

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.08.005

## RFA 联合 TACE 和 HFH 对兔 VX2 肝移植瘤细胞凋亡的影响\*

乔正荣,付志豪,冯虎翼,李元君,龚建平,李生伟

(重庆市第五人民医院普外科 400062)

**[摘要]** **目的** 探讨射频消融(RFA)联合经动脉化疗栓塞(TACE)和高频热疗(HFH)治疗对兔 VX2 肝移植瘤细胞凋亡的影响。**方法** 建立兔 VX2 肝移植瘤模型,随机分为 RFA+TACE 治疗组(A组),RFA+TACE+HFH 治疗组(B组),RFA+HFH 治疗组(C组)和 TACE+HFH 治疗组(D组)。检测各组治疗后的血清谷丙转氨酶(ALT),了解治疗的安全性。TUNEL 法检测癌组织凋亡及计算凋亡指数;免疫组织化学、Western blot 和实时荧光定量 PCR 技术检测 Caspase-3 蛋白和 mRNA 水平。**结果** 血清 ALT 在 B 组升高最明显。与其他组比较,凋亡指数在 B 组显著升高( $P<0.05$ )。免疫组织化学法表明 Caspase-3 蛋白在各组中出现强弱不同的表达,在 B 组表达明显增强。Western blot 和实时荧光定量 PCR 显示 Caspase-3 蛋白和 mRNA 在 B 组表达最高,与其他组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** RFA+TACE+HFH 治疗能有效杀伤肿瘤细胞,促进肿瘤细胞的凋亡,但对于肝功能的损害也较为严重。

**[关键词]** 肝癌;Caspase-3;凋亡;射频消融**[中图分类号]** R735.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)08-1025-04

## Effect of radiofrequency ablation combined with trans arterial chemoembolization and high-frequency hyperthermia on apoptosis in rabbit liver VX2 carcinoma\*

Qiao Zhengrong, Fu Zhihao, Feng Huiyi, Li Yuanjun, Gong Jianping, Li Shengwei

(Department of General Surgery, People's Five Hospital of Chongqing, Chongqing 400062, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effects of apoptosis of the tumor cells in rabbit liver VX2 carcinoma after treatment by radiofrequency ablation(RFA) combined with trans arterial chemoembolization(TACE) and high-frequency hyperthermia(HFH). **Methods** Rabbit liver VX2 carcinoma model was established. Rabbit liver VX2 tumor models were divided into the following group: group A, RFA+TACE; group B, RFA + TACE + HFH; group C, RFA + HFH; group D, TACE+HFH. The changes of serum ALT was detected to realize the safety of the treatment. Cell apoptosis were detected by DNA agarose gel electrophoresis and terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated Dntp nick end-labeling(TUNEL) assay; SP immunohistochemistry, Western blot and Real-time quantitative PCR(RT-PCR) were used to detect Caspase-3 protein and mRNA expression levels. **Results** The changes of serum ALT in group B was significantly higher. Compared with other groups, the apoptosis index in group B was increased markedly( $P<0.05$ ). Western blot and RT-PCR Caspase-3 protein and mRNA levels in group B were higher than the other groups( $P<0.05$ ). **Conclusion** RFA+TACE+HFH can effectively kill tumor cells and promote apoptosis of tumor cells, but, at the same time, can damage liver function.

**[Key words]** liver neoplasms; Caspase-3; apoptosis; radiofrequency ablation

肝癌是一种常见的消化系统恶性肿瘤,手术切除一直是重要的治疗手段。但由于肝癌的早期症状与体征不明确,致使大多患者在确诊时就已错过最佳手术治疗时机。单一的局部治疗手段对晚期肝癌患者的治疗效果不佳,所以,多种方法的综合治疗为中晚期肝癌的治疗提供新的思路。射频消融(RFA)、经动脉化疗栓塞(TACE)和高频热疗(HFH)是目前常用的局部治疗方式,而且他们之间的综合治疗的效果明显优于单一治疗方式的治疗效果<sup>[1-2]</sup>,但具体的机制尚不明确。因此,本研究建立兔 VX2 肝移植瘤模型,检测三者之间联合治疗后癌组织中细胞凋亡和 Caspase-3 的表达情况,并初步探讨联合治疗对肿瘤细胞凋亡的影响。

**1 材料与方法**

**1.1 实验材料** 清洁级,新西兰大白兔 40 只,体质量 1.5~2.0 kg,购于重庆医科大学动物实验中心,合格证号:SCXK

(渝)2012-0001,雌雄不限,隔笼喂养。

**1.2 主要试剂及仪器** TUNEL 试剂盒(Roche 公司),兔抗兔 Caspase-3 抗体(博士德公司),免疫组织化学试剂盒(中杉金桥公司),RT reagent Kit(Takara 公司),RNA 抽提试剂盒(Omega 公司),逆转录试剂盒(Takara 公司),HCGF-3000 型冷循环射频治疗仪及单极射频针(和佳公司),HCGF-2000 型体外高频治疗仪(和佳公司)。

**1.3 方法**

**1.3.1 动物模型的建立、分组及治疗方式** 建立肿瘤模型全部成功。随机分为 RFA+TACE 治疗组(A组)、RFA+TACE+HFH 治疗组(B组)、RFA+HFH 治疗组(C组)和 TACE+HFH 治疗组(D组),每组 10 只。治疗方式:C组:麻醉后开腹,在肿瘤中央插入单极射频消融针,功率为 10 W,治疗区域颜色发黑后停止治疗。RFA 治疗后第 1、4、7 天分别给

\* 基金项目:重庆市卫生局重点基金资助项目(渝卫 2010-1-68);重庆市南岸区科技攻关基金资助项目(南科发 2009-12)。 作者简介:乔正荣(1964-),主任医师,博士,主要从事普通外科和血管外科的研究。

予 HFH 治疗仪治疗,治疗频率为 13.56 MHz,持续 15 min。B 组:麻醉后开腹,暴露肝动脉及其分支,暂时给予阻断肝动脉分支,用皮针直接在肝固有动脉缓慢注入碘化油乳剂 0.2 mL/kg,注完后开放肝动脉,可在肿瘤表面观察到乳白色碘油沉积。再行 RFA 治疗。RFA 治疗后第 1、4、7 天分别给予 HFH 治疗仪治疗。A 组:先行 TACE 治疗,再行 RFA 治疗。D 组:先行 TACE 治疗,治疗后第 1、4、7 天分别给予 HFH 治疗仪治疗。于第 7 天处死全部实验兔,切取肿瘤中心组织、边缘组织作为检测标本收集。

**1.3.2 缺口末端核苷标记法(TUNEL)检测细胞凋亡及计算凋亡指数** 取出各组标本,具体步骤按 TUNEL 试剂盒说明书进行。阳性判断标准:显微镜下肿瘤细胞核显示棕黄色颗粒为阳性,每组随机取 5 个高倍视野( $\times 400$ ),计算细胞凋亡指数(AI)=阳性细胞数/肿瘤细胞数 $\times 100\%$ 。

**1.3.3 免疫组织化学法检测各组肿瘤组织 Caspase-3 蛋白变化** 取出各组标本,采用免疫组织化学 SP 法。具体步骤按照免疫组织化学试剂盒说明书进行。阳性标准:在显微镜下,细胞质出现棕黄色为阳性。

**1.3.4 Western blot 检测各组肿瘤组织中的 Caspase-3 蛋白含量** 取出各组标本,提取组织蛋白、制备十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭、孵育一抗、孵育二抗、洗涤等过程,然后显影,分析结果。

**1.3.5 实时荧光定量 PCR 法检测各组 Caspase-3 mRNA 的表达水平** 将组织磨碎,提取无 RNase 的水溶解 RNA,RNA 定量。逆转录参照试剂盒,实时荧光定量聚合酶链反应扩增条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min;随后 95  $^{\circ}\text{C}$  10 s,退火温度 15 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s,共 40 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。上游引物:5'-CAA TGG ACT CTG GGA AAT-3',下游引物:5'-GCA AGC CTG AAT AAT GA-3'。采用 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法进行实时荧光定量

PCR 相对定量反应,计算相对含量。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 各组血清谷丙转氨酶的情况** 治疗后各组血清谷丙转氨酶明显升高,A 组为(148.7 $\pm$ 8.682)U/L、B 组为(170.5 $\pm$ 7.084)U/L、C 组为(67.55 $\pm$ 4.159)U/L、D 组为(132.1 $\pm$ 4.485)U/L。与其他组比较,B 组治疗后血清谷丙转氨酶显著升高( $P < 0.05$ ),见图 1。

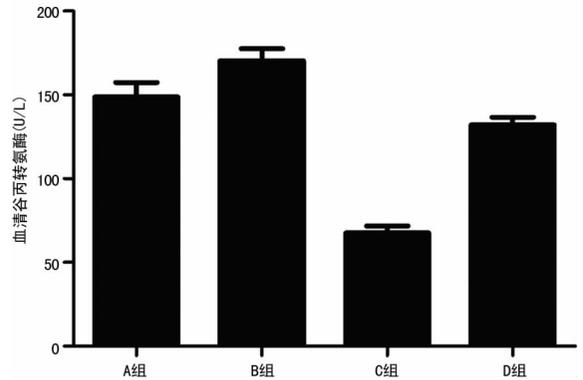


图 1 治疗后各组血清谷丙转氨酶的变化情况

**2.2 在光学显微镜下 TUNEL 检测残余肿瘤的凋亡结果** 在各组观察的细胞凋亡,可见细胞核呈棕黄色颗粒的凋亡细胞,见图 2。各组细胞凋亡指数:A 组为(17.09 $\pm$ 1.310)%、B 组为(25.11 $\pm$ 1.998)%、C 组为(9.684 $\pm$ 1.020)%、D 组为(5.780 $\pm$ 0.583)%、B 组凋亡指数显著升高( $P < 0.05$ ),见图 3。

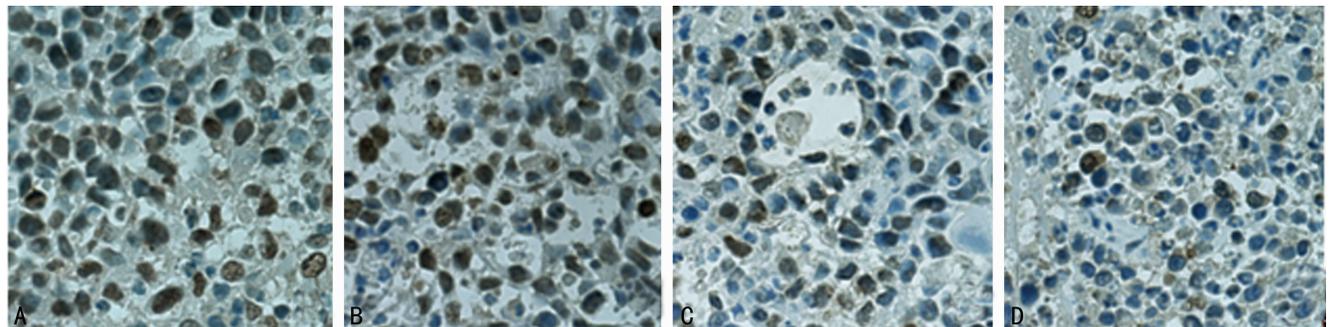


图 2 各组肿瘤组织细胞的凋亡变化( $\times 400$ )

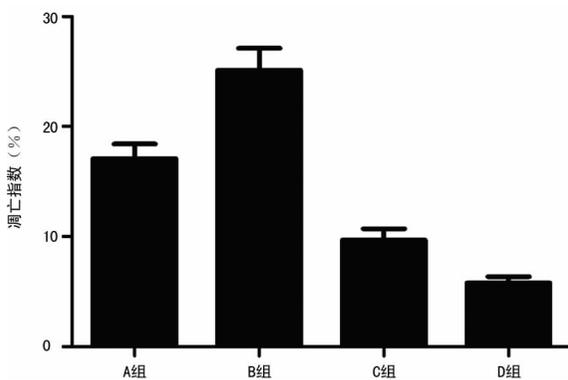


图 3 各组细胞凋亡指数情况

**2.3 免疫组织化学检测 Caspase-3 蛋白在各组表达情况** 在显微镜下,Caspase-3 蛋白的表达定位于细胞质,出现棕黄色颗粒。与其他组比较,B 组肿瘤胞质染色深,而且数量也多,见图 4。

**2.4 Western blot 检测 Caspase-3 蛋白在各组表达情况** Caspase-3 蛋白在各组的相对表达量:A 组为 0.860 3 $\pm$ 0.048 71,B 组为 1.293 $\pm$ 0.006 590,C 组为 0.549 5 $\pm$ 0.037 40,D 组为 0.340 6 $\pm$ 0.019 90,其中,B 组表达最高,与其他组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 5。

**2.5 实时荧光定量 PCR 技术检测 Caspase-3 mRNA 水平** Caspase-3 mRNA 在各组的相对表达量:A 组为 4.242 $\pm$ 0.181 4,B 组为 7.943 $\pm$ 0.746 9,C 组为 1.744 $\pm$ 0.145 4,D 组

为  $1.021 \pm 0.263$ 。其中, B 组表达最高, 与其他组比较差异

有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 6。

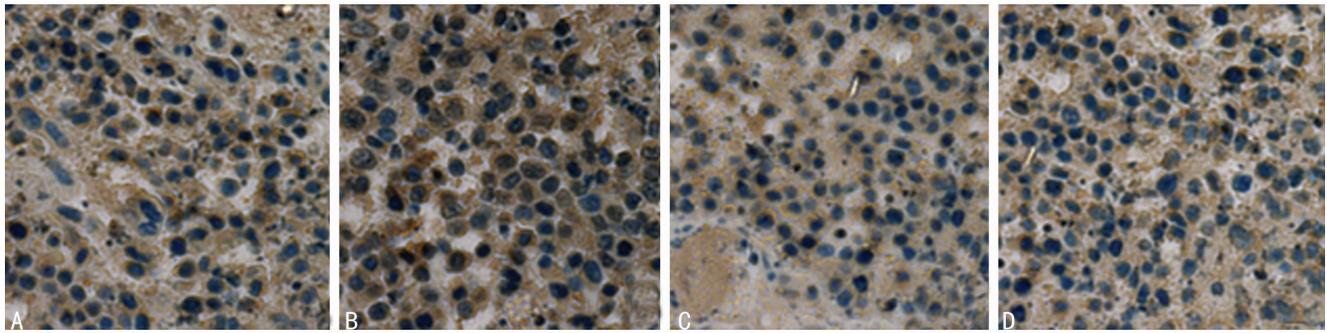


图 4 免疫组织化学法检测 Caspase-3 蛋白在各组表达情况 ( $\times 400$ )

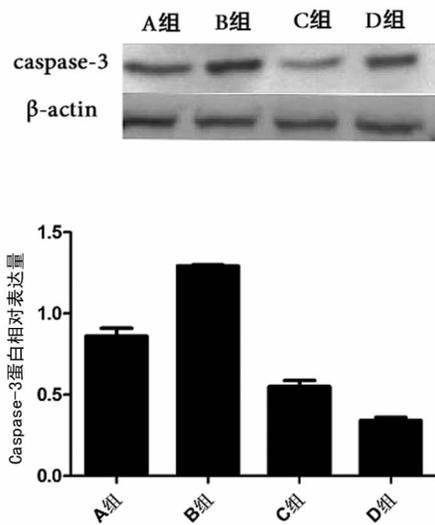


图 5 Caspase-3 蛋白在各组肿瘤组织中的表达情况

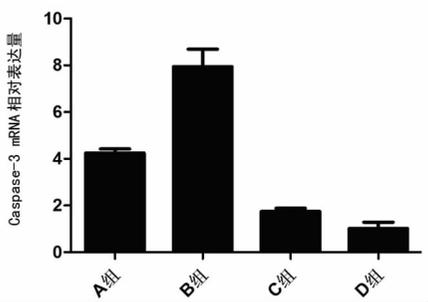


图 6 Caspase-3 mRNA 在各组中的表达情况

### 3 讨论

RFA、TACE、HFH 是安全易行的局部治疗方法, 且应用十分广泛。局部治疗已成为延长晚期肝癌患者生存的最为有效方法, 但由于单一的治疗方式存在局限性, 对晚期的肝癌治疗效果不佳, 因此, 多种局部治疗方式联合应用的综合治疗为晚期肝癌患者提供了新的思路。前期的研究证实了 RFA、TACE、HFH 联合的综合治疗能更有效地杀灭肿瘤细胞和使肿瘤组织局限化, 降低肿瘤的侵袭力, 有效地激活 HSP70 和树突状细胞, 增加机体抗肿瘤细胞免疫力<sup>[3-5]</sup>, 改善预后, 但是, 缺乏对肿瘤持续杀伤作用的研究。Rai 等<sup>[6]</sup>研究证实了 RFA 在治疗后能够产生持续一段时间的凋亡作用, 并促进 HSP70 蛋白的表达, 增强机体对肿瘤细胞的免疫力。Gao 等<sup>[7]</sup>对兔肝 VX2 肿瘤实验表明 TACE 在促进肿瘤细胞凋亡方面也存在一

定的作用, 与药物联合应用后促凋亡作用明显增强。

细胞凋亡是细胞对内环境改变出现的一种生理变化, 主要存在激活 Fas 的外源性信号通路和依赖 Bcl 蛋白家族的线粒体相关的内源性信号通路, 但最终细胞凋亡环节是 Caspase 家族, 其中最重要的是 Caspase-3 蛋白, 是细胞凋亡的最终执行者之一。Takahashi 等<sup>[8]</sup>研究表明热损伤效应可以通过破坏 DNA 双链的稳定性从而导致细胞的凋亡。Weinmann 等<sup>[9]</sup>研究表明缺氧可以通过 FADD/Caspase-8 蛋白最终引起 Caspase-3 蛋白表达增多, 促进缺氧的细胞凋亡。RFA 通过局部电流频率达到一定值后引起组织内带电荷的离子运动产生热效应从而杀伤肿瘤细胞。TACE 则是选择性阻断肿瘤的供血血管, 使肿瘤细胞严重缺血、缺氧而出现局部的坏死。由此可以推断 RFA 和 TACE 两者之间对肿瘤的杀伤作用方式不同, 促进后续的肿瘤凋亡的靶点也是不同的, 可以彼此增加之间的作用, 有协同效应。但 RFA 和 TACE 均为有创的治疗方式, 反复采用对机体影响较大, 而 HFH 是采用高频电磁场对肿瘤组织持续杀伤的无创性治疗手段, 对于加强 RFA 和 TACE 后续损伤作用更具有可操作性和易行性。本研究中 TUNEL 显示凋亡指数在 B 组可以达到  $(25.11 \pm 1.998)\%$ , 可见三者联合的综合治疗可以显著提高治疗的有效性。同时免疫组织化学法证实了 Caspase-3 在各组出现了表达, Western blot 和实时荧光定量 PCR 法显示 Caspase-3 在该组表达最高。可见 RFA+TACE+HFH 联合治疗可以有效杀伤肿瘤细胞, 促进肿瘤细胞的凋亡。

本研究发现 B 组对肝功能损伤严重, 综合治疗的安全性和优势值得有待进一步的评估。Li 等<sup>[10]</sup>临床研究表明索拉菲尼与 RFA、TACE 的综合治疗对于晚期肝癌患者是一种效果明显且安全的治疗方法。Kim 等<sup>[11]</sup>认为在治疗 2~5 cm 的肝癌时 RFA 与 TACE 联合治疗的效果可与手术结果相比, 患者的术后复发率与生存率方面比较差异不明显。在回顾性分析中, 可以发现 TACE 联合 RFA、PEI、HIFU 或三维适形放疗中任一局部治疗方式, 均比单一治疗效果明显, 而且也能够延长晚期肝癌患者的生存时间<sup>[12-15]</sup>。由此可见, 综合治疗虽然对肝功能及机体造成严重损伤, 但从对晚期肝癌患者的生存时间有明显的延长作用, 可以缓解症状, 提高生活质量的明显优势来评估, 是可以被接受和应用的。在应用综合治疗时应结合患者的病情和基本身体情况, 综合评估权衡治疗对患者带来的弊与利。

### 参考文献

[1] Kong QF, Jiao JB, Chen QQ, et al. Comparative effective-

- ness of radiofrequency ablation with or without transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma[J]. *Tumor Biology*, 2014, 35(3): 2655-2659.
- [2] Chen JL. PP-042 Clinical research of HG-2000 regional high-frequency hyperthermia combined with TACE in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Infect Dis*, 2008, 12(3): S67-68.
- [3] 张国武, 乔正荣, 吴华平, 等. 射频联合化疗、体外高频序贯治疗兔肝 VX2 肿瘤的实验研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(8): 938-946.
- [4] 唐荣, 乔正荣, 吴华平, 等. 射频消融联合高频热疗对兔肝 VX2 肿瘤侵袭能力的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(5): 564-569.
- [5] 吴华平, 张国武, 唐荣, 等. RFA 联合 TACE 和 HFH 对兔肝 VX2 肿瘤的作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2008, 17(1): 16-20.
- [6] Rai R, Richardson C, Flecknell P, et al. Study of apoptosis and heat shock protein (HSP) expression in hepatocytes following radiofrequency ablation (RFA)[J]. *Prog Urol*, 2013, 23(2): 105-112.
- [7] Gao L, Song JR, Zhang JW, et al. Chloroquine promotes the anticancer effect of TACE in a rabbit VX2 liver tumor model[J]. *Int J Biol Sci*, 2013, 9(4): 322-330.
- [8] Takahashi A, Matsumoto H, Nagayama K, et al. Evidence for the involvement of double-strand breaks in heat-induced cell killing[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(24): 8839-8845.
- [9] Weinmann M, Jendrossek V, Handrick R, et al. Molecular ordering of hypoxia-induced apoptosis; critical involvement of the mitochondrial death pathway in a FADD/Caspase-8 independent manner[J]. *Oncogene*, 2004, 23(21): 3757-3769.
- [10] Li Y, Zheng YB, Zhao W, et al. Sorafenib in combination with transarterial chemoembolization and radiofrequency ablation in the treatment for unresectable hepatocellular carcinoma[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(4): 730.
- [11] Kim JW, Shin SS, Kim JK, et al. Radiofrequency ablation combined with transcatheter arterial chemoembolization for the treatment of single hepatocellular carcinoma of 2 to 5 cm in diameter: comparison with surgical resection[J]. *Korean J Radiol*, 2013, 14(4): 626-635.
- [12] Liao M, Huang J, Zhang T, et al. Transarterial chemoembolization in combination with local therapies for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68453.
- [13] Ni JY, Liu SS, Xu LF, et al. Meta-analysis of radiofrequency ablation in combination with transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(24): 3872-3882.
- [14] Li JX, Wu H, Huang JW, et al. The influence on liver function after transcatheter arterial chemoembolization combined with percutaneous radiofrequency ablation in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *J Formos Med Assoc*, 2012, 111(9): 510-515.
- [15] Wang S, Yang C, Zhang J, et al. First experience of high-intensity focused ultrasound combined with transcatheter arterial embolization as local control for hepatoblastoma[J]. *Hepatology*, 2014, 59(1): 170-177.
- (收稿日期: 2014-10-18 修回日期: 2014-12-22)
- 
- (上接第 1024 页)
- 旋聚乳酸共聚物支架的细胞相容性测定及与软骨细胞体外复合的实验研究[J]. *医学研究生学报*, 2009, 22(2): 131-134.
- [8] 王玮, 尹庆水, 张余. 重组人骨形态发生蛋白 2 壳聚糖纳米微球的制备及体外细胞毒性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(25): 4611-4614.
- [9] 王晶, 张涇, 刘华. 骨髓间充质细胞与速固化磷酸钙支架共培养的实验研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2007, 15(9): 706-708.
- [10] 张燕搏, 姜明, 王强, 等. 组织工程血管材料体外细胞毒性评价实验研究[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2011, 25(6): 539-542.
- [11] 余荣峰, 邓江, 黄文良, 等. 丝素蛋白/壳聚糖复合支架材料的细胞相容性[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(3): 455-458.
- [12] Yoshikawa T, Ohgushi H, Nakajima H, et al. In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics: a novel method for autogenous bone graft substitution[J]. *Transplantation*, 2000, 69(1): 128-134.
- [13] 乔丽萍, 侯世科, 姚利秀, 等. 角膜缘损伤模型静脉移植兔骨髓间充质干细胞体内动态分布特点的初步研究[J]. *医学研究生学报*, 2013, 26(2): 128-133.
- [14] 苏寒, 张森林, 董震. 组织工程化引导骨再生膜的构建及其修复牙槽骨缺损的实验研究[J]. *医学研究生学报*, 2013, 26(9): 932-936.
- [15] 侯锐, 毛天球, 陈书军, 等. rhBMP-2 及 rhbFGF 对兔骨髓间充质干细胞分化作用长期效应的实验研究[J]. *医学研究生学报*, 2004, 17(8): 694-697.
- [16] Qi R, Shen M, Cao X, et al. Exploring the dark side of MTT viability assay of cells cultured onto electrospun PLGA-based composite nanofibrous scaffolding materials[J]. *Analyst*, 2011, 136(14): 2897-2903.
- (收稿日期: 2014-10-28 修回日期: 2014-12-25)