

微波消融对小鼠肝癌细胞活性和 HSP70 表达的影响

谭进富, 吕明德, 刘大全, 王 竹, 周忠信, 黄洁夫
(中山大学附属第一医院肝胆外科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】探讨微波消融对小鼠肝癌细胞活性和 HSP70 表达的影响。【方法】建立 C57BL/6J 小鼠 Hepa 1-6 肝癌皮下移植模型, 采用微波能量以不同的温度消融肝癌, 分别用酶组织化学和 Western blot 检测被消融肝癌组织细胞琥珀酸脱氢酶(SDH)的活性和 HSP70 的表达, 并观察消融后 30 d 肝癌局部残留率。【结果】经 40、45 或 50、120 s 的条件微波消融后, 50 组消融后 24 h 小鼠肝癌组织细胞的琥珀酸脱氢酶活性明显低于假消融组; 该组消融后 30 d 肝癌局部残留率明显低于假消融组(均 $P < 0.01$)。3 个消融组消融后 12 h 和 24 h 肝癌组织 HSP70 的表达均明显高于相应的假消融组(均 $P < 0.01$), 且随消融温度升高表达明显增强。【结论】微波消融可促进小鼠肝癌 HSP70 的表达, 同时在一定消融条件下能明显降低肝癌细胞的活性。

关键词: 热休克蛋白 70; 细胞活性; 消融; 琥珀酸脱氢酶; 肝肿瘤

中图分类号: R736

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)04-0378-05

Effect of Microwave Ablation on Cell Activity and HSP70 Expression of Mouse Liver Cancer

TAN Jin-fu, LV Ming-de, LIU Da-quan, WANG Zhu, ZHOU Zhong-xin, HUANG Jie-fu
(Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To investigate the effect of microwave ablation on the cell activity and heat shock protein 70 (HSP70) expression of liver cancer in mouse.【Methods】A C57BL/6J mouse model of liver cancer was established by subcutaneous injection of Hepa 1-6 cells. The transplanted tumors were subjected to microwave ablation at different temperature by using microwave power, and the succinic dehydrogenase (SDH) and HSP70 expression of the ablated liver cancer were analyzed by enzymohistochemistry and Western blot, respectively. The rate of local residual liver cancer 30 d after ablation was investigated.【Results】After ablation under the condition of 40, 45, or 50 for 120 s, the SDH activity of liver cancer cells 24 h after ablation in 50 group was lower than that in sham ablation group (SMA) and the rate of local residual liver cancer 30 d after ablation in 50 × 120 s group was significantly lower than that in SMA group (all $P < 0.01$). The HSP70 expressions of liver cancer 12 or 24 h after ablation in three ablation groups were significantly higher than that in corresponding SMA group (all $P < 0.01$), and they were up-regulated in correlation with ablation temperature.【Conclusion】Microwave ablation can promote the expression of HSP70 in transplanted liver cancer in mouse, and simultaneously, at a certain ablation condition, it can significantly decrease cell activity of liver cancer.

Key words: heat shock protein 70; cell activity; ablation; succinic dehydrogenase; liver neoplasms

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006,27(4):378-382]

微波消融以其微创和简便等显著优势已成为肝癌治疗的重要手段之一^[1,2]。热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)是热休克蛋白家族重要成员之一, 加热能使体外培养的细胞 HSP70 表达升高^[3]。HSP70 能结合细胞内肿瘤抗原, 参与抗原的

呈递过程, 在机体抗肿瘤免疫中可能发挥重要作用^[4]。微波消融通过微波致热作用灭活肿瘤细胞, 那么微波消融对肿瘤细胞活性和 HSP70 表达的影响如何? 为此, 本研究观察微波热消融温度为 40~50 对小鼠皮下移植性肝癌细胞活性和 HSP70

收稿日期: 2006-03-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471686)

作者简介: 谭进富(1977-), 男, 江西崇义人, 博士生, 医师; 吕明德, 教授, 博士生导师, 通讯作者。E-mail: lumd@21cn.com

表达的影响,报告如下。

1 材料和方法

1.1 动物与设备

C57BL/6J小鼠(中山大学中山医学院动物实验中心提供),雌性,5周龄,体质量18~20g。来源于C57BL/6J的Hepa 1-6小鼠肝癌细胞株由上海第二军医大学肿瘤研究所郭亚军教授惠赠。FORSEA MTC-3微波消融治疗仪,频率2450 MHz,功率输出范围5~120 W,18 G电极针,微波辐射芯线长0.3 mm(南京庆海微波电子研究所)。数字化温度控制器,20 G测温针,分辨率0.5(日本PKC器械公司)。小鼠抗人HSP70单克隆抗体(Santa cruz公司),二抗为辣根酶标记山羊抗小鼠IgG(Jackson Immuno Research Laboratories公司)。

1.2 模型的建立

Hepa 1-6肝癌细胞常规传代培养,收集对数生长期的细胞,用PBS配成 2×10^7 个/mL的细胞悬液,在无菌条件下在小鼠右肋腰部皮下注射0.1 mL瘤细胞悬液。7 d后可触及皮下结节,待肿瘤长径长至9~10 mm时进行实验。

1.3 小鼠肝癌微波消融

用质量分数10%水合氯醛腹腔注射(1.5 mL/kg)和乙醚间断吸入麻醉小鼠。麻醉满意后小鼠背部向上固定于专用手术台上,距离肿瘤边缘0.5 cm的皮肤做“L”型切口,切开皮肤,充分暴露肝癌。沿肝癌长轴插入微波电极针,电极针旁开2 mm插入测温针并妥善固定。接通微波消融治疗仪对肝癌消融,输出功率为5 W,根据测温调整微波能量输出,分别利用40、45和50 s的条件消融肝癌。

1.4 实验分组

将成功移植肝癌的77只小鼠按随机表随机分为13组。组1:对照组,不对小鼠施行手术;组2、3:假微波消融(sham microwave ablation, SMA),对小鼠实施的手术操作同消融组,只是不接通消融治疗仪;组4、5:40 s消融;组6、7:45 s消融;组8、9:50 s消融。其中组10~13用于检测肝癌组织HSP70的表达和琥珀酸脱氢酶(succinic dehydrogenase, SDH)活性,每组5只小鼠,在组10~13中,双号组和单号组分别于消融后12 h和24 h切取肝癌组织。组14用于观

察消融后30 d局部是否有肝癌残留,残留肝癌用HE染色证实,计算残留率,每组8只小鼠。

1.5 消融后肝癌组织SDH染色

消融后24 h的肝癌组织液氮快速冷冻后切片,厚5~6 μ m,硝基蓝四唑法原位检测SDH活性。在光镜下根据切片染色颗粒分布进行各组间半定量比较观察,并用10个随机高倍视野来分析各组结果。酶活性观察指标记录方法: -:肝癌组织无染色颗粒,阴性; +:肝癌组织染色颗粒稀少或无,弱阳性; ++:肝癌组织染色颗粒较多,阳性; +++:肝癌组织染色颗粒多,布满视野,强阳性。

1.6 Western blot检测HSP70的表达

提取消融后肝癌组织总蛋白,Bradford法测定蛋白浓度。Western blot:100 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,电转膜法将蛋白转移到硝酸纤维素膜上,封闭,然后依次加1:1000小鼠抗人HSP70单克隆抗体,1:5000相应的辣根酶标记山羊抗小鼠IgG,增强化学发光(enhanced-luminescence, ECL)反应,X线片压片曝光,凝胶成像系统测定各条带吸光度(A),分析时设定对照组条带A为100,其他条带的A系统自动读出。以 β -actin作内参照,以HSP70/ β -actin电泳带吸光度的相对百分数作为HSP70表达量。

1.7 统计学处理

计数资料多组间比较采用 χ^2 检验,进一步采用Fisher's精确概率检验法作组间比较。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对照组、SMA 42 h和SMA 48 h组HSP70平均表达水平采用Kruskal-Wallis检验。微波消融和消融后时间对肿瘤HSP70表达的主效应和交互效应采用析因设计的方差分析,原始数据施行对数转换以满足方差齐性要求,用LSD(least significant difference) t检验作组间比较。采用SPSS 10.0统计软件包分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 消融后肝癌组织SDH染色

SDH染色后,SDH的反应产物为蓝紫色颗粒,表示线粒体内SDH有活性。假微波消融、40及45 s消融后24 h肝癌细胞的SDH活性与对照组相比没有明显差异,均表现为肝癌组织染色颗粒

多, 布满视野, 强阳性, 均为+++。50 消融后肝癌组织染色颗粒稀少, 弱阳性(+), SDH 活性降低(图 1, 表 1)。

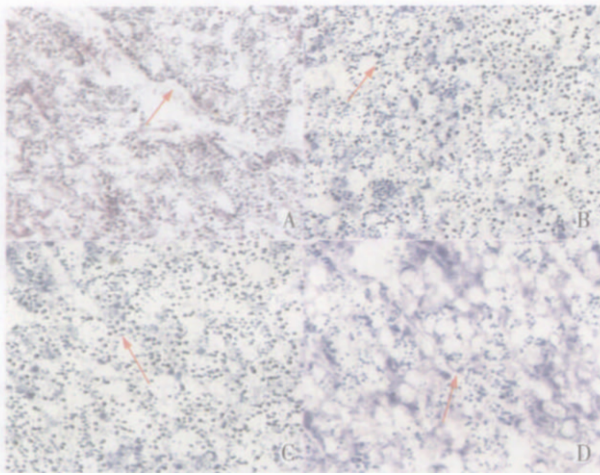


图 1 微波消融后 24 h 小鼠皮下移植性肝癌 SDH 染色
Fig.1 Succinic dehydrogenase(SDH) stain in liver cancer transplanted subcutaneously in mice 24 h after microwave ablation ($\times 400$)

A: Control group; B: 40 group; C: 45 group; D: 50 group

表 1 微波消融后 24 h 小鼠皮下移植性肝癌 SDH 染色
Table 1 Liver cancer transplanted subcutaneously in mice stained by succinic dehydrogenase (SDH) 24 h after microwave ablation

Group	n	+	+++
SMA	5	0	5 ¹⁾
40	5	0	5 ¹⁾
45	5	0	5 ¹⁾
50	5	5	0

The comparison between 4 group rates: $\chi^2=20.000$, $P < 0.01$. The further comparison between two groups Fisher's exact test was used: 1) Compared with 50 group, $P=0.008$

2.2 消融后肝癌局部残留情况

消融后 30 d 小鼠皮下移植性肝癌局部残留用 HE 染色证实, 结果显示, 40 和 45 组消融后 30 d 小鼠皮下移植性肝癌局部残留率与假微波消融组比较无明显差异(均 $P > 0.05$), 50 组明显低于假微波消融组($P < 0.01$, 表 2)。

2.3 微波消融对肝癌组织 HSP70 表达的影响

Western blot 结果显示, 假微波消融后 12 h 和 24 h 肝癌组织 HSP70 的表达, 与对照组相比差异

表 2 微波消融后 30 d 小鼠皮下移植性肝癌局部残留情况
Table 2 Local residual of liver cancer transplanted in mice 30 d after microwave ablation

Group	n	Local residual (n)	Rate of local residual (%)
SMA	8	8	100
40	8	8	100
45	8	6	75 ¹⁾
50	8	1	12.5 ^{2), 3)}

The comparison between 4 group rates: $\chi^2=20.251$, $P < 0.01$. The further comparison between two groups, Fisher's exact test was used: 1) Compared with SMA group, $P=0.001$. All the other pairs were of no statistical significance, all $P > 0.05$

无统计学意义(均 $P > 0.05$)。在 40、45 和 50 $\times 120$ s 的消融条件下, 微波消融和消融后时间的主效应及其交互效应差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。消融后 12 h 和 24 h 肝癌组织 HSP70 的表达均明显高于对照组和假消融组(均 $P < 0.01$), 且随消融温度升高表达增强但消融后 24 h 肝癌组织 HSP70 的表达均明显低于相同温度消融后 12 h 的表达(均 $P < 0.01$, 表 3, 图 2)。

表 3 微波消融对小鼠皮下移植性肝癌 HSP70 表达的影响
Table 3 Effect of microwave ablation on HSP70 expression of liver cancer

Group	12 h	24 h
SMA	103.40 \pm 4.24 ¹⁾	102.10 \pm 4.51 ¹⁾
40	394.88 \pm 9.17 ^{2), 3)}	134.88 \pm 5.13 ²⁾
45	597.92 \pm 7.90 ^{2), 3), 4)}	161.46 \pm 1.67 ^{2), 6)}
50	634.54 \pm 7.58 ^{2), 3), 5)}	266.35 \pm 7.52 ^{2), 7)}

The A of control group was 100 ± 0 . Kruskal-Wallis test was used to compare the average levels between control, SMA $\times 12$ h and SMA $\times 24$ h groups, $H=1.887$, $P=0.430$. Two-way ANOVA for factorial experiment: The main effect of microwave ablation and time after microwave ablation, and their interaction were statistical significant, all $P < 0.001$. LSD test: 1) Compared with control group, $P=0.997$; 2) Compared with control group or corresponding SMA group, all $P < 0.001$; 3) Compared with 24 h group at the same ablation temperature, $P < 0.001$; 4) Compared with 40 $\times 12$ h group, $P < 0.001$; 5) Compared with 45 $\times 12$ h group, $P < 0.001$; 6) Compared with 40 $\times 24$ h group, $P=0.005$; 7) Compared with 45 $\times 24$ h group, $P < 0.001$

3 讨论

微波消融主要通过微波的致热作用导致肿瘤

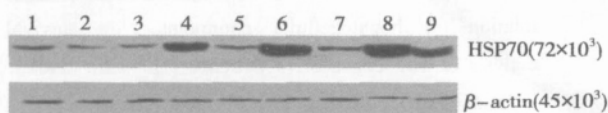


图2 Western blot 分析微波消融后 12 h 和 24 h 小鼠皮下移植性肝癌 HSP70 的表达

Fig.2 Western blot for HSP70 expression in liver cancer transplanted in mice at 12 h and 24 h after microwave ablation

Lane 1: control group; Lane 2: SMA x12 h group; Lane 3: SMA x24 h group; Lane 4: 40 x12 h group; Lane 5: 40 x24 h group; Lane 6: 45 x12 h group; Lane 7: 45 x24 h group; Lane 8: 50 x12 h group; Lane 9: 50 x24 h group

组织发生凝固性坏死而达到治疗肿瘤的目的^[5,6]。微波电极周围组织温度超过 50 时,组织细胞的细胞膜发生融解和融合,在更高的温度条件下,则导致蛋白质变性和细胞不可逆性死亡^[7]。临床上,为了达到确切的灭瘤效果,微波消融时要使肿瘤温度达到 55~60 以上。但是在靠近肝内大血管或重要脏器的肿瘤,微波消融时局部的温度往往达不到灭活肿瘤细胞的温度,这也是造成微波消融肿瘤局部残留的重要原因^[8]。本研究观察了微波消融时肿瘤温度控制在 40~50 时小鼠皮下移植性肝癌细胞活性和热休克蛋白 70 的表达的影响,发现 40、45 和 50,各 x120 s 的微波消融条件均使肝癌组织 HSP70 表达明显升高,但只有 50,120 s 的微波消融条件能使肝癌组织细胞活性明显降低。

SDH 是线粒体呼吸链的限速酶,它的失活将导致细胞能量代谢障碍,最终使细胞死亡^[9],因此 SDH 活性是一个判定细胞存活的指标^[10]。本研究 SDH 染色结果显示,50 组消融后肝癌组织 SDH 染色颗粒稀少,表明 50 x120 s 的消融条件能使大部分肝癌细胞灭活;而 40 和 45,各 x120 s 的消融条件对肝癌细胞无明显灭活作用。这一点在消融后 30 d 肝癌局部残留率实验中进一步得到验证。

HSP70 在细胞应激情况下产生增多^[4]。本研究结果显示,微波消融后肿瘤组织热休克蛋白 70 表达明显增强。在 40~50 范围内,HSP70 的表达随消融温度升高表达明显增强。特别是消融温度为 50 组,消融后 12 h 肿瘤组织 HSP70 的表达是对照组的 6 倍多(634/100)。HSP70 表达与温度相

关原因是^[3,11]:在正常情况下,细胞内热休克转录因子 1(heat shock transcription factor 1, HSF1)以非活性单体形式与 HSP70 蛋白结合,当细胞受到高温等刺激时,细胞内对温度敏感的蛋白质发生变性,这些变性蛋白质与 HSF1 竞争性地与 HSP70 结合,导致 HSF1 单体游离,游离的 HSF1 单体迅速形成有 DNA 结合能力的 HSF1 三聚体,后者与热休克蛋白基因启动子上的热休克元件(heat shock element, HSE)结合,从而启动 HSP 基因的转录。在一定温度范围内,温度越高,细胞内变性蛋白产生越多,HSF1 三聚体的产生也越多,HSP70 表达也越强。本研究析因分析结果也表明,微波消融温度对肿瘤 HSP70 表达的主效应具有统计学意义。当微波消融温度超过 60 时,由于细胞蛋白立即凝固,细胞即刻死亡,将难以在瞬时刺激 HSP70 表达。

另外,本研究结果同时显示,肿瘤组织内 HSP70 表达升高后迅速下降。析因分析结果表明,微波消融后时间是影响消融后肿瘤组织 HSP70 表达的重要因素。消融后 24 h 肿瘤 HSP70 的表达明显低于相同温度消融后 12 h 肿瘤 HSP70 的表达,而且均是成倍地下降。这说明,一方面 HSP70 表达一定量后表达减少和停止,这可能是 HSP70 表达遭到负反馈性抑制^[11];另一方面 HSP70 被细胞内的各种蛋白酶降解,或者被抗原呈递细胞捕获^[12]。但 HSP70 在消融后 24 h 迅速下降的具体机制尚不清楚。

综上所述,在一定消融温度条件下,微波热消融能明显降低肝癌组织细胞的活性,同时可显著增强小鼠肝癌组织 HSP70 的表达。本研究仅观察了微波消融对小鼠皮下移植性肝癌 HSP70 的表达影响,但微波消融对小鼠肝癌原位移植性肝癌 HSP70 表达的影响有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 吕明德,徐辉雄,匡铭,等.改进微波消融技术治疗肝癌的研究[J].中国实用外科杂志,2004,24(11):678-680.
- [2] LIANG P, DONG B, YU X, et al. Prognostic factors for survival in patients with hepatocellular carcinoma after percutaneous microwave ablation [J]. Radiology, 2005, 235(1):299-307.
- [3] 曹林,江伟健,苏兴文,等. LY294002 对热预处理抗低钾诱导的大鼠小脑颗粒神经元凋亡的影响 [J].

- 中山大学学报:医学科学版, 2005, 26(1):4- 10.
- [4] CALDERWOOD S K, KHALEQUE M A, SAWYER D B, et al. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis[J]. Trends Biochem Sci, 2006, 31(3):164-172.
- [5] TANAKA K, SHIMADA H, NAGANO Y, et al. Outcome after hepatic resection versus combined resection and microwave ablation for multiple bilobar colorectal metastases to the liver [J]. Surgery, 139(2): 263- 273.
- [6] LU M D, XU H X, XIE X Y, et al. Percutaneous microwave and radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: a retrospective comparative study[J]. J Gastroenterol, 2005, 40(11):1054- 1060.
- [7] SABEL M S, NEHS M A, SU G, et al. Immunologic response to cryoablation of breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 90(1):97- 104.
- [8] XU H X, LU M D, XIE X Y, et al. Prognostic factors for long - term outcome after percutaneous thermal ablation for hepatocellular carcinoma: a survival analysis of 137 consecutive patients [J]. Clin Radiol, 2005, 60(9):1018- 1025.
- [9] 王海华, 戚仁斌, 张定国, 等. 鱼腥草注射液抗内毒素性心肌损伤作用的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(3):387- 390.
- [10] MOINUDDIN S G, YOUN B, BEDGAR D L, et al. Secoisolariciresinol dehydrogenase: mode of catalysis and stereospecificity of hydride transfer in podophyllum peltatum[J]. Org Biomol Chem, 2006, 4(5):808- 816.
- [11] VOELLMY R. On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells [J]. Cell Stress Chaperones, 2004, 9(2):122- 133.
- [12] SCHUELLER G, KETTENBACH J, SEDIVY R, et al. Heat shock protein expression induced by percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma in vivo[J]. Int J Oncol, 2004, 24(3):609- 613.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 377 页 from page 377)

肽酶非依赖性的信号转导。研究证实 TNF 能激活信号通路导致胱冬肽酶和胱冬肽酶非依赖性通路, 这个胱冬肽酶非依赖性通路包括激活 NFkB 和 JNK。NFkB 是转录活性因子, 能激活一系列抗凋亡基因的活化^[9]。因此, 本文预测 Xaf1 可能抑制胱冬肽酶非依赖性信号转导, 最终诱导细胞凋亡。

参考文献:

- [1] DEVERAUX Q L, REED J C. IAP family proteins - suppressors of apoptosis[J]. Genes Dev, 1999, 13 (3): 239- 252.
- [2] LISTON P, FONG W G, KELLY N L, et al. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti - Caspase activity [J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(2):128- 133.
- [3] MA T L, NI P H, ZHONG J, et al. Low expression of XIAP- associated factor 1 in human colorectal cancers [J]. Chin J Dig Dis, 2005, 6(1):10- 14.
- [4] 夏 焱, 苏浩彬, 马国川, 等. 建立 Doxycyline 诱导表达 Xaf1 的肿瘤细胞株[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(9): 326- 328.
- [5] FONG W G, LISTON P, RAICAN- SEPAROVIC E, et al. Expression and genetic analysis of XIAP - associated factor1 (XAF1) in cancer cell lines[J]. Genomics, 2000, 70(1):113- 122.
- [6] KATSUI K, KURODA M, WANG Y, et al. Cepharanthin enhances adriamycin sensitivity by synergistically accelerating apoptosis for adriamycin-resistant osteosarcoma cell lines, SaOS2- AR and SaOS2 F- AR [J]. Int J Oncol, 2004, 25(1):45- 56.
- [7] ARAGANE Y, KULMS D, METZE D, et al. Ultraviolet light induce apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/ APO- 1) independently of its ligand CD95L [J]. J Cell Biol, 1998, 140(1):171- 182.
- [8] HAO Y, SEKINE K, KAWABATA A, et al. Apollon ubiquitinates SMAC and caspase- 9, and has an essential cytoprotection functions [J]. Nat Cell Biol, 2004, 6(9): 849- 860.
- [9] HOFER- WARBINEK R, SCHMID J A, STEHLIK C, et al. Activation of NF- kappa B by XIAP, the X chromosome- linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1 [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (29): 22064- 22068.

(编辑 张恩健)