

¹²⁵I 放射性粒子植入联合 CIK 细胞对人肝癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用

吴 念¹, 龚建平¹, 冯虎翼², 幸定培¹, 吴 伟¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科, 重庆 400010; 2. 重庆市第五人民医院普外科, 重庆 400062)

【摘要】目的:观察¹²⁵I 放射性粒子组织间植入联合细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞对人肝癌裸鼠移植瘤生长的抑制效应。**方法:**取健康人外周血单个核细胞, 加入不同的细胞因子促进 CIK 细胞成熟, 流式细胞仪检测 CIK 细胞表型, CD3⁺CD56⁺双阳性细胞达 20% 以上为达标; 用人肝癌细胞株 SMMC-7721 建立裸鼠皮下移植瘤模型, 随机分为¹²⁵I 放射性粒子组(A 组)、CIK 细胞组(B 组)、¹²⁵I 粒子+CIK 细胞组(C 组)、空白对照组(D 组), 分别加处理因素, 每 4 d 测量各组移植瘤体积, 观察它们对裸鼠移植瘤生长的抑制作用。HE 染色检测各组移植瘤病理变化, 免疫组织化学技术检测各组 Ki-67 蛋白表达, TUNEL 试剂盒检测各组移植瘤原位凋亡。**结果:**¹²⁵I 粒子放射性粒子植入联合 CIK 细胞静脉输入可明显抑制人肝癌裸鼠移植瘤的生长, C 组瘤体积为(0.42 ± 0.17) cm³, 显著小于 A 组(1.23 ± 0.83) cm³、B 组(3.77 ± 1.42) cm³ 和 D 组(6.62 ± 0.53) cm³, 各组瘤体积有显著性差异($F=155.706, P<0.001$); C 组抑瘤率为 93.71%, 显著高于 A 组(81.33%) 和 B 组(43.06%)。免疫组化染色发现各组移植瘤 Ki-67 蛋白表达的平均吸光度值分别为: C 组(0.481 ± 0.063)、A 组(0.592 ± 0.104)、B 组(0.669 ± 0.120)、D 组(0.797 ± 0.113), 差异有统计学意义($F=24.334, P<0.001$)。TUNEL 法发现: C 组凋亡的平均光吸光度值(0.859 ± 0.067), 显著高于 A 组(0.756 ± 0.055) 和 B 组(0.517 ± 0.051), 差异有显著统计学意义($F=318.373, P<0.001$), 联合治疗明显抑制细胞增殖, 促进肿瘤细胞凋亡。**结论:**¹²⁵I 放射性粒子永久植入联合 CIK 细胞免疫治疗在体内可显著抑制人肝癌裸鼠移植瘤的生长, 抑制癌细胞增殖, 诱导其凋亡, 其疗效优于单一治疗方式, 局部内放疗联合细胞免疫治疗可能有协同增效作用, 有可能成为肝癌综合治疗的方法之一。

【关键词】肝癌; ¹²⁵I 放射性粒子; 细胞因子诱导的杀伤细胞; 裸鼠移植瘤

【中国图书分类号】R735.7

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-11-19

作者介绍: 吴 念, Email: cqwn2010@126.com,

研究方向: 肝癌的微创治疗研究。

通信作者: 龚建平, Email: gongjianping11@126.com。

multistep hepatocarcinogenesis[J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124(7): 1061-1065.

[3] Van Vliet J, Turner J, Crossley M. Human Krüppel-like Factor 8: a CACCC-box binding protein that associates with CtBP and represses transcription[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(9): 1955-1962.

[4] Wang X, Zhao J. KLF8 transcription factor participates in oncogenic transformation[J]. Oncogene, 2007, 26(3): 456-461.

[5] Li J C, Yang X R, Sun H X, et al. Up-regulation of Krüppel-Like factor 8 promotes tumor invasion and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2010, 139(6): 2146-2157.

[6] Fu W J, Li J C, Wu X Y, et al. Small interference RNA targeting Krüppel-like factor 8 inhibits the renal carcinoma 786-0 cells growth in vitro and in vivo[J]. Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(8): 1255-1265.

[7] Poon R T, Ng I O, Lau C, et al. Serum vascular endothelial growth factor predicts venous invasion in hepatocellular carcinoma: a prospective study[J]. Ann Surg, 2001, 233(2): 227-235.

[8] Yao D F, Wu X H, Zhu Y, et al. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2005, 4(2): 220-226.

[9] Mise M, Arai S, Higashitani H, et al. Clinical significance of vascu-

lar endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor gene expression in liver tumor[J]. Hepatology, 1996, 23(3): 455-464.

[10] Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, et al. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors[J]. Cancer Res, 2000, 60(2): 203-212.

[11] Moon W S, Rhyu K H, Kang M J, et al. Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma[J]. Mod Pathol, 2003, 16(6): 552-557.

[12] Semenza G L. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(10): 721-732.

[13] Yasuda S, Arai S, Mori A, et al. Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor 1 alpha and its significance[J]. Hepatol, 2004, 40(1): 117-123.

[14] Pang R, Poon R T. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Lett, 2006, 242(2): 151-167.

[15] Belotti D, Paganoni P, Manenti L, et al. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation[J]. Cancer Res, 2003, 63(17): 5224-5229.

(责任编辑: 关蕴良)

Inhibitory effects of ^{125}I radioactive particle implantation combined with CIK cells on the growth of human hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice

WU Nian¹, GONG Jianping¹, FENG Hui², XING Dingpei¹, WU Wei¹

(Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. Department of General Surgery, the Fifth People's Hospital of Chongqing)

[Abstract] **Objective:** To observe the inhibitory effects of ^{125}I interstitial brachytherapy combined with cytokine-induced killer (CIK) cells on the growth of human hepatocellular carcinoma (HCC) xenografts in nude mice. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells were taken from health people and different cytokines were added to promote the mature of CIK cells. CIK cell phenotype was detected by flow cytometry; $\text{CD3}^+\text{CD56}^+$ double positive cells reaching 20% was considered as qualified. BALB/c nude mice were transplanted with SMMC-7721 HCC cell to establish tumor model and the mice were divided into ^{125}I radioactive particle group (group A), CIK cell group (group B), ^{125}I radioactive particle + CIK cell group (group C) and blank control group (group D). Treatment was given respectively, diameters of tumors in each group were measured every 4 d and inhibitory effects of different treatments on growth of HCC xenografts were observed. Pathological changes of xenografted tumors were detected by HE staining, histo-pathology and apoptotic rate of these tumors were examined by TUNEL; expressions of Ki-67 protein were detected by immunohistochemical staining. **Results:** ^{125}I radioactive particle implantation combined with CIK cells intravenously can significantly inhibit the growth of HCC xenografts in nude mice. In group C, tumor volume was $(0.42 \pm 0.17) \text{ cm}^3$, less than those in group A $(1.23 \pm 0.83) \text{ cm}^3$, group B $(3.77 \pm 1.42) \text{ cm}^3$ and group D $(6.62 \pm 0.53) \text{ cm}^3$, with significant differences among groups ($F=155.706, P<0.001$). Inhibition rate in group C was 93.71%, significantly higher than those in group A (81.33%) and group B (43.06%). Immunohistochemical staining revealed that mean absorbance value of Ki-67 protein in each group were: group C (0.481 ± 0.063) , group A (0.592 ± 0.104) , group B (0.669 ± 0.120) , group D (0.797 ± 0.113) respectively, with statistically significant differences among groups ($F=24.334, P<0.001$). According to the results of TUNEL, apoptotic mean absorbance value in group C was (0.859 ± 0.067) , higher than that in group A (0.756 ± 0.055) and group B (0.517 ± 0.051) respectively, with statistically significant differences in each group ($F=318.373, P<0.001$). **Conclusions:** Permanently implanted radioactive ^{125}I particle combined with CIK cells immune therapy can significantly inhibit the growth of HCC xenografts in nude mice, restrain the proliferation of tumor and induce apoptosis in vivo, thus it could become a therapy for hepatoma.

[Key words] hepatocellular carcinoma; ^{125}I radioactive seed; cytokine-induced killer cells; xenografts

^{125}I 放射性粒子组织间永久植入是中晚期肝癌综合治疗的手段之一,取得了较好的临床疗效^[1-2]。有临床研究显示局部放疗能诱导机体的肿瘤特异性免疫和固有免疫,增强抗肿瘤免疫治疗的功效,在肝癌患者病灶中植入 ^{125}I 放射性粒子能激发病人较强的全身抗肿瘤免疫反应^[3-4]。但中晚期肝癌患者体内有功能的免疫细胞数量下降,免疫功能明显减弱,如何供给机体更多有功能的免疫细胞,提高免疫功能一直困扰着研究者。过继细胞免疫疗法正逐步解决这一难题。细胞因子诱导的杀伤 (cytokine-induced killer, CIK) 细胞是外周血单个核细胞经多种细胞因子刺激后获得的一组以 $\text{CD3}^+\text{CD56}^+$ T 细胞为主要效应的异质细胞群,兼有 T 淋巴细胞的强大抗癌活性和自然杀伤细胞及主要组织相容性复合限制杀瘤的特点,是一类杀瘤活性强和抗癌谱

广的新型抗肿瘤效应细胞,可通过非特异性免疫杀伤作用根治肿瘤患者体内微小残余病灶^[5-7]。目前,还未见 ^{125}I 放射性粒子永久植入联合 CIK 细胞治疗肝癌的相关文献报道,本研究观察 ^{125}I 放射性粒子永久植入联合 CIK 细胞免疫治疗对人肝癌 SMMC-7721 细胞裸鼠移植瘤的体内杀伤效果,初步探讨二者联合治疗的合理性,为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂

细胞培养 RPMI1640 培养基、胎牛血清 (Hyclone, 美国), DeadEnd™ Colorimetric TUNEL system (Peomage Co., 美国), 检测 T 细胞亚群的各种抗体 (B.D Co., 美国); 抗 CD3 单抗 (北京军事医学科学研究所), Ki-67 (北京中杉金桥公司), ^{125}I 粒子 18.5 MBq (0.5 mCi) (北京智博高科生物技术有限公

司);rhIL-2、rhINF- γ (北京双鹤药业有限公司),人外周血淋巴细胞分离液(天津灏洋公司)。

1.2 实验动物及细胞株

BALB/c 裸鼠,雄性,4~5 周龄,16~18 g,购自中国协和医科大学实验动物研究所(京)[2009-0004]。SMMC-7721 人肝癌细胞由重庆医科大学感染分子生物学重点实验室惠赠。

1.3 细胞培养

1.3.1 SMMC-7721 培养 人肝癌细胞株 SMMC-7721 常规培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37℃、含 5%CO₂ 的饱和水蒸汽培养箱中培养,隔天对指数增殖期的细胞进行传代,取对数生长期的培养细胞,用 0.25%的胰酶消化、离心、生理盐水重悬后,对细胞悬液进行计数及台酚蓝染色,当细胞活力达 95%以上时,调整细胞浓度后接种于裸鼠皮下。

1.3.2 CIK 细胞制备 采集健康自愿者外周血 30 ml,经人淋巴细胞分离液密度梯度离心获得外周血单个核细胞,用 PBS 洗涤 2 次,置于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,调整细胞密度至 1×10^6 个/ml,加干扰素- γ (interferon- γ , INF- γ)(1 000 U/ml),24 h 后加 CD3 单抗(50 ng/ml)、白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)(500 U/ml),以后每 3 d 补加新鲜培养基,并补加 IL-2(500 U/ml),第 14 天行流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测 CIK 免疫表型。

1.4 动物模型建立及分组实验

将对数生长期的 SMMC-7721 细胞(2×10^6 个/ml),0.2 ml/只,种植于 70 只 BALB/c 裸鼠右侧背部皮下,约第 4 天成瘤,成瘤率约 95%,第 14 天移植瘤直径达 0.5~0.6 cm,去掉直径过大或过小的 7 只,将 60 只合格的裸鼠随机分 ¹²⁵I 放射性粒子组(A 组)、CIK 细胞组(B 组)、¹²⁵I 粒子+CIK 细胞组(C 组),空白对照组(D 组),每组 15 只。D 组不予处理;A 组在移植瘤正中央植入 18.5 MBq 粒子 1 枚;B 组给予尾静脉注入 3×10^7 个检测合格的 CIK 细胞,每周 1 次,共 4 次;C 组植入粒子的同时给予尾静脉注入 CIK 细胞,数量、时间、次数与 CIK 组相同。

1.5 观察指标和方法

从治疗开始每 4 d 测量肿瘤的最大纵径(a)及最大横径(b),计算肿瘤体积,肿瘤体积(V)= $a \times b^2/2$,观察肿瘤的生长情况,并测量瘤大小。治疗至第 32 天时,计算抑瘤率。抑瘤率(%)=(对照组平均体积-治疗组平均体积)/对照组平均体积 $\times 100\%$ 。处死所有裸鼠,取各组瘤组织,立即用 4%的多聚甲醛浸没,常规制备石蜡包埋切片,做 HE 染色、光学显微镜下观察肿瘤组织病理改变。免疫组化及 TUNEL 试剂盒分别检测各组瘤组织 Ki-67 表达与凋亡情况。

1.6 免疫组织化学检测瘤组织 Ki-67 蛋白表达

瘤块固定、石蜡包埋、切片、脱蜡、过氧化氢封闭,微波修复抗原。组织切片滴加 Ki-67 一抗,湿盒中过夜,加二抗, DAB 染色。用已知阳性标本作阳性对照,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。阳性表现为细胞核显棕黄色或棕褐色,并呈颗

粒状,背景为紫蓝色。

1.7 TUNEL 检测移植瘤细胞凋亡

采用 TUNEL 法检测移植瘤凋亡情况,以 PBS 代替 TUNEL 反应液为阴性对照。阳性表现为细胞核显棕黄色或棕褐色,背景为紫蓝色。

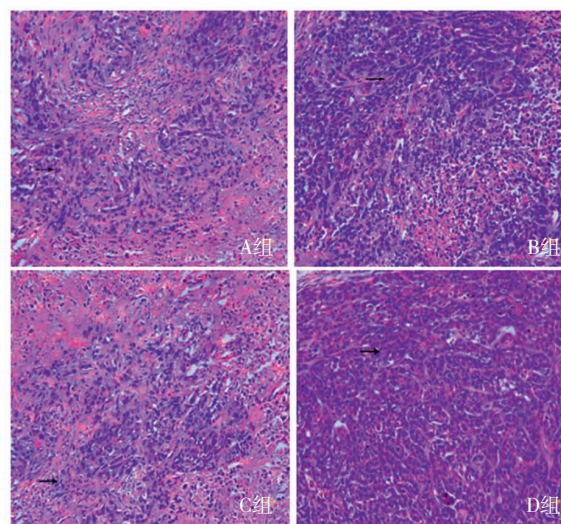
1.8 统计学分析

数据录入和分析采用 SPSS 16.0 统计软件。数据均为计量资料,采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组内比较用重复测量资料的方差分析,组间比较用单因素方差分析,多重比较采用 LSD-t 法。检验水准定为 $\alpha=0.05$,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理结果

光镜下各治疗组均可见不同程度的肿瘤细胞结构被破坏,粒子周围瘤组织显示明显坏死软化,残组织内瘤细胞排列松散,瘤细胞内部发生核固缩、细胞质减少,嗜酸性增强改变;C 组肿瘤细胞破坏程度更严重,可见均质红染的大片凝固样坏死区域,存活的细胞明显减少;B 组瘤细胞增殖较明显,也有坏死区域;D 组肿瘤细胞丰富,生长活跃,排列密集,核大深染,有较多核分裂象,呈增殖样生长(图 1)。



黑色箭头所指为肿瘤细胞

图 1 ¹²⁵I 粒子植入联合 CIK 细胞对肿瘤生长抑制作用的病理结果 (HE 染色, 200 $\times$)

Fig.1 Pathological results of inhibitory effects of radioactive ¹²⁵I particle combined with CIK cells immune therapy on tumor growth (HE staining, 200 $\times$)

2.2 CIK 细胞表型鉴定

体外将外周单个核细胞经 INF- γ 、CD3McAb、rhIL-2 诱导培养 14 d 后,经 FCM 检测 CIK 细胞中 CD3⁺、CD56⁺双阳性细胞(CD3⁺/CD56⁺)比例,达 20.0%以上为达标。如图 2 所示, CD3⁺/CD56⁺细胞比例达 35.5%。

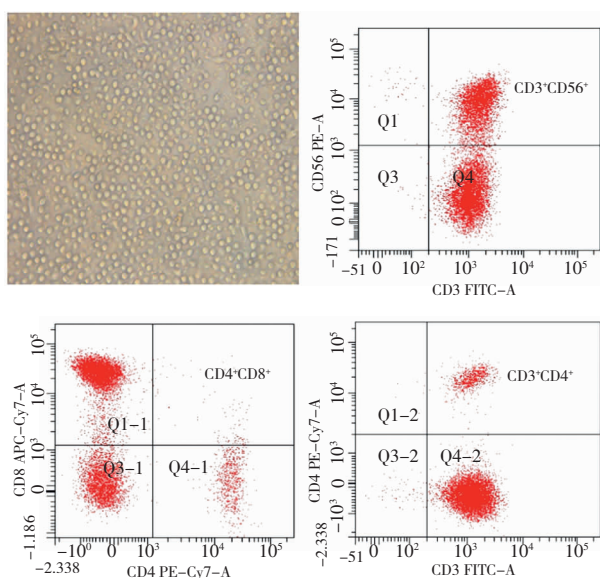


图 2 CIK 细胞立体图及 FCM 检测图

Fig.2 Stereogram and FCM of CIK cells

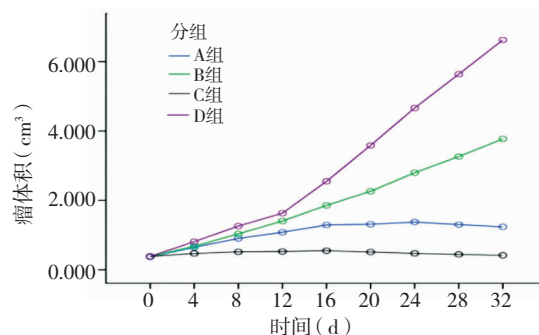
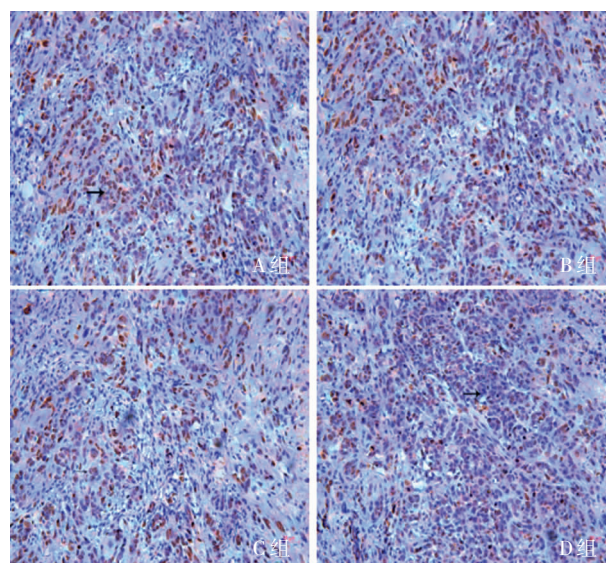
2.3 ^{125}I 粒子、CIK 细胞以及两者联合抑制肝癌裸鼠抑制生长

如图 3 和表 1 所示: ^{125}I 粒子、CIK 细胞以及两者联合均能抑制肿瘤生长,第 0 天时,各组瘤体积无明显统计学差异 ($F=1.528, P>0.05$)。加处理因素后,第 4 天开始,A、B、C 组与 D 组相比,瘤体积差异有统计学意义 ($F=31.968, P<0.05$),但 A 组与 B 组组间比较瘤体积无明显差异 ($F=6.314, P=0.325$)。2 周以内各组瘤体积增长趋于缓慢,D 组与 B 组瘤体积逐渐增长,B 组增长显著慢于 D 组 ($F=38.19, P<0.01$),A 组与 C 组瘤体积增长缓慢。2 周以后,D 组、B 组瘤体积逐渐增大,但 B 组较 C 组瘤体积增长相对较慢 ($F=55.671, P<0.01$),A 组和 C 组瘤体积增长基本得到控制,并有瘤体积缩小趋势 ($F=23.59, P<0.01$),C 组与 A 组比较,瘤体积缩小更明显 ($F=155.706, P<0.001$)。第 32 天时,抑瘤率 A 组为 81.33%,B 组为 43.06%,C 组为 93.71%。

2.4 免疫组织化学检测结果

Ki-67 为细胞核染色,阳性细胞表现为细胞核棕黄色或棕褐色染色。用专业图像分析软件系统(Image-Pro Plus 6.0)分析阳性程度,可见 A 组和 C 组阳性细胞相对较少,染色较浅,大多为棕黄色,C 组阳性细胞最少,染色最浅,多为棕黄色,D 组阳性细胞最多,染色较深,大多为棕褐色(图 4 和表

2)。各治疗组均能抑制肿瘤细胞增殖,C 组瘤细胞增殖显著弱于 A 组和 B 组,差异有统计学意义 ($F=24.334, P<0.001$)。

图 3 ^{125}I 粒子联合 CIK 细胞抑制肿瘤生长曲线图Fig.3 Inhibitory effects of ^{125}I particle combined with CIK cell immune therapy on tumor growth

黑色箭头所指黄褐色细胞为增殖细胞

图 4 Ki-67 在各组瘤组织中表达 (DAB 显色, 200 ×)

Fig.4 Expressions of Ki-67 in the each group (DAB developing, 200 ×)

2.5 TUNEL 试剂盒检测肿瘤组织凋亡结果

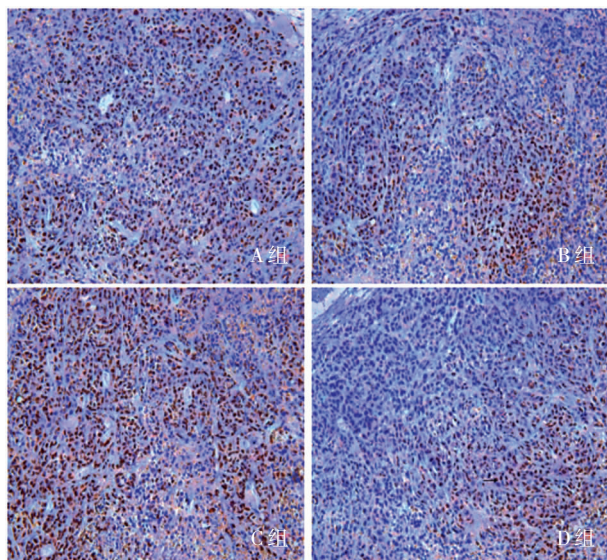
TUNEL 染色凋亡细胞表现为棕黄色或者棕褐色,胞核染色。用专业图像分析软件系统(Image-Pro Plus 6.0)分析阳性程度。A、B、C 组凋亡细胞明显增多,以 C 组阳性细胞数量最多,染色最深,呈棕黄色,A 组次之,以棕黄色、棕褐色均明

表 1 各组治疗前后移植瘤体积变化 ($\text{cm}^3, \bar{x} \pm s$)Tab.1 Changes in transplanted tumor volume before and after treatment in each group ($\text{cm}^3, \bar{x} \pm s$)

分组	例数 (n)	第 0 天	治疗后 8 d	治疗后 16 d	治疗后 24 d	治疗后 32 d	抑瘤率 (%)
A 组	15	0.38 ± 0.27	0.90 ± 0.22	1.29 ± 0.60	1.38 ± 0.83	1.23 ± 0.83	81.33
B 组	15	0.38 ± 0.17	1.03 ± 0.27	1.85 ± 0.58	2.80 ± 0.98	3.77 ± 1.42	43.06
C 组	15	0.38 ± 0.01	0.51 ± 0.13	0.54 ± 0.22	0.47 ± 0.20	0.42 ± 0.17	93.71
D 组	15	0.38 ± 0.11	1.26 ± 0.45	2.55 ± 0.18	4.67 ± 0.52	6.62 ± 0.53	0.00

注:C 组瘤体积显著小于 A 组 ($F=155.706, P<0.001$)、B 组 ($F=152.052, P<0.001$) 和 D 组 ($F=163.014, P<0.001$)

显,B 组和 D 组数量较少,染色呈棕褐色(图 5 和表 2);与单独治疗相比,联合治疗明显抑制细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡,差异有统计学意义($F=318.373, P<0.001$)。



黑色箭头所指黄褐色细胞为凋亡的瘤细胞

图 5 各组凋亡细胞在瘤组织中表达 (DAB 显色, 200 ×)

Fig.5 Expressions of apoptotic cell in each group
(DAB staining, 200 ×)

表 2 各组 Ki-67 和 TUNEL 染色阳性的平均吸光度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison on average positive absorbance of Ki-67
and TUNEL staining in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (n)	Ki-67	TUNEL
A组	15	0.592 ± 0.104	0.756 ± 0.055
B组	15	0.669 ± 0.120	0.517 ± 0.051
C组	15	0.481 ± 0.063	0.859 ± 0.067
D组	15	0.797 ± 0.113	0.397 ± 0.049

注:与 A、B、D 组比较,C 组移植瘤增殖明显减弱,差异有统计学意义 ($F=24.334, P<0.001$),C 组凋亡明显增多,差异有统计学意义 ($F=318.373, P<0.001$)

3 讨论

肝细胞癌放射生物学观念的改变为肝癌放射治疗的开展奠定了理论基础,现认为肝细胞肝癌的放射敏感性与低分化鳞癌相似。 ^{125}I 放射性粒子植入,是一项依靠立体定向系统将 ^{125}I 粒子准确植入人体肿瘤内,通过微型放射源发出持续、短距离的 γ 、X 射线,使肿瘤组织遭受最大限度杀伤,而正常组织不损伤或微损伤的肿瘤治疗技术。局部放疗的目标是最大限度地杀伤肿瘤细胞及最大限度地保护肿瘤周围的正常组织,但肿瘤细胞的放射敏感性在很大程度上受到了宿主的免疫状态的影响,中晚

期肝癌患者体内有功能的免疫细胞数量下降,免疫功能明显减弱。

本研究首先从健康人外周血中提取单个核细胞,采用 Franceschetti 等^[8]的方法进行体外扩增,至培养 14 d 时,细胞总量扩增约 18 倍,CD3⁺、CD3⁺CD56⁺、CD3⁺CD8⁺效应细胞亚群的比例明显增高,分别由最初的 58.0%、6.7%、24.6% 上升至 93.5%、35.5%、43.0%,成功诱导高比例 CD3⁺CD56⁺ 的 CIK 细胞。然后采用尾静脉注射的方法将 CIK 细胞输入裸鼠体内,能良好模拟体内环境。从治疗后的第 4 天开始,A、B、C 组瘤体增长较 D 组慢,2 周内瘤体生长较缓慢,与 D 组趋势相对一致,治疗 2 周过后,D 组移植瘤体积增长明显加快,显著快于 B 组,治疗 1 个月左右,B 组的抑瘤率为 43.06%,说明 CIK 细胞免疫治疗对人肝癌裸鼠移植瘤有效,但疗效较 Kim 等^[9]报道的抑瘤率为 60.0% 差,可能与机体的个体差异或诱导试剂的质量有关。

C 组在裸鼠移植瘤中植入 ^{125}I 粒子的同时,多次尾静脉注入 CIK 免疫细胞。从治疗的第 4 天开始,C 组瘤体增长慢于 D 组,2 周内联合组瘤体无明显增长,2 周后开始有缩小趋势,至第 32 天时,C 组的抑瘤率高达 93.71%,分别高于 A 组抑瘤率 (81.33%),和 B 组的抑瘤率 (43.06%),表明 ^{125}I 粒子局部放疗联合 CIK 细胞全身免疫治疗对移植瘤有良好的抑制作用,疗效优于 A、B 组。这一结果与局部放疗联合免疫治疗对其他肿瘤的作用一致^[3,10]。一方面, ^{125}I 放射性粒子释放的 X、 γ 射线能够直接损伤肝癌细胞的 DNA,使双链断裂,诱导肝癌细胞凋亡,还可通过粒子释放的低线性能量传递射线电离癌细胞内的水分子,产生自由基 (H^+ 、 H_2O_2 、 OH^- 、 O_2^-),与细胞核酸、蛋白等相互作用,引起组织损伤,而至组织中的肿瘤细胞失去繁殖能力而凋亡^[11]。另一方面,这种持续放疗诱导的细胞死亡、濒死细胞以及它们组成的微环境,可激发机体的肿瘤特异性免疫和固有免疫,不但能增强抗肿瘤免疫治疗的功效,还可以诱导更多的 CIK 免疫细胞到达靶区。CIK 细胞可通过淋巴细胞功能相关抗原-1 与细胞间黏附分子-1 途径与肿瘤细胞结合,分泌含大量颗粒酶或穿孔素,能穿透靶细胞膜,导致肿瘤细胞裂解,也可活化后产生大量细胞因子 ($\text{INF-}\gamma$ 、IL-2、IL-6、肿瘤坏死因子- α 、粒-巨噬细胞集落刺激因子等) 直接抑制肿瘤生长或调节免疫系统间接抑制肿瘤生长^[5]。

肿瘤细胞的放射敏感性在很大程度上受到了

宿主的免疫状态的影响。本研究选择在植入¹²⁵I 放射性粒子时同时注入 CIK 免疫细胞。这样既通过微型放射源发出持续、短距离的 γ 、X 射线,使肿瘤组织遭受最大限度杀伤,又通过 CIK 细胞作用于肿瘤细胞,不但可直接杀伤肿瘤细胞,还可间接提高机体的免疫力。局部放疗除了对机体肿瘤组织直接杀伤作用外,还可以通过旁观者效应、免疫调节反应、免疫放大效应、远隔效应等抑制放疗靶区外的肿瘤生长,加之¹²⁵I 粒子所释放的微量 γ 射线、X 射线可增强靶区 CIK 细胞活性,提高杀伤效果,进一步说明二者联合治疗的合理性。

此外,本研究还从微观方面,检测了各实验组移植瘤组织增殖及凋亡情况。Ki-67 是一种增殖细胞相关的核抗原,其功能与有丝分裂密切相关,常用作标记肿瘤细胞的增殖状态。结果发现 C 组 Ki-67 阳性细胞平均吸光度值显著低于 A 组和 B 组,二者联合治疗可显著抑制瘤细胞增殖。对瘤组织进行原位凋亡检测发现,联合治疗可诱导肿瘤细胞凋亡,效果较单一治疗方式更明显。因此,从微观上说明二者联合治疗的有效合理。联合治疗的可能机制是抑制癌细胞增殖,诱导其凋亡。

目前,还未见¹²⁵I 放射性粒子永久植入联合 CIK 细胞治疗肝癌的相关文献报道,本研究从体内实验验证了两者的联合对人肝癌裸鼠移植瘤的抑制效应。两者联合能有效促进肝癌细胞凋亡坏死,抑制肿瘤细胞增殖,效应远大于单独治疗的抑制效应,可能有协同作用。因此局部内放疗联合细胞免疫治疗可能是综合治疗肝癌的方案之一,本研究为肝癌的放疗联合生物治疗提供了实验依据。

本研究不足之处:①未能观察各组裸鼠的生存率,原因在于皮下移植瘤模型长到 1 个多月时会出现缺血性溃疡,破溃,影响裸鼠存活时间,在以后的研究中将采用兔肝原位种植瘤模型。②本研究只观察了¹²⁵I 放射性粒子永久植入联合 CIK 细胞免疫治疗的初步疗效,未研究二者协同增效的具体机制,这可能与局部放疗所形成的局部微环境与机体免疫有着复杂的联系,这将是以后研究的重点。③设计之初,未考虑 CIK 注射之后裸鼠免疫力变化,因为裸鼠小,血容量少,取血困难。

总之,本实验从动物模型中证实了¹²⁵I 放射性粒子永久植入联合 CIK 细胞免疫治疗在体内可显著抑制人肝癌裸鼠移植瘤的生长,其疗效优于单一治疗方式,可能与抑制癌细胞增殖,促进其凋亡有关,局部内放疗联合细胞免疫治疗可能有协同增效作用,有望成为肝癌综合治疗的方法之一。

参 考 文 献

- [1] Kollmeier M A, Pei X, Algur E, et al. A comparison of the impact of isotope (¹²⁵I VS. (¹⁰³)Pd) on toxicity and biochemical outcome after interstitial brachytherapy and external beam radiation therapy for clinically localized prostate cancer[J]. Brachytherapy, 2012, 11(4): 271-276.
- [2] Ma J X, Jin Z D, Si P R, et al. Continuous and low-energy ¹²⁵I seed irradiation changes DNA methyltransferases expression patterns and inhibits pancreatic cancer tumor growth[J]. J Exp Clin cancer Res, 2011, 30(1): 35-47.
- [3] Takeshima T, Chamoto K, Wakita D, et al. Local radiation therapy inhibits tumor growth through the generation of tumor-specific CTL: its potentiation by combination with TH1 cell therapy[J]. Cancer Res, 2010, 70(7): 2697-2706.
- [4] Xiang G A, Chen K Y, Wang H N, et al. Immunological influence of iodine-125 implantation in patients with hepatocellular carcinoma resection[J]. J South Med Univ, 2010, 30(2): 292-294.
- [5] Schmidt-wolf I G, Negrin R S, Kiem H P, et al. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity[J]. J Exp Med, 1991, 174(1): 139-149.
- [6] Thanendrarajan S, Kim Y, Schmidt-Wolf I, et al. New adoptive immunotherapy strategies for solid tumors with CIK cells[J]. Expert Opin Biol Ther, 2012, 12(5): 565-572.
- [7] Sangiolo D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors[J]. J Cancer, 2011, 2: 363-368.
- [8] Franceschetti M, Pievani A, Borieri G, et al. Cytokine-induced killer cells are terminally differentiated activated CD8 cytotoxic T-EMRA lymphocytes[J]. Exp Hematol, 2009, 37(5): 616-628.
- [9] Kim H M, Lim J, Yoon Y D, et al. Anti-tumor activity of ex vivo expanded cytokine-induced killer cells against human hepatocellular carcinoma[J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7(13): 1793-1801.
- [10] Chi K, Liu S J, Li C P, et al. Combination of conformal radiotherapy and intratumoral injection of adoptive dendritic cell immunotherapy in refractory hepatoma[J]. J Immunother, 2005, 28(2): 129-135.
- [11] Jakobs T F, Hoffmann R T, Tatsch K, et al. Therapy response of liver tumors after selective internal radiation therapy[J]. Radiologe, 2008, 48(9): 839-849.

(责任编辑:唐秋姗)