

## ·非血管介入 Non-vascular intervention·

## 电化学治疗兔肝 VX2 肿瘤后残余肿瘤细胞的生物学特性

张琳, 王健, 牟玮, 周代全, 刘凤秀, 胡春芳, 黄学全

**【摘要】目的** 探讨电化学治疗(EChT)兔肝 VX2 肿瘤后残余肿瘤细胞生物学特性的变化。**方法** 采用移植的方法建立兔肝 VX2 肿瘤模型后行 EChT,通过控制肿瘤边缘的酸碱度造成肿瘤残余,采用免疫组化、TUNEL 法、活组织细胞内显微注射、明胶酶谱法及电子显微镜观察等方法探讨残余肿瘤细胞生物学特性的变化。**结果** ①病理学观察显示 EChT 后第 1 周时残余肿瘤细胞被大量纤维组织包绕;治疗后第 2 周,残余肿瘤细胞数目增多,其周围仍可见较多的纤维组织;超微结构观察显示,治疗前肿瘤细胞核质比例增大,核异型性明显,线粒体数目较多但发育幼稚,细胞间连接较少;EChT 后第 1、2 周,胞质内线粒体体积增大,发育较成熟,细胞间连接增多。②增殖细胞核抗原(PCNA)及 Ki-67 阳性指数在第 1、2 周时均比对照组明显降低;凋亡指数及 Bax 阳性指数在 EChT 后第 1、2 周时均明显高于对照组;凋亡指数与 Bax 阳性指数呈显著正相关。③Cx32 阳性指数及 LY 扩散范围在治疗后第 1、2 周均明显高于对照组;显微注射后 LY CH 荧光染料在肿瘤组织内的扩散范围与 Cx32 阳性指数呈显著正相关。④明胶酶谱法检测基质金属蛋白酶-9(MMP-9)相对含量的结果显示与免疫组化染色结果一致,治疗后第 1、2 周均明显低于对照组。**结论** EChT 治疗后 2 周内残余肿瘤细胞的增殖活性明显降低,凋亡指数明显增加,缝隙连接细胞间通讯(GJIC)功能明显改善,侵袭能力明显降低。结论较大肝癌行 EChT 治疗时肿瘤残余将难于完全避免,残余癌细胞生物学特性的变化对正确选择治疗后复查及再次治疗时机,提高疗效有重要的意义。

**【关键词】** 电化学治疗; VX2 肿瘤; 残余肿瘤; 生物学特性

中图分类号:R 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2012)-11-0923-07

Biological characteristics of remnant VX2 tumor cells after electrochemical treatment: an experimental study in rabbits ZHANG Lin, WANG Jian, MU Wei, ZHOU Dai-quan, LIU Feng-xiu, HU Chun-fang, HUANG Xue-quan. Department of Radiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: HUANG Xue-quan, E-mail: [hxuequan@163.com](mailto:hxuequan@163.com)

**【Abstract】Objective** To explore the biological characteristics of remnant VX2 tumor cells after electrochemical treatment (EChT) in experimental rabbits. **Methods** Rabbit models of hepatic VX2 tumor were established by using transplantation method. EChT was carried out in rabbit models. By controlling the pH profile around the tumor's margin, the remnant tumors were created. With the help of immunohistochemistry, TUNEL, microinjection in vivo, gelatin zymography, electric microscope, etc. the biological characteristics of the remnant VX2 tumor cells were evaluated. **Results** (1) Biopsy revealed that the remnant tumor cells were surrounded by a great deal of fibrous tissue in the first week. In the second week the number of remnant tumor cells was increased, and more fibrous tissues were found around the lesions. Ultramicroscopic structure showed that before the treatment enlarged proportion of nucleoplasm, obvious nuclear heteromorphosis, many babyish mitochondria and fewer intercellular junctions could be seen. In the first and second week after EChT, mitochondria in cytoplasm became larger and more mature, and the intercellular junction grew in number. (2) In the first and second week after EChT, positive indices of PCNA and Ki-67 of the study group were significantly lower than those of the control

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2012.11.009

作者单位: 400038 重庆 第三军医大学西南医院放射科

通信作者: 黄学全 E-mail: [hxuequan@163.com](mailto:hxuequan@163.com)

group, while the apoptosis index and Bax positive index of the study group were significantly higher than those of the control group. A significant parallel relationship existed between apoptosis index and Bax positive index. (3) In the first and second week after EChT, Cx32 positive index and LY transferring scope in the study group were markedly higher than those in the control group. After microinjection in vivo the spread extent of LY transferring was positively correlated with the positive index of Cx32. (4) Relative content of MMP-9 determined by gelatin zymography was consistent with that determined by immunohistochemistry, which in the study group was significantly lower than that in the control group in the first and second week after EChT. Conclusion Within two weeks after EChT, the proliferation activity of the remnant tumor cells decreases dramatically, while the apoptosis index increases strikingly. As the secretion of MMP-9 decreases and the function of GJIC has been grossly improved, the invasive potentiality of the remnant tumor cells remarkably decreases. Tumor residue is hard to be avoided in EChT for larger liver tumors. Therefore, in order to improve the clinical efficacy a full understanding of the biological characteristics of the remnant tumor cells is very helpful in selecting appropriate re-examination time as well as in selecting the re-treat opportune moment. (J Intervent Radiol, 2012, 21: 923-929)

【Key words】 electrochemical treatment; VX2 tumor; remnant tumor; biological characteristic

电化学治疗(electrochemotherapy EChT)是肝癌局部治疗方法,由于其疗效可靠,创伤小,可反复进行,应用已日益广泛。但对于较大的肿瘤 EChT 治疗后仍有较高的肿瘤残余率<sup>[1-2]</sup>,由于临床上以进展期的较大肿瘤居多,肿瘤残余成为影响 EChT 疗效的主要因素;采用联合血管栓塞疗法及多点多次治疗虽可扩大 EChT 的毁损范围<sup>[3]</sup>,但由于受肝功能的限制,EChT 的毁损范围不能过分地扩大,较大肝癌行 EChT 治疗时肿瘤残余难以完全避免。EChT 治疗后由于残余的癌细胞在治疗过程中曾经受非致死性酸、碱、其他电解质以及电场的影响,治疗后其增殖速度、侵袭转移能力等生物学行为可能会发生变化,因此研究 EChT 治疗后残余癌细胞生物学特性的变化对正确选择治疗后复查及再次治疗时机,提高疗效有重要的意义<sup>[4-5]</sup>。本实验用移植的方法建立兔肝 VX2 肿瘤模型后行 EChT 治疗,并通过控制肿瘤边缘的 pH 值,人为造成肿瘤残余,对 EChT 治疗后残余肿瘤细胞生物学特性的变化作一初步探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 纯种新西兰大白兔 24 只,体重 1.8 ~ 2.5 kg,3 ~ 4 月龄,雌雄不限,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要实验仪器 Vitris Company, USA. 显微注射系统, Nikon Inc, Japan, Mias 图像分析系统, 四川大学图像图形研究所。凝胶成像分析系统, Gel-Doc2000 型, Bio-Rad Inc, USA. 透射电子显微镜, Philips, 荷兰。

1.1.3 主要实验试剂 抗基质金属蛋白酶 (Anti-MMP-9), 抗 Ki-67 (Maxim Biotech, ); 抗 PCNA, 抗 Bax (Santa Cruz Biotech Inc, USA); 抗 Cx32 (Chemicon Inc, USA); 原位凋亡检测试剂盒 (Roch Inc, German)

### 1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 开腹直视下组织块种植方法制作兔 VX2 移植瘤动物模型,模型制成后随机分为对照组 6 只, EChT 治疗组 18 只。治疗组又根据治疗后取材时间的不同分为 3 小组 (每组 6 只): 1 周活检组, 2 周活检组和 3 周活检组。

1.2.2 EChT 接种后 3 周开腹治疗,将电极针插入肿瘤中央,张开约 1/2,设计 EChT 毁损范围占肿瘤总体积的 2/3 左右,监测肿瘤边缘阳极区 pH > 5, 阴极区 pH < 9,通过降低电流维持 30 min。pH > 9 和 pH < 4.5 会使肿瘤细胞坏死,肿瘤细胞在偏碱和偏酸条件下可以造成损伤但可以存活<sup>[6]</sup>。取材部位选取病灶边缘的残余肿瘤组织进行实验。

### 1.2.3 观察指标及其检测方法

1.2.3.1 采用免疫组织化学染色方法检测增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA), Ki-67, Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax), 细胞间连接蛋白 (connexin 32, Cx32), 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9)。

1.2.3.2 原位凋亡检测,采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (TUNEL) 方法进行 (参照凋亡检测试剂盒说明书)。

1.2.3.3 采用活组织块细胞内显微注射方法测定缝

隙连接细胞间通讯功能,其具体方法参照文献[7]进行。

1.2.3.4 明胶酶谱法定量检测组织中 MMP-9,其具体步骤参照文献[8]进行。

1.2.3.5 EChT 治疗后肿瘤组织病理及超微结构的变化

1.2.3.6 图像分析:原位凋亡检测及免疫组化染色后,用图像分析仪对每张切片随机选取 5 个高倍视野,对阳性表达的细胞计数,每张切片计数细胞总数不少于 1 000 个,计算其阳性率即阳性指数,或测定阳性显色的面积与视野总面积,计算阳性面积比。其中凋亡细胞阳性率称为凋亡指数<sup>[9]</sup>(Apoptosis Index, AI)。

### 1.3 数据处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,行统计学分析; $P < 0.05$  为相差显著, $P < 0.01$  为相差非常显著。

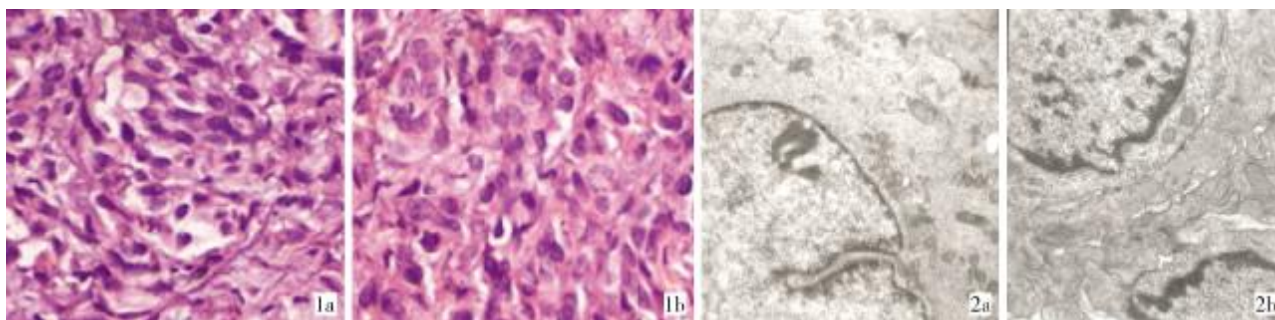
## 2 结果

### 2.1 治疗后残余肿瘤组织病理学及超微结构的改变

肿瘤组织石蜡切片经 HE 染色后光镜下观察显

示,对照组未经治疗的 VX2 肿瘤细胞形态不规则,核大深染,呈椭圆形、梭形或不规则形,核质比例增大,细胞排列紊乱,可呈实体样、巢样或假腺体样排列;EChT 治疗后第 1 周,肿瘤细胞坏死较多的区域有大量纤维组织增生,排列较稀疏的残余肿瘤细胞被纤维组织包绕;治疗后第 2 周,残余肿瘤细胞数目增多,增生的肿瘤细胞呈团状排列,其周围仍可见较多的纤维组织;治疗后第 3 周,残余的肿瘤细胞大量增生,排列致密呈实体状,细胞间纤维成份少见。(图 1)

经透射电镜对超微结构的观察结果显示,对照组肿瘤细胞核质比例增大,核异型性明显,常染色质多,异染色质较少,胞质成份较多,线粒体数目较多但发育幼稚,粗面内质网少见,游离核糖体较多,细胞间连接较少,发育差,细胞突起多,形成明显的相嵌连接;EChT 治疗后第 1、2 周,残余的肿瘤细胞核内异染色质明显增多,胞质内线粒体体积增大,其内嵴增多,发育较成熟,可见较多的粗面内质网,游离核糖体减少,细胞间连接增多;治疗后第 3 周时肿瘤细胞的超微结构则与对照组无明显差别。(图 2)



1a EChT 后第 1 周,残余肿瘤细胞数目较少,其周围有大量的纤维组织增生。(HE  $\times 200$ ) 1b EChT 后 2 周,残余肿瘤细胞数目增多,呈团状排列,其周围仍有较多纤维组织包绕。(HE  $\times 200$ ) 2a 对照组 VX2 肿瘤细胞胞核大,异染色质较少,胞质内线粒体较多,但发育幼稚,游离核糖体较多,粗面内质网少见,细胞间连接较少。( $\times 6\ 000$ ) 2b 治疗后第 1 周,残余肿瘤细胞胞核较小,异染色质增多,胞质成份较少,线粒体数目增多,可见较多的细胞间连接。( $\times 8\ 000$ )

图 1 EChT 后 1、2 周肝脏组织学改变

图 2 治疗后 1 周及对照组肝组织电镜改变

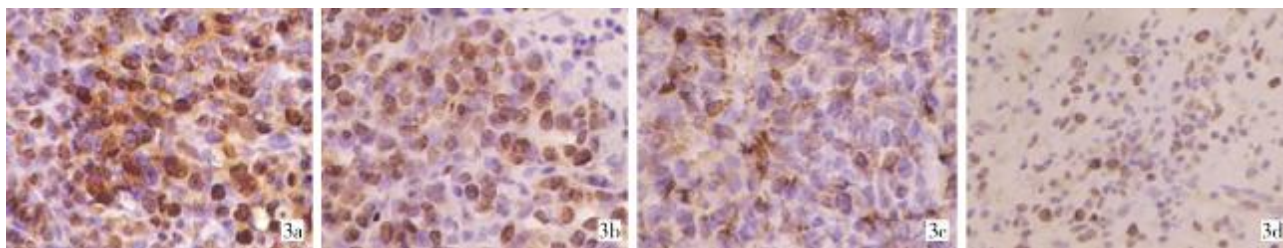
### 2.2 EChT 治疗后残余 VX2 肿瘤细胞增殖、凋亡活性的变化

2.2.1 EChT 治疗后残余 VX2 肿瘤细胞增殖活性的变化 免疫组化染色结果显示,PCNA 及 Ki-67 阳性表达部位均为细胞核内,阳性细胞的染色强度在不同的细胞以及不同组内无明显差别,但阳性指数在各组间有差别。对照组 PCNA 及 Ki-67 的阳性表达较高,PCNA 及 Ki-67 在 EChT 治疗后第 1 周时阳性表达比对照组均明显降低,第 2 周又逐渐回升,

PCNA 至第 3 周接近对照组的水平,但 Ki-67 第 3 周时的阳性表达仍明显低于对照组(图 3)。采用图像分析仪阳性计数的结果显示,同一组内 Ki-67 阳性指数均明显低于 PCNA 的阳性指数( $P < 0.01$ );EChT 治疗后残余肿瘤细胞在第 1 周及第 2 周时 PCNA 阳性指数均比对照组明显降低( $P < 0.01$ ),第 3 周时 PCNA 阳性指数比第 1 周及第 2 周时均明显升高( $P < 0.01$ ),而与对照组无明显差异;Ki-67 阳性指数在治疗后第 1、2、3 周均明显低于对



对照组,第 2、3 周时明显高于第 1 周( $P < 0.01$ ),第 3 周时高于第 2 周,但未达统计学差异。(表 1)



3a 对照组兔肝 VX2 肿瘤 PCNA 阳性表达率较高( $\times 200$ ) 3b EChT 治疗后第 1 周残余肿瘤细胞 PCNA 阳性表达比对照组明显降低。(  $\times 200$ ) 3c 对照组兔肝 VX2 肿瘤细胞 Ki-67 阳性表达较多( $\times 200$ ) 3d EChT 后第 1 周时残余肿瘤细胞 Ki-67 表达明显减少( $\times 200$ )

图 3 对照组和 EChT 治疗后 1 周组织学免疫组化染色结果

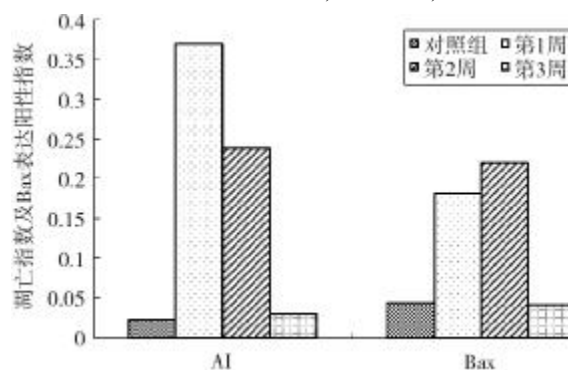
表 1 EChT 治疗后残余肿瘤细胞 PCNA 及 Ki-67 的阳性指数的变化

组别或时相	PCNA	Ki-67
对照组	$0.733 \pm 0.093$	$0.552 \pm 0.037^c$
术后		
1 周	$0.589 \pm 0.064^a$	$0.212 \pm 0.029^{ac}$
2 周	$0.708 \pm 0.017^b$	$0.363 \pm 0.053^{abc}$
3 周	$0.714 \pm 0.062^b$	$0.420 \pm 0.073^{abc}$

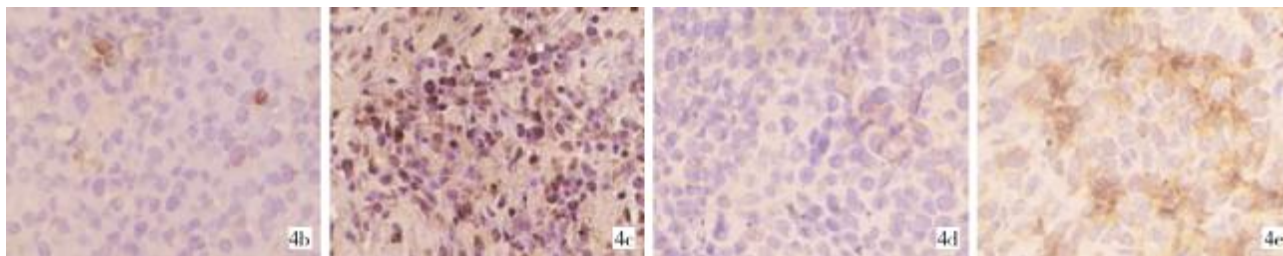
注<sup>a</sup>: $P < 0.01$ ,与对照组比;<sup>b</sup>: $P < 0.01$ ,与第 1 周时比;<sup>c</sup>: $P < 0.01$ ,与 PCNA 比

**2.2.2 EChT 治疗后残余 VX2 肿瘤细胞原位凋亡及 Bax 阳性表达变化** 经 TUNEL 法原位检测凋亡的结果显示,TUNEL 标记阳性的凋亡细胞呈现出核膜皱缩,染色质边集,胞质空胞化等多种表现,对照组 TUNEL 标记阳性的凋亡细胞数较少,而 EChT 治疗后残余肿瘤组织内标记阳性的凋亡细胞则较多。采用图像分析仪阳性细胞计数的结果显示,凋亡指数在 EChT 治疗后第 1、2 周时均明显高于对照组( $P < 0.01$ ),第 2 周明显低于第 1 周( $P < 0.01$ ),第 3 周时的凋亡指数则降至接近对照组的水平。免疫组化染色结果显示 Bax 蛋白阳性表达部位主要位于胞浆

内,部分位于细胞膜表面,各组肿瘤组织 Bax 蛋白的阳性表达情况与凋亡指数的变化趋势类似,对照组 Bax 表达阳性的细胞数较少,治疗后第 1、2 周时其阳性表达明显增多,经图像分析阳性细胞计数结果显示,肿瘤细胞 Bax 阳性指数在治疗后第 1、2 周时均明显高于对照组( $P < 0.01$ ),第 3 周时 Bax 阳性指数与第 1、2 周时相比则明显下降,但与对照组相比无显著差异( $P > 0.05$ )。(图 4)。凋亡指数与 Bax 阳性指数呈显著正相关, $r = 0.79, P < 0.01$ 。



4a MMP-9 定量检测及电泳图



4b EChT 前对照组兔肝 VX2 肿瘤 4c EChT 后 1 周时残余肿瘤组织 4d 未行治疗的兔肝 VX2 肿瘤组 4e EChT 后 2 周,残余肿瘤组织 组织中凋亡细胞较少( $\times 200$ ) 中凋亡细胞明显增多( $\times 200$ ) 织内 Bax 阳性表达较少( $\times 200$ ) Bax 蛋白阳性表达较多。(  $\times 200$ )

图 4 EChT 前后肿瘤组织凋亡和 Bax 蛋白表达对比

**2.3 EChT 治疗后残余 VX2 肿瘤细胞间连接及通信功能的变化**

**2.3.1 细胞间连接蛋白 Cx32 表达变化** Cx32 阳性表达部位主要在细胞质及细胞膜,对照组兔肝 VX2

肿瘤组织内 Cx32 阳性表达率很低,且染色较浅,治疗后第 1~2 周,残余的肿瘤组织内 Cx32 阳性达明显增多,第 3 周时 Cx32 阳性表达又明显减少。第 1 周时 Cx32 阳性表达部位主要位于细胞膜,而第 2

周时的阳性表达则在胞质内也有较多的阳性表达,即出现较多的异位分布。采用图像分析仪阳性细胞计数结果显示,治疗后第 1、2 周时肿瘤细胞的 Cx32

表达的阳性指数均明显高于对照组( $P < 0.01$ ),第 2 周时明显高于第 1 周( $P < 0.01$ ),第 3 周时则与对照组无明显差别( $P > 0.05$ )。(图 5)。

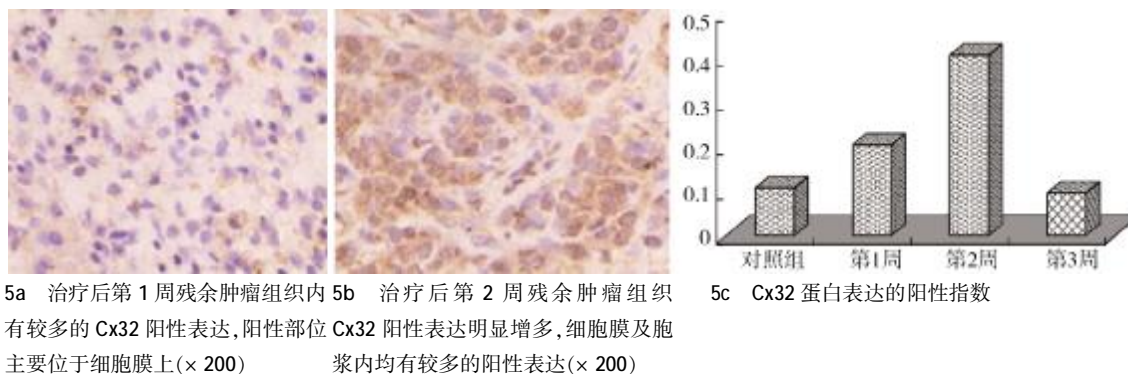


图 5 EChT 后不同时期 Cx32 表达

**2.3.2 细胞间通讯功能的变化** 显微注射后荧光显微镜观察发现,荧光染料 LY 发射黄绿色的荧光,注射点的肿瘤细胞内的荧光最强,荧光染料分布范围接近圆形,荧光强度由中央向周围递减,有荧光染料进入的细胞结构清晰,形状不规则,可见较明显的细胞突起,荧光染料主要分布在胞质中,胞核体积较大,形态不规则,表现为荧光染料的“充盈缺损”。对照组荧光染料的扩散范围较小,而治疗后第

1、2 周时行显微注射后荧光染料的扩散范围则较大,明显大于对照组( $P < 0.01$ ),第 2 周时荧光染料的扩散范围与第 1 周时相比无明显差别( $P > 0.05$ ),第 3 周时荧光染料扩散范围比第 1 及第 2 周时明显缩小,但与对照组已无显著差异( $P > 0.05$ )。显微注射后 LY CH 荧光染料在肿瘤组织内的扩散范围与 Cx32 阳性指数呈显著正相关, $r = 0.88, P < 0.01$ (图 6)。

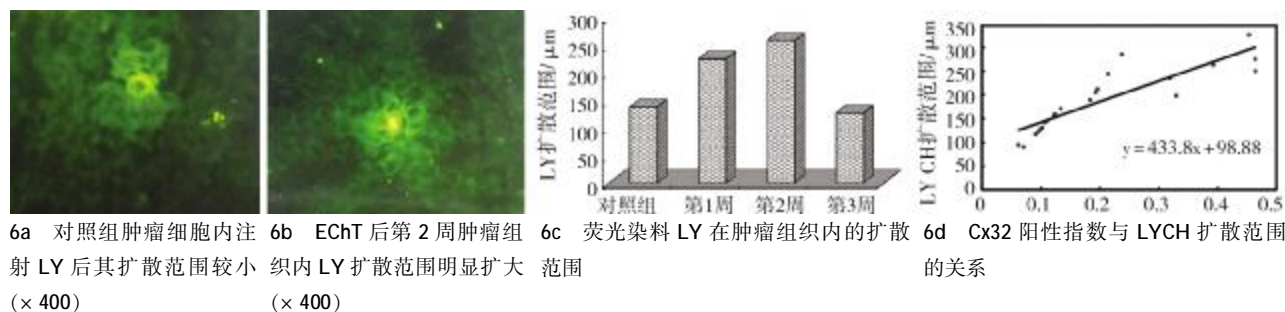


图 6 EChT 治疗后 2 周和对照组组织内 LY 扩散比较

## 2.4 EChT 治疗后残余 VX2 肿瘤细胞侵袭转移特性的变化

免疫组化染色结果显示,MMP-9 阳性表达部位主要在细胞周围的基质中,而细胞质中的分布较少,对照组肿瘤组织 MMP-9 阳性表达较多,而治疗后第 1、2 周时残余肿瘤组织内阳性表达均明显减少,第 3 周时阳性表达又明显增多(图 22 - 23)。明胶酶谱法测定结果显示,兔肝 VX2 肿瘤组织中的 IV 型胶原酶以 92Ku 的 MMP-9 为主,而 72Ku 的 MMP-2 含量则较低。经凝胶成像系统反色成像后计算 MMP-9 相对含量的结果显示与免疫组化染色结果一致(图 7),治疗后第 1 周及第 2 周时残余肿瘤组织内的 MMP-9 含量均明显低于对照组( $P < 0.01$ );第 3 周时与对照组相比无明显差异( $P >$

0.05),但第 3 周时明显高于第 1 周及第 2 周时的结果( $P < 0.01$ ),而第 1 周与第 2 周时相比无显著差异( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

细胞周期活性及细胞动力学的变化是恶性肿瘤生物学行为的重要表现形式,PCNA 及 Ki-67 均是细胞周期中与细胞增殖有关的重要蛋白质。免疫组织化学染色结果显示,EChT 治疗后残余肿瘤细胞的 PCNA 及 Ki-67 阳性指数在第 1 周及第 2 周时均比对照组明显降低,第 2 周后又逐渐回升,至第 3 周时 PCNA 阳性指数已接近对照组的水平。但 Ki-67 阳性指数在治疗 2 周后回升较慢,至第 3 周时仍明显低于对照组。这一结果说明 EChT 治疗后残余



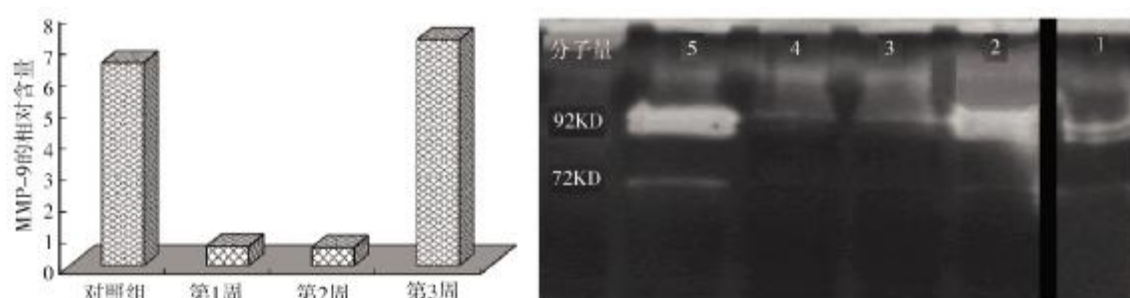


图 7 MMP-9 定量检测及电泳图

的肿瘤细胞的增殖活性在第 1 周时比治疗前有明显降低,但于第 2 周后其增殖活性又逐渐回升。实验结果显示,Ki-67 阳性指数在不同的时相点均明显低于 PCNA,这可能是由于 PCNA 半衰期较长,约 20 h,在有丝分裂停止后的较长时间内仍不能完全分解,有一定的累计效应,在非增殖周期细胞中也可检测到,因此 PCNA 在肿瘤细胞中的阳性指数较高<sup>[10]</sup>,且 PCNA 除了参与 DNA 复制外,还参与了 DNA 的合成与修复<sup>[11]</sup>。EChT 治疗过程中残余肿瘤细胞受到高热以及电磁波的作用后可能会有较多的 DNA 损伤,因此,治疗后伴有 DNA 损伤的肿瘤细胞有一个 DNA 修复的过程,而 Ki-67 在细胞周期中只参与 DNA 的半保留复制,且其半衰短,在细胞有丝分裂停止后很快分解,因此检测出的表达率较低,能够更准确地反应残余肿瘤细胞增殖活性的变化。

多数研究表明,肿瘤增殖活性越高,其分化程度越低,生长越快,预后也越差<sup>[12-13]</sup>。本实验中 EChT 治疗后 VX2 肿瘤在短期内增殖活性明显的降低,说明了其生长速度减慢,分化程度也可能有一定的改善。组织学观察结果表明,EChT 治疗后两周内残余肿瘤细胞周围有较多的纤维组织增生,超微结构显示,肿瘤细胞在治疗后 1 周时与对照组相比,胞质内游离核糖体减少,粗面内质网增多,线粒体发育较成熟,细胞间连接增多,这可能是由于肿瘤细胞周围增生的纤维组织限制了其生长增殖的速度,从而使其分化趋于好转。但由于治疗第 2~3 周后其增殖活性逐渐回升,超微结构的改变也逐渐消失,说明其分化程度的改变是一过性的。

TUNEL 法原位检测凋亡的结果显示,EChT 治疗后第 1、2 周时凋亡指数均明显高于对照组,第 2 周肿瘤细胞凋亡指数开始降低,明显低于第 1 周,第 3 周时的凋亡指数则降至与对照组无显著差异。这些结果说明 EChT 治疗对残余肿瘤细胞凋亡有促进作用,但这一作用在 3 周后趋于消失,说明 EChT

治疗对肝 VX2 肿瘤细胞的促凋亡作用为一过性的。肿瘤细胞的凋亡取决于多种凋亡相关基因产物的表达水平及其相互作用<sup>[14]</sup>,本研究采用免疫组化染色结果显示治疗前后 Bax 蛋白的阳性指数与凋亡指数的变化趋势一致,相关性分析显示 EChT 治疗后凋亡指数与 Bax 阳性指数呈显著正相关,说明 Bax 蛋白的表达增加对 EChT 治疗后 VX2 肿瘤细胞的凋亡起了促进作用。EChT 治疗后短期内残余肿瘤细胞的凋亡指数有明显增加,促凋亡基因 Bax 的表达增加等因素可能在这一过程中起了重要作用。

缝隙连接是细胞间进行小分子物质交换的重要通道,LY 荧光染料只能通过缝隙连接通道在细胞间扩散,显微注射法观察细胞间通讯功能是利用显微注射仪器将荧光染料 LY 注入活组织中的单个细胞内,LY 在细胞间借助于其浓度级差通过缝隙连接在组织内迅速传输扩散,在 5 min 内即可达到高峰,并可维持 40 min,且 LY 毒性低,对细胞无损伤,不能跨膜转运,因此 LY 在组织中的扩散范围能代表缝隙连接细胞间通讯 (gap junctional intercellular communication, GJIC) 功能<sup>[15]</sup>。

实验发现,荧光染料注入肿瘤细胞后以注射点的肿瘤细胞内荧光最强,荧光强度由中央向周围递减,有荧光染料进入的细胞结构清晰,形状不规则,可见较明显的细胞突起,荧光染料主要分布在胞质中,这种荧光强度的递减现象及其在组织细胞内的分布规律反应了 LY 在组织内的扩散过程。本实验对残余肿瘤细胞 Cx32 免疫组化染色结果表明,对照组兔肝 VX2 肿瘤组织内 Cx32 阳性表达率较低,且染色较浅,治疗后残余肿瘤组织内 Cx32 表达水平的变化趋势与 LY 的扩散范围的变化基本一致,两者呈明显的正相关,说明 EChT 治疗后 Cx32 的表达水平的变化是残余肿瘤细胞 GJIC 功能提高的重要因素。在 EChT 治疗后由于细胞间连接蛋白的表达升高,细胞间连接的数目增多,使残余肿瘤细胞在 2 周内 GJIC 功能比治疗前有明显的改善,从而

使其恶性生物学行为在短期内有一定的好转。

本实验对残余肿瘤组织切片 HE 染色的观察结果表明, 在 EChT 治疗后第 1 周时残余肿瘤细胞被大量纤维组织环绕, 第 2 周时肿瘤细胞增生呈团状, 但周围仍有较多的纤维组织, 而第 3 周时肿瘤细胞大量增殖, 细胞间的纤维成份已明显减少, 残余肿瘤细胞周围纤维组织含量的变化可能与 MMP-9 表达的量有关, EChT 治疗后第 1 周时残余肿瘤细胞分泌的 MMP-9 较少, 对周围的纤维组织降解少, 限制了肿瘤细胞向周围的浸润性生长, 第 2 周时残余肿瘤细胞有一定的增殖, 但由于 MMP-9 的分泌无明显增多, 周围仍有较多的纤维组织, 第 3 周时肿瘤细胞大量增殖, 分泌的 MMP-9 也明显增多, 其侵袭能力明显增强, 大量的纤维组织被降解, 肿瘤细胞呈现明显的浸润性生长。此外, 肿瘤细胞 GJIC 功能也与其侵袭能力密切相关<sup>[16]</sup>,

本实验中 GJIC 功能变化可能也是 EChT 治疗后残余肿瘤细胞侵袭能力降低的重要因素之一。由于 MMP-9 的分泌减少, 残余肿瘤细胞周围的纤维组织增生以及残余肿瘤细胞 GJIC 功能改善使 EChT 治疗后残余肿瘤细胞的侵袭能力在 2 周内呈一过性的降低。

总之, EChT 治疗后残余肿瘤细胞的增殖活性有明显降低, 凋亡指数明显增加, GJIC 功能有明显改善, 侵袭能力有明显的降低, 但这种变化均为一过性, 3 周后则恢复到治疗前的水平。由于对于较大的肿瘤 EChT 治疗后肿瘤残余难于完全避免, 这一结论对于 EChT 的肿瘤患者确定合适的复查及再次治疗的时机有重要参考价值, 如对于 EChT 治疗后发现有肿瘤残余的患者在 2 周内行补救治疗可能有助于提高疗效, 但其具体应用效果尚有待于临床应用结果的证实。

#### [参考文献]

- [1] 崔恒武, 陈爱华, 田建明, 等. CT 引导下电化学治疗肝癌[J]. 中华放射学杂志, 2002, 36: 317 - 320.
- [2] von Euler H, Söderstedt A, Thörne A, et al. Cellular toxicity induced by different pH levels on the R3230AC rat mammary tumour cell line. An in vitro model for investigation of the tumour destructive properties of electrochemical treatment of tumours[J]. Bioelectrochemistry, 2002, 58: 163 - 170.
- [3] Berry DP, Dennison AR, Ward R, et al. Electrolytic ablation of colorectal liver metastases: 1-year histological patient follow-up [J]. Dig Surg, 2000, 17: 518 - 519.
- [4] 张 玮, 蒋志峰, 黎丹戎, 等. 电化学治疗导致宫颈癌细胞系离子浓度改变及其对生长抑制作用的体外实验[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17: 1332 - 1336.
- [5] Goldenberg NM, Steinberg BE. Surface charge: a key determinant of protein localization and function [J]. Cancer Res, 2010, 70: 1277 - 1280.
- [6] von Euler H, Olsson JM, Hultén K, et al. Animal models for treatment of unresectable liver tumours: a histopathologic and ultra-structural study of cellular toxic changes after electrochemical treatment in rat and dog liver [J]. Bioelectrochemistry, 2003, 59: 89 - 98.
- [7] Kandouz M, Batist G. Gap junctions and connexins as therapeutic targets in Cancer[J]. Expert Opin Ther Targets, 2010, 14: 681 - 692.
- [8] Hung WC, Tseng WL, Shiea J, et al. Skp2 overexpression increases the expression of MMP - 2 and MMP-9 and invasion of lung Cancer cells[J]. Cancer Lett, 2010, 288: 156 - 161.
- [9] 倪金良, 陈晓星, 张国新, 等. 胰腺癌组织 Survivin 的表达与细胞凋亡、增殖的关系 [J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16: 1425 - 1429.
- [10] Gramantieri L, Trerè D, Chieco P, et al. In human hepatocellular carcinoma in cirrhosis proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is involved in cell proliferation and cooperates with P21 in DNA repair[J]. J Hepatol, 2003, 39: 997 - 1003.
- [11] Kang BY, You H, Bandyopadhyay S, et al. Cervical Cancer isolate PT3, super - permissive for adeno - associated virus replication, over-expresses DNA polymerase delta, PCNA, RFC and RPA[J]. BMC Microbiol, 2009, 9: 79.
- [12] 陈建国, 邓传宗, 蔡用武, 等. Ki-67, 增殖细胞核抗原、P53 在脑膜瘤中的表达及意义 [J]. 南通医学院学报, 2003, 23: 29 - 33.
- [13] Kotnik T, Pucihar G, Miklavcic D. Induced transmembrane voltage and its correlation with electroporation-mediated molecular transport[J]. J Membr Biol, 2010, 236: 3 - 13.
- [14] Lai TC, Chou HC, Chen YW, et al. Secretomic and proteomic analysis of potential breast Cancer markers by two-dimensional differential gel electrophoresis [J]. J Proteome Res, 2010, 9: 1302 - 1322.
- [15] Baltaziak M, Kanczuga - Koda L, Rutkowski R, et al. Gap junction intercellular communication in carcinogenesis of endometrial Cancer[J]. Ginekol Pol, 2011, 82: 520 - 524.
- [16] Wu J, Zhou HF, Wang CH, et al. Decreased expression of Cx32 and Cx43 and their function of gap junction intercellular communication in gastric Cancer [J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2007, 29: 742 - 747.

(收稿日期: 2012-02-05)

(本文编辑: 俞瑞纲)