论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201410139

高强度聚焦超声治疗小鼠皮下瘤后IL-6和IL-10表达的变化

杨 敏[1],李 欢[1],袁世梅[1],唐祖川[1],陈 楚[1],宋琪玲[1],施 琼[1],周 兰[1],罗进勇[1],何通川[1],李发琪[2],王智彪[2],翁亚光[1] (400016 重庆,重庆医科大学:检验医学院,临床检验诊断学教育部重点实验室[1],生物医学工程学院,省部共建超声医学工程国家重点实验室[2])

[**摘要**] **目的** 探讨高强度聚焦超声(HIFU)治疗小鼠结直肠癌皮下瘤的有效性和治疗前后IL-6和IL-10表达的变化情况。**方法** 采用结直肠癌细胞系,建立BABL/c小鼠皮下瘤模型,数量60只;采用JC-200肿瘤治疗系统,分为6组:对照组(荷瘤假照组),治疗后1、3、5、7 d及14 d组,眼球取血,收集肿瘤组织,石蜡包埋后HE染色观察组织病理变化,并检测残余肿瘤组织和血清中IL-6和IL-10的表达水平。**结果** HIFU能有效地消融肿瘤组织,靶区组织随时间的变化出现以水肿、出血、炎症细胞浸润、坏死、纤维增生为主的病理学变化。HIFU消融后肿瘤组织及外周血IL-6和IL-10的表达均表现为上升后下降的趋势。HIFU后1、3、5、7 d血清中IL-6的浓度均显著高于对照组($P<0.05$),14 d检测,IL-6的表达则明显下降($P>0.05$);血清中IL-10的浓度与对照组相比在1、3 d明显升高($P>0.05$),1 d后达到最高峰,而血清IL-10的浓度在5、7、14 d组与对照组相比,无明显差异($P>0.05$)。**结论** HIFU能有效治疗结直肠癌,且肿瘤残余组织和血清中IL-6和IL-10的表达早期升高,后期IL-6明显降低,而IL-10无明显变化。

[**关键词**] 高强度聚焦超声;结直肠癌;白细胞介素6;白细胞介素10
[**中图法分类号**] R392.32; R454.3; R735.35 [**文献标志码**] A

Expression of IL-6 and -10 in subcutaneously transplanted tumor of colorectal cancer in mice after high intensity focused ultrasound treatment

Yang Min[1], Li Huan[1], Yuan Shimei[1], Tang Zuchuan[1], Chen Chu[1], Song Qiling[1], Shi Qiong[1], Zhou Lan[1], Luo Jinyong[1], He Tongchuan[1], Li Faqi[2], Wang Zhibiao[2], Weng Yaguang[1] ([1] Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of Ministry of Education, College of Clinical Laboratory Diagnostics; [2] State Key Laboratory of Ultrasound Engineering in Medicine Co-founded by Chongqing and Ministry of Science and Technology, College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the efficacy of high intensity focused ultrasound (HIFU) treatment for the subcutaneously transplanted tumor of colorectal cancer in mice and its following influence on the expression levels of indicative markers IL-6 and IL-10. **Methods** Sixty BALB/C mice undergoing subcutaneous injection of colorectal cancer cells were employed to serve as subcutaneous tumor mice model. The mice were randomly divided into 6 groups, control group, and groups in 1, 3, 5, 7 and 14 d after treatment. The mice of the later 5 groups were treated by type JC-200 focused ultrasound tumor therapy system. the mice were sacrificed in the corresponding time points for their eyeballs, tumor tissues and blood samples. HE staining was used to observe the pathological changes of the tumor tissues. ELISA and RT-PCR were employed to detect the levels of IL-6 and IL-10 in the serum and tumor tissue respectively. **Results** HIFU not only effectively ablated the tumor issue, but also exerted its effect on target zone over time exhibiting various pathological

[**基金项目**] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2011CB707906)
[**通信作者**] 翁亚光,E-mail:yaguangweng@126.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150121.1028.003.html(2015-01-21)

changes such as edema, hemorrhage, inflammatory cell infiltration, necrosis, and fibrosis. After HIFU ablation treatment, the levels of IL-6 and IL-10 were elevated in the peripheral blood and tumor tissue in the early stage, while tended to decrease over time. The serum level of IL-6 was increased significantly in 1, 3, 5 and 7 d after the treatment when compared with that of control group ($P<0.05$), but that was reduced enormously in day 14 ($P<0.05$). The serum level of IL-10 was obviously higher in the days 1 and 3 than the control ($P<0.05$), and reached its peak at day 1, but no significant difference was seen in the days 5, 7 and 14 when compared with control group. **Conclusion** HIFU treatment has effective impact on tumor tissue through its focused ablation effect, and causes the early up-regulation of IL-6 and IL-10 in the residual tumor tissue and serum, but in later, the treatment leads the decrease of the former, while has no effect on the latter.

[**Key words**] high intensity focused ultrasound; colorectal cancer; IL-6; IL-10

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2011CB707906). Corresponding author: Weng Yaguang, E-mail: yaguangweng@126.com

高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)是局部非入侵性治疗中晚期癌症的方法[1]。HIFU 将超声波汇聚于靶区组织,引起靶区瞬态温升(>65 ℃)和空化效应,使靶区蛋白质变性,组织凝固性坏死,而对周围正常组织无损伤,具有微创、靶向特点[2-3]。目前国内外关于 HIFU 的研究集中于生物学焦域、影像学变化,而关于 HIFU 治疗后引起的炎症反应和血清中炎症因子变化情况研究较少。IL-6 和 IL-10 主要由 2 型辅助性 T 淋巴细胞(Th2)产生,IL-6 能够促进肺癌、结肠癌、肝癌等的生长与转移[4-5];IL-10 是一个著名的免疫调节和抗炎细胞因子,抑制肿瘤的进展,而缺乏 IL-10 可以抑制抗肿瘤免疫力,有利于肿瘤生长[6]。本研究采用 HIFU 治疗小鼠结直肠癌皮下瘤,观察肿瘤组织病理学变化,检测肿瘤组织和血清中促炎因子 IL-6、抑炎因子 IL-10 的表达变化,为 HIFU 临床应用提供更多实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

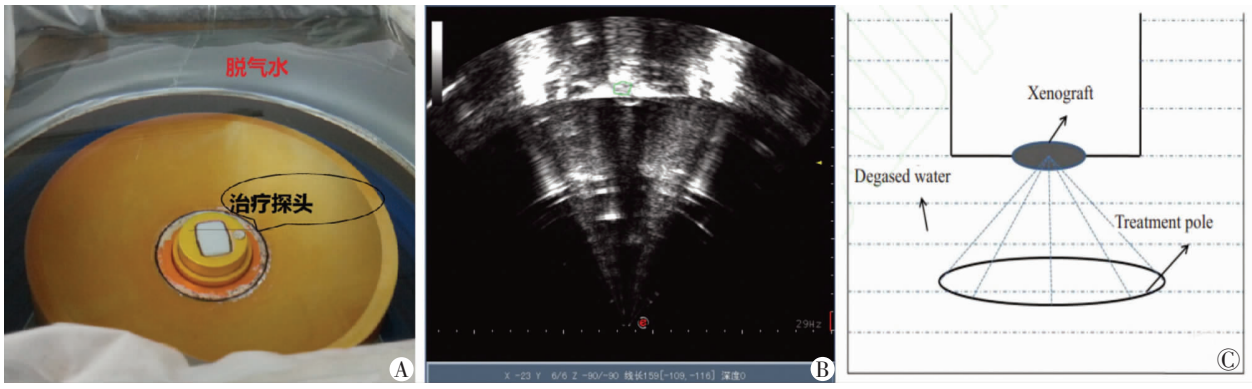
RPMI1640 完全培养基(HyClone 公司)、10% 特级胎牛血清(hyClone 公司)、1% 青链霉素(HyClone 公司)、TRIzol(Invitrogen 公司,美国)、RT-PCR 反应试剂(TaKaRa 公司)、PCR 显影仪(Bio-Rad,美国)、鼠源 ELISA 试剂盒 IL-6、IL-10(北京四正柏生物技术公司)、无毒环保苏木精-伊红(H-E)染液(南京建成生物工程研究所)、普通正置光学显微镜(尼康)、组织切片机(德国徕卡 RM2235)、病理组织漂烘处理仪(PHY-Ⅲ 型,国产)、海扶 JC200 型聚焦超声肿瘤治疗系统(图 1)由重庆医科大学超声工程研究所自行设计研制,重庆海扶公司生产,该系统由 5 部分组成:海扶超声聚焦刀,由主机、运动系统、控制台统、功率源及水处理系统几部分组成,治疗头 1.0 MHz。

1.2 动物及细胞株

BABL/c 雌性小鼠 60 只,6~8 周龄,质量 16.5~18 g,购自重庆医科大学实验动物中心[实验动物等级:SPF 级,合格证号 SCXK(渝)],标准饲料喂养,自由饮水。CT-26 肿瘤细胞株(BABL/c 小鼠来源的结直肠癌细胞,由本实验室保存)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 小鼠 CT-26 结直肠癌细胞在含 10% 胎牛血清 1640 培养基,置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养。



A:治疗探头;B:B 超监测治疗;C:治疗示意图

图 1 高强度聚焦超声(HIFU)治疗系统

1.3.2 BABL/c小鼠结直肠癌移植瘤模型的建立、分组及治疗方式 用0.25%胰蛋白酶消化呈单个的CT-26细胞，调整细胞数至1×10^7/mL，在60只小鼠右侧后部皮下接种细胞悬液0.1 mL。待小鼠皮下瘤直径为0.8～1.2 cm时，使用JC-200肿瘤治疗系统，输入治疗参数(治疗频率1.0 MHz，功率为80 W，总计时间6 s)。对照组不给予任何处理。对照组、HIFU治疗后1、3、5、7、14 d各取10只小鼠，眼球取血后，断颈法处死小鼠，剥离肿瘤组织，PBS冲洗，置于4%多聚甲醛溶液固定。

1.3.3 HE染色观察各组肿瘤组织的病理变化 标本置于4%多聚甲醛溶液固定48 h后，给予常规脱水，透明浸蜡和包埋。石蜡切片，厚约5 μm。每组标本取5片HE染色，光镜下观察。

1.3.4 RT-PCR检测肿瘤组织IL-6、IL-10 mRNA的表达 取新鲜的残余肿瘤组织约50 mg，PBS冲洗，置于液氮中，然后碾磨成粉末，加入800 μL TRIzol试剂裂解细胞，按常规方法提取组织中的RNA。逆转录参照大连宝生物公司提供的25 μL反转录体系。聚合酶链反应体系10 μL，PCR反应条件94 ℃预变性2 min，扩增94 ℃ 1 min、退火56 ℃ 15 s、72度延伸60 s、总计33循环、72 ℃延伸5 min；扩增产物于TBE缓冲液电泳120 V，15 min，PCR成像仪显影。引物序列鼠源IL-6：上游5′-TGCTGGTGACAACCACGGC-3′，下游5′-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3′；产物长度308 bp。鼠源IL-10：上游5′-CCCTTTGCTATGGTGTCCTT-3′，下游5′-TGGTTTCTCTTCCCAAGACC-3′；产物长度97 bp。鼠源GAPDH：上游5′-GGCTGCCCAGAACATCT-3′，下游5′-CGGACACATTGGGGGTAG-3′，产物长度122 bp。

1.3.5 细胞因子检测 采用ELISA试剂盒检测血清中IL-6、IL-10水平，具体步骤按照北京四正柏生物技术公司说明书操作。

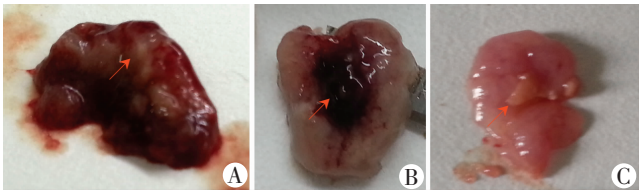
1.4 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件进行分析，计量资料均用$\bar{x}\pm s$表示，采用单因素方差分析，组间有差异进一步比较采用SNK-q检验。

2 结果

2.1 移植瘤治疗后的肉眼改变

HIFU照射1 d治疗区为灰白色无光泽凝固性坏死区，呈椭圆形，周围有明显出血带，边界清楚；5 d后呈境界清晰的红黑色凝固性坏死灶，周围肿瘤组织水肿出血减少；14 d坏死灶周围形成纤维索，病变开始缩小(图2)。



A：HIFU治疗1 d 箭头示灰白色是凝固性死，出现出血和水肿；B：HIFU治疗5 d 消融区由红黑色坏死，周围区出血水肿逐渐消退；C：HIFU治疗后14 d 箭头示消融区的变化

图2 肉眼观察HIFU治疗后肿瘤的变化

2.2 HE染色观察HIFU治疗移植瘤后病理变化

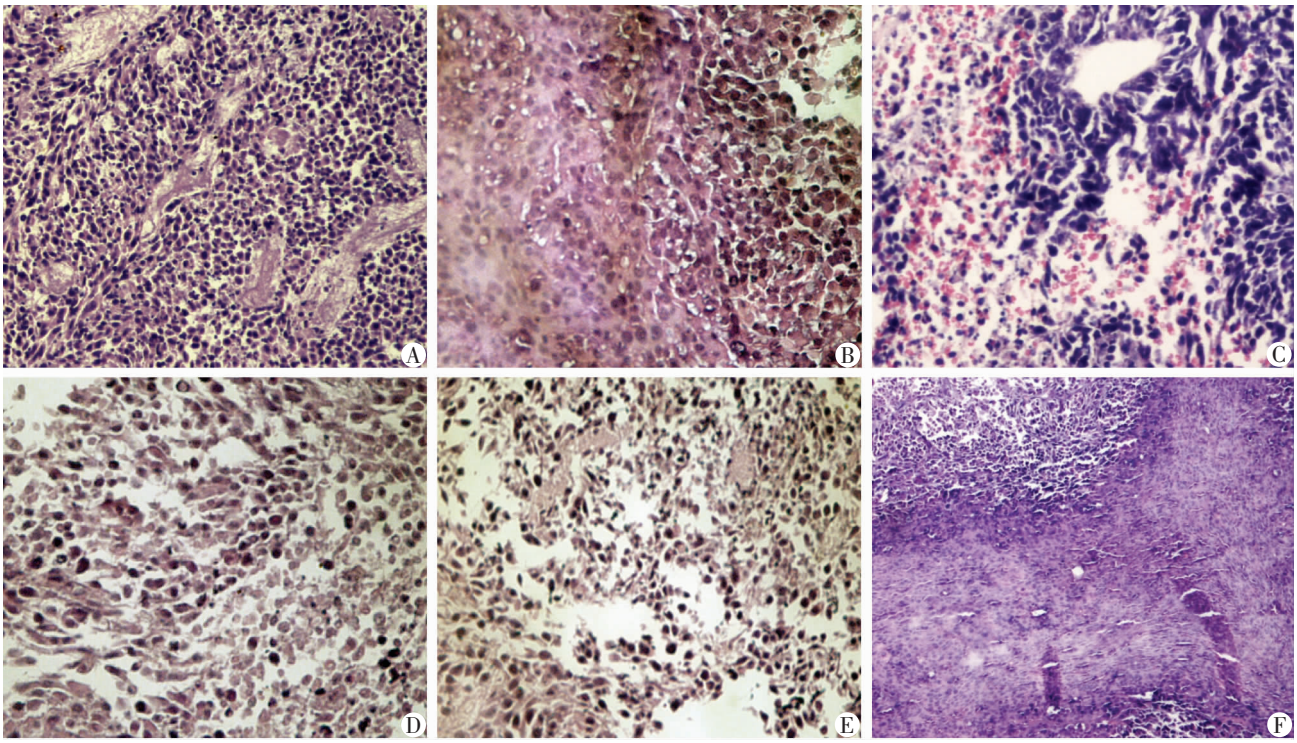
显微镜下观察显示，对照组各细胞体积形态均一，胞浆无明显空泡(图3A)；HIFU治疗1 d后，治疗中央区瘤细胞发生凝固性坏死，坏死区内肿瘤细胞体积变小，肿瘤细胞外形结构尚存，见少量空泡样结构零星散布于胞浆内，消融区可见散在的炎性细胞(图3B)；3 d靶区肿瘤组织内形成境界明显的坏死区，细胞间隙增大，其内仍可见大量核固缩的肿瘤细胞并见明显的细胞碎片，可见大量红细胞，并且出现炎性细胞的浸润(图3C)；5 d核碎裂明显增多，坏死靶区内可见核碎片被组织溶解吸收(图3D)；7 d细胞核碎屑也被组织溶解吸收溶解而消失(图3E)；14 d有纤维包裹及炎症细胞浸润(图3F)。

2.3 RT-PCR检测HIFU治疗前后残存肿瘤组织IL-6和IL-10的表达情况

与对照组相比，HIFU治疗组IL-6、IL-10的表达分别于3 d、5 d达到最高($P<0.05$，图4)，之后逐渐下降，随时间变化表现为先上升后下降的趋势。HIFU治疗后14 d后与对照组相比，IL-6的表达有明显的下降，而IL-10的基本没有变化。

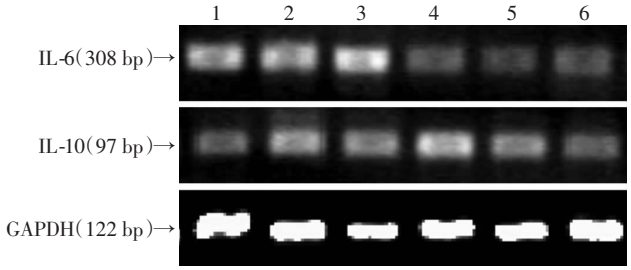
2.4 ELISA检测HIFU治疗前后外周血不同时间IL-6和IL-10的含量

如图5所示，血清中细胞因子IL-6和IL-10均表现为先增高，后降低的趋势。与对照组相比，HIFU治疗后检测1、3、5、7 d IL-6的表达均明显升高($P<0.05$)；而在HIFU治疗后14 d检测，IL-6的表达水平较对照组明显下降($P<0.05$)。HIFU治疗后1、3 d IL-10的浓度较对照组显著升高($P<0.05$)，而在5、7、14 d IL-10的浓度与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。



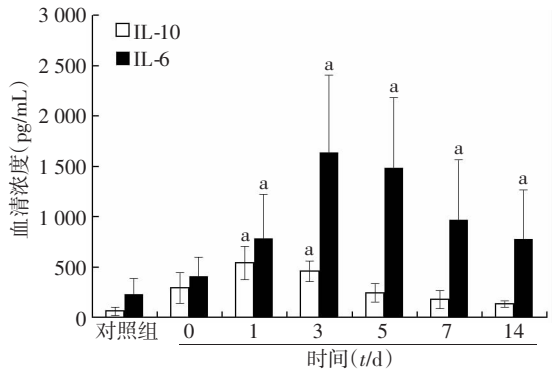
A:对照组;B ~ F:分别为 HIFU 治疗后 1、3、5、7、14 d

图 3　HIFU 治疗后不同时间点肿瘤组织病理组织学变化　(HE ×400)



1:对照组;2:治疗后 1 d;3:治疗后 3 d;4:治疗后 5 d;5:治疗后 7 d;6:治疗后 14 d

图 4　RT-PCR 检测治疗前后不同组残余组织 IL-6 和 IL-10 的变化



a:$P<0.05$,与对照组(0 d)比较

图 5　HIFU 治疗前后各组血清中 IL-6 和 IL-10 浓度变化

3　讨论

本研究所使用的 HIFU 治疗系统由超声实施全程监控,确保治疗区域覆盖瘤体(图 1)。本研究证实,HIFU 消融后靶区组织随时间的变化表现出水肿、出血、坏死的过程(图 2)。HIFU 治疗后于第 3、5、7、14 天取材发现,HE 染色观察发现,靶区组织有不同程度炎症细胞的浸润,成纤维细胞的增生(图 3)。证实了 HIFU 不仅能有效的摧毁靶区的肿瘤细胞,还出现了以炎症细胞浸润为主的炎症反应。

研究证实,热消融治疗肿瘤能够在体内摧毁肿瘤细胞同时诱导机体产生炎症反应,而炎症却在肿瘤发展的各个阶段,包括启动、进展和转移起了很重要作用[7-10]。IL-6 和 IL-10 主要由 Th2 型淋巴细胞产生。本研究证实 HIFU 治疗 3 后,血清 I-L6 和 IL-10 水平达到升高峰,光镜下显示肿瘤组织区有不同程度的炎症细胞浸润,这提示早期浸润的炎症细胞主要是 Th2 型淋巴细胞。

HIFU 治疗可以诱导系统性 IL-6 水平升高,通过体循环 IL-6 可以刺激存在于消融区域边缘或者离消融区域较远的区域有活性的肿瘤细胞进行增殖。那么在 HIFU 治疗后,可通过辅助疗法来降低 IL-6 的水平,

提高 IL-10 的表达水平,同时影响这些基因的下游靶基因的水平(如 STAT3),从而有效减少局部复发及远处转移率[11-15]。IL-6 和 IL-10 是开发辅助疗法的两个较为有潜力的靶点,而这种辅助疗法可以加强 HIFU 治疗肿瘤疗效。此外,由于热消融引起血液和消融区域的淋巴细胞数目增加,那么免疫治疗策略就是针对 Th2 淋巴细胞(产生 IL-6)向 Th1 淋巴细胞(促进细胞诱导的肿瘤杀伤作用)转变,这对以后进一步研究较为有用[16-18]。我们发现 HIFU 治疗后,IL-6 和 IL-10 的表达水平有不同程度的升高,

综上所述,HIFU 能有效地摧毁小鼠结直肠癌的皮下瘤。HIFU 治疗后早期残余肿瘤组织及外周血中 IL-6 和 IL-10 表达先明显上升,而早期 IL-6 和 IL-10 表达量的变化影响到 HIFU 治疗后残余肿瘤组织的生长速度。因此,IL-6 和 IL-10 既可以作为 HIFU 治疗后早期辅助疗法的靶点,也可作为监测 HIFU 治疗效果观察的指标。

参考文献:

[1] Zhou Y F. High intensity focused ultrasound in clinical tumor ablation[J]. World J Clin Oncol, 2011, 2(1): 8-27.

[2] 刘贤伟, 张建华, 杨阳, 等. 高强度聚焦超声在结直肠癌肝转移治疗中的研究现状[J]. 肝胆外科杂志, 2014, 22(1): 42-45.

[3] Yu W, Tang L, Lin F, *et al*. High-intensity focused ultrasound: Noninvasive treatment for local unresectable recurrence of osteosarcoma[J]. Surg Oncol, 2014, 24(1): 9-15.

[4] Yao Z, Fenoglio S, Gao D C, *et al*. TGF-beta IL-6 axis mediates selective and adaptive mechanisms of resistance to molecular targeted therapy in lung cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(35): 15535-15540.

[5] 彭晔, 张旭刚, 郑运田, 等. 白细胞介素 6 与恶性肿瘤关系的临床研究进展[J]. 临床荟萃, 2012, 27(14): 1281-1284.

[6] Acuner-Ozbabacan E S, Engin B H, Guven-Maiorov E, *et al*. The structural network of Interleukin-10 and its implications in inflammation and cancer[J]. BMC Genomics, 2014, 15(Suppl 4): S2.

[7] Wah T M, Arellano R S, Gervais D A, *et al*. Image-guided percutaneous radiofrequency ablation and incidence of post-radiofrequency ablation syndrome: prospective survey[J]. Radiology, 2005, 237(3): 1097-1102.

[8] Broughton G 2nd, Janis J E, Attinger C E. Wound healing: an overview[J]. Plast Reconstr Surg, 2006, 117(7 Suppl): 1e-S-32e-S.

[9] Ahmad F, Gravante G, Bhardwaj N, *et al*. Changes in interleukin-1beta and 6 after hepatic microwave tissue ablation compared with radiofrequency, cryotherapy and surgical resections[J]. Am J Surg, 2010, 200(4): 500-506.

[10] Muangchant C, Pope J E. The significance of interleukin-6 and C-reactive protein in systemic sclerosis: a systematic literature review[J]. Clin Exp Rheumatol, 2013, 31(2 Suppl 76): 122-134.

[11] Gabrysova L, Howes A, Saraiva M, *et al*. The regulation of IL-10 expression[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2014, 380: 157-190.

[12] Grivennikov S, Karin E, Terzic J, *et al*. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer[J]. Cancer Cell, 2009, 15(2): 103-113.

[13] Hsia C Y, Huo T I, Chiang S Y, *et al*. Evaluation of interleukin-6, interleukin-10 and human hepatocyte growth factor as tumor markers for hepatocellular carcinoma[J]. Eur J Surg Oncol, 2007, 33(2): 208-212.

[14] Draskovic-Pavlovic B, Vucevic D, Bozic B, *et al*. Functional properties of granulocytes after thermal injury[J]. Immunol Res, 2012, 52(1/2): 133-138.

[15] Shao D D, Suresh R, Vakil V, *et al*. Pivotal Advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation[J]. J Leukoc Biol, 2008, 83(6): 1323-1333.

[16] Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, *et al*. Activation of $CD4^+$ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice[J]. Circulation, 2012, 125(13): 1652-1663.

[17] Wan S, Zhao E, Kryczek I, *et al*. Tumor-associated macrophages produce interleukin 6 and signal via STAT3 to promote expansion of human hepatocellular carcinoma stem cells[J]. Gastroenterology, 2014, 147(6): 1393-1404.

[18] Waitz R, Solomon S B, Petre E N, *et al*. Potent induction of tumor immunity by combining tumor cryoablation with anti-CTLA-4 therapy[J]. Cancer Res, 2012, 72(2): 430-439.

(**收稿**:2014-10-23;**修回**:2014-12-04)

(编辑 汪勤俭)