

激光免疫疗法对小鼠 H22 肝癌的长期抗瘤效应

曾超英 罗芳洪 黄萍

摘要

目的 观察激光免疫疗法对小鼠 H22 肝癌的抗瘤效应。

方法 昆明种小鼠 240 只,随机分为 4 组,每组 60 只。光动力学组:小鼠腹腔内注射 HpD10 mg/kg 后 48 h 行激光照射(功率 320 W,时间 400 s,能量 130 J);激光免疫组:处理同前组,另于照光前 12 h 小鼠瘤内及瘤周注射糖基化氨基葡糖(GC) 0.2 ml/只;单纯 GC 组:仅于瘤内及瘤周注射 GC;对照组:不做任何处理。比较前 3 个实验组的抑瘤率、生存率。

结果 3 实验组小鼠均有显著抑瘤效果,激光免疫组的抑瘤率、生存率较单纯免疫佐剂治疗组和光动力学治疗组有显著提高,激光免疫组 23.3% 肿瘤治愈小鼠长期存活。

结论 激光免疫疗法对小鼠 H22 肝癌显示出长期抗瘤效应,该疗法可能成为一种长期有效的综合治疗肿瘤新方法。

关键词 激光免疫疗法; 免疫佐剂; 抗瘤效应

中图分类号: R312;R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-9430(2007)01-0001-03

Long-term Anti-cancer Effect on H22 Liver Cancer after Laser Photo-immunotherapy

ZENG Chao-ying, LUO Fang-hong, HUANG Ping

Cancer Research Center, Medical College, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China

ABSTRACT

Objective To study the long-term anti-cancer effect on H22 liver cancer after laser photo-immunotherapy in mice.

Methods Anti-cancer effect, tumor inhibition rate, survival rate and pathology were observed respectively in immunoadjuvant (glycated chitosan), photodynamic therapy (PDT) and laser photo-immunotherapy (PDT + glycated chitosan) groups, as well as in control group ($n = 60$ in each group).

Results Immunoadjuvant, PDT and laser photo-immunotherapy could inhibit the tumor growth rate effectively compared to the contrast group. The tumor inhibition rate of laser photo-immunotherapy group was 60.4% which was significantly higher than the immunoadjuvant and PDT groups. 23.3% of mice of laser photo-immunotherapy group were cured and long-term survivable.

Conclusions Laser photo-immunotherapy demonstrates long-term anti-cancer effect on H22 liver cancer which indicates that laser photo-immunotherapy maybe a novel modality for cancer treatment.

Key words Laser photo-immunotherapy; Immunoadjuvant; Anti-cancer effect

基金项目: 福建省重点科技计划项目(2001Z048)

作者单位: 厦门大学医学院抗癌研究中心(厦门市,361005)

作者简介: 曾超英(1959~),女,广东广州人,主任医师,主要从事肿瘤的激光治疗研究。

激光免疫疗法(laser photo-immunotherapy)是将一定波长激光、光吸收剂或光敏剂和免疫佐剂相结合的一种肿瘤治疗新方法。近年来国外文献报道该疗法在抗肿瘤的远期疗效方面表现出很好的优势^[1-7],目前国内尚无相关报道。本研究以小鼠皮下移植性肝细胞癌(H22)为实验对象,观察以波长630 nm激光为光源,血卟啉衍生物(HpD)为光敏剂,糖基化聚氨基葡萄糖(glycated chitosan, GC)为免疫佐剂的激光免疫综合疗法的抗癌效应。

材料与方 法

一、实验材料

1. 实验动物与瘤株 昆明种小鼠360只,清洁级,体重20~22 g,雌雄各半,本中心动物室提供。小鼠肝癌腹水型瘤株从福建医科大学引进。

2. 光敏剂 血卟啉衍生物(HpD),北京医药工业研究所产品。

3. 免疫佐剂 糖基化聚氨基葡萄糖(GC),美国Oklahoma大学Chen WR教授赠送,稀释为1%溶液备用。

4. 激光器 半导体激光器,激光波长630 nm,石英光纤传输,光纤芯径400 μm,英国Diomed公司。

二、方法与分组

1. 肿瘤模型建立 抽取生长良好的肝癌腹水,无菌生理盐水1:3稀释成浓度约为 10^7 /ml的小鼠肝癌细胞悬液,取0.1 ml接种于小鼠右后腿皮下,形成实体肿瘤模型。5~7 d后,待肿瘤长到直径为5 mm左右,随机分4组,每组60只。光动力组:小鼠腹腔注射HpD 10 mg/kg后48 h行激光照射治疗,照光前将瘤体表面脱毛,四肢固定。激光辐照功率为320 mW,照射时400 s,光能量累积约130 J。激光免疫组:小鼠腹腔注射HpD后48 h行激光照射治疗,照光前12 h小鼠瘤内及瘤周注射GC 0.2 ml/只。单纯GC组:仅于瘤内及瘤周注射GC 0.2 ml/只。空白对照组:未进行任何处理。

2. 观察内容 每天观察各组小鼠瘤体生长情况。

每2~3 d测定一次瘤体体积,直至小鼠死亡。测量方法:用游标卡尺测量肿瘤直径,按直角测量2次,最后计算肿瘤体积(V)。

$$V = 1/6\Pi ab^2$$

Π 为圆周率, a 为长径, b 为短径。

根据V,计算肿瘤体积抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{对照组肿瘤体积} - \text{治疗组肿瘤体积}}{\text{对照组肿瘤体积}} \times 100\%$$

准确记录每只小鼠死亡时间,计算各组动物生存率。

另取120只小鼠,按前述方法分成4组,每组30只,分别于治疗后24和72 h及15 d将各组小鼠脱颈椎处死10只,取出瘤组织用10%甲醛溶液固定、石蜡包埋、切片、HE染色,光镜下观察肿瘤的组织学变化。

结 果

一、瘤体生长情况

空白对照组小鼠瘤体逐渐增大,部分瘤体向周围组织浸润生长,有些转移至腹腔形成癌性腹水,有些转移至胸腹部及腹股沟、头颈部淋巴结形成转移性实体瘤。瘤体长至2 cm左右,部分瘤体中央缺血坏死,形成溃疡。光动力组照光后3~4 d瘤体缩小、瘤体表面发黑结痂,瘤体中央凹陷,瘤体生长速度减慢;15 d左右原瘤体周围长出肿瘤组织,形成火山口状。单纯GC组小鼠瘤体生长情况与空白对照组相似,肿瘤生长速度相对缓慢,瘤体长至2 cm左右,部分瘤体中央缺血坏死,形成溃疡。激光免疫组小鼠,照光后24 h照光区皮肤红肿、渗出,激光照射后2~3 d瘤体表面中央出现黑色痂皮,瘤体生长缓慢;照光后15 d左右部分瘤体开始逐渐变小、干瘪,瘤体消失,未出现转移瘤。

二、抑瘤率

3个实验组均有明显的抑瘤效果。激光免疫组抑瘤效果较另两组有显著提高,体积抑瘤率达60.4%,且抑瘤时间长久持续(见图1)。

三、生存率

空白对照组、光动力组和单纯GC组共180只小鼠均于治疗后40 d左右死亡;而激光免疫组于治疗后25~70 d有14只小鼠瘤体消失,且未发现转移瘤,直至240 d小鼠仍然生存良好,生存率为23.3%。

四、病理组织学变化

实验第24小时空白对照组和单纯GC组癌细胞生长活跃,细胞密集,呈片状分布,间质少,癌细胞呈不规则形,细胞边界清楚,核大染色深,核结构清

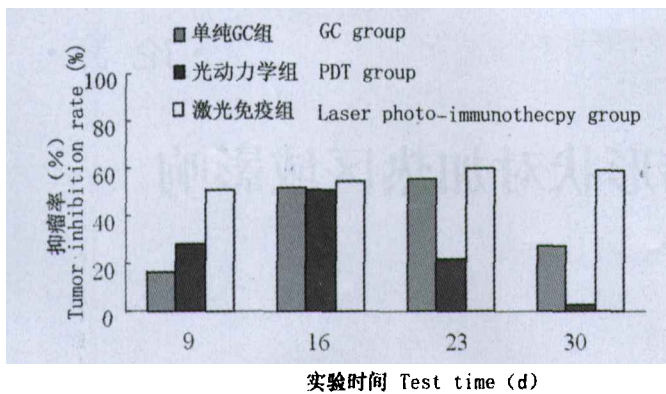


图 1 各治疗组小鼠肿瘤体积抑瘤率比较 (每组 n=60)
 Fig. 1 Comparison of tumor inhibition rate among 3 groups (n=60 in each group)

晰,核分裂象多见。激光免疫组和光动力组癌细胞边界不清,胞浆出现空泡性改变,核固缩、破裂、溶解,出现坏死。实验第 72 小时激光免疫组和光动力组癌细胞坏死更加广泛,癌细胞分布不规则,坏死为凝固性或液化性。实验第 15 天,激光免疫组肿瘤间质内大量淋巴细胞浸润,尤以坏死边缘为甚,吞噬细胞数量较多,少数残存的癌细胞团呈分散分布;光动力组和单纯 GC 组瘤组织大片坏死和淋巴细胞浸润,但坏死边缘有癌组织生长。对照组瘤组织大片坏死,但淋巴细胞和吞噬细胞数量较少。

讨 论

Chen 等^[1,2]研究表明,在瘤体局部注射光敏剂吲哚菁绿(ICG)和免疫佐剂糖基化聚氨基葡萄糖后,以波长 805nm 激光为光源照射瘤体表面,能有效抑制大鼠转移性乳癌 DMBA-4 的生长,部分荷瘤鼠得以治愈。随后研究发现大鼠体内产生抗肿瘤的特异性抗体起到长期抑制肿瘤甚至治愈的作用^[3-5]。Korbelik 等^[6]报道以 HpD 为光敏剂,波长 630 nm 激光为光源与免疫佐剂 MCWE、BCG 结合治疗小鼠 EMT6,发现 MCWE、BCG 能增强免疫细胞抑制肿瘤细胞的侵袭,提高动物生存率。Uehara 等^[7]采用和 Mladen 等同样的光敏剂和激光光源,但免疫佐剂采用溶链菌素(picibanil)OK-432,发现 OK-432 亦能显著提高大鼠鳞状细胞癌的疗效,延长生存期。可以说激光免疫疗法在恶性肿瘤治疗中展现出很好的应用前景,已逐渐成为肿瘤治疗一个新的研究热点。而激光光源、光敏剂以及免疫佐剂的选择匹配和剂量参数对激光免疫疗法的抗癌效果有着至关重要的影响。

本研究以小鼠皮下移植性肝细胞癌为实验对象,以 HpD 为光敏剂,以波长 630 nm 激光为光源,以 GC 为免疫佐剂,观察比较单纯 GC 组、光动力组和激光免疫组的抑瘤效应。结果显示,单纯 GC 组、光动力组均能明显抑制肿瘤生长,但荷瘤小鼠未能治愈;而激光免疫组抑瘤作用较其他组显著增强;且有部分激光免疫组小鼠肿瘤被彻底治愈,能长期存活。这表明光源 630 nm 激光,光敏剂 HpD 能与免疫佐剂 GC 相匹配,起协同作用,抑制肿瘤的生长,杀灭肿瘤,阻止转移瘤形成,对小鼠肝癌有长久持续的抗癌效应。本研究建立的激光免疫治疗新技术,首次用于小鼠肝癌实验,并获得成功,为进一步临床实验提供了重要参数和依据。由于光动力疗法在临床上已应用于多种肿瘤的治疗,特别是在中晚期肝癌的治疗上有较大突破^[8];这就为本疗法向临床过渡奠定了基础。该疗法的剂量参数和抗肿瘤机制值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Chen WR, Adams RL, Heaton S, et al. Chromophore-enhanced laser-tumor tissue photothermal interaction using 808 nm Diomed laser[J]. Cancer Lett, 1995, 88:15-19.
- [2] Chen WR, Adams RL, Bartels KE, et al. Chromophore-enhanced *in vivo* tumor cell destruction using an 808 nm Diomed laser[J]. Cancer Lett, 1995, 94:125-131.
- [3] Chen WR, Adams RL, Carubelli RL, et al. Laser-photosensitizer assisted immunotherapy: a novel modality in cancer treatment[J]. Cancer Lett, 1997, 115:25-30.
- [4] Chen WR, Jeong SW, Lucroy MD, et al. Induced antitumor immunity against DMBA-4 metastatic mammary tumors in rats using laser immunotherapy[J]. Int J Cancer, 2003, 107:1053-1057.
- [5] Chen WR, Carubelli R, Liu H, et al. Laser immunotherapy-a novel treatment modality for metastatic tumors[J]. Mol Biotechnol, 2003, 25:37-43.
- [6] Korbelik M, Cecic I. Enhancement of tumour response to photodynamic therapy by adjuvant mycobacterium cell-wall treatment[J]. Photochem Photobiol, 1998, 44:151-158.
- [7] Uehara M, Sano K, Wang ZL, et al. Enhancement of the photodynamic antitumor effect by streptococcal preparation OK-432 in the mouse carcinoma[J]. Cancer Immunol Immunother, 2000, 49:401-409.
- [8] 曾超英,杨栋,黄萍. 光动力治疗肝癌远期疗效及影响因素探讨[J]. 中国激光医学杂志, 2000, 9:146-149.

(收稿日期:2006-03-13)