81403250); 北京中医药大学青年教师项目(2018-JYB-JS)

作者单位: ¹ 北京中医药大学东方医院, 北京 100078

² 北京中医药大学东直门医院, 北京 100007

³ 北京中医药大学中药学院, 北京 100029

作者简介: 孙满强, 男, 博士研究生;

周天, 女, 副主任医师, 责任作者, E-mail: zhoutian_med@163.com

冷冻消融设备实行冷冻手术。将 1.66 mm 冷冻刀头插入肿瘤中央,采用单循环冷冻方法,当冷冻范围到达癌旁组织时开始升温,直到肿瘤中心温度到达 0℃,停止复温,拔出探针。T40 组操作如上,当肿瘤中心温度达到 40℃时,拔出探针。冷冻消融术第 1 天记为第 0 天(Day0, D0)。

1.5 取材 小鼠的体质量每隔 1 d 记录 1 次,在术后第 14 天(D14)进行脱颈处死,剥离肿瘤并进行称重,计算肿瘤抑制率 = $([\text{对照组平均肿瘤重量}] - [\text{实验组平均肿瘤重量}]) / [\text{对照组平均肿瘤重量}] \times 100\%$ 。肿瘤称重后放入 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,用于免疫组化检测。

1.6 免疫组化染色法检测 取包埋后的组织修剪边缘后装入切片机作 4 μm 切片,烘箱过夜进行脱蜡,脱蜡后将标本进行阻断内源性过氧化物酶,PBS 冲洗后将标本架置于 pH 9.0 抗原修复液中进行修复(置于微波炉中高火 7 min,中低火 15 min),用自来水复温后取适量 Anti-Twist 抗体用一抗稀释液稀释至合适浓度(稀释浓度 1:100)孵育标本 30 min,冲洗后滴加二抗孵育 20 min,最后进行 DAB 显色,封片后用显微镜观察 Twist 蛋白表达及分布(按照抗体说明书及文献, Twist 阳性表现为胞核出现黄色或棕色的颗粒状物质沉积)。Twist 蛋白表达水平以平均光密度值(Image Pro Plus 6.0 软件分析图像所得)表示。同理,按照上述实验方法进行 E-Cadherin、VEGF-A、VEGF-C 蛋白检测。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 20.0 进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素多组资料之间的比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠冷冻消融术后体质量比较 对小鼠术后各时间段体质量进行统计分析,见表 1。对照组小鼠体质量大于 T0 组和 T40 组($P < 0.05$),T0 组与 T40 组之间比较,差异无统计学意义。

2.2 各组小鼠肿瘤质量及抑瘤率计算 对照组肿瘤质量大于 T0 组和 T40 组($P < 0.05$),T0 组平均肿瘤抑制率为 25.14%,T40 组平均肿瘤抑制率为 15.85%,T0 组与 T40 组之间比较,差异无统计学意义,见表 1。

2.3 各组肿瘤组织中 Twist、E-cadherin、VEGF-A、VEGF-C 蛋白的表达 免疫组化染色结果显示,高倍镜下观察,用细胞内棕黄色强弱来判断肿瘤细胞内蛋白表达的高低,结果以平均光度值来表示。

T0 组 Twist 表达低于对照组($P < 0.05$),T40 组 Twist 表达低于对照组($P < 0.05$),T0 组与 T40 组之间比较,差异无统计学意义。T0 组 E-Cadherin 表达高于对照组($P < 0.05$),T40 组 E-Cadherin 表达高于对照组($P < 0.05$),T0 组与 T40 组之间比较,差异无统计学意义。T0 组 VEGF-A 表达低于对照组($P < 0.05$),T40 组 VEGF-A 表达低于对照组($P < 0.05$),T0 组与 T40 组之间比较,差异无统计学意义。T0 组 VEGF-C 表达低于对照组($P < 0.01$),T40 组 VEGF-C 表达低于对照组($P < 0.05$),T0 组与 T40 组之间比较,差异无统计学意义。见图 1、2。

表 1 各组小鼠体质量和肿瘤质量变化($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

组别	体质量	肿瘤质量
对照	20.43 $\pm$ 1.74	1.83 $\pm$ 2.59
T0	18.59 $\pm$ 0.98*	1.37 $\pm$ 1.69*
T40	18.91 $\pm$ 0.86*	1.54 $\pm$ 1.00*

与对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

冷冻消融手术具有安全、有效、微创、副作用小等优点,目前已广泛应用于中晚期肺癌、肝癌、肾癌、前列腺癌等恶性肿瘤的治疗^[2-3]。当前国内外关于氩氦刀抗肿瘤效应的机制研究主要体现在溶解效应、凋亡效应、微血栓形成和免疫效应 4 个方面^[4-8]。0℃以上的复温温度均可使冰球融化,但是不同复温温度是否会对残存瘤侵袭转移产生影响的相关研究较少。

当前研究^[9-10]表明,EMT 和血管新生是肿瘤侵袭转移的重要环节。EMT 过程可使具有极性特点的上皮细胞转化为可移动的间质细胞,利于肿瘤的侵袭和转移^[9]。E-Cadherin 减少是 EMT 过程中的重要表现^[11-12]。肿瘤组织血流供应增强是肿瘤恶性程度的重要标志,VEGF 具有促内皮细胞生长、增加血管通透性,以及协助肿瘤细胞进入脉管系统等作用^[13]。VEGF-A 主要促进血管内皮新生,VEGF-C 主要促进淋巴管内皮新生。而 Twist 蛋白对于 E-Cadherin 和 VEGF 均有调控作用, Twist 在多种人类肿瘤中表达上调,并直接导致 E-cadherin 表达下调,致使上皮细胞间黏附力降低,细胞失去上皮特征、从原位脱落、运动能力加强,并在侵袭带形成伪足、组装张力丝并召集细胞基质降解酶,为侵袭转移提供了必要前提^[10]。转染 Twist 的肿瘤细胞可增加 VEGF 的表达,促进肿瘤微血管、微淋巴管生成,而

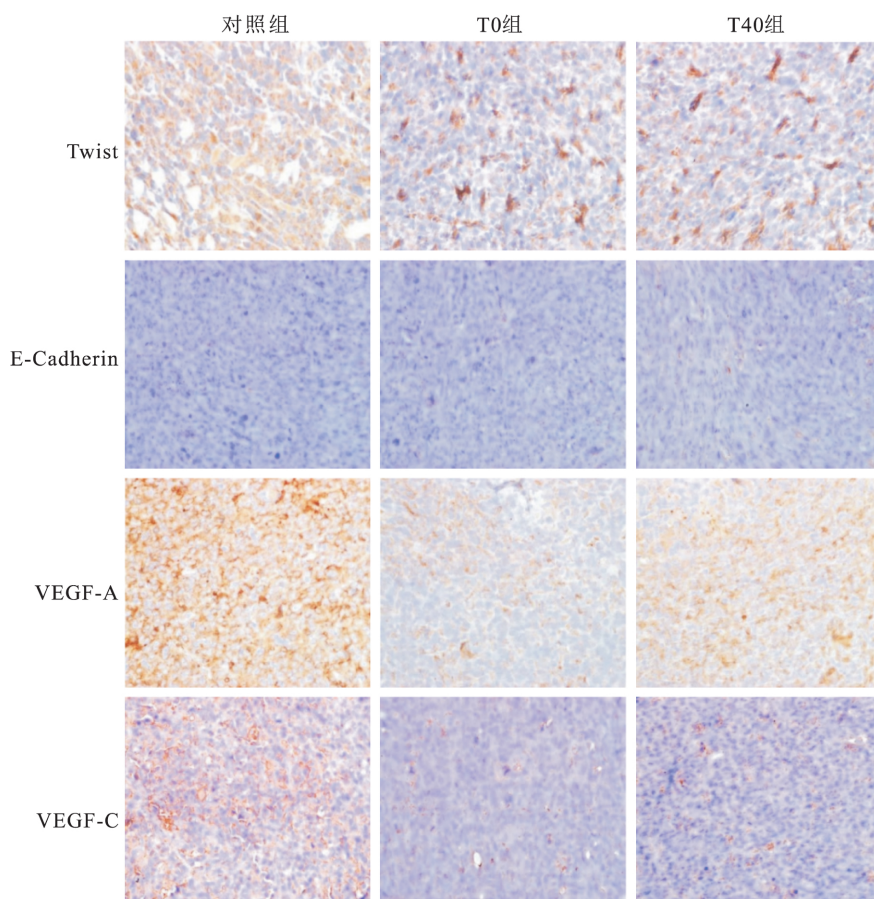
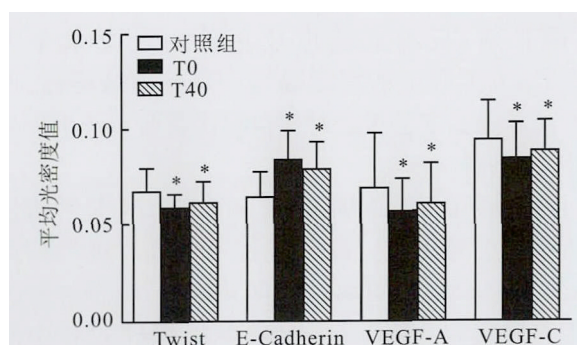


图1 各组肿瘤组织免疫组化结果 ×400

图2 各组肿瘤组织中 Twist 平均光密度值
与对照组比较: * $P < 0.05$

通过小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 下调 Twist 则可见 VEGF 表达量下降, 通过 RT-PCR 检测得其 mRNA 呈同样变化趋势^[14]。由此得知 Twist、E-Cadherin、VEGF 是肿瘤侵袭转移过程的重要蛋白, 而 E-Cadherin 和 VEGF 的表达受 Twist 调控。

本实验结果显示, 实验组小鼠在手术之后体质量减少, 这与剪开皮毛, 暴露肿瘤的手术损伤有关。对照组肿瘤质量大于 T0 组和 T40 组 ($P < 0.05$), 表明冷冻消融术对肿瘤起到抑制作用。进一步行免疫

组化发现, 相比对照组, T0 组和 T40 组的 Twist、VEGF-A、VEGF-C 蛋白表达降低, E-Cadherin 蛋白表达增高 ($P < 0.05$)。T0 组和 T40 组在肿瘤抑制率和相关蛋白表达方面差异虽无统计学意义, 但 T0 组在各项数据统计方面均优于 T40 组。由此得出: 冷冻消融术后 0 °C 复温相较于 40 °C 复温对于肿瘤的侵袭性和转移性具有更好的抑制作用, 其机制与抑制上皮间质转化和肿瘤血管新生两个过程有关。氩气和氦气是稀有气体, 具有很高的价值性和战略性, 0 °C 复温符合环保节能的原则, 此实验结果对于氩氦刀术后复温温度选择具有一定指导意义。本研究只从组织层面对实验目的进行验证, 缺少基因转录层面的验证, 并且肿瘤的表现层面缺乏更强的说服力, 以上是本实验的不足和待改进之处。除此之外, 冷冻消融对肿瘤微环境的影响是多方面的, 以上只是从转移角度进行探索, 在炎症、免疫方面的探索将是后续的研究方向。

参考文献

- [1] Chen D, Dang B L, Huang J Z, et al. MiR-373 drives the epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis via the miR-373-ITX-

- NIP-HIF1 α -TWIST signaling axis in breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(32) : 32701 – 12.
- [2] Shi J, Li Y, Liang S, et al. Circulating tumour cells as biomarkers for evaluating cryosurgery on unresectable hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(4) : 1845 – 51.
- [3] Baust J G, Gage A A, Bjerklund Johanse T E, et al. Mechanisms of cryoablation: clinical consequences on malignant tumors [J]. *Cryobiology*, 2014, 68(1) : 1 – 11.
- [4] Kumar A, Kumar S, Katiyar V K, et al. Phase change heat transfer during cryosurgery of lung cancer using hyperbolic heat conduction model [J]. *Comput Biol Med*, 2017, 84: 20 – 9.
- [5] Kongnyuy M, Halpern D M, Kosinski K E, et al. Cryosurgery, an alternative treatment option for organ-confined prostate cancer: current beliefs and practice patterns of urologists [J]. *Int Urol Nephrol*, 2017, 49(1) : 43 – 8.
- [6] Malamas A S, Hammond S A, Schlom J, et al. Combination therapy with an OX40L fusion protein and a vaccine targeting the transcription factor twist inhibits metastasis in a murine model of breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(53) : 90825 – 41.
- [7] He X Z, Wang Q F, Han S, et al. Cryo-ablation improves antitumor immunity through recovering tumor educated dendritic cells in tumor-draining lymph nodes [J]. *Drug Des Ther*, 2015, 9: 1449 – 58.
- [8] Robilotto A T, Baust J M, Van Buskirk R G, et al. Temperature-dependent activation of differential apoptotic pathways during cryoablation in a human prostate cancer model [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2013, 16(1) : 41 – 9.
- [9] Xu Z, Zheng G, Wang Y, et al. Aqueous huaier extract suppresses gastric cancer metastasis and epithelial to mesenchymal transition by targeting twist [J]. *J Cancer*, 2017, 8(18) : 3876 – 86.
- [10] Ren H, Du P, Ge Z, et al. TWIST1 and BMI1 in cancer metastasis and chemoresistance [J]. *J Cancer*, 2016, 7(9) : 1074 – 80.
- [11] Chu K F, Dupuy D E. Thermal ablation of tumours: biological mechanisms and advances in therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(3) : 199 – 208.
- [12] Wang Y, Li C, Li Y, et al. Involvement of breast cancer stem cells in tumor angiogenesis [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6) : 8150 – 5.
- [13] Zhao Z, Rahman M A, Chen Z G, et al. Multiple biological functions of Twist1 in various cancers [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12) : 20380 – 93.
- [14] 李文卿, 丁 怡, 姜 雨, 等. TWIST 对 EMT 调控在循环肿瘤细胞监测与抗癌药物评价中的临床意义 [J]. *中国肿瘤临床*, 2016, 43(17) : 770 – 4.

Experimental study of cryoablation for the invasion and metastasis of Lewis lung cancer transplanted tumor in mice

Sun Manqiang¹, Hu Kaiwen¹, Chen Qi², et al

(¹ Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine Beijing 100078,

² Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine Beijing 100007)

Abstract Objective To study the effects of two thawing temperature on tumor and possible mechanism. **Methods** 45 C57BL mice were randomly divided into three groups 15 in each group ,control group(no intervention) ,the T0 group (thawing to 0 ℃) ,the T40 group (thawing to 40 ℃) . The mice in the experimental group underwent single-cycle cryopreservation and rewarming ablation ,when ice ball cover to the edge of the tumor ,stop the cooling temperature ,rewarm to 0℃ and 40℃ respectively. On the 14th day after cryoablation ,mice were sacrificed and sampled. The body weight and tumor weight of the mice were measured. The expressions of Twist ,E-Cadherin ,vascular endothelial growth factor-A(VEGF-A) and VEGF-C in tumor tissues were measured by immunohistochemistry. **Results** There was no significant difference in body weight between the groups before the intervention of cryosurgery. But both T0 group and T40 group were lower body weight than the control group within 14 days after the operation ($P < 0.05$) . The tumor weight of T0 and T40 group were lower than that of control group ($P < 0.05$) . Immunohistochemical results showed that the protein expression levels of Twist ,VEGF-A and VEGF-C in T0 group and T40 group were significantly less than those in the control group ($P < 0.05$) . The expression of E-Cadherin in both T0 and T40 group were significantly more than that in the control group ($P < 0.05$) . **Conclusion** Cryoablation have obvious inhibition effect on residual tumor invasion and metastasis. The mechanism may be related to inhibit the epithelial mesenchymal transformation and reduce the associated angiogenesis ,compared with 40 ℃ temperature ,0 ℃ has better inhibition effect.

Key words cryoablation; 0 ℃ rewarming temperature; 40 ℃ rewarming temperature; immunohistochemistry; invasion and metastasis