

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790( 2007 )19-1742-04

## 氩氦刀对 T739 小鼠 LA795 皮下移植瘤坏死及细胞凋亡的影响

温居一 段蕴铀 邹曰坤 冯华松 聂舟山 ( 海军总医院呼吸内科 北京 100037 )

## Effect of Argon-Helium cryoablation on necrosis and cell apoptosis of subcutaneously transplanted tumor of LA795 in T739 mice

WEN Ju-Yi, DUAN Yun-You, ZOU Yue-Kun, FENG Hua-Song, NIE Zhou-Shan

Department of Respiratory Medicine, Navy General Hospital, Beijing 100037, China

**【Abstract】** AIM: To study the effect of Argon-Helium cryoablation on necrosis and apoptosis of subcutaneously transplanted tumor of the lung adenocarcinoma LA795 in T739 mice *in vivo*, thus to evaluate the feasibility and therapeutic efficacy of argon-helium cryoablation in treatment of Non-small cell lung cancer ( NSCLC ). **METHODS**: Animal model of subcutaneously transplanted tumor of the lung adenocarcinoma LA795 in T739 mice was established. After argon-helium cryoablation, necrosis and ablation laws were studied under light microscope. Cell apoptosis in peripheral cryoablation zone was detected by *in-situ* end labeling ( TUNEL ). Bcl-2 and Bax expression were detected by immunohistochemical SABC procedures. The cleavage and activation of Caspase 3 and PARP in peripheral cryoablation zone was detected by Western Blot. **RESULTS**: In central area of cryoablation, necrosis dominated in cell death, showing double peak efficacy. The first necrosis peak occurred at 3 h after argon-helium cryoablation ( area of necrotic area/area of tumor = 47% ); the 2nd necrosis peak occurred at 4 days after cryoablation ( area of necrotic area/area of tumor = 68% ). In peripheral cryoablation zone, definite cell apoptosis was observed by morphological examination under light microscope and TUNEL staining, and it reached the peak at 8 - 16 h after cryoablation. Immunohistochemical results showed no obvious change in Bcl-2 protein expression before and after cryoablation. Bax protein expression was up-regulated after cryoablation. Western Blot results showed cleavage and activation of Caspase-3 and PARP in peripheral cryoablation zone around ice ball after the treatment. **CONCLUSION**: Argon-Helium-based

cryoablation is an efficient technique to induce cell death either by necrosis or by apoptosis. Cryoablation might induce cell apoptosis in peripheral cryoablation zone through Caspase pathway. Bax protein may be involved in apoptosis mechanism, but it is irrelevant to Bcl-2.

**【Keywords】** Endocare Cryocare™ surgery system ( Argon-Helium-based ); cryoablation; adenocarcinoma; apoptosis

**【摘要】**目的: 研究氩氦刀冷冻消融对 T739 小鼠 LA795 肺腺癌皮下移植瘤坏死和细胞凋亡的影响。评价氩氦刀冷冻治疗非小细胞肺癌的可行性及疗效。方法: 建立 T739 小鼠 LA795 肺腺癌皮下移植瘤动物模型。氩氦刀冷冻后, 光学显微镜观察冷冻坏死消融规律; 末端标记法( TUNEL )原位检测周边冷冻损伤区带细胞凋亡, 免疫组织化学法检查 Bcl-2 和 Bax 表达; Western Blot 检测冰球周边冷冻损伤区 Caspase-3 表达及聚腺苷二磷酸核苷聚合酶( PARP )剪切活性。结果: 在冷冻中心区, 细胞死亡以坏死为主, 坏死呈现“双峰”效应: 氩氦刀术后 3 h 出现第 1 次坏死高峰, 坏死区域面积/肿瘤面积达 ( 47 ± 5.51 )% ; 术后 4 d 出现第 2 次坏死峰, 坏死区域面积/肿瘤面积达 ( 68 ± 4.69 )% 。在周边冷冻损伤区, 光镜形态学检查及 TUNEL 染色可观察到明确的细胞凋亡, 术后 8 ~ 16 h 凋亡达高峰, 凋亡率为 ( 71 ± 6.41 )% 。免疫组化显示, Bcl-2 蛋白表达在冷冻前后无明显变化, bax 蛋白在冷冻后其表达上调。Western Blot 结果显示: 冷冻后冰球周边损伤区带 Caspase-3 和 PARP 剪切、激活。结论: 氩氦刀通过坏死和凋亡两种途径达到有效的消融。冷冻消融可能通过 Caspase 途径诱导周边损伤区带细胞凋亡。其凋亡机制有 Bax 蛋白参与, 而与 Bcl-2 无关。

**【关键词】** Endocare 氩氦刀 冷冻消融 腺癌 凋亡

**【中图分类号】** R73-36 **【文献标识码】** A

## 0 引言

近年来氩氦靶向冷冻治疗, 因具有安全、有效、微创、副作用小等特点, 已成为一种令人关注的肿瘤微创治疗技术。目前已经应用于前列腺癌、肺癌、肝癌等多种实体瘤的治疗<sup>[1]</sup>, 其疗效也已得到初步证实。有关资料显示, 目前该研究大多集中在体外细胞学试验<sup>[2-3]</sup>, 有关氩氦刀冷冻消融治疗对活体肺癌组织、细胞的坏死、凋亡有何影响的研究报道较少。我们建立 T739 小鼠 LA795 肺腺癌皮下移植瘤动物模型, 通

收稿日期 2007-04-23; 接受日期 2007-06-25

基金项目 全军“十一·五”医药卫生科研项目( 06MB021 )

通讯作者 段蕴铀. Tel ( 010 ) 66958008 Email zhuanyunyou@126.com

作者简介 温居一, 博士, 主治医师. Tel ( 010 ) 66958515 Email wen-juyi@126.com

过实验观察氩氦刀冷冻消融治疗对肺腺癌组织坏死和细胞凋亡的影响,旨在进一步探讨氩氦刀冷冻消融治疗后肺癌组织的超微结构改变及可能的细胞生物学变化,为临床应用提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 6周龄健康 T739 小鼠 48 只,雌雄各半,体重(20 ± 2.05)g(中国协和医科大学动物研究所);小鼠肺腺癌 LA795 细胞株(协和医科大学肿瘤研究所);氩氦刀冷冻治疗系统及 2 mm 冷冻刀头(美国 Endocare 公司);TUNEL 原位免疫组化试剂盒(美国 Roche 公司);Bax 及 Bcl-2 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);leica Qwin 图像分析系统(德国徕卡公司);DNA-Ladder Marker(华美生物工程公司);聚丙烯酰胺电泳凝胶电泳系统及半干式电泳转移仪(美国 Bio-RAD 公司);抗 PARP 抗体 A338-MC-50(美国 Santa cruz 公司);Caspase-3 抗体(加拿大真达公司);其余相关试剂均为国产或进口分装分析纯级产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 T739 小鼠 LA795 肺腺癌皮下移植瘤动物模型的建立** LA795 肺腺癌细胞培养至对数期,取 LA795 腺癌细胞悬液 0.2 mL,调节细胞数目,按  $2.5 \times 10^6$ /只接种于小鼠右腿背侧皮下。2 wk 后游标卡尺测量肿瘤长径(25.64 ± 1.98)mm,短径(23.41 ± 1.45)mm。开始实验。

**1.2.2 试验分组** 将小鼠分为对照组和冷冻组,每组 24 只(雌雄各半)。冷冻组 24 只小鼠用速眠新 II 注射液 0.2 mL/kg 麻醉,固定后,备皮,消毒 2 mm 氩氦刀冷冻刀头插入肿瘤中央。采用双循环冷冻方法:温度降低至 -120℃ 冷冻 10 s,复温至 0℃,重复上述冻融循环。冰球平均长径:(23.50 ± 1.06)mm,短径(18.04 ± 0.96)mm。对照组不进行冷冻手术,正常喂饲。两组分别于术后 3、5、8、16、24 h 和 2、4、8 d 同时处死动物取材。每组各时间点各处死小鼠 3 只,尽量完整剥离肿瘤组织。

**1.2.3 形态学观察** 将剥离的肿瘤组织用 40 g/L 甲醛固定后,常规石蜡包埋切片,HE 染色后光镜下观察。

**1.2.4 TUNEL 末端标记法原位检测冷冻损伤区细胞凋亡** 方法参照 TUNEL 试剂盒说明书步骤进行。结果判定:细胞核呈棕黄色颗粒者定义为阳性细胞。400 倍下视野随机计数 5 个不重复视野的阳性细胞数,每个时间点 3 只小鼠,取平均值计算凋亡细胞阳性率。

**1.2.5 免疫组织化学 SABC 法检查冷冻损伤区 Bcl-2 和 Bax 表达** 标本于 40 g/L 多聚甲醛中浸泡固定 24 h,常规石蜡包埋,切片。步骤按说明书方法进行。PBS 替代一抗作阴性对照。结果判断:Bcl-2 和 Bax 染色均以胞质出现棕黄色颗粒定义为阳性细胞。每张切片随机观察 5 个高倍视野,应用 leica Qwin 图像分析系统进行处理,随机选场,自动采点分析,测得阳性细胞积分吸光度值。分析比较 Bcl-2 与 Bax 表达量的变化(积分吸光度值越高,表示阳性细胞区域越大或信号越强)。

**1.2.6 Western Blot 检测冰球周边冷冻损伤区 Caspase-3 表达及 PARP 剪切活性** 分别提取冷冻组周边冷冻损伤区和对照组同部位组织,按文献 [2] 的方法提取蛋白,上样。按文献 [3] 的方法走电泳,电转移。蛋白质转移到硝酸纤维素膜上后,用 1 × PBS,50 mg/L 脱脂奶粉,1 g/L Tween-20 18℃ ~ 24℃ 微振荡下封闭 1 h。用 1 × PBS,50 mg/L 脱脂奶粉,1 g/L Tween-20 稀释的 1:2000 抗聚腺苷二磷酸核苷聚合酶 (poly-ADP-ribose polymerase, PARP) 抗体和 Caspase-3 抗体 4℃ 过夜。1 × PBS,1 g/L Tween-20 洗膜 3 次。加入 1:300 封闭液稀释的 HRP 标记的二抗 18℃ ~ 24℃ 1 h。1 × PBS,1 g/L Tween-20 洗膜 3 次。最后用 ECL 发光试剂盒显色,观察结果。

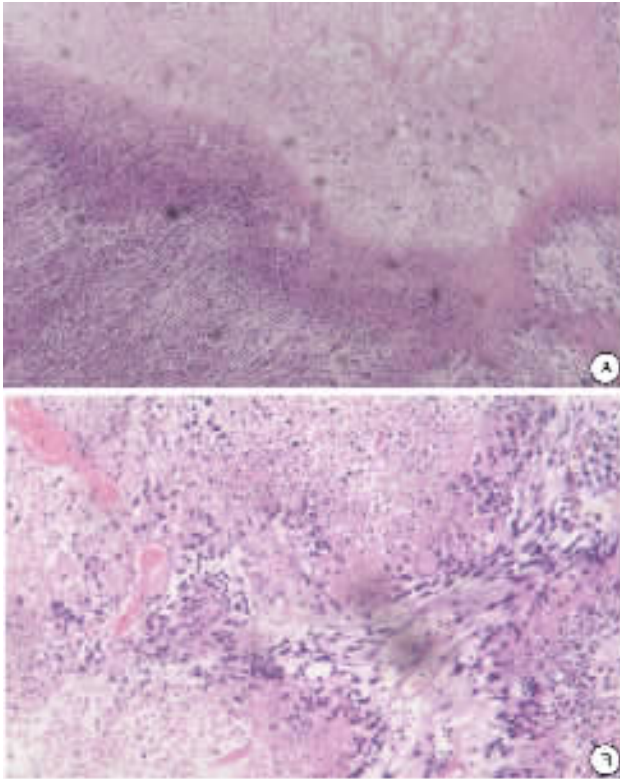
统计学处理:使用 SPSS 11.0 统计软件。采用 Kaplan-Meier 生存分析,率的比较使用  $\chi^2$  检验,计量资料的均数比较使用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 氩氦刀术后不同时间病灶消融坏死率** 氩氦刀冷冻消融治疗 T739 小鼠 LA795 肺腺癌皮下移植瘤,冷冻后病灶局部可见三个比较明显的分区(图 1A):冷冻区中心(围绕氩氦刀探头插入处)细胞完全坏死崩解,核碎裂,呈凝固性坏死,坏死区域周边出现明显的损伤区带,其中仍可见部分癌细胞,但细胞皱缩,核浓集,染色质固缩,呈典型的凋亡细胞特征。局部血管充血、栓塞、渗出(图 1B);外围则是未受损的肿瘤细胞,形态正常。冷冻组坏死区域面积/肿瘤面积比值远远大于对照组(*P* < 0.01)。坏死呈现“双峰”效应,氩氦刀冷冻消融术后 3 h 出现第 1 次坏死高峰,坏死区域面积/肿瘤面积达(47 ± 5.51)%;术后 4 d 出现第 2 次坏死峰,坏死区域面积/肿瘤面积达(68 ± 4.69)%。

**2.2 TUNEL 末端标记法原位检测细胞凋亡** 对 T739 小鼠 LA795 肺腺癌皮下移植瘤实施局部冷冻

后, TUNEL 染色结果显示, 凋亡细胞主要集中分布在冰球周围损伤区带, 细胞出现了凋亡特有的形态学变化, 表现为细胞核着棕黄色, 核固缩, 染色质靠核膜周边呈蚕豆或新月形浓染(图2), 对照组肿瘤组织中少量凋亡细胞散在分布. 与对照组相比, 冷冻组各时间点凋亡细胞阳性率均显著高于对照组( $P < 0.05$ ). 冷冻组凋亡细胞于术后 3 h 即开始增多, 术后 8 ~ 16 h 凋亡达高峰( $71 \pm 6.41$ )%.



A 冷冻消融术后组织病理变化 HE  $\times 200$ ; B 冷冻损伤区血管效应 HE  $\times 400$ .

图1 T739 小鼠 LA795 肺腺癌皮下移植瘤氩氦刀冷冻消融术后光学显微镜观察

**2.3 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达** 光镜观察可见 Bcl-2 主要位于胞浆内, 呈棕黄色, 散在或灶状分布. 冷冻坏死区中心几乎未见 Bcl-2 表达. 冷冻组各时间点组周边损伤区与对照组相比 Bcl-2 蛋白的表达稍下降, 但其差异无统计学意义( $P > 0.05$ ). Bax 亦位于胞浆, 呈棕黄色. 冷冻消融治疗后在冷冻灶周边损伤区

Bax 表达增多, 染色也较深. 对照组 Bax 呈散在分布. Bax 在冷冻后表达明显上调( $P < 0.01$ , 图3 表1) 其分布与 TUNEL 染色结果大体一致.

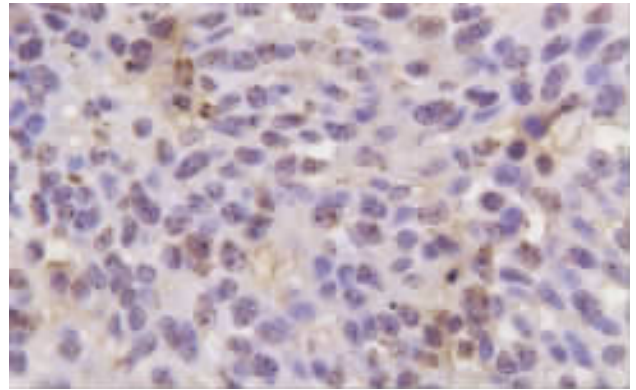
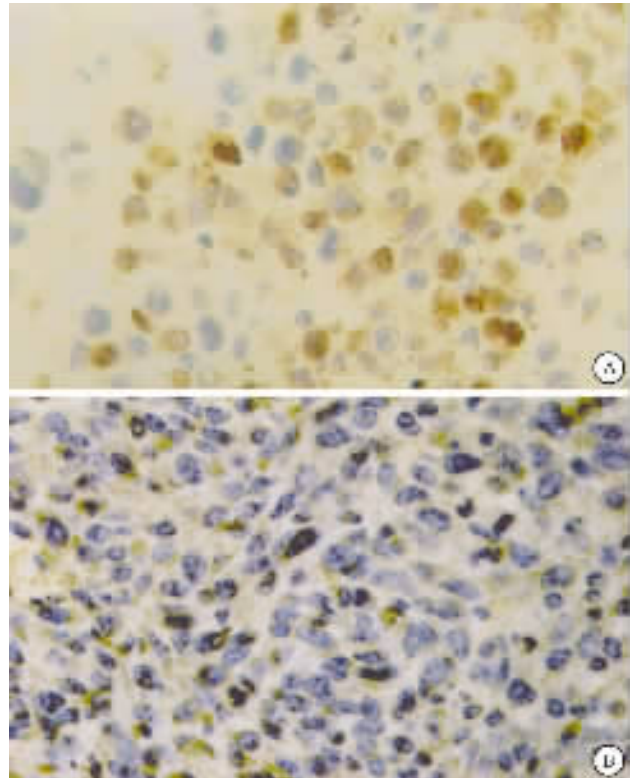


图2 氩氦刀冷冻消融术后 TUNEL 染色检测细胞凋亡  $\times 400$



A 冷冻后 Bax 免疫组化染色; B 冷冻后 Bcl-2 免疫组化染色.

图3 氩氦刀冷冻消融术后损伤区带细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

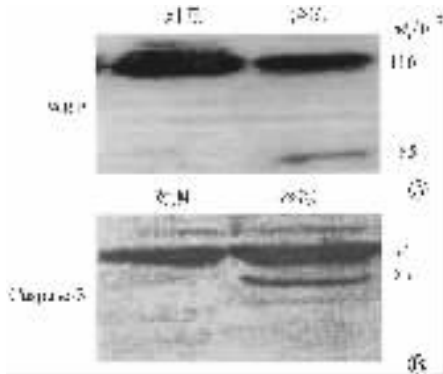
表1 Bax 和 Bcl-2 免疫组化染色积分吸光度值

( $n = 24, \bar{x} \pm s$ )

组别	5 h		8 h		16 h		2 d		4 d	
	Bax	Bcl-2	Bax	Bcl-2	Bax	Bcl-2	Bax	Bcl-2	Bax	Bcl-2
对照	3.69 $\pm$ 0.20	7.20 $\pm$ 0.19	3.50 $\pm$ 0.32	6.40 $\pm$ 0.28	5.58 $\pm$ 0.49	8.63 $\pm$ 0.91	4.65 $\pm$ 0.47	6.70 $\pm$ 0.66	5.20 $\pm$ 0.68	7.38 $\pm$ 0.68
冷冻	69.83 $\pm$ 1.52 <sup>b</sup>	4.70 $\pm$ 0.37	96.01 $\pm$ 4.07 <sup>b</sup>	5.33 $\pm$ 1.06	120.79 $\pm$ 10.32 <sup>b</sup>	8.92 $\pm$ 1.35	100.50 $\pm$ 11.66 <sup>b</sup>	7.06 $\pm$ 0.49	87.29 $\pm$ 9.75 <sup>b</sup>	6.92 $\pm$ 1.20

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照.

**2.4 Western Blot 检测冰球周边冷冻损伤区 Caspase-3 及 PARP 剪切活性** 实验结果表明冷冻后冰球周边损伤区组织 PARP 蛋白从一条完整的  $M_r$  约为 116 ku 剪切为 85 ku, 而对照组相同部位取材则未见 PARP 剪切; 冷冻组 Caspase-3 由  $M_r$  约为 32 ku 剪切为 20 ku, 而对照组则未见剪切片断(图4)。



A PARP 剪切; B Caspase-3 剪切。

图4 各实验组 PARP 及 Caspase-3 剪切活性

### 3 讨论

氩氦刀是局部破坏肿瘤的一个有效手段<sup>[4]</sup>。治疗时,氩氦刀冷冻冰球中心的温度可达  $-125^{\circ}\text{C}$  左右,可致细胞完全坏死消融。但随着距探头中心距离的增加,温度逐渐回升<sup>[5]</sup>,冰球周围癌细胞并未坏死,而表现为一个冷冻损伤区带。研究氩氦刀对该区域组织细胞的影响,对于手术靶区设计及解决术后残留问题,具有重要的临床意义。

我们的研究结果显示,T739 小鼠 LA795 肺腺癌皮下移植瘤经氩氦刀冷冻消融后,组织坏死呈“双峰”效应,冷冻术后 4 d 出现第 2 次坏死高峰。并且在冷冻后相当长的时间内,冷冻损伤区带细胞仍存在较高的凋亡率。这与国外液氮冷冻的试验结果一致<sup>[6-7]</sup>。提示:由于坏死和低氧血症等共同诱导的继发炎症反应,构成了冷冻术的延迟效应,也可以诱导细胞凋亡,其凋亡机制可能亦参与了冷冻所致的细胞损伤。

Bcl-2 蛋白的过表达可在多种肿瘤中发生<sup>[8]</sup>,作为一种抑凋亡蛋白已得到普遍认同。Bax 与 Bcl-2 作用相反,能促进细胞凋亡,但其是否能单独介导凋亡存在争议,肺癌组织存在 Bcl-2 蛋白表达上调和 Bax 蛋白表达下调<sup>[9]</sup>。而冷冻后 Bcl-2 家族蛋白表达则是细胞特异性的<sup>[10]</sup>。本试验结果显示,冷冻后 Bcl-2 蛋白的表达未见明显变化,这与文献报道的基本一致<sup>[10]</sup>,提示冷冻诱导肺癌凋亡的途径可能不是通过

调节 Bcl-2 来实现的。我们同时观察到, Bax 在冷冻后表达上调,在组织中的分布与 TUNEL 染色结果类似,说明 Bax 在冷冻促进凋亡的过程中显示了作用。

有研究证实, Caspase 蛋白水解 PARP 是细胞凋亡的早期事件。通过检测 PARP 剪切片断,证实细胞凋亡事件发生<sup>[3,11-12]</sup>。本实验结果表明在冷冻后冰球周边损伤区带组织可观察到 Caspase-3 和 PARP 蛋白剪切,表明冷冻治疗可能通过 Caspase 途径诱导冰球周边损伤区带细胞凋亡。这提示我们在氩氦冷冻消融治疗后,有必要联合放、化疗等治疗手段,以进一步促进冷冻周边损伤区带细胞凋亡,进而提高冷冻治疗的效果。

### 【参考文献】

- [1] 王洪武. CT 引导下经皮穿刺氩氦刀靶向治疗肺癌[J]. 中国肿瘤, 2002, 11(8): 462-464.
- [2] Clarke DM, Robilotto AT, Rhee E, et al. Cryoablation of renal cancer: Variables involved in freezing-induced cell death[J]. Technol Cancer Res Treat, 2007, 6(2): 69-80.
- [3] Valérie F, Michel P, Lydia C, et al. Effects of cryotherapy or chemotherapy on apoptosis in a non-small-cell lung cancer xenografted into SCID mice[J]. Cryobiology 2005, 50: 29-37.
- [4] 陈洪雷, 高俊, 梁素美, 等. 人肺癌组织中 Caspase-3 及其底物 PARP 蛋白的表达和意义[J]. 武汉大学学报(医学版), 2005, 26(6): 726-729.
- [5] 于天骅, 王洪武, 周一欣, 等. Endocare 型氩氦冷刀冻结与复温性能的实验研究[J]. 航天医学与医学工程, 2003, 16(1): 60-63.
- [6] Vivien S, Kerstin B, Rolf-Markus S, et al. Apoptosis and leucocyte-endothelium interactions contribute to the delayed effects of cryotherapy on tumours *in vivo* [J]. Arch Dermatol Res, 2002, 294: 341-348.
- [7] Yaren A, Oztop I, Kargi A, et al. Bax, Bcl-2 and c-kit expression in non-small-cell lung cancer and their effects on prognosis[J]. Int J Clin Pract, 2006, 60(6): 675-682.
- [8] Konturek PC, Konturek SJ, Sulekova Z, et al. Expression of hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha, apoptosis related protein Bax and Bcl-2, and gastrin in human gastric cancer [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2001, 15: 989-999.
- [9] Yang WL, Addona T, Nair DG, et al. Apoptosis induced by cryo-injury in human colorectal cancer cells is associated with mitochondrial dysfunction[J]. Int J Cancer, 2003, 103(3): 360-369.
- [10] Borst P, Rottenberg S. Cancer cell death by programmed necrosis [J]? Drug Resist Updat, 2004, 7(6): 321-324.
- [11] Vitale I, Antocchia A, Cenciarelli C, et al. Combretastatin CA-4 and combretastatin derivative induce mitotic catastrophe dependent on spindle checkpoint and caspase-3 activation in non-small cell lung cancer cells[J]. Apoptosis 2007, 12(1): 155-166.