

• 实验研究 Experimental research •

热损伤对肝细胞肝癌细胞增殖及侵袭转移特性影响的实验研究

杨国威, 张 巍, 钱 晟, 瞿旭东, 周 波, 朱 樑, 王建华, 颜志平, 刘 嵘

【摘要】 目的 体外实验评价热损伤对肝细胞肝癌(HCC)细胞增殖、侵袭转移能力及上皮-间质细胞转化(EMT)等特性的影响,探索热消融与 HCC 复发转移之间的关系。**方法** 通过体外加热构建 McA-RH7777 HCC 细胞热损伤模型。CCK-8 法检测热损伤对 HCC 细胞增殖能力的影响,流式细胞技术检测细胞周期情况。Transwell 实验研究热损伤对 HCC 细胞侵袭能力的影响。荧光定量-聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白印迹(Western blot)分析热损伤对 HCC 细胞侵袭及 EMT 相关分子标志物 VEGF、MMP-9、Nm23、E-cadherin、vimentin 的 mRNA 和蛋白表达的影响。**结果** McA-RH7777 HCC 细胞热处理条件为 43.5℃水浴 30 min。热处理后 2~5 d 细胞增殖能力显著高于对照组($P<0.05$)。热处理 48 h 及 72 h 后处于 G1 期细胞比例降低,S+G2 期细胞比例增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,热处理后 24 h 后 HCC 细胞侵袭能力差异不明显,而热处理 72 h 后细胞侵袭能力显著增加(22.3 ± 2.46 对 14.2 ± 1.82 , $P<0.001$)。RT-PCR 和蛋白印迹分析结果显示,热处理 72 h 后 HCC 细胞 VEGF、MMP-9 和 vimentin 表达水平显著增加,E-cadherin 表达显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 亚致死量热损伤诱导 McA-RH7777 HCC 细胞发生 EMT 并增加其增殖和侵袭转移能力,表现出更高的恶性潜能。

【关键词】 热损伤;微波消融;肝细胞肝癌;上皮-间质细胞转化;肿瘤转移

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2017)-05-0436-07

The effect of thermal damage on the cell proliferation and invasive metastasis of HCC: an experimental study in vitro YANG Guowei, ZHANG Wei, QIAN Sheng, QU Xudong, ZHOU Bo, ZHU Liang, WANG Jianhua, YAN Zhiping, LIU Rong. Department of Interventional Radiology, Affiliated Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai Institute of Medical Imaging, Shanghai 200032, China

Corresponding author: LIU Rong, E-mail: liu.rong@zs-hospital.sh.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the influence of thermal damage on the cell proliferation, invasive metastasis and epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma (HCC) through experiments in vitro, and to explore the relationship between thermal ablation and the recurrence, metastasis of HCC. **Methods** The McA-RH7777 HCC cell thermal damage model was established by using external heating method. The effect of thermal damage on the proliferation of HCC cells was detected by Kit-8 assay (CCK-8), and the cell cycle changes were studied by flow cytometry. The effect of thermal damage on the invasion potential of HCC cells was assessed by using Transwell assay. Fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to evaluate the influence of thermal damage on HCC cell invasion potential, and on the mRNA and protein expression levels of EMT-related molecular markers, including VEGF, MMP-9, Nm23, E-cadherin and vimentin. **Results** Heating treatment of McA-RH7777 HCC cells was performed by putting the cells in 43.5℃ water basin for 30 min. Two to five days after heating treatment the cell proliferative ability was significantly higher than that of control group ($P<0.05$). At 48-72 hours after heating treatment the proportion of HCC cells in G1 phase was obviously reduced and the

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2017.05.014

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81171432)、上海市自然科学基金(15ZR1406700)、上海市卫生计生委计划项目(201440540)

作者单位:200032 上海 复旦大学附属中山医院介入科、上海市影像医学研究所

通信作者:刘 嵘 E-mail: liu.rong@zs-hospital.sh.cn

proportion of HCC cells in S+G2 phase was significantly increased, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with the control group, the difference in HCC cell invasion potential determined at 24 h after heating treatment was not significant, while the HCC cell invasion potential determined at 72 h after heating treatment was strikingly increased (22.3 ± 2.46 vs. 14.2 ± 1.82 , $P<0.001$). Real-time PCR and Western blotting results indicated that at 72 h after heating treatment the expression levels of VEGF, MMP-9 and vimentin were significantly increased, while the expression level of E-cadherin was remarkably decreased, the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Thermal damage with sub-lethal heating dose can induce McA-RH7777 HCC cell to develop epithelial-mesenchymal transition and to enhance its proliferation and invasive metastasis potential, and HCC cells show higher malignant potential. (J Intervent Radiol, 2017, 26: 436-442)

【Key words】 thermal damage; microwave ablation; hepatocellular carcinoma; epithelial-mesenchymal transition; metastasis

肝细胞肝癌(HCC)起病隐匿,恶性程度高,手术切除率仅占 20%~25%,需要多学科综合治疗^[1-4]。肿瘤热消融局部治疗具有升温速度快、局部灭活彻底、创伤小、并发症少等特点^[5]。热消融治疗 HCC 效果显著,但肿瘤残存及高转移复发率仍严重制约患者预后。目前热消融后亚致死量热损伤对 HCC 细胞增殖、侵袭能力影响的研究仍较少,热损伤究竟是促进还是抑制 HCC 转移尚无定论。上皮-间质细胞转化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)是目前研究较多的一种重要肿瘤转移机制,它以上皮细胞极性丧失及间质特性获得为重要特征,伴有上皮钙黏素(E-cadherin)丧失和神经钙黏素(N-cadherin)表达升高^[6-7]。本研究拟通过体外加热建立 HCC 热损伤模型,研究热损伤对 HCC 细胞增殖、侵袭能力及 EMT 等特性的影响,探索热消融与 HCC 复发、转移之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验细胞株及主要器材

大鼠 HCC 细胞株 McA-RH7777 购自美国菌种保藏中心(ATCC),常规方法培养、传代。主要试剂及仪器:细胞增殖与活性检测试剂盒(CCK-8)(上海碧云天生物技术公司)、碘化丙啶(PI)染液试剂盒(南京建成生物科技公司)、Moloney 鼠白血病病毒(M-MLV)逆转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司)、PowerSyberGreen® qPCR Master Mix 试剂(美国 Applied Biosystems 公司)、聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore 公司)、兔抗鼠 E-cadherin、波形蛋白(vimentin)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)单抗(英国 Abcam 公司)、兔抗鼠 Nm23 多抗(美国细胞信号技术公司, CST)、兔抗鼠基质金属蛋白酶(MMP)-9 单抗、小鼠抗 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)单抗(美

国 Santa Cruz 生物技术公司)、山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG(美国 Jackson 公司)、FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 医疗公司)、Cell-IQ 活细胞实时成像分析仪(芬兰 Chip-Man 公司)、NanoDrop 分光光度计(美国 GE 公司)、ABI Stepone Plus 荧光定量-聚合酶链反应(RT-PCR)仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

1.2 HCC 热损伤模型构建

将对数生长期 McA-RH7777 HCC 细胞吹下后,在 15 ml 聚丙烯管中密封并置于恒温水浴箱,以不同温度加热 30 min 处理细胞,锥虫蓝染色法测定细胞存活率,选择 43.5℃作为后续实验的处理温度。将 McA-RH7777 细胞均分为两部分,热处理组以 43.5℃恒温水浴处理 30 min,对照组常规 37.5℃培养。

1.3 CCK-8 法检测热损伤对细胞增殖的影响

收集热处理组与对照组细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^4 个/ml,接种于 96 孔板(200 μ l/孔),每组设 6 个复孔及 2 个空白调零孔,培养箱中预培养(37℃, 5%CO₂)。连续 5 日每日每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,混匀后孵育 2 h。用酶标仪测定每孔在 450 nm 的吸光度值,结果以校正 $A_{450\text{ nm}}$ 表示。细胞抑制率按照 $(1-\text{实验孔 } A_{450\text{ nm}}/\text{对照孔 } A_{450\text{ nm}})\times 100\%$ 计算。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期

热处理组与对照组细胞悬液接种 6 孔板中培养,每组 3 个复孔,分别收集培养 48 h 及 72 h 后的 HCC 细胞,4℃磷酸缓冲液(PBS)洗涤 2 次,以 70%乙醇固定。加 RNA 酶 A 300 μ l, 37℃水浴 30 min,加 PI 溶液 200 μ l 再次 37℃水浴 30 min。用 300 目筛网过滤于流式上机管中,上流式细胞仪检测,软件计算细胞周期各个时相百分比。

1.5 检测细胞侵袭力

分别收集培养 24 h、72 h 后热处理组和对照组

McA-RH7777 HCC 细胞,用不含血清 DMEM 液重悬,浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。基质胶(matrigel)稀释后加入 Transwell 上室,37℃ 孵育过夜。上室加入 100 μl 细胞悬液,下室加入 750 μl 含 10% 胎牛血清(FBS)细胞培养液上清的条件培养基,于 37℃、5% CO_2 条件下孵育 24 h。取出小室,用棉签擦净微孔滤膜上室面未侵袭的细胞及基质胶,PBS 洗涤数次。经 4% 多聚甲醛固定及 Giemsa 染液染色,PBS 洗涤 3 次,干燥后切下膜固封于载玻片上。200 倍光镜下随机选择 5 个视野进行细胞计数,取平均值。

1.6 检测细胞 mRNA 水平

收集 72 h 后热处理组和对照组 HCC 细胞,RT-PCR 及蛋白印迹(Western blot)法检测侵袭相关分子 VEGF、MMP-9、Nm23 及 EMT 相关分子 E-cadherin、vimentin 表达。PCR 引物根据 Primer5.0 软件设计,由上海生工生物工程公司合成,内参为大鼠源 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH),具体如下: VEGF F:5'-CGATTTGTTTGTCCAAGA-3'; VEGF R:5'-GAACGT CTAGACTGTTCCGGTTCC-3'; MMP-9 F:5'-TCCAGTAGACAATCCTTGCAA TGTG-3'; MMP-9 R:5'-CTCCGTGATTGAGAACTTCCAATA -3'; Nm23 F:5'-CTGTCTTACCACGTTTCAGC -3'; Nm23 R:5'-GGCCTCTGAAGAACACCT GA-3'; E-cadherin F:5'-CCCTGTCTCTGAATCCAACC -3'; E-cadherin R:5'-TCAATGATGAAAACGCCAAC -3'; vimentin F:5'-AGATCGATGTGGACGTTTCC -3'; vimentin R:5'-CACCTGTCTCCGGTATTCGT-3'。蛋白印迹法一抗稀释比例:VEGF 1:1 000、MMP-9 1:500、Nm23 1:1 000、E-cadherin 1:1 000、vimentin 1:500、GAPDH 1:1 000。

1.7 统计分析

应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。数据资料均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布且方差齐的计量资料组件比较用 T 检验或单因素方差分析,否则用近似 t 检验或秩和检验。

2 结果

2.1 热处理 HCC 细胞后存活率测定

以不同温度(42.5~44.5℃)水浴加热 30 min 处理 McA-RH7777 HCC 细胞,对照组常规 37℃ 培养,各组 24 h 及 48 h 细胞存活率见图 1。加热造成迟发性细胞死亡,随着加热温度上升细胞存活率逐渐降低,温度高于 44℃ 时处理组 48 h 细胞存活率显

著低于 24 h。其中 43.5℃ 处理 30 min 后细胞 24 h、48 h 存活率分别为 81.9%、77.1%。

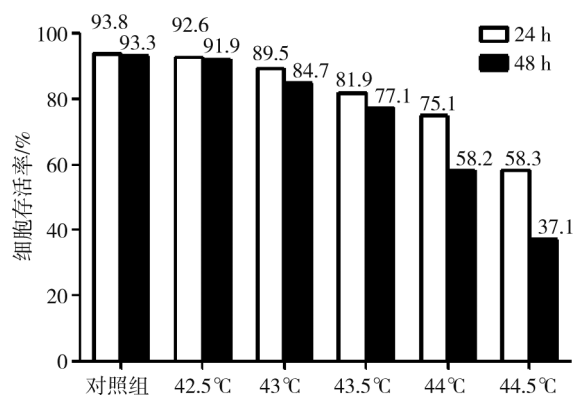


图 1 不同温度处理 30 min 后 McA-RH7777 HCC 细胞存活率比较

2.2 热损伤对 HCC 细胞增殖力影响

热处理早期 McA-RH7777 HCC 细胞生长受到抑制,2 d 后逐渐转为促进细胞增殖,其最大负抑制效应出现在热处理后 3 d,为 -45.5%,热处理后 2~5 d McA-RH7777 HCC 细胞增殖均显著高于对照组($P < 0.05$)(表 1、图 2)。

表 1 热损伤对 McA-RH7777 HCC 细胞增殖力影响 $\bar{x} \pm s$

热处理后	对照组		热处理组	
	A 值	抑制率/%	A 值	抑制率/%
1 d	0.182 \pm 0.008	-	0.154 \pm 0.007	15.4
2 d	0.228 \pm 0.012	-	0.237 \pm 0.010	-3.9
3 d	0.494 \pm 0.021	-	0.719 \pm 0.044	-45.5
4 d	1.350 \pm 0.100	-	1.768 \pm 0.043	-31.0
5 d	1.765 \pm 1.118	-	2.242 \pm 0.124	-27.0

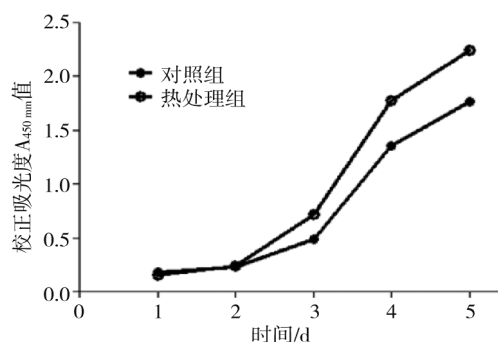


图 2 McA-RH7777 HCC 细胞对照组与热处理组生长曲线

2.3 热损伤对 HCC 细胞周期影响

与对照组相比,热处理组 48 h、72 h 后 McA-RH7777 HCC 细胞中处于 G1 期细胞比例显著降低,S+G2 期细胞比例显著增加,提示热处理后 48 h、72 h McA-RH7777 HCC 细胞 DNA 复制和细胞分裂活跃,差异有统计学意义($P < 0.05$)(表 2、图 3、4)。

表 2 加热对 McA-RH7777 HCC 细胞周期的影响 $\bar{x} \pm s$

加热	对照组		热处理组		P 值
	G1 期/%	S+G2 期/%	G1 期/%	S+G2 期/%	
48 h	57.36 \pm 1.31	42.64 \pm 1.31	47.32 \pm 1.57	52.68 \pm 1.57	<0.001
72 h	60.13 \pm 1.85	39.87 \pm 1.85	49.47 \pm 1.62	51.53 \pm 1.62	<0.001

2.4 热损伤对 HCC 细胞侵袭力影响

与对照组比较,热处理组 24 h 后 McA-RH7777 HCC 细胞差异不明显,热处理 72 h 后肝癌细胞侵袭能力显著增加,穿透基质胶基底膜细胞数明显增

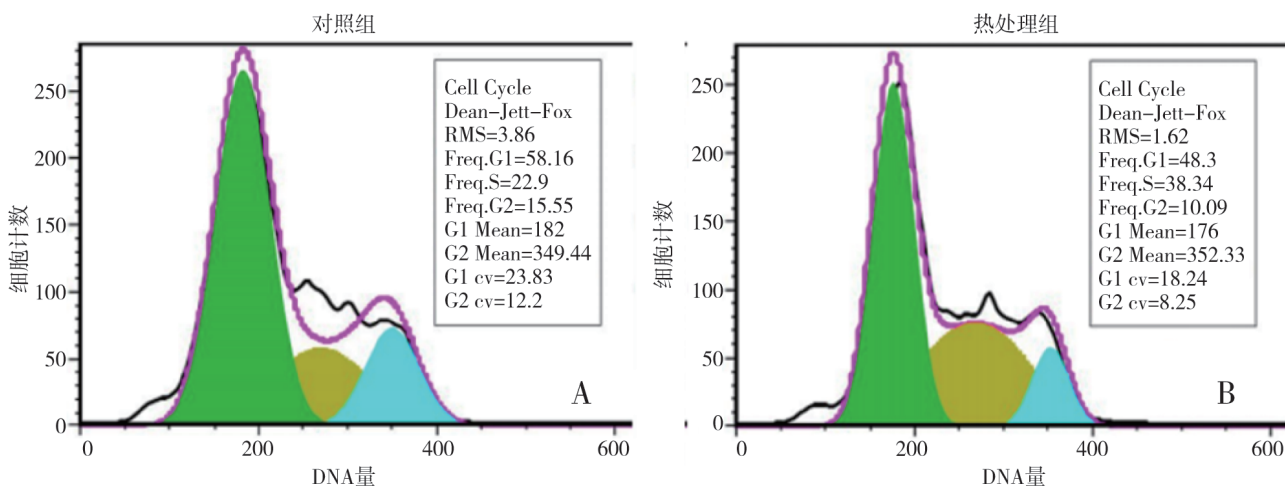


图 3 对照组与热处理组 48 h 后 McA-RH7777 HCC 细胞周期差异

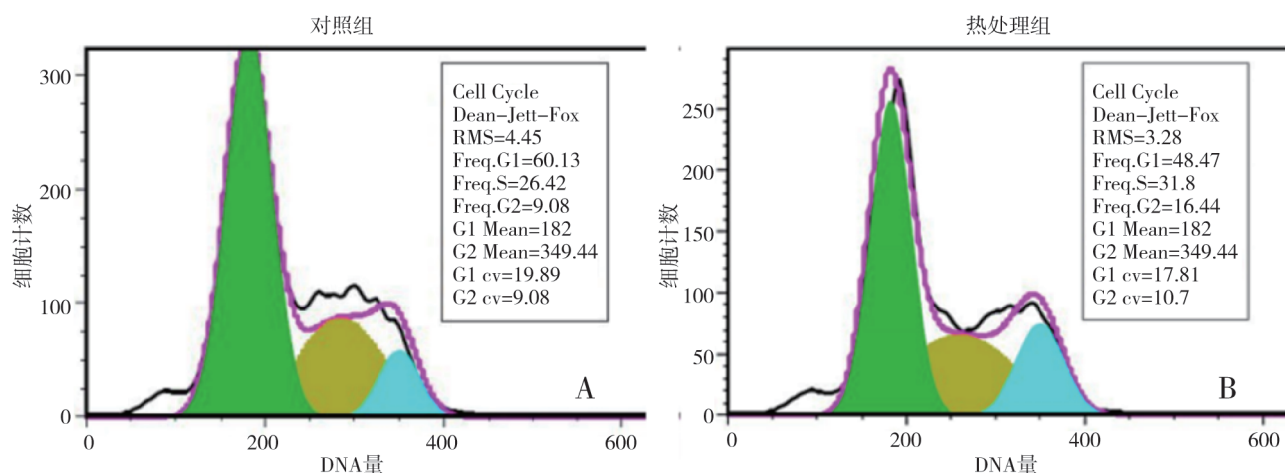


图 4 对照组与热处理组 72 h 后 McA-RH7777 HCC 细胞周期差异

多(22.3 \pm 2.46 对 14.2 \pm 1.82, $P<0.001$),提示热损伤后 McA-RH7777 HCC 细胞侵袭力增加(图 5)。

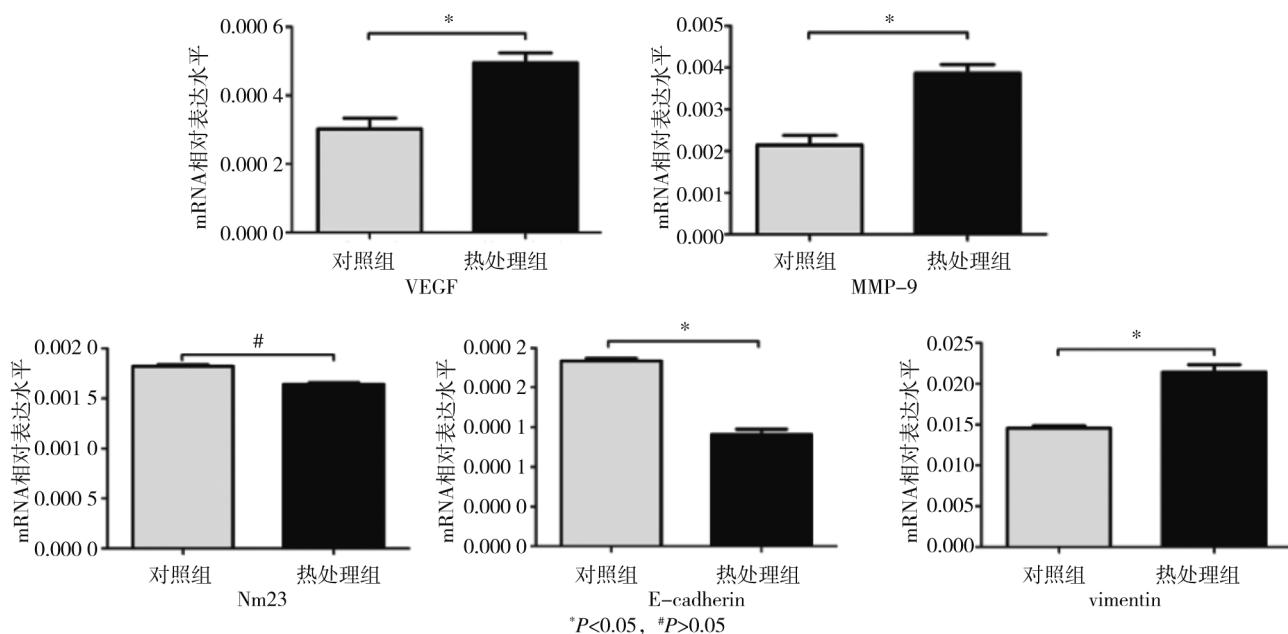
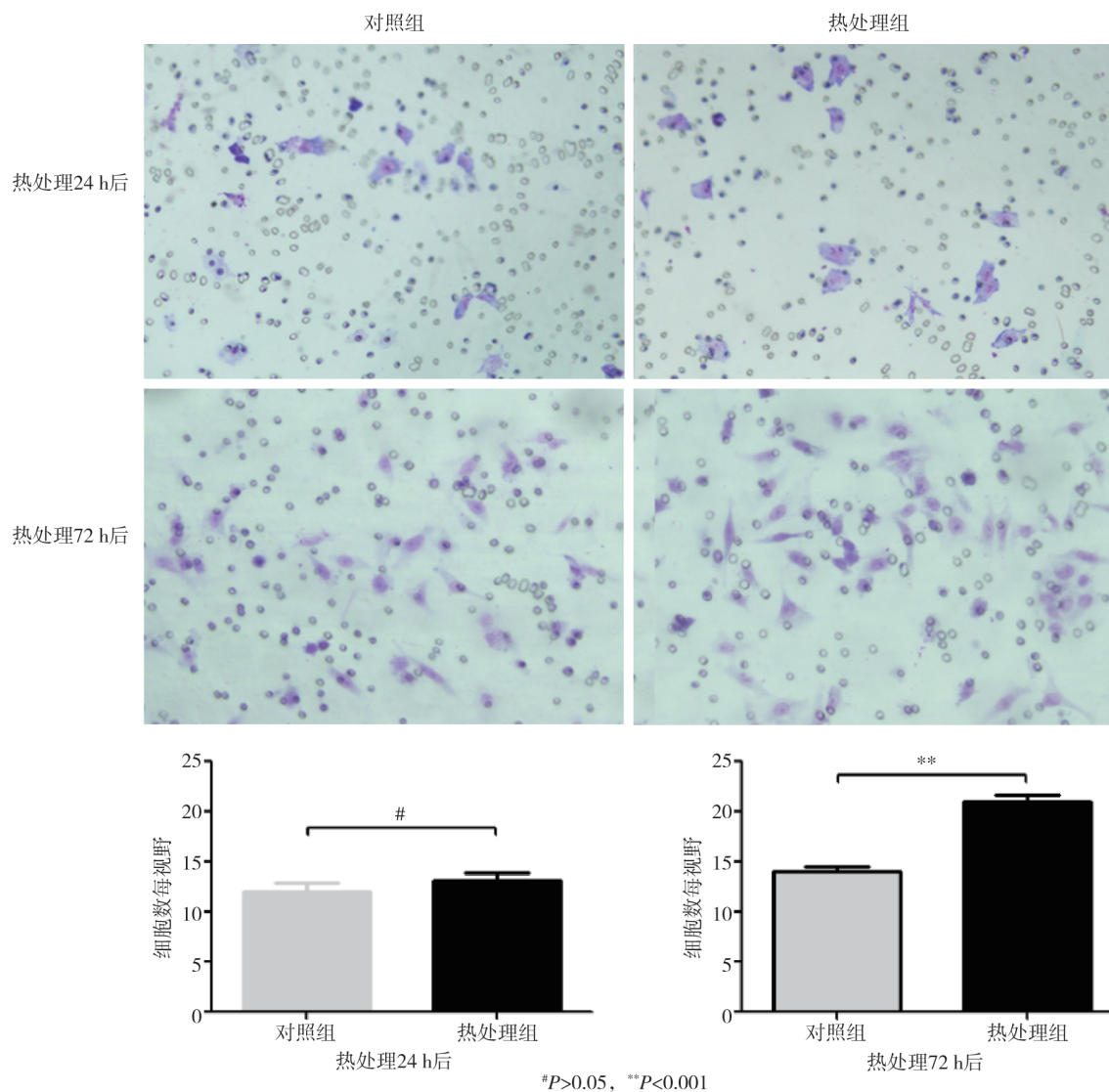
2.5 热损伤后对 HCC 细胞侵袭及 EMT 的影响

RT-PCR 检测结果显示,与对照组比较,热处理 72 h 后 McA-RH7777 HCC 细胞 VEGF、MMP-9 和 EMT 相关间质分子 vimentin mRNA 水平增加,上皮分子 E-cadherin mRNA 水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$),Nm23 mRNA 水平与对照组比较,差异无统计学意义(图 6);蛋白印迹分析进一步验证了上述结论。这些均提示热损伤后,McA-RH7777 HCC 细胞侵袭和血管生成相关蛋白分泌增加,并且发生了 EMT(图 7)。

3 讨论

肿瘤热消融是 20 世纪 90 年代肿瘤非手术治疗的重大进展,在小肝癌治疗方面疗效确切,可作为与外科手术、肝移植等同的根治性治疗方法^[8]。研究认为,热消融对直径 <3 cm 小肝癌疗效确切^[9]。但实际临床应用中还常常用于超出这个范围的 HCC 治疗。

目前热消融治疗后仍面临着肿瘤复发、转移的棘手问题,消融后肿瘤残存是影响患者预后的主要原因之一^[10-11],而亚致死量热损伤势必会对残存肿瘤细胞生物学特性发生影响,改变肿瘤增殖和侵袭转移特性并影响患者预后。目前关于消融后亚致死量热损伤对残癌特性影响的研究较少,并且存在一



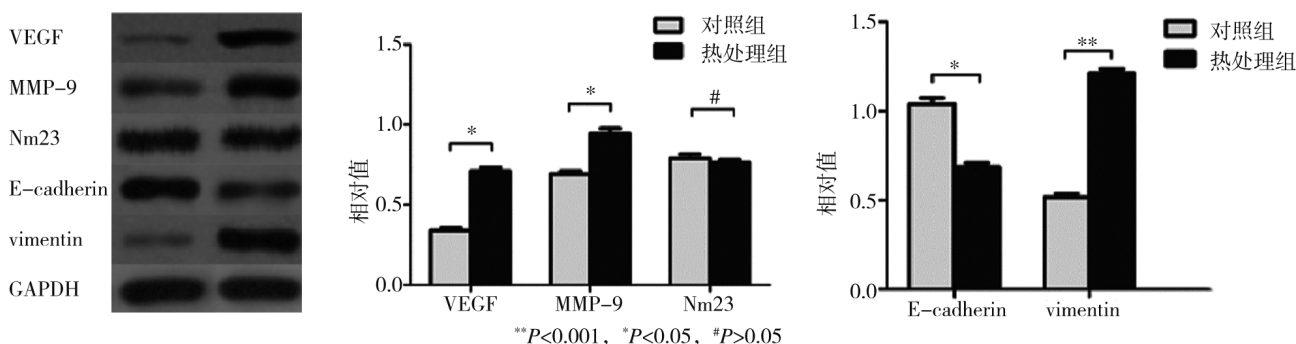


图 7 蛋白印迹检测对照组和热处理组 HCC 细胞侵袭和 EMT 相关蛋白表达差异

定争议。部分研究认为消融后亚致死量热损伤会增加残癌增殖、侵袭特性,促进肿瘤复发转移^[12-13],另有部分研究则显示热损伤不会增加,甚至反而降低了肿瘤细胞增殖和侵袭能力,热消融术后肿瘤复发转移可能仅为治疗不彻底所致^[14-15]。本研究体外模拟微波消融后肿瘤灶边缘存活的 HCC 细胞生物学特性变化,通过对体外培养的 McA-RH7777 大鼠 HCC 细胞进行 43.5℃ 水浴加热处理,研究热损伤对 HCC 细胞体外增殖及侵袭能力的影响及其机制。

Nikfarjam 等^[16]研究发现,结肠癌肝转移患者热消融术后 12 h 残癌增殖能力较对照组增强,且在术后 72 h 达高峰;认为其可能机制在于残癌中成纤维细胞生长因子(FGF)-2 和 VEGF 等表达增加。Kroeze 等^[17]报道显示,动物肾细胞癌模型热消融术后残癌增殖潜能增加,且凋亡减少;认为其可能机制在于缺氧、热休克蛋白和炎性细胞等的共同作用。Ke 等^[18]研究发现 VX2 兔肝癌模型热消融术后残癌侵袭性增强,肿瘤侵袭相关因子 VEGF、MMP-9、增殖细胞核抗原(PCNA)和白细胞介素(IL)-6 等表达上调。本实验结果显示,热处理后存活的 McA-RH7777 HCC 细胞经过短暂恢复即进入快速增殖状态,其最大促进增殖效应出现在热处理后第 3 天,抑制率达到-45.5%,并且处于 DNA 合成期和分裂期比例显著增加,而与对照组比较,热处理 72 h 后 HCC 细胞侵袭能力显著增加($P<0.05$),提示热消融后亚致死量热损伤会导致残存肿瘤细胞生长加速,且侵袭性增加,这可能是临床上不完全消融后残余肿瘤短期内迅速进展的原因之一。

肿瘤转移是一个非常复杂的病理生理过程,有肿瘤原发灶、循环肿瘤细胞、微环境等诸多因素参与,涉及肿瘤细胞黏附性改变、细胞外基质降解、肿瘤相关基因异常和血管生成等复杂过程。EMT 是肿瘤转移的重要机制之一,由极性上皮细胞转换成间质细胞而获得活动能力,以上皮分子 E-cadherin 表

达下降和间质分子 vimentin、N-cadherin 等上调为特征^[19]。EMT 可使 HCC 细胞通过失去细胞极性、与基底膜黏附等上皮表型,获得较高的迁移与侵袭、抗凋亡和降解细胞外基质能力,从而易于脱离原发灶并增加在血循环中存活机会。细胞外基质降解是肿瘤细胞实现浸润转移与新生血管形成的前提,参与降解细胞外基质的蛋白水解酶中,目前在 HCC 中研究较多的是 MMP 家族。其中 MMP-9 研究较多,在 HCC 组织中均有过度表达,且与肿瘤转移密切相关^[20]。VEGF 是促进新血管生成最重要的生长因子,在 HCC 侵袭转移过程中起重要作用,其表达与 HCC 肝内转移、血管浸润相关^[21]。Nm23 是 1988 年首先确定的第一个肿瘤转移抑制基因,目前研究结果显示 Nm23 基因及其表达产物与 HCC 侵袭转移关系密切,其表达下调与 HCC 肝内转移和门静脉侵犯相关^[22]。

本研究通过 RT-PCR 和蛋白印迹检测发现,热处理 72 h 后 McA-RH7777 HCC 细胞 VEGF、MMP-9 和 EMT 相关间质分子 vimentin 表达上调,上皮分子 E-cadherin 表达降低,但抑癌基因 Nm23 表达未见显著变化,提示热损伤引起 McA-RH7777 HCC 细胞分泌 VEGF 和 MMP-9 增加,并且发生 EMT,增加了 HCC 细胞突破基底膜、侵袭和促肿瘤血管生成能力,表现出了更高的恶性潜能。本结论亦与近期几项研究结论基本一致,进一步证实了亚致死量热损伤促进 HCC 细胞增殖和侵袭能力增加。Kong 等^[23]在动物实验中发现热消融治疗 HCC 后,残癌中 VEGF 及低氧诱导因子(HIF)-1 α 表达上调。Yoshida 等^[24]研究证实,亚致死量热损伤可能诱导肿瘤细胞发生 EMT 并表现出高增殖潜能。但是体外实验仅能反映热损伤后 HCC 细胞自身特性变化,未能涉及肿瘤微环境和机体免疫等方面影响,与真实活体内情况仍具有一定差异。既往一些体外研究由于缺少高转移潜能肿瘤模型,得出结论不一致。我们后

续实验中拟采用前期所构建的高转移潜能 Buffalo 大鼠 McA-RH7777 原位 HCC 模型进行不完全微波消融,结合循环肿瘤细胞情况研究活体内消融后残癌组织增殖和侵袭转移潜能情况。

总之,本研究证实亚致死量热损伤诱导 McA-RH7777 HCC 细胞发生 EMT 并增加其增殖和侵袭转移能力,上调 VEGF 和 MMP-9 表达,表现出更高的恶性潜能。尽管微波消融是目前重要的有根治潜能的 HCC 治疗手段,但是不完全微波消融可能会诱导残存肿瘤表现出更高的恶性潜能,增加复发和远处转移机会。因此,临床上需要选择合适患者或联合其它治疗方法,以提高 HCC 疗效。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61: 69-90.
- [2] de Lope CR, Tremosini S, Forner A, et al. Management of HCC [J]. J Hepatol, 2012, 56(Suppl 1): S75-S87.
- [3] 王建华. 呼唤规范化的肝癌介入治疗[J]. 介入放射学杂志, 2007, 16: 145-147.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 原发性肝癌诊疗规范(2011 年版)[J]. 临床肿瘤学杂志, 2011, 16: 929-946.
- [5] Chu KF, Dupuy DE. Thermal ablation of tumours: biological mechanisms and advances in therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14: 199-208.
- [6] Blick T, Hugo H, Widodo E, et al. Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines parallel the CD44^{hi}/CD24^{lo}-stem cell phenotype in human breast cancer[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15: 235-252.
- [7] Cavallaro U, Dejana E. Adhesion molecule signalling: not always a sticky business[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12: 189-197.
- [8] Vogl TJ, Farshid P, Naguib NN, et al. Ablation therapy of hepatocellular carcinoma: a comparative study between radiofrequency and microwave ablation[J]. Abdom Imaging, 2015, 40: 1829-1837.
- [9] Boutros C, Somasundar P, Garrean S, et al. Microwave coagulation therapy for hepatic tumors: review of the literature and critical analysis[J]. Surg Oncol, 2010, 19: e22-e32.
- [10] Pillai K, Akhter J, Chua TC, et al. Heat sink effect on tumor ablation characteristics as observed in monopolar radiofrequency, bipolar radiofrequency, and microwave, using ex vivo calf liver model[J]. Medicine(Baltimore), 2015, 94: e580.
- [11] 韦传军, 李彦豪, 陈 勇, 等. 肝动脉化疗栓塞术后联合射频热凝治疗大肝癌[J]. 介入放射学杂志, 2005, 14: 246-248.
- [12] Kong J, Kong L, Kong J, et al. After insufficient radiofrequency ablation, tumor-associated endothelial cells exhibit enhanced angiogenesis and promote invasiveness of residual hepatocellular carcinoma[J]. J Transl Med, 2012, 10: 230.
- [13] Dong S, Kong J, Kong F, et al. Insufficient radiofrequency ablation promotes epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells through Akt and ERK signaling pathways [J]. J Transl Med, 2013, 11: 273.
- [14] Meredith K, Haemmerich D, Qi C, et al. Hepatic resection but not radiofrequency ablation results in tumor growth and increased growth factor expression[J]. Ann Surg, 2007, 245: 771-776.
- [15] Yoo J, Lee YJ. Effect of hyperthermia and chemotherapeutic agents on TRAIL-induced cell death in human colon cancer cells [J]. J Cell Biochem, 2008, 103: 98-109.
- [16] Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. Altered growth patterns of colorectal liver metastases after thermal ablation[J]. Surgery, 2006, 139: 73-81.
- [17] Kroeze SG, van Melick HH, Nijkamp MW, et al. Incomplete thermal ablation stimulates proliferation of residual renal carcinoma cells in a translational murine model[J]. BJU Int, 2012, 110(6 Pt B): E281-E286.
- [18] Ke S, Ding X, Kong J, et al. Low temperature of radiofrequency ablation at the target sites can facilitate rapid progression of residual hepatic VX2 carcinoma[J]. J Transl Med, 2010, 8: 73-82.
- [19] Jing Y, Han Z, Zhang S, et al. Epithelial-mesenchymal transition in tumor microenvironment[J]. Cell Biosci, 2011, 1: 29.
- [20] Chen R, Cui J, Xu C, et al. The significance of MMP-9 over MMP-2 in HCC invasiveness and recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection[J]. Ann Surg Oncol, 2012, 19(Suppl 3): S375-S384.
- [21] 管清龙, 纪卫政, 任伟新, 等. 肝癌介入治疗后血清缺氧诱导因子和血管内皮生长因子含量变化对预后的影响[J]. 介入放射学杂志, 2014, 23: 142-146.
- [22] Deli G, Jin CH, Mu R, et al. Immunohistochemical assessment of angiogenesis in hepatocellular carcinoma and surrounding cirrhotic liver tissues[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11: 960-963.
- [23] Kong J, Kong J, Pan B, et al. Insufficient radiofrequency ablation promotes angiogenesis of residual hepatocellular carcinoma via HIF-1 α /VEGFA[J]. PLoS One, 2012, 7: e37266.
- [24] Yoshida S, Kornek M, Ikenaga N, et al. Sublethal heat treatment promotes epithelial-mesenchymal transition and enhances the malignant potential of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2013, 58: 1667-1680.

(收稿日期:2017-01-12)

(本文编辑:边 佑)