

完全冷冻消融术与部分冷冻消融术对肺腺癌小鼠远端肿瘤免疫微环境的影响

张硕^{1,2,3}, 赵晓雨³, 刘露³, 谭周力^{1,2,3}, 刘梦³, 王雪³, 陈旭昕⁴, 丁毅伟³, 陈韦^{3,4}, 张春阳^{3,4*}, 韩志海^{1,2,3,4*}

¹安徽医科大学海军临床学院, 安徽合肥 230032; ²安徽医科大学第五临床医学院, 安徽合肥 230032; ³解放军总医院第六医学中心呼吸与危重症医学科, 北京 100048; ⁴解放军总医院第八医学中心呼吸与危重症学部, 北京 100091

[中图分类号] R734.2 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0362.2026.0609

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 张硕,赵晓雨,刘露等.完全冷冻消融术与部分冷冻消融术对肺腺癌小鼠远端肿瘤免疫微环境的影响[J].解放军医学杂志, DOI:10.11855/j.issn.0577-7402.0362.2026.0609.

[收稿日期] 2026-02-10 [录用日期] 2026-05-06 [上线日期] 2026-06-09

[摘要] 目的 比较完全冷冻消融(CA)与部分冷冻消融(ICA)治疗肺腺癌小鼠后远端肿瘤的免疫微环境变化。方法 选取60只雌性C57BL/6N小鼠, 双侧腹股沟皮下注射肺腺癌(LLC)细胞构建肺腺癌双侧荷瘤小鼠模型; 待肿瘤体积达75 mm³时将小鼠随机分为对照组、ICA组和CA组, 每组20只。其中, ICA组小鼠接受单侧肿瘤ICA治疗, 消融时形成冰球范围约为可视肿瘤体积的80%; CA组接受单侧肿瘤CA治疗, 对照组不做治疗。术后观察小鼠生存期。采用HE染色观察术后24 h肿瘤组织的病理变化。以手术时间为第1天, 每隔3天测量小鼠未消融的远端肿瘤体积并绘制肿瘤生长曲线; 第10天称量小鼠体重、远端肿瘤重量, 流式细胞术检测远端肿瘤组织中CD4⁺T细胞及CD8⁺T细胞数量; 第14天取小鼠远端肿瘤组织, 采用RT-qPCR检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ 干扰素 (IFN- γ)、凋亡相关因子(Fas)、Fas配体(FasL)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)及程序性死亡配体-1(PD-L1)的mRNA表达水平, ELISA试剂盒检测TNF- α 、IFN- γ 蛋白含量, Western Blotting检测Bax、Bcl-2蛋白表达水平。结果 ICA术后小鼠肿瘤组织可见清晰的消融边界, 消融区域呈凝固性坏死, 周围为残余肿瘤组织; CA术后肿瘤组织完全坏死。与对照组相比, ICA组和CA组小鼠体重差异无统计学意义($P>0.05$), 总生存期延长($P<0.05$); 远端肿瘤生长受抑制, 抗肿瘤免疫因子TNF- α 、IFN- γ 和促凋亡指标Bax、Fas、FasL的mRNA和蛋白表达水平升高($P<0.05$), 抑制凋亡指标Bcl-2的mRNA和蛋白表达水平降低($P<0.0001$), CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞均增多($P<0.05$), PD-L1 mRNA表达水平升高($P<0.01$)。与ICA组比较, CA组远端肿瘤组织中TNF- α 、IFN- γ 、Bax、Fas及FasL表达水平升高($P<0.05$), Bcl-2表达水平降低($P<0.001$), CD4⁺T细胞及CD8⁺T细胞数量增多($P<0.05$), PD-L1 mRNA表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 CA和ICA治疗均可诱导激活肺腺癌小鼠远端肿瘤的抗肿瘤免疫, 且CA治疗更有利于重塑肿瘤免疫炎症微环境。

[关键词] 冷冻消融; 肺腺癌; 肿瘤微环境; 细胞凋亡

Effects of distant tumor immune microenvironment remodelling following complete *versus* incomplete cryoablation in mouse lung carcinoma

Zhang Shuo^{1,2,3}, Zhao Xiao-Yu³, Liu Lu³, Tan Zhou-Li^{1,2,3}, Liu Meng³, Wang Xue³, Chen Xu-Xin⁴, Ding Yi-Wei³, Chen Wei^{3,4}, Zhang Chun-Yang^{3,4*}, Han Zhi-Hai^{1,2,3,4*}

¹The Naval Clinical College of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032, China

²The Fifth Clinical College of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032, China

³Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, the Sixth Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China

⁴Senior Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, the Eighth Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing

[基金项目] 解放军总医院第六医学中心创新培育基金(cxy202402)

[作者简介] 张硕, 硕士研究生, 主要从事肺癌治疗方面的基础研究

[通信作者] 张春阳, E-mail: zhcy101@126.com; 韩志海, E-mail: hanzhihai@301hospital.com.cn

100091, China

*Corresponding author, Zhang Chun-Yang, E-mail: zhcy101@126.com; Han Zhi-Hai, E-mail: hanzhihai@301hospital.com.cn

This work was supported by the Innovation Incubation Fund of the Sixth Medical Center of Chinese PLA General Hospital (cxpy202402)

[Abstract] **Objective** To compare changes in the immune microenvironment of distant tumors in mice with lung adenocarcinoma following complete cryoablation (CA) versus partial cryoablation (ICA). **Methods** Sixty female C57BL/6N mice were selected and injected subcutaneously in both inguinal regions with lung adenocarcinoma (LLC) cells to establish a bilateral tumor-bearing mouse model. When tumor volume reached 75 mm³, the mice were randomly divided into control group, ICA group, and CA group, with 20 mice in each group. Mice in ICA group underwent unilateral tumor ICA treatment, with the ice ball formed during ablation covering approximately 80% of the visible tumor volume; mice in CA group underwent unilateral tumor CA treatment, while control group received no treatment. Postoperative survival of mice was monitored. Pathological changes in tumor tissue were observed via HE staining 24 hours post-surgery. With the day of surgery designated as day 1, tumor volume on the non-ablated side was measured every 3 days and tumor growth curves were plotted; On day 10, mouse body weight and the weight of the distal tumor tissue (not treated with ablation) were measured. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), apoptosis-related factor (Fas), Fas ligand (FasL), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-related X protein (Bax), and programmed death ligand-1 (PD-L1) in the distal tumor tissue; ELISA kits were used to detect TNF- α and IFN- γ protein levels; Western blotting was used to detect Bax and Bcl-2 protein expression levels; and flow cytometry was used to determine the number of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells. **Results** In mice treated with ICA, tumor tissues exhibited a distinct ablation margin post-surgery, with the ablated area showing coagulative necrosis and residual tumor tissue surrounding it; in mice treated with CA, tumor tissues were completely necrotic. Compared with control group, mice in ICA and CA groups showed no statistically significant difference in body weight ($P>0.05$), but overall survival prolonged ($P<0.05$); distant tumor growth inhibited, and mRNA and protein expression levels of the antitumor immune factors TNF- α and IFN- γ , as well as the pro-apoptotic markers Bax, Fas, and FasL elevated ($P<0.05$), while mRNA and protein expression levels of anti-apoptotic marker Bcl-2 decreased ($P<0.0001$); both CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells increased ($P<0.05$), and PD-L1 mRNA expression levels elevated ($P<0.01$). Compared with ICA group, mice in CA group showed elevated expression levels of TNF- α , IFN- γ , Bax, Fas, and FasL in distant tumor tissue ($P<0.05$), Bcl-2 expression was reduced ($P<0.001$), the number of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells increased ($P<0.05$), and there was no statistically significant difference in PD-L1 mRNA expression levels ($P>0.05$). **Conclusions** Both CA and ICA treatments can induce and activate antitumor immunity in distant tumors of lung adenocarcinoma-bearing mice, and CA treatment is more effective in reshaping the tumor immune-inflammatory microenvironment.

[Key words] cryoablation; lung adenocarcinoma; tumor microenvironment; apoptosis

肺癌居全球恶性肿瘤死亡原因的首位^[1]。冷冻消融术是一种精准微创术,其具备痛感轻、直接破坏肿瘤病灶等优势,被广泛应用于肺癌的临床治疗。对于难以手术的早期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),经皮冷冻消融的局部控制率可达90%以上,且并发症发生率较低;对于确诊时已处于晚期或因心肺功能差而难以耐受手术的NSCLC患者,冷冻消融治疗已成为延长生存期的重要手段之一^[2]。除了可直接破坏肿瘤病灶外,冷冻消融也可诱导激活远隔效应。与射频或微波消融导致蛋白质变性不同,冷冻消融引发的细胞坏死能更完整地保留肿瘤相关抗原(tumor-associated antigens, TAAs),使其作为“原位疫苗”被释放至微环境中,进而激活树突状细胞并诱导全身性的抗肿瘤免疫反应^[3]。研究显示,冷冻消融后释放的大量抗原能促进机体产生Th1型免疫应答,抑制远处未治疗肿瘤病灶的生长^[2, 4]。尽管多项研究报告了完全冷冻消融(complete cryoablation, CA)的免疫激活作用,但在

临床实践中,受限于肿瘤体积过大或毗邻大血管等因素,部分患者仅能接受“部分冷冻消融”(incomplete cryoablation, ICA)治疗。

近年研究显示,部分消融后残余肿瘤可能诱导免疫抑制。ICA治疗后,小鼠肝癌的残余肿瘤内CD206⁺M2型巨噬细胞显著增加,促进免疫抑制微环境形成^[5];局部射频消融可诱导残余肿瘤中骨髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)聚集,加速肿瘤进展^[6]。本课题组前期研究也显示,ICA治疗后残余肿瘤可能通过P38/JNK通路促进肿瘤进展^[7]。另有研究显示,ICA可诱导远处肿瘤中CD8⁺T细胞浸润和激活^[8]。目前尚未见CA与ICA治疗后远端肿瘤免疫浸润的对比研究。本研究构建肺腺癌双侧荷瘤小鼠模型,探究CA与ICA治疗后远端肿瘤免疫微环境的差异,旨在为优化肿瘤冷冻消融的相关治疗策略提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 小鼠 Lewis 肺腺癌细胞(LLC 细胞, CL-0140, 武汉普诺赛生命科技有限公司), 使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 待细胞密度达到约 80% 时按照 1:3 的比例传代, 置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养, 每 2~3 天更换一次培养基。

1.2 实验动物 60 只 6~8 周龄 SPF 级、健康雌性 C57BL/6N 小鼠, 购自北京唯尚立得生物科技有限公司[实验动物生产许可证号: SCXK(京)2023-0004]。所有小鼠均分笼饲养在 SPF 级动物房中, 室温 22±1 °C, 湿度 40%~60%, 12 h 光照/12 h 黑暗; 可自由获取标准饲料和饮水。本研究动物实验方案获解放军总医院动物中心伦理委员会审批(2024-X20-83)。

1.3 实验动物分组及肺腺癌双侧荷瘤小鼠模型的构建 小鼠适应性喂养 1 周后, 参照文献经典造模方法构建 Lewis 肺腺癌双侧荷瘤小鼠模型^[4,9-10]。于小鼠双侧腹股沟区分别注射 LLC 细胞(1×10^6 个/侧), 待双侧腹股沟区可触及明显结节后, 定期用游标卡尺测量双侧肿瘤的长径(A)和短径(B), 并计算肿瘤体积[肿瘤体积=($A \times B^2$)/2]。当小鼠双侧皮下肿瘤均自然长出, 双侧肿瘤基线体积均达到约 75 mm³, 且小鼠生理状态良好、无非特异性死亡, 则认为造模成功。造模成功的小鼠可纳入随机分组及后续实验。

将小鼠按随机数法分为对照组、部分冷冻消融组(ICA 组)和完全冷冻消融组(CA 组), 每组 20 只。术前腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉, 并用碘伏消毒待消融侧肿瘤。冷冻消融术均使用相同的设备和统一的双循环冻融程序。实行冷冻消融术时, 使用直径 2 mm 的冷冻探针, 由肿瘤长轴穿入, 针尖置于肿瘤中心位置, 氩气工作压力设置为 3000 psi, 氦气的工作压力设置为 2000 psi。通过预实验确定冻融程序设置参数, ICA 组提前标记 80% 肿瘤体积时肿瘤的长短径, 以确保冰球形成范围不超过界限; CA 组以肉眼可见冰球范围覆盖整个肿瘤并略超出其边缘, 且肿瘤组织在冷冻过程中出现明显变硬及冻结感。最终确定, ICA 组小鼠接受每个冷冻循环的冻结时间为 10 s, 复温时间为 60 s; CA 组小鼠接受每个冷冻循环的冻结时间为 60 s, 复温时间为 60 s。以手术当天为第 1 天, 第 14 天, 对小鼠未接受冷冻消融治疗的同侧远端肿瘤组织取材并置于 -80 °C 冻存, 用于后续的各项指标检测。

1.4 试剂与仪器

1.4.1 试剂 特级胎牛血清(10099141), DMEM 培养基(C11995500bt), Hanks' 平衡盐溶液(14025092), 胶原酶 IV(17104-019)(美国赛默飞世尔科技有限公司); 戊巴比妥钠(P3761, Sigma, 德国西格玛奥德里

奇贸易有限公司); 碘伏(MZL0319, 利尔康, 山东利尔康医疗科技股份有限公司); 通用型组织固定液(G1101), 10×TBST 缓冲液(G0004), PBS 缓冲液(G4202)(武汉赛维尔生物科技有限公司); RNA Easy Fast 动物组织/细胞总 RNA 提取试剂盒(DP451, 天根, 北京天根生化科技有限公司); PrimeScriptTM RT Master Mix(RR036A), TB Green Premix Ex Taq II(RR820A)(日本宝日生物科技股份有限公司); 0.25% 胰酶细胞消化液(HXJ1031), RIPA 裂解液(HX1862-1), 5×蛋白上样缓冲液(HX1891), 电泳缓冲液 10×(HX1896), 电转移缓冲液 10×(HX189), Super ECL plus 超敏发光液(A+B 液)(HX1868)(北京华兴博创基因技术有限公司); M5 Prestained Plus Protein Ladder(MF028-plus-01), M5 蛋白酶抑制剂 Cocktail(MF182-plus-01)(北京聚合美生物科技有限公司); 15%PAGE 胶简易制备试剂盒(D032203, 阳光英锐, 北京阳光英锐生物科技有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0012), QuickBlockTM Western 一抗稀释液(P0256), QuickBlockTM Western 二抗稀释液(P0258)(上海碧云天生物技术股份有限公司); PVDF 膜(IPVH00010, 德国默克密理博有限公司); 1 分钟 WB 膜再生液(C230501, 北京阳光英锐生物科技有限公司); β -actin 鼠源单克隆抗体(HX1827, 北京华兴博创基因技术有限公司); B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)兔源单克隆抗体(ab182858)(英国艾博抗贸易有限公司); Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)兔源多克隆抗体(50599-2-Ig)(武汉三鹰生物技术有限公司); 脱氧核糖核酸酶 I (1121MG010, 德国 neoFroxx GmbH 公司); 70um 细胞过滤器(15-1070, 山东巴罗克生物科技股份有限公司); FITC 标记的抗小鼠 CD3 抗体(100203), PerCP 标记的抗小鼠 CD45 抗体(103129), PE/Cyanine7 标记的抗小鼠 CD4 抗体(116015), APC/Cyanine7 标记的抗小鼠 CD8a 抗体(100713)(美国 BIOLEGEN 生物科技有限公司); 小鼠 γ 干扰素(IFN- γ) ELISA Kit(E-EL-M0048), 小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA Kit(E-EL-M3063)(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司)。

1.4.2 仪器 石蜡切片机(PM-24), 组织摊片机(SWE-JK5), 数字病理切片扫描仪(LG-FS80, Servicebio, 武汉赛维尔生物科技有限公司); FACS CANTO II 流式细胞仪(Becton Dickinson, 美国贝克顿-迪金森公司); Applied BiosystemsTM QuantstudioTM 3&5 实时定量 PCR 仪(美国赛默飞世尔科技有限公司)。

1.5 小鼠远端肿瘤体积的测量 以小鼠接受冷冻消融手术为第 1 天, 于第 1、4、7、10 天用游标卡尺测量小鼠消融对侧肿瘤的长径(A)和短径(B), 并计算肿瘤体积[肿瘤体积=($A \times B^2$)/2]。根据各时间点的肿

瘤体积绘制肿瘤生长曲线,对比各组远端肿瘤增长趋势,并对第10天的各组肿瘤体积进行比较。

1.6 小鼠生存期分析 以小鼠接受冷冻消融手术为第1天,记录各组小鼠生存情况($n=10$)。当小鼠自然死亡或肿瘤体积达到 2000 mm^3 时,实验终止。根据所得数据绘制Kaplan-Meier曲线并进行统计分析。

1.7 HE染色观察冷冻消融术后的肿瘤组织坏死情况 在冷冻消融术后24 h,处死小鼠。对照组小鼠任一侧肿瘤组织获取样本,ICA组和CA组小鼠则对接受消融侧的肿瘤组织取材。剥离后的肿瘤置于组织固定液中固定 $>24\text{ h}$ 。将固定好的肿瘤组织依次放入75%乙醇(1 h)、95%乙醇(1 h)、无水乙醇(1 h)。再用二甲苯脱水透明后,肿瘤组织置于包埋槽内,通过石蜡包埋制成蜡块。使用切片机将蜡块切成 $4\text{ }\mu\text{m}$ 厚的连续切片。将切片置于摊片机恒温水域中展开,组织切片粘贴于载玻片上后, $65\text{ }^\circ\text{C}$ 烤箱烘烤1 h。然后将载玻片放入二甲苯中脱蜡,再依次放入无水乙醇(5 min)、95%乙醇(5 min)、75%乙醇(5 min)及蒸馏水(2 min)。将制得的切片先后用苏木精染色液和伊红染色液染色,以显示细胞核和细胞质的结构。再依次用不同浓度的乙醇脱水和二甲苯透明。在组织中央滴加适量的中性树脂,盖上盖玻片,封片。光学显微镜下观察肿瘤组织的形态学特征,并通过数字病理切片扫描仪获得扫描结果图。

1.8 ELISA检测远端肿瘤组织中TNF- α 和IFN- γ 水平 取用 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冻存的肿瘤组织,加入RIPA裂解液和蛋白酶抑制剂(100:1)混合液后在冰上裂解10 min。加入研磨珠并使用组织研磨仪研磨1~2 min获得待测组织匀浆。根据说明书使用各ELISA试剂盒检测各组TNF- α 和IFN- γ 的浓度。

1.9 RT-qPCR检测远端肿瘤组织中TNF- α 、IFN- γ 、Bax、Bcl-2、凋亡相关因子(Fas)、Fas配体(FasL)和程序性死亡配体-1(PD-L1)的mRNA表达水平 取用 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冻存的肿瘤组织,使用动物组织/细胞总RNA提取试剂盒提取总RNA,使用反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA,再使用qRT-PCR试剂盒配制成体系后上机扩增。引物序列: GAPDH,上游5'-TCACCATCTTCCAGGAGCG-3',下游5'-AAGCAGTTGGTGGTGACAGG-3'; TNF- α ,上游5'-GATTATGGCTCAGGGTCCAA-3',下游5'-GCTCCAGTGAATTCGGAAG-3'; IFN- γ ,上游5'-ATGAACGCTACACACTGCATC-3',下游5'-CCATCCTTTTGCCAGTTCCTC-3'; Bax,上游5'-TGCTGATGGCAACTTCAACTG-3',下游5'-AAGTCCAGTGTCCAGCCCAT-3'; Bcl-2,上游5'-CCTGTGGATGACTGAGTACCTG-3',下游5'-AGCAGGAGAAATCAAACAGAGG-3'; Fas,上游5'-CTGCGATTCTCCTGGCTGTGAA-3',下游5'-CAACAAC

CATAGGCGATTCTGG-3'; FasL,上游5'-GTTTTTCCCTGTCCATCTTGTG-3',下游5'-TCTTCTTTAGAGGGGTCAGTGG-3'; PD-L1,上游5'-GCTCCAAAGGACTTGTACGTG-3',下游5'-TGATCTGAAGGGCAGCATTTTC-3'。引物序列均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以GAPDH为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算其他目的基因的相对表达量。

1.10 Western blotting检测远端肿瘤组织中Bax和Bcl-2的表达水平 取用 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冻存的肿瘤组织,加入RIPA裂解液和蛋白酶抑制剂(100:1)混合液、研磨珠后,使用组织研磨仪研磨1~2 min。 $4\text{ }^\circ\text{C}$,12 000 r/min离心15 min,保留上清液。取部分上清液使用BCA试剂盒测定蛋白浓度。剩余上清液加入上样缓冲液后金属浴(预热至 $98\text{ }^\circ\text{C}$)15 min。配制分离胶及浓缩胶后上样、电泳,然后将蛋白通过电转步骤转移至PVDF膜上,5%脱脂牛奶封闭2 h,TBST洗3次,每次10 min。裁剪膜后分别加 β -actin抗体(稀释比1:10000)和Bax抗体(稀释比1:1000), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,TBST洗3次,每次10 min;分别使用驴抗鼠IgG(稀释比1:10000)和山羊抗兔(稀释比1:10000)于室温孵育2 h,TBST洗3次,每次10 min。以1:1比例混合发光液A液和B液,使其覆盖PVDF膜表面后使用曝光仪对条带显影,采用Image J软件对条带进行灰度值分析。

1.11 流式细胞术检测远端肿瘤组织中CD4 $^+$ 和CD8 $^+$ T细胞数量 第10天处死小鼠后,立即取材肿瘤组织,置于含有胶原酶和DNA酶的HBSS缓冲液中,将肿瘤组织剪碎, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴加热下消化45 min。使用 $70\text{ }\mu\text{m}$ 细胞过滤器过滤出消化后的组织获得单细胞悬液。离心弃去单细胞悬液的上清,染色缓冲液重悬细胞。先将相同体积的细胞混悬液分别加入试管,再加入以下荧光标记抗体: FITC标记的抗小鼠CD3抗体,PerCP标记的抗小鼠CD45抗体,PE/Cyanine7标记的抗小鼠CD4抗体,APC/Cyanine7标记的抗小鼠CD8a抗体;混合均匀后 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育30 min。使用PBS溶液洗涤3次,采用流式细胞仪对标记的细胞分析。收集数据并采用FlowJo软件进行分析和分析。

1.12 统计学处理 采用GraphPad Prism软件进行统计分析并作图。计量资料均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,小鼠远端肿瘤的生长曲线采用双因素方差分析,小鼠Kaplan-Meier生存曲线使用log-rank检验进行统计分析;其余的多组间比较均采用单因素方差分析,进一步两组间比较采用LSD- t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CA和ICA后肿瘤组织的HE染色结果 HE染色结果显示,未消融小鼠肿瘤组织结构完整,形态正

常;CA后小鼠肿瘤组织表现为凝固性坏死,细胞核碎裂;ICA后小鼠肿瘤组织可见清晰的消融边界,消融区域呈凝固性坏死,周围为残余肿瘤组织(图1)。

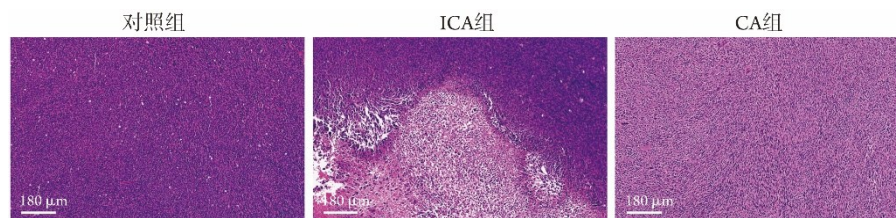


图1 未消融、ICA后和CA后的小鼠肺腺癌组织(HE染色)

Fig.1 Mouse lung adenocarcinoma tissue in control group, ICA group, and CA group (HE Staining)

ICA. 部分冷冻消融; CA. 完全冷冻消融

2.2 CA和ICA治疗对小鼠体重、远端肿瘤体积及生存期的影响 冷冻消融术后第10天,各组小鼠体重差异无统计学意义($F=0.3036$, $P>0.05$)(图2A);肿瘤大体图和肿瘤生长曲线显示,与对照组相比,CA和ICA组小鼠远端肿瘤生长受抑制,其中CA组小鼠远

处肿瘤体积缩小更明显(图2B-C)。与对照组相比,ICA组和CA组小鼠生存期均明显延长($P<0.05$ 、 $P<0.001$);与ICA组相比,CA组小鼠生存期明显延长($P<0.05$,图2D)。

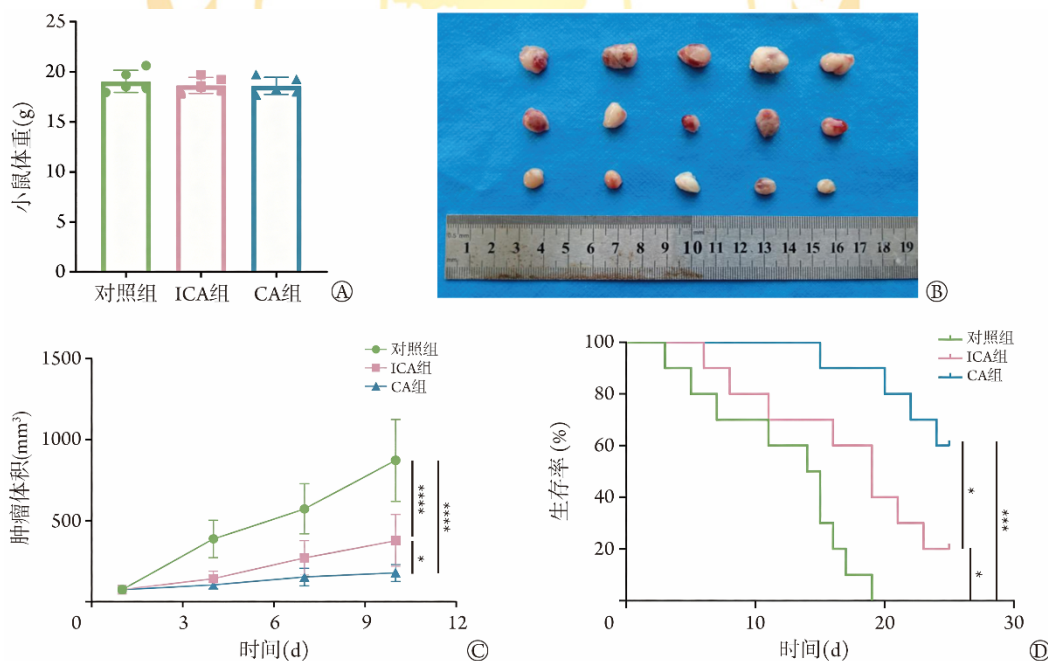


图2 各组肺腺癌小鼠的体重、生存期、远端肿瘤体积与生长曲线及生存期($n=5$)

Fig.2 The body weights, survival curves, distant tumor volumes and growth curves, and survival period of lung adenocarcinoma-bearing mice in each group ($n=5$)

A. 小鼠体重比较($n=5$); B. 未经消融治疗的远端肿瘤组织大体图($n=5$); C. 未经消融治疗的远端肿瘤生长曲线($n=5$); D. 小鼠Kaplan-Meier生存曲线($n=10$). * $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. ICA. 部分冷冻消融; CA. 完全冷冻消融

2.3 CA和ICA治疗对小鼠远端肿瘤组织中抗肿瘤免疫细胞因子的影响 RT-qPCR检测结果显示,与对照组相比,ICA组和CA组小鼠远端肿瘤组织中TNF- α 和IFN- γ 的mRNA相对表达水平均明显升高($P<0.01$ 、 $P<0.001$ 或 $P<0.0001$);与ICA组相比,CA组小鼠远端肿瘤组织中TNF- α 和IFN- γ 的mRNA相对表

达水平明显升高($P<0.01$ 或 $P<0.0001$,图3)。ELISA检测结果显示,与对照组相比,ICA组和CA组小鼠远端肿瘤组织中TNF- α 和IFN- γ 表达水平均明显升高($P<0.01$ 或 $P<0.0001$);与ICA组相比,CA组小鼠远端肿瘤组织中TNF- α 和IFN- γ 表达水平明显升高($P<0.001$ 或 $P<0.0001$,图3)。

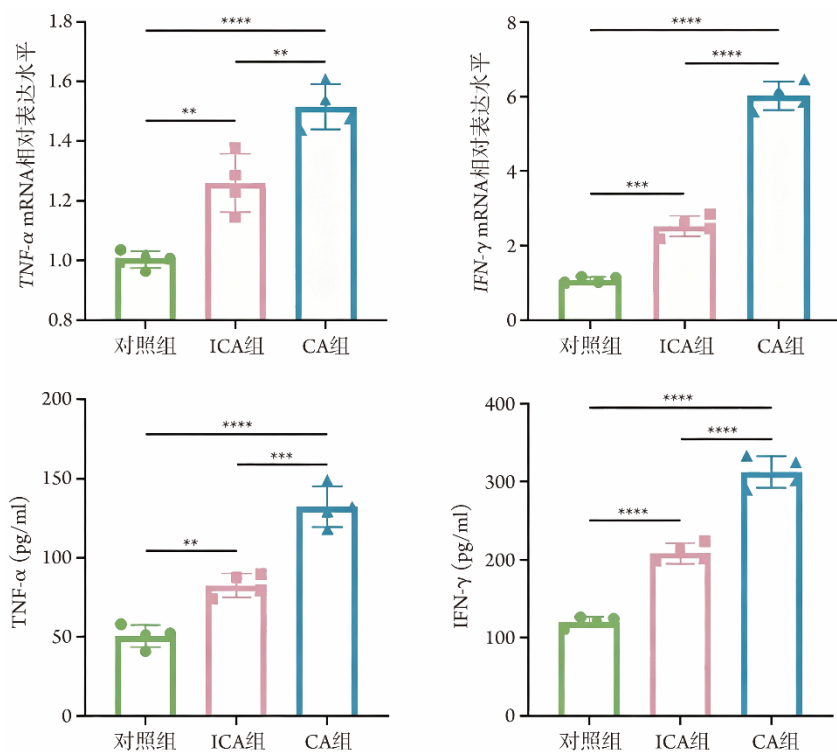


图3 肺腺癌小鼠冷冻消融术后远端肿瘤中TNF-α、IFN-γ的mRNA和蛋白表达水平(n=4)

Fig. 3 Expression of mRNA and protein of TNF-α and IFN-γ in the distant tumors of lung adenocarcinoma-bearing mice after cryoablation (n=4)

P<0.01, *P<0.001, ****P<0.0001. ICA. 部分冷冻消融; CA. 完全冷冻消融; TNF-α. 肿瘤坏死因子-α; IFN-γ. γ干扰素

2.4 CA和ICA治疗对小鼠远端肿瘤组织细胞凋亡相关指标的影响 RT-qPCR检测结果显示,与对照组相比,ICA组和CA组小鼠远端肿瘤组织中促凋亡指标Bax、Fas和FasL的mRNA相对表达水平明显升高($P<0.0001$),Bcl-2 mRNA相对表达水平明显降低($P<0.0001$);与ICA组相比,CA组小鼠远端肿瘤组织中Bax、Fas和FasL的mRNA相对表达水平明显升高($P<0.01$ 或 $P<0.0001$),Bcl-2 mRNA相对表达水平明显降低($P<0.001$,图4A)。

Western blotting检测结果显示,与对照组相比,ICA组和CA组小鼠远端肿瘤组织中促凋亡蛋白Bax相对表达水平明显升高($P<0.01$ 或 $P<0.0001$),CA组小鼠远端肿瘤组织中抑制凋亡蛋白Bcl-2相对表达水平明显降低($P<0.0001$),ICA组Bcl-2相对表达水平差异无统计学意义($P>0.05$);与ICA组相比,CA组小鼠远端肿瘤组织中Bax相对表达水平明显升高($P<0.05$),Bcl-2相对表达水平明显降低($P<0.0001$,图4B)。

2.5 CA和ICA治疗对小鼠远端肿瘤组织中CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞的影响 流式细胞术检测显示,与对照组相比,ICA组和CA组小鼠远端肿瘤组织中CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞均明显增多($P<0.05$ 、 $P<0.01$ 或 $P<0.001$);与ICA组相比,CA组小鼠远端肿

瘤组织中CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞明显增多($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图5)。

2.6 CA和ICA治疗对小鼠远端肿瘤组织中PD-L1 mRNA水平的影响 RT-qPCR检测结果显示,与对照组相比,ICA组和CA组小鼠远端肿瘤组织中PD-L1 mRNA相对表达水平均明显升高($P<0.01$);与ICA组相比,CA组小鼠远端肿瘤组织中PD-L1 mRNA相对表达水平差异无统计学意义($P>0.05$,图6)。

3 讨论

本研究对比CA与ICA治疗对肺腺癌荷瘤小鼠远端肿瘤的影响,结果显示,两种消融方式均能激发不同程度的“远隔效应”,抑制远处肿瘤生长并延长荷瘤小鼠生存期;且CA在诱导小鼠全身抗肿瘤免疫反应、促进肿瘤细胞凋亡,以及增加远处病灶中细胞毒性T淋巴细胞浸润方面,均优于ICA;此外,两种消融方式后远端肿瘤组织中PD-L1均表达代偿性上调。这提示冷冻消融诱导的免疫激活可引起负反馈调节,可为“冷冻消融联合免疫治疗”的临床策略提供实验依据。

消融治疗的核心原理为通过物理手段(高温或冷冻)诱导肿瘤组织发生不可逆的凝固性坏死^[11]。在肿瘤治疗领域,影像引导下的消融治疗方案因其微创

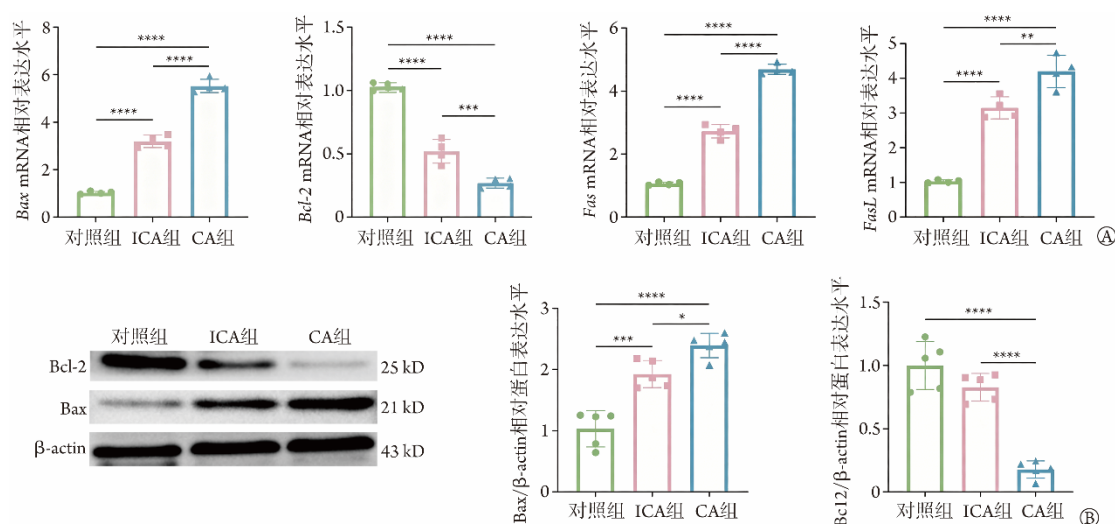


图4 肺腺癌小鼠冷冻消融术后远端肿瘤中凋亡相关指标水平(n=4)

Fig.4 Apoptosis-related indicators in the distant tumors of lung adenocarcinoma-bearing mice after cryoablation (n=4)

A. Bax、Bcl-2、Fas和FasL的mRNA表达水平(RT-qPCR); B. Bax和Bcl-2蛋白表达水平(Western blotting)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。ICA. 部分冷冻消融; CA. 完全冷冻消融; Bcl-2. B细胞淋巴瘤-2; Bax. Bcl-2相关X蛋白; Fas. 凋亡相关因子; FasL. Fas配体

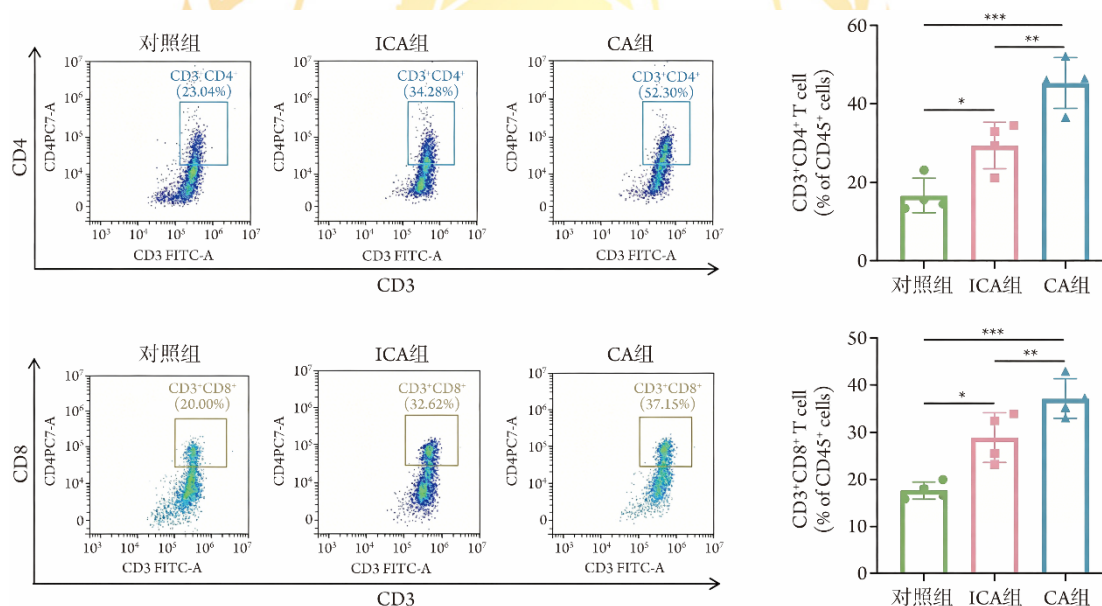


图5 肺腺癌小鼠冷冻消融术后远端肿瘤中CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞数量

Fig.5 CD4⁺T cells and CD8⁺T cells in the distant tumors of lung adenocarcinoma-bearing mice after cryoablation

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。ICA. 部分冷冻消融; CA. 完全冷冻消融

和精准的特点,已成为难以耐受手术的实体肿瘤患者的重要治疗选择^[12]。对于肺癌患者,相较于放化疗,局部消融可有效降低肿瘤负荷,同时有利于保留肿瘤周围的正常肺组织功能^[13]。

目前主要的肿瘤消融治疗包括射频消融、微波消融和冷冻消融等。与射频消融和微波消融等热消融技术相比,冷冻消融在肿瘤免疫治疗中具有独特优势。热消融时高温使蛋白质变性,破坏了肿瘤抗原的免疫原性;而冷冻消融通过“冻融循环”使细胞膜破裂并释放出包括TAA的胞内物,可较好地保

持TAA的天然构象,有利于促进树突状细胞的摄取与提呈,诱导全身肿瘤特异性免疫反应,抑制远处肿瘤生长,即产生“远隔效应”^[11,14]。此外,在CT影像下,冷冻消融过程中形成的“冰球”边界清晰,便于精准控制消融范围;而且冷冻对肺部及其他组织的胶原基质损伤较小,用于肺癌治疗的安全性较高^[15-16]。

理想情况下,消融治疗后的肿瘤应完全坏死;但实际治疗中,很可能出现残余的肿瘤组织。例如,当肿瘤周围存在直径>3 mm的血管,流动的血液会

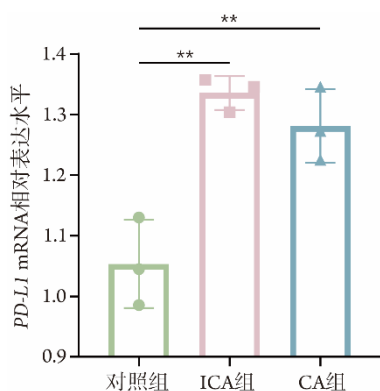


图6 肺腺癌小鼠冷冻消融术后远端肿瘤组织中PD-L1 mRNA表达水平

Fig.6 Expression of PD-L1 mRNA in the distant tumors of lung adenocarcinoma-bearing mice after cryoablation

** $P < 0.01$. PD-L1. 程序性死亡配体-1

增加消融时紧邻血管区域肿瘤组织的热量,导致该处肿瘤组织难以达到致细胞坏死的低温,即“热池效应”^[11];由此导致的“过渡带”区域的肿瘤细胞可能仅发生可逆性损伤,部分肿瘤细胞在复温后可引起局部肿瘤复发。

目前关于部分消融对远处肿瘤影响的相关研究较少。本研究显示,与对照组相比,CA和ICA治疗可不同程度地抑制远处肿瘤生长,延长肺腺癌小鼠的生存期,且以CA诱导产生抗肿瘤免疫反应的作用更为显著。该结果提示,ICA后虽释放TAAs,但可能由于残余肿瘤组织常处于缺氧状态,招募M2型巨噬细胞和MDSCs导致抗原提呈的效率被削弱^[5];而CA可彻底降低肿瘤负荷,避免形成免疫抑制,诱导更强的全身抗肿瘤免疫。对于ICA治疗后远处肿瘤的免疫微环境变化,Mauda-Havakuk等^[17]使用早獭构建肝细胞癌模型发现,ICA治疗后远端肿瘤中调节性T细胞(regulatory cells, Tregs)数量增加。此外,本课题组前期一项研究显示,CA治疗后小鼠远端肿瘤中MDSCs数量减少,CA治疗联合PD-1抑制剂可通过JAK2-STAT3-S100A8/A9轴抑制MDSCs的增殖和功能,协同治疗远处肿瘤^[10]。而ICA治疗后远端肿瘤免疫微环境中MDSCs等免疫抑制细胞的数量和功能变化,仍有进一步研究。

CD8⁺ T细胞是抗肿瘤免疫中的主要效应细胞,可识别并杀伤肿瘤细胞。CD4⁺ T细胞不仅可促进CD8⁺ T细胞的激活、增殖和记忆形成^[18-19],也可直接转化为具有细胞毒性的表型,通过MHC-II类分子识别并杀伤肿瘤^[20]。本研究的流式细胞术分析显示,与对照组相比,ICA和CA治疗后远处肿瘤中CD4⁺和CD8⁺ T细胞浸润均增多,且CA组远处肿瘤免疫细胞浸润程度高于ICA组;提示冷冻消融后的

残余肿瘤可能阻碍远处肿瘤中免疫细胞浸润。

CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞浸润肿瘤后,两种细胞可分泌抗肿瘤免疫细胞因子IFN- γ 和TNF- α ^[20-21]。本研究的RT-qPCR和ELISA结果均显示,与对照组相比,ICA组和CA组远端肿瘤组织中IFN- γ 和TNF- α 表达均升高,且CA组升高比ICA组更为显著;与上述流式结果一致。另有研究显示,在IFN- γ 和TNF- α 的协同作用下,Fas/FasL通路被激活,可强效诱导肿瘤细胞凋亡^[22]。本研究的RT-qPCR和Western blot检测结果显示,与对照组相比,ICA组远端肿瘤组织中促凋亡蛋白Bax、细胞凋亡相关因子Fas及其配体FasL表达升高,抑制凋亡蛋白Bcl-2表达降低;而与ICA组相比,CA组Bax、Fas和FasL表达更高,Bcl-2表达更低。这提示远处肿瘤体积的缩小可能是通过免疫因子介导的典型凋亡途径引起。ICA组可能由于冷冻消融坏死区域受限,释放TAAs载量少,引起免疫激活强度不足,从而无法维持炎性微环境,导致诱导远处肿瘤发生凋亡的能力受限。

免疫激活的肿瘤微环境通常伴随PD-L1的高表达。尽管本研究上述结果提示CA组的抗肿瘤效果优于ICA组,但是RT-qPCR检测显示,ICA组和CA组远处肿瘤中PD-L1的mRNA表达水平相较于对照组均明显升高,且两组差异无统计学意义;两组远处肿瘤出现PD-L1表达升高可能是适应性免疫抵抗的结果。有研究显示,肿瘤细胞受到T细胞和其分泌的IFN- γ 攻击时,可反应性上调PD-L1的表达以逃避T细胞杀伤^[23]。因此,虽然冷冻消融后可诱导远处肿瘤中免疫细胞浸润,将“冷肿瘤”转变为“热肿瘤”,但随之而来的PD-L1表达上调可能限制疗效的持久性,这也可解释本研究中CA组也未能完全消除远端肿瘤。此外,肿瘤细胞PD-L1表达上调可使其对免疫治疗更敏感,可能是联合免疫治疗的契机^[24]。对于PD-L1高表达的癌症患者,使用免疫检查点抑制剂可能增强抗肿瘤免疫效果。有研究显示,肿瘤中PD-L1高度表达的患者对于抗PD-L1治疗的客观缓解率显著高于低表达者^[25]。以上结果提示,ICA和CA可联合免疫治疗提升疗效。已有研究显示,冷冻消融、射频消融等微创治疗技术可通过破坏肿瘤组织,释放肿瘤抗原而激活机体免疫系统,与免疫检查点抑制剂(ICI)联合应用时发挥协同抗肿瘤作用^[11,26]。本课题组的前期研究也显示,冷冻消融联合PD-1抑制剂可协同抑制肺腺癌模型小鼠远处肿瘤的生长,并诱导远端肿瘤中CD8⁺ T细胞浸润增多^[4]。

虽然CA治疗可更有效地激活免疫反应,但在临床实际操作中,受限于患者身体耐受情况、肿瘤体积和位置等因素,有些患者仅能接受ICA治疗,此时联合ICI治疗有望提升抗肿瘤疗效,弥补部分消融

治疗的不足。Wehrenberg-Klee等^[8]发现,对结肠癌荷瘤小鼠单侧肿瘤进行ICA治疗后,消融后残余肿瘤及远处肿瘤对ICI的反应均显著提高,ICA联合ICI治疗组小鼠的生存率较ICA治疗组明显增长。在肝细胞癌模型小鼠中,部分射频消融联合ICI治疗同样显示出显著的协同抗肿瘤作用^[27]。此外,一项二期临床研究显示,在对PD-1耐药的转移性黑色素瘤患者中,ICA联合PD-1抑制剂治疗的客观缓解率为23.5%,疾病控制率为41%,提示了该联合治疗策略的安全与可行性^[28]。

本研究存在一定局限性。首先,仅使用LLC细胞一种肿瘤细胞系构建荷瘤小鼠模型,后续研究可使用多种肿瘤细胞系建模以验证结论的可靠性;其次,本研究主要观察ICA和CA后小鼠远处肿瘤中CD4⁺T和CD8⁺T细胞的变化,肿瘤微环境中的其他细胞类型如肿瘤相关巨噬细胞、MDSCs、树突状细胞等的变化尚待探究;此外,ICA联合免疫治疗的疗效及其相关作用机制仍需深入研究。

本研究发现,与ICA相比,CA治疗可更有效地重塑远处肿瘤的免疫微环境,体现为促进CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞浸润及促炎症性细胞因子释放增多;但消融后诱导的PD-L1反馈性上调提示,单纯CA仍存在局限性。未来的策略应聚焦于在临床治疗中尽量达到完全消融的基础上,联合抗PD-1/PD-L1免疫治疗阻断这一负反馈回路,以期延长和放大远隔效应,达到更好的抗肿瘤疗效。

【参考文献】

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] Velez A, Demiao A, Stermann D. Cryoablation and immunity in non-small cell lung cancer: a new era of cryo-immunotherapy[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1203539.
- [3] Den Brok MH, Suttmuller RP, Nierkens S, *et al.* Efficient loading of dendritic cells following cryo and radiofrequency ablation in combination with immune modulation induces anti-tumour immunity[J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(7): 896-905.
- [4] Liu Q, Chen X, Qi M, *et al.* Combined cryoablation and PD-1 inhibitor synergistically enhance antitumor immune responses in Lewis lung adenocarcinoma mice *via* the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870(7): 167262.
- [5] Shewarega A, Santana JG, Nam D, *et al.* Effect of incomplete cryoablation and matrix metalloproteinase inhibition on intratumoral CD8⁺ t-cell infiltration in murine hepatocellular carcinoma[J]. *Radiology*, 2024, 310(2): e232365.
- [6] Poston GJ, Joseph AE, Riddle PR. The accuracy of ultrasound in the measurement of changes in bladder volume[J]. *Br J Urol*, 1983, 55(4): 361-363.
- [7] 赵晓雨. 冷冻消融不全后Lewis小鼠肺腺癌模型残余肿瘤进展的机制研究[D]. 张家口: 河北北方学院, 2025.
- [8] Wehrenberg-Klee E, Hampilos P, Austin EE, *et al.* Evaluating the impact of adjunctive partial cryoablation on dual checkpoint inhibitor immunotherapy response in a murine model[J]. *Radiol Imaging Cancer*, 2024, 6(6): e230187.
- [9] Katzman D, Wu S, Stermann DH. Immunological aspects of cryoablation of non-small cell lung cancer: a comprehensive review [J]. *J Thorac Oncol*, 2018, 13(5): 624-635.
- [10] Li J, Zhao X, Qi M, *et al.* Cryoablation combined with programmed cell death protein 1 (PD-1) inhibitors regulates myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) through the JAK2-STAT3-S100A8/A9 axis in mice with Lewis lung carcinoma[J]. *Int J Hyperthermia*, 2025, 42(1): 2525444.
- [11] Chu KF, Dupuy DE. Thermal ablation of tumours: biological mechanisms and advances in therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(3): 199-208.
- [12] Ahmed M, Solbiati L, Brace CL, *et al.* Image-guided tumor ablation: standardization of terminology and reporting criteria--a 10-year update[J]. *Radiology*, 2014, 273(1): 241-260.
- [13] Palussière J, Catena V, Buy X. Percutaneous thermal ablation of lung tumors - Radiofrequency, microwave and cryotherapy: Where are we going?[J]. *Diagn Interv Imaging*, 2017, 98(9): 619-625.
- [14] Sabel MS. Cryo-immunology: a review of the literature and proposed mechanisms for stimulatory versus suppressive immune responses[J]. *Cryobiology*, 2009, 58(1): 1-11.
- [15] Alzubaidi SJ, Liou H, Saini G, *et al.* Percutaneous image-guided ablation of lung tumors[J]. *J Clin Med*, 2021, 10(24): 5783.
- [16] Castillo-Fortuño A, Pérez-Carpio A, Matute-González M, *et al.* Lung cryoablation: patient selection, techniques, and postablation imaging[J]. *Radiographics*, 2025, 45(6): e240157.
- [17] Mauda-Havakuk M, Hawken NM, Owen JW, *et al.* Immune effects of cryoablation in woodchuck hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatocell Carcinoma*, 2023, 10: 1973-1990.
- [18] Ahrends T, Spanjaard A, Pilzecker B, *et al.* CD4⁺T cell help confers a cytotoxic T cell effector program including coinhibitory receptor downregulation and increased tissue invasiveness[J]. *Immunity*, 2017, 47(5): 848-861.
- [19] Ahrends T, Busselaar J, Severson TM, *et al.* CD4⁺T cell help creates memory CD8⁺T cells with innate and help-independent recall capacities[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5531.
- [20] Oh D Y, Fong L. Cytotoxic CD4⁺T cells in cancer: Expanding the immune effector toolbox[J]. *Immunity*, 2021, 54(12): 2701-2711.
- [21] Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment[J]. *Science*, 2015, 348(6230): 74-80.
- [22] Yu Z, Shi J, Fang Y, *et al.* Developing innovative strategies of tumor-infiltrating lymphocyte therapy for tumor treatment[J]. *Oncol Rep*, 2024, 51(6).
- [23] Taube JM, Anders RA, Young GD, *et al.* Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape[J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(127): 127-137.
- [24] Lin X, Kang K, Chen P, *et al.* Regulatory mechanisms of PD-1/PD-L1 in cancers[J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 108.
- [25] Herbst RS, Soria JC, Kowanzetz M, *et al.* Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients[J]. *Nature*, 2014, 515(7528): 563-567.

- [26] Aarts BM, Klompenhouwer EG, Rice SL, *et al.* Cryoablation and immunotherapy: an overview of evidence on its synergy[J]. *Insights Imaging*, 2019, 10(1): 53.
- [27] Xiao T, Hu S, Dong S, *et al.* A study on combination of non-ablative local RFA with PD-1 and angiogenesis blocking to prolong survival through improvement of immune microenvironment in advanced Hepatocellular Carcinoma[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 134: 112144.
- [28] Mooradian MJ, Fintelmann FJ, Lasalle TJ, *et al.* Cryoablation and post-progression immune checkpoint inhibition in metastatic melanoma: a phase II trial[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 7357.

(责任编辑: 蒋铭敏)

