

## ·实验研究 Experimental research·

## 冷冻消融后残存肿瘤与上皮-间质转化关系的实验研究

常旭, 郭志, 司同国, 张炜浩, 于海鹏, 杨雪玲, 杨红彩

**【摘要】** 目的 探究不完全冷冻消融对前列腺癌 RM-1 细胞生物学行为的影响及其产生机制。方法 前列腺癌 RM-1 细胞放入 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻 5 min,  $37^{\circ}\text{C}$ 水域复温, 待细胞状态恢复后重复冷冻 10 min、15 min。培养 1 d 后镜下观察细胞形态。20 只 C57/BL 小鼠构建荷瘤模型, 随机分为对照组与不完全冷冻消融组。不同时间点测量肿瘤大小, 14 d 时处死小鼠、取肺组织行 HE 染色, 统计肿瘤肺转移枚数。Transwell 法检测细胞迁移及侵袭能力变化, 免疫印迹检测相关蛋白表达水平, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测细胞上清液转化生长因子 (TGF)- $\beta$  分泌量。结果 经不完全冷冻消融的 RM-1 细胞排列紊乱, 形态发生改变, 可有触角结构形成。术后 3、7 d 不完全冷冻消融组肿瘤体积略小于对照组, 但仅术后 7 d 差异有统计学意义 ( $P=0.019$ ), 术后 10、14 d 肿瘤体积基本相等。不完全冷冻消融组肿瘤肺转移枚数明显多于对照组 ( $P<0.001$ )。Transwell 试验显示不完全冷冻消融组细胞迁移及侵袭能力强于对照组 ( $P<0.05$ )。免疫印迹检测显示, 不完全冷冻消融组与对照组相比, N-cadherin、MMP-9、vimentin、表达上调, E-cadherin 表达下调。ELISA 检测结果显示, 不完全冷冻消融组细胞上清液中 TGF- $\beta$  分泌增多。结论 不完全冷冻消融可使 RM-1 细胞迁移及侵袭能力增强, 增加荷瘤小鼠肿瘤肺转移枚数, 影响上皮-间质转化相关蛋白表达。

**【关键词】** 冷冻消融; 上皮-间质转化; 侵袭; 转移

中图分类号: R737.15 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2017)-08-0722-05

**The relationship between the remnant tumor and the epithelial-mesenchymal transition after cryoablation: an experimental study** CHANG Xu, GUO Zhi, SI Tongguo, ZHANG Weihao, YU Haipeng, YANG Xueling, YANG Hongcai. Department of Interventional Therapy, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center of Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy of Tianjin, Tianjin 300060, China

Corresponding author: GUO Zhi, E-mail: cjr.guozhi@vip.163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of incomplete cryoablation on the biological behavior of prostatic cancer RM-1 cells and its mechanism. **Methods** RM-1 cells of prostatic cancer were placed in  $-20^{\circ}\text{C}$  icebox to be frozen for 5 min. After the recovery of the cell state, the RM-1 cells were frozen again for 10 min and 15 min successively. After culture for one day, the cellular morphology was microscopically examined. A total of 20 C57/BL mice were used to establish the tumor-bearing models, which were randomly and equally divided into the control group and the incomplete cryoablation group with 10 mice in each group. At scheduled time points the tumor lesion size was measured for all mice. The mice were sacrificed at 14 days, the lung tissues were collected and were stained with HE; the numbers of metastatic lesions in the lung were calculated. Transwell assay was used to test the cell migration and invasion, immuno-blotting method was adopted to determine the epithelial-mesenchymal transition-related (EMT-related) protein expression level, and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to check the secretion volume of

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2017.08.013

基金项目: 国家自然科学基金 (81471761、81501568)

作者单位: 300060 天津医科大学肿瘤医院介入科、国家肿瘤临床医学研究中心、天津市肿瘤防治重点实验室、天津市恶性肿瘤临床医学研究中心

通信作者: 郭志 E-mail: cjr.guozhi@vip.163.com

transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). **Results** After incomplete cryoablation, RM-1 cells became disorderly arranged, their morphology was changed, and antenna structure might be formed. At 3 and 7 days after cryoablation, the tumor size in the incomplete cryoablation group was slightly smaller than that in the control group, but only the difference at 7 days after cryoablation was statistically significant between the two groups ( $P=0.019$ ). At 10 and 14 days after cryoablation, the tumor volume of the two groups was almost equal. The pulmonary metastatic lesions in the incomplete cryoablation group were obviously much more than those in the control group ( $P<0.001$ ). Transwell assay indicated that the cell migration and invasion ability in the incomplete cryoablation group was stronger than that in the control group ( $P<0.05$ ). Immuno-blotting test revealed that, when compared with the control group, in the incomplete cryoablation group the expressions of N-cadherin, MMP-9 and Vimentin were up-regulated, while the expression of E-cadherin was down-regulated. ELISA test showed that increased secretion of TGF- $\beta$  was observed in the incomplete cryoablation group. **Conclusion** Incomplete cryoablation can enhance the migration and invasion ability of RM-1 cells, increase the number of pulmonary metastatic lesions in tumor-bearing mice, and affect the EMT-related protein expression level. (J Intervent Radiol, 2017, 26: 722-726)

**[Key words]** cryoablation; epithelial-mesenchymal transition; invasion; migration

氩氦刀冷冻消融作为一种局部微创治疗方法,安全有效且创伤小,目前被广泛应用于前列腺癌、肝癌、肾癌、乳腺癌局部治疗<sup>[1-5]</sup>。正常情况下冷冻消融范围应超过肿瘤边缘 0.5~1 cm 才能达到完全消融效果,尽管冷冻消融可多点穿刺融合治疗以扩大有效治疗范围,但对体积较大或邻近重要器官或血管的肿瘤消融范围很难达到上述要求,近年也有报道冷冻消融治疗后肿瘤复发增快,转移发生率高<sup>[6]</sup>。本研究旨在通过体外及体内实验验证不完全冷冻消融对肿瘤细胞生物学行为的影响及其产生机制。

## 1 材料与方法

取对数生长期小鼠前列腺癌 RM-1 细胞,放入 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻 5 min,迅速取出并 $37^{\circ}\text{C}$ 水域复温,待细胞状态恢复后再次放入冰箱冷冻 10 min,同样方法再次冷冻 15 min。培养 1 d 后,显微镜下观察细胞形态变化。

实验试剂包括神经钙黏素(N-cadherin)、基质金属蛋白酶(MMP)-9、波形蛋白(vimentin)、转化生长因子(TGF)- $\beta$  抗体(英国 Abcam 公司),上皮钙黏素(E-cadherin)(美国 Santa Cruz 公司),酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国 R&D 公司)。

### 1.1 小鼠前列腺癌远处转移模型构建及分组

20 只雄性 C57/BL 小鼠(6~8 周龄,体重 25~30 g,由天津市血液病研究所提供),饲养于天津市肿瘤医院动物实验室无特定病原体(SPF)级无菌层流室,所用食物和水均经灭菌处理,符合标准饲养条件。本实验遵从动物伦理学条例。收集正常处于对数生长期 RM-1 细胞,用 0.9%NaCl 溶液调整细

胞浓度为 $5\times 10^7/\text{ml}$ ,将细胞悬液吸入 1 ml 注射器,驱赶注射器中的气泡。将制备好的细胞悬液按 $5\times 10^6$  细胞/只接种于小鼠腹股沟皮下部位,出针时用棉签压迫。每天观察肿瘤生长情况,一般 4~7 d 皮下可触及肿瘤,肿瘤生长至直径 1 cm 时确认模型构建成功。将小鼠随机分为两组,即对照组(假手术组,只插入冷冻器,不进行冷冻处理)、不完全冷冻消融组,每组 10 只。分别于术后 3、7、10、14 d 计算肿瘤体积(游标卡尺测量肿瘤最大径 a、最小径 b,体积 $V=ab^2/2$ )。14 d 时处死小鼠,取小鼠肺组织行 HE 染色,统计肺转移枚数。

### 1.2 小鼠前列腺癌氩氦刀冷冻消融

将小鼠固定于木板上,术区备皮、常规消毒。10%水合氯醛(3 mg/kg)腹腔注射。于术区皮肤切开约 0.5 cm 开口,将直径 1.7 mm 冷冻器插入肿瘤组织内。开启冷冻系统,根据测温探针温度调整输出功率,冰球完全覆盖肿瘤之前停止冷冻,人为制造不完全冷冻消融模型,平均冷冻时间约持续 20 s,复温 30 s 至探针可转动(温度约 $12^{\circ}\text{C}$ ),缓慢撤出冷冻器和测温探针,确认无出血、渗出,压迫伤口片刻。冷冻治疗结束后肌内注射庆大霉素(8 万 U/d) 3 d 预防感染,于动物实验室常规饲养。

### 1.3 Transwell 迁移及侵袭试验

将正常生长及经过冷冻处理的 RM-1 细胞分别种植于 Transwell 小室上室(每孔 $5\times 10^4$  个细胞,仅用 1 640 培养基培养),下室 24 孔板中加入含 20% 胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 作为趋化剂,每组设 3 个对照。培养 24 h, Thermo Fisher 三步法染色剂固定及染色。显微镜下观察计数穿膜细胞。侵袭实验

方法同迁移实验,不同处在于小室底部加入Matrigel 基质胶。

### 1.4 免疫印迹检测

取 RM-1 细胞,加入裂解液进行裂解。二辛可酸 (BCA)法测定蛋白浓度。配置 10%分离胶和 8%浓缩胶、取 20 μg 蛋白行十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE),湿转至聚偏二氟乙烯 (PVDF)膜上。5%脱脂奶粉封闭后,抗体及内参 4℃ 过夜孵育;Tris 缓冲 0.9%NaCl 液 (TBST)漂洗后,辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h;TBST 漂洗后电化学发光法检测。

### 1.5 细胞上清 TGF-β 检测

采用双抗体夹心 ELISA 试剂盒检测细胞上清液 TGF-β 表达,操作方法严格按照试剂盒使用说明操作,重复 3 次取均值。

### 1.6 统计学分析

采用 SPSS22 软件分析实验结果, 计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组数据间比较用 *t* 检验,  $P<0.05$  具有统计学差异。

## 2 结果

经过不完全冷冻消融处理培养 1 d 后, RM-1 细胞形态相对于对照组有明显变化, 出现排列紊乱、长梭形改变,部分细胞边缘生出不规则触角结构现象(图 1)。

术后 3、7 d 不完全冷冻消融组和对照组小鼠

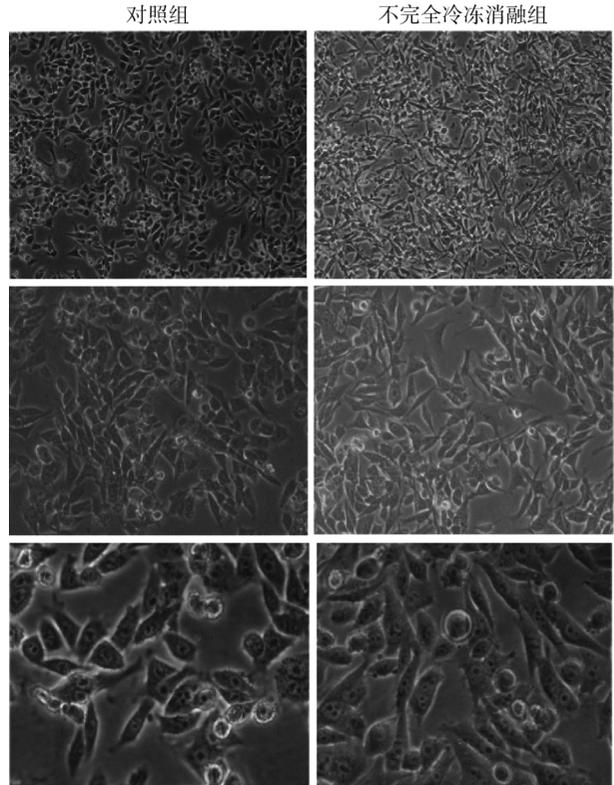


图 1 两组不同放大倍数下细胞形态变化

肿瘤分别为  $(968\pm 200)$  mm<sup>3</sup>、 $(1217\pm 140)$  mm<sup>3</sup> 和  $(1211\pm 148)$  mm<sup>3</sup>、 $(1612\pm 169)$  mm<sup>3</sup>, 术后 10、14 d 分别为  $(2467\pm 374)$  mm<sup>3</sup>、 $(3402\pm 686)$  mm<sup>3</sup> 和  $(2384\pm 184)$  mm<sup>3</sup>、 $(3360\pm 537)$  mm<sup>3</sup>, 但仅术后 7 d 两组差异有统计学意义( $P=0.019$ )(图 2)。

术后 14 d 处死小鼠, 肺组织经苏木精-伊红

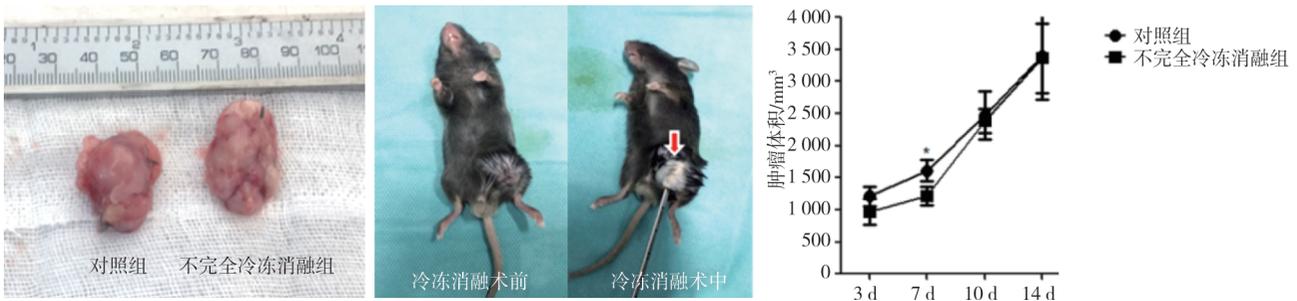


图 2 术后 3、7、10、14 d 测量肿瘤大小

(HE)染色后镜下观察显示,肿瘤转移在对照组为  $(8.1\pm 2.5)$  枚,不完全冷冻消融组为  $(16.7\pm 3.7)$  枚,差异有统计学意义( $P<0.001$ )(图 3)。

Transwell 迁移及侵袭试验检测术后 RM-1 细胞迁移及侵袭能力变化(固定、染色后倒置显微镜下每个视野摄影 5 张,计数后求单个视野下穿过小室滤膜平均细胞数),结果显示迁移试验中对照组、不完全冷冻消融组穿膜细胞数分别为  $154.75\pm 18.99$ 、 $223.00\pm 21.98$ ,差异有统计学意义( $P=0.031$ );侵袭

试验中对照组、不完全冷冻消融组穿膜细胞数分别为  $47.0\pm 7.6$ 、 $84.5\pm 6.6$ ,差异有统计学意义( $P=0.004$ )。经不完全冷冻处理培养细胞的迁移及侵袭能力增强(图 4)。

免疫印迹试验检测结果显示,与对照组相比,不完全冷冻消融组 N-cadherin、MMP-9、vimentin、TGF-β 表达上调,而 E-cadherin 表达下调(图 5)。ELISA 检测结果显示,对照组、不完全冷冻消融组细胞上清 TGF-β 含量分别为  $(25.80\pm 0.65)$  ng/ml、 $(34.62\pm$

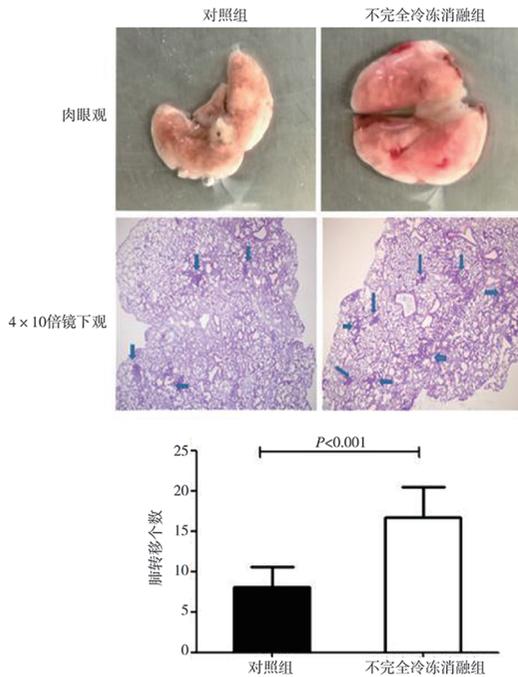


图3 镜下观察肺转移

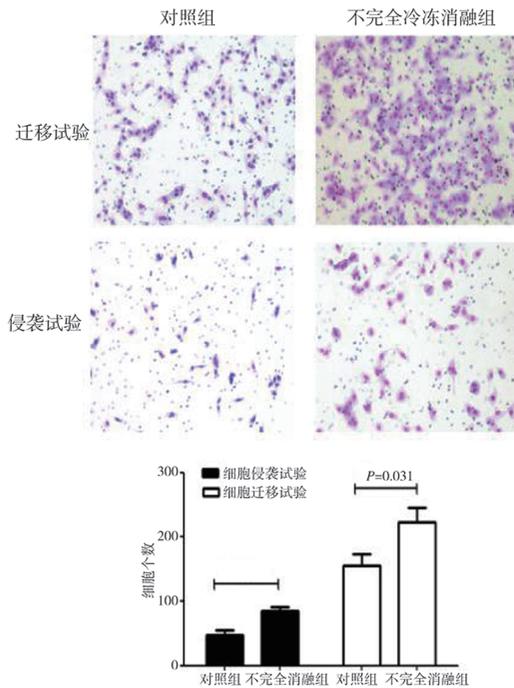


图4 Transwell 迁移及侵袭试验结果

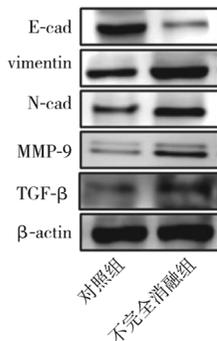


图5 免疫印迹试验检测结果

2.56) ng/ml, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

氩氦刀冷冻消融作为一种局部微创治疗方法, 安全有效、创伤小, 目前广泛应用于多种肿瘤局部治疗<sup>[1-5]</sup>, 对于体积较小、位置合适肿瘤甚至可达到与外科切除相同的疗效。正常情况下, 冷冻消融范围应超过肿瘤边缘 0.5~1 cm、温度达到  $< -20^{\circ}\text{C}$ <sup>[7]</sup>, 才能达到完全消融效果。尽管冷冻消融可多点穿刺融合治疗以扩大有效范围, 相对于射频消融(RFA)等消融范围已大为提高, 但对于体积较大或是邻近重要器官或血管肿瘤, 消融范围时常受限, 肿瘤周边会残存亚致死细胞。这可能与肿瘤复发与转移有关。目前关于不完全冷冻消融后导致残存肿瘤复发与转移能力增强的研究较少, 其机制尚不明确。

上皮-间质转化(EMT)是上皮细胞在特定生理、病理状态下向间质细胞分化的现象, 由连接紧密、相对静止的上皮细胞转化为连接疏松、具有迁移、活动能力的间质组织。研究表明, EMT 在恶性肿瘤发生、发展、侵袭及转移过程中起着关键作用<sup>[8-10]</sup>。EMT 过程中不仅细胞表型由上皮细胞转化为间质细胞, 而且细胞标志物也发生变化——上皮标志物 E-cadherin、细胞角质蛋白等表达下调, 间质标志物 N-cadherin、vimentin、纤维结合蛋白、平滑肌肌动蛋白等表达上调, 同时 MMP 上调细胞外基质重构, 有利于癌细胞向邻近组织侵袭或进入血管、淋巴管向远处转移<sup>[11]</sup>。因此, EMT 是肿瘤局部侵袭和远处转移的始动环节。本研究中经过处理的肿瘤细胞转移及侵袭能力增强, N-cadherin、vimentin 等间质标志物表达上调, 上皮标志物 E-cadherin 表达下调, 证明不完全冷冻消融与 EMT 发生有关; 不完全冷冻消融后小鼠肿瘤负荷减小不明显, 肺转移明显增加, 进一步证明体外实验的结论。Kroeze 等<sup>[6]</sup>对比分析 RFA、氩氦刀冷冻不完全消融的荷瘤小鼠与外科手术切除肿瘤小鼠, 发现不完全消融术后 2 h 残存肿瘤细胞增殖能力增强并持续至术后 14 d, 术后 3 d 达峰值; RFA 组残存肿瘤细胞增殖明显强于氩氦刀冷冻消融组 ( $P < 0.05$ ), 外科手术组则无改变; RFA 组、氩氦刀冷冻消融组残存肿瘤细胞凋亡逐渐减弱, 外科手术组逐渐增强; 分析原因可能为, 不完全消融术后乏氧环境生成, 热休克蛋白(HSP)表达上调、炎性细胞增多等。Nailing 等<sup>[12]</sup>研究认为, 不完全冷冻消融后坏死组织周围亚致死细胞分泌 TGF-β 增多, 且离坏死中心越近分泌的 TGF-β 越多, 信号转导蛋白

Smad2/3、Smad4 表达量也越高。本研究中不完全冷冻消融后 RM-1 细胞表达 TGF- $\beta$  增加,与既往结果吻合<sup>[13]</sup>。TGF- $\beta$  可通过 Smad 信号通路激活多种转录因子如 ZEB1、SIP1、Snail、Slug、Twist 等,它们可引起紧密连接蛋白 ZO-1、Claudin-1 和上皮标志物 E-cadherin 等表达下调,间质标志物 vimentin、N-cadherin 等表达上调,诱导 EMT 产生。

EMT 在肿瘤非手术治疗后残癌侵袭、转移过程中扮演重要角色,如果能够阻止或抑制治疗诱导的 EMT,可能会阻断治疗后恶性表型发展及肿瘤侵袭、转移。因此,临床上应力争对肿瘤进行彻底消融治疗。若肿瘤体积较大或位置不佳,无法完成彻底消融,可施行多次冷冻治疗,在残存肿瘤未达到增值高峰时较短时间内再次给予冷冻消融,或联合<sup>125</sup>I 放射性粒子等其它局部治疗,以“小步快走”达到完全杀死肿瘤细胞的效果,但相邻 2 次局部治疗的最佳时间尚需进一步实验研究。同时,联合 TGF- $\beta$  抑制剂等新靶向药物联合治疗,可提高抗癌总体疗效,降低肿瘤复发与转移。此外,探索参与 EMT 过程的分子机制,发现其中关键分子,进一步降低 EMT 发生,对于改善冷冻消融治疗患者预后具有重要意义。

#### [参 考 文 献]

- [1] Cohen JK, Miller RJ Jr, Ahmed S, et al. Ten-year biochemical disease control for patients with prostate cancer treated with cryosurgery as primary therapy[J]. *Urology*, 2008, 71: 515-518.
- [2] Hu KQ. Advances in clinical application of cryoablation therapy for hepatocellular carcinoma and metastatic liver tumor[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2014, 48: 830-836.
- [3] 刘长富, 郭志, 邢文阁, 等. 栓塞联合冷冻消融对比索拉菲尼治疗Ⅲ期肾癌疗效评价[J]. *介入放射学杂志*, 2015, 24: 964-968.
- [4] Cazzato RL, de Lara CT, Buy X, et al. Single-centre experience with percutaneous cryoablation of breast cancer in 23 consecutive non-surgical patients[J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2015, 38: 1237-1243.
- [5] 黄斌, 周石. TACE 联合氩氦刀冷冻术治疗巨块型肝细胞癌的临床研究[J]. *介入放射学杂志*, 2011, 20: 28-31.
- [6] Kroeze SG, van Melick HH, Nijkamp MW, et al. Incomplete thermal ablation stimulates proliferation of residual renal carcinoma cells in a translational murine model[J]. *BJU Int*, 2012, 110 (6 Pt B): E281-E286.
- [7] Heuer R, Gill IS, Guazzoni G, et al. A critical analysis of the actual role of minimally invasive surgery and active surveillance for kidney cancer[J]. *Eur Urol*, 2010, 57: 223-232.
- [8] De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13: 97-110.
- [9] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119: 1420-1428.
- [10] 吕文姣. 上皮-间质转化与肿瘤侵袭转移关系的研究进展[J]. *肿瘤学杂志*, 2014, 20: 508-511.
- [11] Jang MJ, Baek SH, Kim JH. UCH-L1 promotes cancer metastasis in prostate cancer cells through EMT induction[J]. *Cancer Lett*, 2011, 302: 128-135.
- [12] Nailong T, Zhi G, Xueling Y. Cryoablation induced the change of TGF-beta pathway in CWR-22RV prostate cancer cell line[J]. *Cryobiology*, 2015, 71: 130-134.
- [13] Ikushima H, Miyazono K. TGF beta signalling: a complex web in cancer progression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10: 415-424.

(收稿日期:2016-10-25)

(本文编辑:边 佶)