

激光免疫疗法对小鼠肝癌的抗瘤及免疫效应

罗芳洪 黄萍 曾超英

我们以小鼠肝细胞癌(H22)为实验对象,以波长 630 nm 激光为光源,以血卟啉(HPD)为光敏剂,以糖基化聚氨基葡萄糖(GC)为免疫佐剂的激光免疫疗法的抑瘤作用和免疫效应,并探讨其作用机制。

一、材料和方法

1. 材料:光敏剂:HPD(北京医药工业研究所);免疫佐剂:GC 由美国 Oklahoma 大学 Chen WR 教授赠送。激光器:半导体激光器(英国 Diomed 公司),激光波长 630 nm,石英光纤传输,光纤芯径 400 μm。

2. 实验动物和肿瘤模型:昆明种小鼠(本中心动物室),清洁级,体重 20~22 g,雌雄各半。抽取 0.1 ml(约 1×10^6 个)H22 细胞悬液接种于小鼠右后腿皮下,形成实体瘤。5~7 d 后,待肿瘤长至 5 mm,随机分组,每组 60 只,分别给予不同治疗方案。

3. 实验分组和治疗:630 nm 激光+HPD 组:腹腔注射 HPD,剂量 10 mg/kg 体重,48 h 后激光照射治疗,照光前瘤体表面脱毛,四肢固定,激光辐照功率为 320 mW,照射时间 400 s,光能量累积约 130 J。激光免疫治疗组:与 630 nm 激光+HPD 组同,但照光前 12 h 瘤内注射 GC,剂量 0.2 ml。单纯 GC 组:于相应时间瘤内注射 GC。对照组:未进行治疗。

4. 长期免疫效应检测:激光治疗后瘤体消失且无转移瘤出现的小鼠为成功治愈小鼠。取成功治愈小鼠,于小鼠右后腿皮下再次接种 H22 细胞悬液。取正常小鼠同法接种作为对照。

5. 免疫组织化学检查:肿瘤组织固定、石蜡包埋后切片,切片分别用 1:200 稀释荷瘤鼠对照组血清和成功治愈组小

鼠血清 37 °C 孵育 1 h,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,超敏 SP 试剂盒过氧化物酶显色后光镜观察。

6. 血清抗体结合肿瘤细胞:腹水 H22 细胞涂片、固定,封闭液封闭。分别取荷瘤鼠对照组和成功治愈组小鼠血清作为一抗,与细胞涂片 4 °C 孵育过夜,加入异硫氰酸荧光素标记二抗,孵育后, PBS 冲洗,荧光显微镜观察。

二、结果

1. 瘤体情况观察:对照组小鼠瘤体逐渐增大,向周围组织浸润,部分瘤体中央缺血坏死、溃疡,形成转移瘤。630 nm 激光+HPD 组小鼠照光后 3~4 d 瘤体表面结痂,中央凹陷,生长速度减慢;15 d 左右周围肿瘤组织长出,形成火山口状。单纯 GC 组小鼠瘤体表面无局灶性坏死,但可见肿瘤生长较对照组缓慢。激光免疫治疗组小鼠照光后 24 h 照光区皮肤红肿、渗出,2~3 d 后瘤体表面中央出现黑色痂皮,生长缓慢,15 d 左右部分瘤体逐渐变小、干瘪,直至消失。

2. 肿瘤生长曲线:治疗后,每 2~3 d 测定 1 次瘤体积(V),公式为 $V = 1/6 \pi ab^2$, a 为长径, b 为短径。绘制肿瘤体积变化曲线如图 1。由图可知,3 个治疗组均有明显的抑瘤效果。但激光免疫治疗组抑瘤效果较其他治疗组有显著提高,体积抑瘤率达 60.4%。

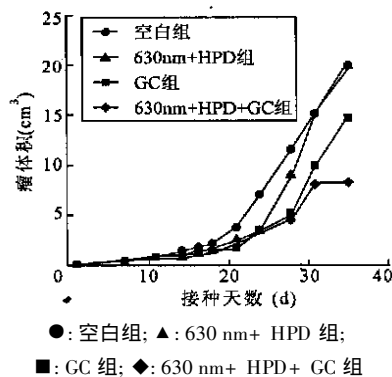


图 1 各治疗组小鼠肿瘤体积生长曲线

3. 治愈率及生存情况:记录小鼠死亡时间,计算治愈率。结果对照组、630

nm 激光+HPD 组和单纯 GC 组小鼠均于治疗后 40 d 左右死亡;而激光免疫治疗组有 14 只小鼠瘤体彻底消失,消失时间多于治疗后 35~50 d,且未发现转移瘤,直至治疗后 240 d 小鼠仍然存活,治愈率为 23.3%。

4. 长期免疫效应:成功治愈小鼠多次接种肿瘤细胞后均未见瘤体长出,对照组小鼠瘤体生长良好。

5. 免疫组织化学变化:成功治愈组小鼠血清与小鼠肿瘤组织结合为阳性,胞膜呈黄褐色;对照组为阴性。

6. 血清抗体结合肿瘤细胞:成功治愈组小鼠血清与小鼠肿瘤组织结合为阳性,胞膜呈黄绿色;对照组为阴性。

三、讨论

本研究结果显示,激光免疫治疗组抑瘤作用较其他治疗组显著增强,部分激光免疫治疗组小鼠被彻底治愈,长期存活,并产生对 H22 的特异性免疫力。进一步研究结果证实了成功治愈小鼠血清中 H22 细胞特异性抗体的存在。这表明 630 nm 激光、HPD 能与 GC 相匹配起协同作用,通过诱导体液免疫,抑制 H22 细胞生长,杀灭肿瘤,并防止转移瘤形成。有研究结果表明术后创伤因素有利于瘤细胞黏附可能导致 H22 转移^[1]。本研究为 H22 提供一种长期有效的微创治疗新方法,也为该法应用于人肝癌治疗提供实验依据。由于 630 nm 激光+HPD 在临床上已应用于中晚期肝癌治疗^[2],这就为本疗法向临床过渡奠定了基础。但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 白莉,黄志强,黄洁,等.肿瘤细胞黏附与实验性肝切除术肝转移.中华实验外科杂志,1999,16:259-260.
- 2 陈静,王彩霞,宛苏,等.CT 引导下光动力疗法治疗原发性肝癌的研究.中华实验外科杂志,1994,11:341-342.

(收稿日期:2004-07-18)

基金项目:福建省重点科技计划资助项目(2001Z048)

作者单位:361005 福建厦门大学医学院抗癌研究中心

通信作者:曾超英