

冷冻消融术对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤微环境炎症因子的影响

孙满强, 胡凯文, 陈 琪, 庞皓玥, 周 天

(北京中医药大学东方医院, 北京 100078)

摘 要: [目的] 探究不同复温温度下冷冻消融术对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤微环境中炎症因子的影响。[方法] 45 只 C57BL 小鼠随机分为 3 组, 每组 15 只, 分别是对照组、T0 组 (复温至 0℃)、T40 组 (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 14d 对小鼠进行处死、取材, 称量小鼠的体重和肿瘤重量, 采用免疫组化的方法测量肿瘤组织中白细胞介素 4(IL-4)、转化生长因子-β(TGF-β)、干扰素-γ(IFN-γ)和肿瘤坏死因子(TNF-α)的表达。[结果] 各组小鼠体重在冷冻手术干预前并无显著性差异, 术后 14d 对照组体重为 (20.43±1.74)g, T0 组体重为 (18.59±0.98)g, T40 组体重为 (18.91±0.86)g。T0 组和 T40 组体重均小于对照组 ($F=9.199, P<0.05$)。术后第 14 天对照组瘤重为 (1.83±2.59)g, T0 组瘤重为 (1.37±1.69)g, T40 组瘤重为 (1.54±1.00)g, T0 组和 T40 组瘤重均低于对照组 ($F=0.23, P<0.05$)。免疫组化结果以平均光密度值 (IOD/Area) 来表示, 对照组 IL-4 表达量为 0.102±0.015, T0 组表达量为 0.094±0.012, T40 组表达量为 0.101±0.013, T0 组<对照组 ($P<0.05$), T40 组与对照组之间无统计学差异。对照组 TGF-β 表达量为 0.129±0.036, T0 组表达量为 0.090±0.013, T40 组表达量为 0.110±0.039, T0 组<对照组 ($P<0.05$), T40 组与对照组之间无统计学差异。对照组 IFN-γ 表达量为 0.100±0.016, T0 组表达量为 0.121±0.036, T40 组表达量为 0.112±0.043, T0 组>对照组 ($P<0.05$), T40 组与对照组之间无统计学差异。对照组 TNF-α 表达量为 0.110±0.018, T0 组表达量为 0.129±0.033, T40 组表达量为 0.117±0.018, T0 组>对照组 ($P<0.05$), T40 组与对照组之间无统计学差异。[结论] 冷冻消融术对于残存瘤侵袭转移有抑制作用, 其机制可能与调控肿瘤微环境中的炎症因子有关, 相较于 40℃复温, 0℃在这一机制方面具有更好的调控效果。

主题词: 冷冻消融术; 0℃复温; 40℃复温; 炎症因子

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)09-0774-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.09.B002

Effects of Cryoablation on Tumor Microenvironmental Inflammatory Factors in Lewis Lung Cancer Mice

SUN Man-qiang, HU Kai-wen, CHEN Qi, PANG Hao-yue, ZHOU Tian

(Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of cryoablation at different rewarming temperatures on inflammatory factors in tumor microenvironment of Lewis lung cancer mice. [Methods] Forty-five C57BL mice were randomly divided into 3 groups, 15 in each group, control group, T0 group (thawing to 0℃), the T40 group (thawing to 40℃). The mice in the experimental group were treated with single cycle cryopreservation and rewarming ablation. When the puck reaches the edge of the tumor, stop the cooling. After wen to 0℃ and 40℃ respectively. Mice were sacrificed and sampled 14 days after cryoablation. The mice were weighed and the tumor was weighed. Testing the expression of IL-4, TGF-β, IFN-γ, TNF-α with immunohistochemistry. [Results] There was no significant difference in body weight between the groups before cryosurgery intervention. 14 days after surgery, the weight of the control group was (20.43±1.74)g, the T0 group was (18.59±0.98) g, and the T40 group was (18.91±0.86)g. Both T0 group and T40 group had significantly lower body weight than that in control group ($F=9.199, P<0.05$). On the 14th day after surgery, the tumor weight of the control group was (1.83±2.59) g, that of the T0 group was (1.37±1.69)g, and that of the T40 group was (1.54±1.00)g, both of which were lower than those of the control group ($F=0.23, P<0.05$). Immunohistochemical results were represented by mean optical density (IOD/Area). The expression level of IL-4 in the control group was 0.102±0.015, that in the T0 group was 0.094±0.012, that in the T40 group was 0.101±0.013. The expression of T0< that of control group ($F=1.511, P<0.05$). There was no significant difference between T40 group and control group. The expression level of TGF-β in the control group was 0.129±0.036, that in the T0 group was 0.090±0.013, that in the T40 group was 0.110±0.039. The expression of T0<that of control group ($F=12.8, P<0.05$). There was no significant difference between T40 group and control group. The expression level of IFN-γ in the control group was 0.100±0.016, that in the T0 group was 0.121±0.036, that in the T40 group was 0.112±

基金项目: 国家自然科学基金(81403250); 北京中医药大学基本科研业务(2019-JYB-XS)

通信作者: 周天, 副主任医师, 博士; 北京中医药大学东方医院肿瘤科, 北京市丰台区方庄芳星一区 6 号(100078);

E-mail: zhoutian_med@163.com

收稿日期: 2019-02-24; **修回日期:** 2019-05-28

0.043. The expression of T0>that of control group ($F=1.89, P<0.05$). There was no significant difference between T40 group and control group. The expression level of TNF- α in the control group was 0.110 ± 0.018 , that in the T0 group was 0.129 ± 0.033 , that in the T40 group was 0.117 ± 0.018 . The expression of T0>that of control group ($F=6.041, P<0.05$). There was no significant difference between T40 group and control group. [Conclusion] Cryoablation can inhibit the invasion and metastasis of residual tumor. The mechanism may be related to the regulation of inflammatory factors in tumor microenvironment. Compared with 40°C temperature, 0°C in this mechanism has better control effect.

Subject words: cryoablation; 0°C rewarming temperature; 40°C rewarming temperature; inflammatory cytokines

冷冻消融术作为一种新兴的微创治疗具有低损伤、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°C 和 0~15°C,术者在复温选择时常常依据经验和习惯。冷冻消融术会对肿瘤细胞所生长的环境即肿瘤微环境产生重要作用,肿瘤相关炎症是肿瘤微环境的重要组成部分,各类炎症因子具有协同、抑制、拮抗等复杂的网络关系,通过血管新生、减少细胞间黏附和逃逸免疫等机制以达到促进肿瘤转移的作用^[1]。

1 材料与方法

1.1 动物和瘤株

45 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠,年龄 4~5 周,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(LLC)采购自美国 CA 公司。LLC 细胞用含 10%FBS(Biochrom 公司,英国)的 RPMI1640 培养基(Corning 公司,美国)进行培养,放置于 37°C、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 $1\times 10^7/\text{ml}$,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 800 001 手术系统(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(Leica 公司,德国);显微镜(Olympus 公司,日本)。Anti-IL-4 单克隆抗体(Abcam 公司,美国);Anti-TGF- β 单克隆抗体(Abcam 公司,美国);Anti-IFN- γ 单克隆抗体(Abcam 公司,美国);Anti-TNF- α 单克隆抗体(Abcam 公司,美国);羊抗兔/鼠 IgG H+L 抗体(二抗)(Protein-tech 公司,美国)。

1.3 造模

取 100 μl 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 超低温冷冻消融手术

造模 24d 后,将 45 只荷瘤小鼠随机分为 3 组,分别为对照组、复温至 0°C 组(T0 组)、复温至 40°C 组(T40 组),每组 15 只。对照组未予任何干预,T0 组予 100mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠,固定后,备皮,消毒,采用海杰亚冷冻消融设备实行冷冻手术。将 1.66mm 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°C,停止复温,拔出探针。T40 组操作如上,当肿瘤中心温度达到 40°C 时,拔出探针。冷冻消融手术这一天记为第 0 天(D0)。

1.5 取材

小鼠的体重每隔 1 天记录 1 次,在术后第 14d(D14)进行脱颈处死,剥离肿瘤并进行称重,计算肿瘤抑制率=(对照组平均肿瘤重量-实验组平均肿瘤重量)/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制作 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 液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 7min,中低火 15min),用自来水复温后取适量 Anti-IL-4 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 30min,冲洗后滴加二抗孵育 20min,最后进行 DAB 显色,封片后用显微镜观察 IL-4 蛋白表达及分布(按照抗体说明书及文献,IL-4

阳性表现为胞核出现黄色或棕色的颗粒状物质沉积)。IL-4 蛋白表达水平以平均光密度值(Image Pro Plus 6.0 软件分析图像)表示。同理,按照上述实验方法进行 TGF- β 、IFN- γ 、TNF- α 蛋白检测。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件分析数据,两组连续变量间比较采用 *t* 检验,多组连续变量间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

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,对照组小鼠体质量为 (20.43 ± 1.74) g, T0 组体质量为 (18.59 ± 0.98) g, T40 组体质量为 (18.91 ± 0.86) g, 对照组小鼠体质量大于 T0 组和 T40 组 ($F = 9.199, P < 0.05$), T0 组与 T40 组之间比较差异无统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 各组小鼠肿瘤体质量及抑瘤率计算

对照组肿瘤体质量为 (1.83 ± 2.59) g, T0 组肿瘤体质量为 (1.37 ± 1.69) g, T40 组肿瘤体质量为 (1.54 ± 1.00) g, 对照组肿瘤质量大于 T0 组和 T40 组 ($F =$

$0.23, P < 0.05$)。

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。

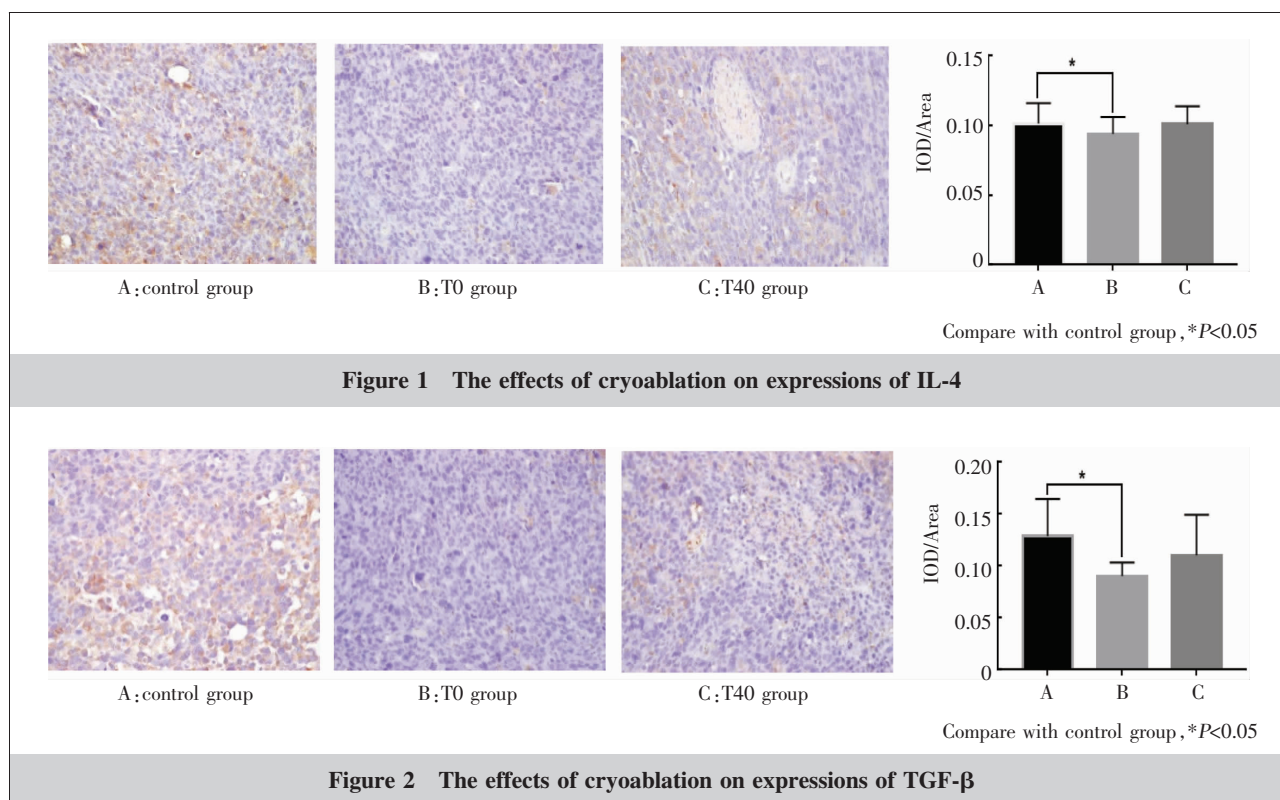
2.3 肿瘤组织中 IL-4、TGF- β 、IFN- γ 和 TNF- α 蛋白表达

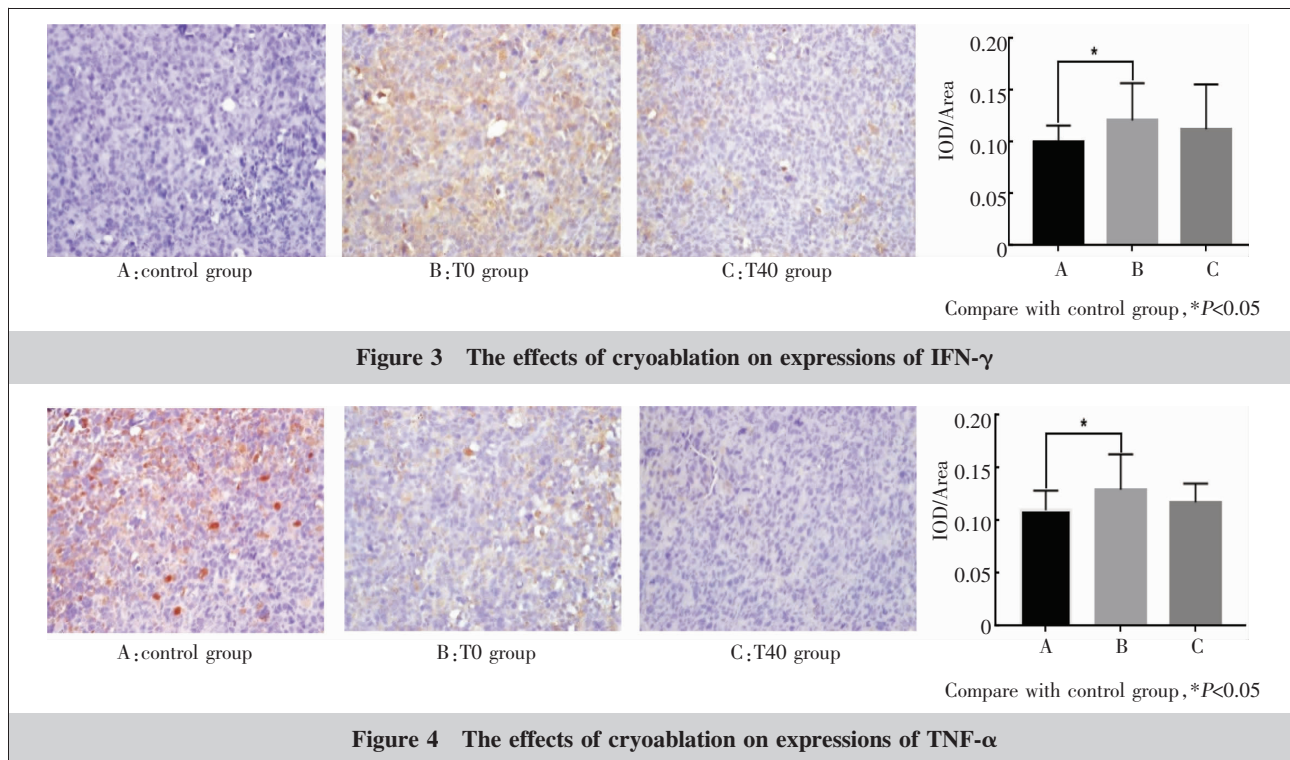
对照组 IL-4 表达量为 0.102 ± 0.015 , T0 组表达量为 0.094 ± 0.012 , T40 组表达量为 0.101 ± 0.013 , T0 组 < 对照组 ($F = 1.511, P < 0.05$), T40 组与对照组之间比较差异无统计学意义 (Figure 1)。

对照组 TGF- β 表达量为 0.129 ± 0.036 , T0 组表达量为 0.090 ± 0.013 , T40 组表达量为 0.110 ± 0.039 , T0 组 < 对照组 ($F = 12.80, P < 0.05$), T40 组与对照组之间比较差异无统计学意义 (Figure 2)。

对照组 IFN- γ 表达量为 0.100 ± 0.016 , T0 组表达量为 0.121 ± 0.036 , T40 组表达量为 0.112 ± 0.043 , T0 组 > 对照组 ($F = 1.89, P < 0.05$), T40 组与对照组之间比较差异无统计学意义 (Figure 3)。

对照组 TNF- α 表达量为 0.110 ± 0.018 , T0 组表达量为 0.129 ± 0.033 , T40 组表达量为 0.117 ± 0.018 , T0 组 > 对照组 ($F = 6.041, P < 0.05$), T40 组与对照组之间比较差异无统计学意义 (Figure 4)。





3 讨论

肿瘤微环境中炎症细胞浸润与基质细胞的相互作用是复杂的,炎症既具有促肿瘤发生的作用,又具有抗肿瘤的作用^[2]。0℃以上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的炎症因子产生影响的相关研究较少。

TGF- β 细胞因子超家族包括 TGF- β s、活化素(activin)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins,BMP)、生长分化因子(growth and differentiation factors,GDF)等^[3-4]。每个家族成员在许多细胞过程中都发挥着至关重要的作用,包括免疫抑制、生长抑制、上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)、细胞迁移、侵袭和细胞外基质(extracellular matrix,ECM)重构^[5]。在肿瘤发展的早期阶段,TGF- β 经常作为一个肿瘤抑制,而在后期癌症进展阶段,TGF- β 信号能促进 EMT,通过增加间叶细胞标志物的表达,比如 N-cadherin 和波形蛋白,减少上皮标志物的表达,如 E-cadherin。EMT 对正常胚胎发育至关重要,但其在肿瘤进展过程中的应用被认为有助于肿瘤侵袭和转移^[6]。

肿瘤微环境中浸润了大量的免疫细胞,主要是由 T 淋巴细胞和髓源性细胞组成。T 细胞是肿瘤免

疫应答中的效应性细胞。Th1 细胞亚群主要表型为 CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺,主要介导细胞免疫应答,在抗病毒免疫、清除寄生虫和移植排斥中发挥着重要作用^[7-8]。其分泌的 IFN- γ 又可以活化巨噬细胞,是其具备吞噬、清除病原微生物的能力^[9]。TNF- α 是另外一个 Th1 细胞分泌的功能因子,具有调控细胞凋亡和介导 T 淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的作用^[10]。Th2 细胞亚群主要表型为 CD3⁺CD4⁺IL-4⁺,主要介导体液免疫应答,Th2 主要分泌 IL-4、IL-10 以及 TGF- β 等,通过影响抗原递呈细胞上负性共刺激分表达在肿瘤免疫抑制中发挥着重要作用^[11]。Th1/Th2 细胞功能平衡是机体维持正常免疫功能的重要基础,正常情况下,Th1 细胞会分泌大量免疫细胞因子,发挥免疫作用^[12]。当机体细胞发生癌变时,Th1/Th2 细胞功能平衡会被打破,使得 Th1 细胞因子减少,Th2 细胞亢进,分泌大量免疫抑制性细胞因子,形成 Th1/Th2 免疫漂移,易带动肿瘤细胞发生远处转移和局部复发^[13-14]。

本实验结果表明冷冻消融术直接打击病灶抑制肿瘤生长,T0 组肿瘤抑制率为 25.14%,T40 组肿瘤抑制率为 15.85%,0℃复温相较于 40℃复温对肿瘤具有更好的抑瘤效果。免疫组化结果显示,相比于对照组,T0 组 IL-4、TGF- β 表达降低,IFN- γ 、TNF- α 表达升高 ($P<0.05$),Th1 细胞因子分泌增多,Th2 细胞

因子分泌减少,纠正了 Th1/Th2 免疫漂移,增强了 T 淋巴细胞对肿瘤的杀伤作用和免疫监控;而 T40 组与对照组之间在炎症因子表达方面无统计学差异,表明 0℃复温对肿瘤细胞具有更好的免疫调节作用,抑制肿瘤细胞生长和转移。除此之外,氦气是稀有气体,0℃复温具有节约能源的优点。

但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和流式细胞术对于 T 淋巴细胞亚型的检测,并且肿瘤表面缺乏更强的说服力,有待进一步改进。

参考文献:

- [1] van Kempen LC, Ruiter DJ, van Muijen GN, et al. The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution[J]. *Eur J Cell Biol*, 2003, 82(11): 539–548.
- [2] Shi L, Wang L, Hou J, et al. Targeting roles of inflammatory microenvironment in lung cancer and metastasis[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2015, 34(2): 319–331.
- [3] Budi EH, Duan D, Derynck R. Transforming growth factor-beta receptors and smads: regulatory complexity and functional versatility[J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(9): 658–672.
- [4] Frick CL, Yarka C, Nunns H, et al. Sensing relative signal in the TGF-beta/Smad pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(14): E2975–E2982.
- [5] Zhang YE. Mechanistic insight into contextual TGF-beta signaling[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2018, 51: 1–7.
- [6] Maddaly R, Subramaniam A, Balasubramanian H. Cancer cytokines and the relevance of 3d cultures for studying those implicated in human cancers[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(9): 2544–2558.
- [7] Refaelli Y, Van Parijs L, Alexander SI, et al. Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes[J]. *J Exp Med*, 2002, 196(7): 999–1005.
- [8] Feuerer M, Eulenburg K, Loddenkemper C, et al. Self-limitation of Th1-mediated inflammation by IFN-gamma[J]. *J Immunol*, 2006, 176(5): 2857–2863.
- [9] Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, et al. CD4(+)CD25(-) Foxp3 (-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis[J]. *J Exp Med*, 2007, 204(2): 285–297.
- [10] Cope A, Le Friec G, Cardone J, et al. The Th1 life cycle: molecular control of IFN-gamma to IL-10 switching[J]. *Trends Immunol*, 2011, 32(6): 278–286.
- [11] Xiao M, Wang C, Zhang J, et al. IFN gamma promotes papilloma development by up-regulating Th17-associated inflammation[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(5): 2010–2017.
- [12] Medina-Echeverez J, Haile LA, Zhao F, et al. IFN-γ regulates survival and function of tumor-induced CD11b+ Gr-1 high myeloid derived suppressor cells by modulating the anti-apoptotic molecule Bcl2a1[J]. *Eur J Immunol*, 2014, 44(8): 2457–2467.
- [13] Liu Y, Wang YY, Li L, et al. Relationship between lymphocyte subsets and cytokines in tumor patients peripheral blood[J]. *Journal of Modern Oncology*, 2019, 27(7): 1132–1134. [柳瑛, 王一羽, 李林, 等. 肿瘤患者外周血免疫细胞亚群和有关细胞因子含量的相关性研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(7): 1132–1134.]
- [14] Xu J, Wang J, Zhu XJ, et al. Application of YiQi ZhuYu decoction in patients with qi deficiency and blood stasis after gastric cancer surgery and its effect on gastrointestinal function recovery and Th1/Th2 immune drift[J]. *Journal of Sichuan of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 36(11): 90–92. [徐健, 汪军, 祝徐军, 等. 益气逐瘀汤在胃癌术后气虚血瘀证患者中的应用及对胃肠功能恢复和 Th1/Th2 免疫漂移的影响[J]. *四川中医*, 2018, 36(11): 90–92.]