

## • 实验研究 •

## ACI 大鼠肝细胞癌模型的免疫化疗栓塞术研究

陈葆竑, 钱骏, 梁惠民, Vossoughi Daryusch, Oppermann Elsie, Vogl Thomas, 冯敢生

**【摘要】 目的:**评价生物反应调节剂(BRM)经肝动脉化疗栓塞术(TACE)治疗 ACI 大鼠肝细胞癌的疗效。**方法:**在 30 只雄性 ACI 大鼠肝包膜下植入 Morris Hepatom 3924A 肝癌瘤块(2 mm<sup>3</sup>),移植术后 13 天行 MRI 检查,测量肿瘤体积 V<sub>1</sub>;第 14 天时,经腹部切开术及胃十二指肠动脉逆行插管而采取以下 3 种介入治疗方案:①A 组,0.1 mg 丝裂霉素、0.1 ml 碘油、7.5 μg TNFα 和 5×10<sup>3</sup> IU IL-2 (n=10);②B 组,0.1 mg 丝裂霉素、0.1 ml 碘油、0.05 mg 链球菌提取物(OK-432)和 5×10<sup>3</sup> IU IL-2 (n=10);③C 组(对照组),0.1 mg 丝裂霉素、0.1 ml 碘油(n=10);13 天后再次行 MRI 检查以确定肿瘤体积 V<sub>2</sub> 变化。比较肝肿瘤体积生长率 V<sub>2</sub>/V<sub>1</sub>。**结果:**肿瘤治疗前和治疗后体积分别为 A 组 0.0377 cm<sup>3</sup> 和 0.2752 cm<sup>3</sup>;B 组 0.0344 cm<sup>3</sup> 和 0.2233 cm<sup>3</sup>;C 组 0.0380 cm<sup>3</sup> 和 0.3398 cm<sup>3</sup>。介入治疗后肿瘤体积与治疗前肿瘤体积之比(V<sub>2</sub>/V<sub>1</sub>)分别为 A 组 7.31、B 组 6.53、C 组 9.14。与对照组相比,采取 A 组的治疗方案能抑制肝肿瘤体积的生长(P=0.042),采取 B 组的治疗方案能明显抑制肿瘤的生长(P=0.004)。**结论:**采取免疫化疗栓塞术能有效抑制 ACI 大鼠肝细胞癌的生长。

**【关键词】** 癌,肝细胞;化学栓塞,治疗性;放射学,介入性

**【中图分类号】** R815 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2005)12-1090-03

**Experimental Transarterial Immuno-chemoembolization of Hepatocellular Carcinoma in ACI Rats** CHEN Bao-hong, QIAN Jun, LIANG Hui-ming, et al. Department of Radiology, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, P. R. China

**【Abstract】 Objective:** To assess the value of biological response modifiers (BRM) such as tumor necrosis factor (TNFα) and OK-432 in transarterial chemoembolization (TACE) for hepatocellular carcinoma (HCC) in ACI rats. **Methods:** A solid Morris Hepatoma 3924A (2 mm<sup>3</sup>) was implanted into the liver of 30 male ACI rats. After laparotomy and retrograde placement of a microcatheter into the gastroduodenal artery, the following agents were injected into the hepatic artery (14 days after implantation): (A) Mitomycin (0.1 mg) + Lipiodol (0.1 ml) + TNα (7.5 μg) + IL-2 (5×10<sup>3</sup>) (n=10); (B) Mitomycin (0.1 mg) + Lipiodol (0.1 ml) (OK-432 (0.05 mg) + IL-2 (5×10<sup>3</sup>) (n=10); (C) Mitomycin (0.1 mg) + Lipiodol (0.1 ml) (n=10, control group). The tumor volumes before treatment (V<sub>1</sub>) and after treatment (V<sub>2</sub>) were determined by MRI and the tumor growth ratio (V<sub>2</sub>/V<sub>1</sub>) was calculated. **Results:** The mean tumor volumes of V<sub>1</sub> and V<sub>2</sub> were 0.0377 cm<sup>3</sup> and 0.2752 cm<sup>3</sup> in group A, 0.0344 cm<sup>3</sup> and 0.2233 cm<sup>3</sup> in group B, 0.0380 cm<sup>3</sup> and 0.3398 cm<sup>3</sup> in group C, respectively. The resulting mean ratios (V<sub>2</sub>/V<sub>1</sub>) were 7.31 in group A, 6.53 in group B and 9.14 in group C, respectively. Compared with group C (control group), groups A and B both showed significant inhibition of tumor growth within the period of observation (P=0.042 and 0.004, respectively). **Conclusion:** The growth of HCC can be obviously inhibited by utilizing the combined transarterial immuno-chemoembolization therapy in ACI rats.

**【Key words】** Carcinoma, hepatocellular; Chemoembolization, therapeutic; Radiology, interventional

肝癌作为癌中之王及世界上第四大恶性肿瘤,每年患病者已逾 100 万人<sup>[1]</sup>。在中国,每年约 22 万人死于原发性肝癌<sup>[2]</sup>。肝癌患者的预后不良,可切除性肝癌不足 30%<sup>[3]</sup>。目前,经肝动脉化疗栓塞术(transarterial chemoembolization, TACE)被公认为治疗不可切除性肝癌的一种重要手段,但迄今为止,其疗效尚难

以完全令人满意。究其原因,与 TACE 治疗后肝肿瘤的复发和转移有关。近年来,生物反应调节剂(biological response modifier, BRM)正逐渐应用于经 TACE 治疗肝癌的临床研究中<sup>[4]</sup>,但至今尚未在肝细胞癌这一与人类大多数肝癌病理类型相一致的动物模型上进行有关的实验研究。本研究旨在通过建立肝细胞癌大鼠模型,在此动物模型上考察经免疫化疗栓塞术治疗肝细胞癌的疗效。

## 材料与方法

### 1. 肝细胞癌同种移植术

选择雄性 ACI 大鼠作为受试动物 30 只(Harlan

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科(陈葆竑、钱骏、梁惠民、冯敢生);60590 Frankfurt, Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Frankfurt University Hospital, Germany (Vossoughi Daryusch, Oppermann Elsie, Vogl Thomas)

作者简介:陈葆竑(1966—),男,湖北人,技师,主要从事影像技术和实验研究工作。

通讯作者:钱骏, E-mail: qianjun-hcc@yahoo. com. cn

基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2001ABB134);武汉市科技计划项目基金资助(20016010118)

Winkelmann 公司提供,德国),体重  $(230 \pm 20)$  g,肝细胞癌瘤株(Morris Hepatom 3924A)由德国海德堡癌症研究中心提供。

第 1 天在 1 只大鼠胁部皮下注入  $5 \times 10^6$  肿瘤细胞,13 天后长出直径约 1.5 cm 的肿瘤结节。第 14 天将携带母瘤动物处死后取出瘤结节,选择新鲜活组织部分切取约  $2 \text{ mm}^3$  的小瘤块,植入另外 30 只大鼠肝包膜下,将肝脏送回原位并关腹。

## 2. MRI 检查

第 27 天选择 MR 仪(Sonata, 1.5 T, Siemens 公司,德国)测量肿瘤术前体积。选择手部小线圈,  $T_1$  WI: SE 序列, TR 460 ms, TE 15 ms;  $T_2$  WI: TSE 序列, TR 3170 ms, TE 99 ms; 层厚 2.0 mm, 无间距横断面扫描, 矩阵  $184 \times 256$ 。

利用公式  $V = 0.5 \times d_1 \times d_2^2$  计算肿瘤体积( $d_1$  为肿瘤最大径;  $d_2$  为与之呈垂直方向的最小径)。

## 3. 介入治疗

第 28 天再一次在大鼠正中腹作切开术,于显微镜下暴露并分离出肝总动脉及胃十二指肠动脉,在肝总动脉绕一丝线备用,再行胃十二指肠动脉逆行插管(聚乙烯微导管,内径 0.28 mm,外径 0.61 mm, Wenzel 公司,德国),经胃十二指肠动脉注药时,轻拉丝线以防止药品逆行进入腹主动脉。在注药后拔出导管时结扎胃十二指肠动脉。

免疫化疗栓塞术采用以下综合介入治疗方案:① A 组( $n=10$ ),经肝动脉注入 0.1 mg 丝裂霉素、0.1 ml 碘油、 $7.5 \mu\text{g}$   $\text{TNF}\alpha$  (Sigma 公司,德国)和  $5 \times 10^3$  IU IL-2 (Sigma 公司,德国);② B 组( $n=10$ ),经肝动脉注入 0.1 mg 丝裂霉素、0.1 ml 碘油、0.05 mg 链球菌提取物 OK-432 (Chugai Pharmaceutical 公司,日本)和  $5 \times 10^3$  IU IL-2;③ C 组( $n=10$ ) (对照组),经肝动脉注入 0.1 mg 丝裂霉素和 0.1 ml 碘油。

采取各介入治疗方案治疗 13 天后,再行 MRI 检查,测得肝肿瘤体积  $V_2$ 。计算肿瘤治疗前后的体积变化  $V_2/V_1$ , 采取  $t$  检验比较 A、B 两组与对照组 C 之间  $V_2/V_1$  的显著性差异。  $P < 0.05$ , 表明有统计学意义。

## 结 果

所有动物均存活,肝癌移植率为 100%, MRI 检查均发现肿瘤,病灶在  $T_1$  WI 上呈低信号,在  $T_2$  WI 上呈不均匀高信号,边界较清晰。

肿瘤治疗前和治疗后体积分别为 A 组  $0.0377 \text{ cm}^3$  和  $0.2752 \text{ cm}^3$ ; B 组  $0.0344 \text{ cm}^3$  和  $0.2233 \text{ cm}^3$ ; C 组  $0.0380 \text{ cm}^3$  和  $0.3398 \text{ cm}^3$ 。介入治疗后肿瘤体积与

治疗前肿瘤体积之比 ( $V_2/V_1$ ) 分别为 A 组 7.31、B 组 6.53、C 组 9.14。与对照组 C 相比,采取 A、B 两组的治疗方案均可抑制肿瘤生长,而采取 B 组的治疗方案在抑制肿瘤体积增长率方面具有极显著性意义 ( $P = 0.042$ )。A 组和 B 组均未见肝内肿瘤转移,而在对照组 C 有 2 只大鼠 (20%) 出现肝内肿瘤转移,在 A 和 C 组均有 1 例 (10%) 出现肝内肿瘤坏死 (图 1~3)。

## 讨 论

目前, TACE 被公认为治疗不可切除性中、晚期肝癌的一种重要手段,它在抑制肿瘤生长、提高患者生存率、使无法手术者获得二期手术切除的机会等方面取得明显进展,但迄今为止,其总体生存率和疗效仍欠佳,经 TACE 治疗后肿瘤的复发和转移是其中一个重要的原因<sup>[5]</sup>。

众所周知,肿瘤坏死因子  $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ) 是一种从激活的单核/巨细胞所提取的细胞素,属于 BRM,它对肿瘤细胞有直接的细胞毒作用和细胞抑制作用,是迄今所发现的直接杀伤肿瘤细胞作用最强的一种生物活性因子。Watanabe 等<sup>[6]</sup>通过实验证明,在兔经肝动脉注入  $\text{TNF}\alpha$  和碘油乳剂可产生显著的抗癌效应。Yang 等<sup>[7]</sup>亦发现,在大鼠注入  $\text{TNF}\alpha$  并结扎肝动脉能明显抑制肝肿瘤的生长。肝动脉灌注 IL-2、 $\text{TNF}\alpha$  之所以取得了较好的临床效果,这是因为经肝动脉灌注 IL-2、 $\text{TNF}\alpha$  等细胞因子直接到达肿瘤局部,既减少了用量,又能充分发挥细胞因子的局部抗肿瘤作用,且局部灌注 IL-2 同样作用于肿瘤患者机体免疫系统,提高肿瘤患者的免疫力,克服单纯化疗栓塞疗法使肿瘤患者免疫功能低下的不良反应<sup>[8]</sup>。本研究是建立在一种理想的肝细胞癌大鼠模型之上,该模型与人类大多数肝癌病理类型相一致。与以往的动物实验相比,该实验研究具有更强的科学性和说服力<sup>[9]</sup>,也更接近临床上治疗肝癌的 TACE 三明治疗法。本实验证明,采用丝裂霉素、碘油、 $\text{TNF}\alpha$  和 IL-2 的联合治疗方案经 TACE 途径治疗大鼠肝细胞癌能抑制肝肿瘤的生长和复发。

链球菌提取物 OK-432 是 A 群链球菌冻干的产物,也是一种细菌免疫强诱导剂,在日本已广泛用于肿瘤的辅助治疗。在临床上将 OK-432 注入肝动脉并结合化疗术能增强丝裂霉素的抗癌作用,这是因为 OK-432 对肿瘤细胞具有直接的细胞毒作用和细胞抑制作用,能抑制肿瘤 RNA 和 DNA 的合成,而化疗药可增强肿瘤细胞对 OK-432 的敏感性及其抗癌效应,OK-432 和 IL-2 均能增强 NK 细胞和 LAK 细胞的活性,并有协同作用<sup>[10,11,12]</sup>。另外,有关组织学病理检查

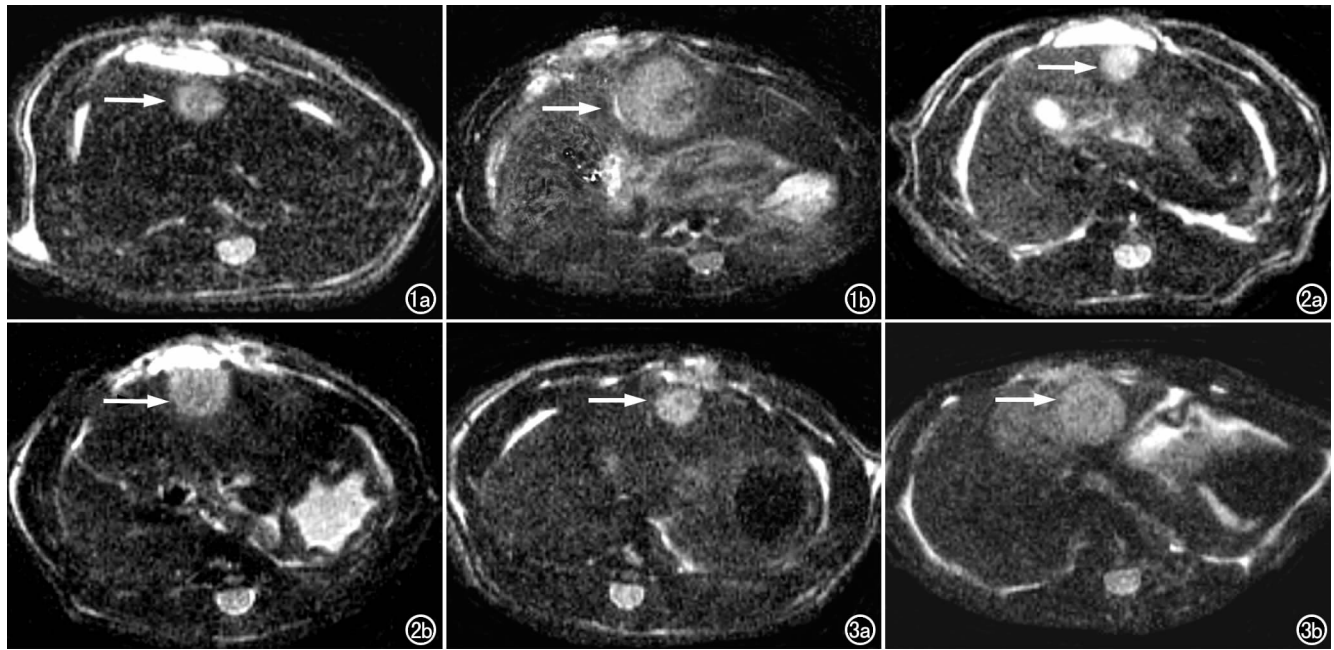


图 1 A 组经 TACE 治疗前后肝肿瘤 MRI( $T_2$ WI)表现。a) 介入治疗前肝左叶有一较小的类圆形高信号病灶(箭); b) 介入治疗后肿瘤体积稍增大, 肿瘤内部出现坏死灶(箭), 未见肝内肿瘤转移。图 2 B 组经 TACE 治疗前后肝肿瘤 MRI( $T_2$ WI)表现。a) 介入治疗前肝左叶有一较小的类圆形高信号病灶(箭); b) 经介入治疗后肿瘤体积略增大(箭), 但未见肝内肿瘤坏死和转移。图 3 C 组经 TACE 治疗前后肝肿瘤 MRI( $T_2$ WI)表现。a) 经介入治疗前肝左叶有一较小的类圆形高信号病灶(箭); b) 介入治疗后肿瘤体积与术前相比明显增大(箭), 且发现肝内肿瘤转移。

结果证实, 经肝动脉注入 OK-432 结合肝动脉栓塞术能明显抑制肝肿瘤的转移和复发, 并提高机体的免疫力和患者的生存率<sup>[13]</sup>。本实验首次尝试将肝动脉注射 OK-432 与化疗术、栓塞术结合起来, 实验证明, 该免疫化疗栓塞术能明显抑制肝肿瘤的生长和防止肿瘤的复发, 与对照组相比, 在肝肿瘤体积增长率方面具有极显著性意义。

综上所述, 经肝动脉注射生物反应调节剂  $TNF\alpha$  和 OK-432 并联合肝动脉化疗术和栓塞术的疗法能明显抑制肝肿瘤的生长, 有着良好的临床应用前景。当然, 其准确的作用机制及其适应证、并发症等还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Cha C, DeMatteo RP, Blumgart LH. Surgery and Ablative Therapy for Hepatocellular Carcinoma[J]. J Clin Gastroenterol, 2002, 35(1): S130-S137.
- [2] 常旭. 原发性肝癌的治疗[M]. 河南: 河南医科大学出版社, 1999. 1.
- [3] Sasson AR, Sigurdson ER. Surgical Treatment of Liver Metastases[J]. Semin Oncol, 2002, 29(2): 107-118.
- [4] Yoshida T, Sakon M, Umeshita K, et al. Appraisal of Transarterial Immunoembolization for Hepatocellular Carcinoma: a Clinicopathologic Study[J]. J Clin Gastroenterol, 2001, 32(1): 59-65.
- [5] 钱骏, 冯敢生. 原发性肝癌的综合介入治疗[J]. 中华肿瘤杂志, 2003, 25(5): 417-419.

- [6] Watanabe D, Ueo H, Inoue H, et al. Antitumor Effects of Intraarterial Infusion of Tumor Necrosis Factor/Lipiodol Emulsion on Hepatic Tumor in Rabbits[J]. Oncology, 1995, 52(1): 76-81.
- [7] Yang R, Liu Q, Rescorla FJ, et al. Experimental Liver Cancer: Improved Response After Hepatic Artery Ligation and Infusion of Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interferon-Gamma [J]. Surgery, 1995, 118(1): 768-774.
- [8] 葛焕琦, 李东复, 杨海山. 肝动脉化疗栓塞同时灌注白细胞介素 1 和肿瘤坏死因子治疗肝癌[J]. 中华医学杂志, 1998, 78(2): 156-157.
- [9] 钱骏, 冯敢生, Trubenbach J, 等. 同种移植大鼠肝细胞癌模型的建立及其磁共振表现[J]. 中华放射学杂志, 2002, 36(5): 455-458.
- [10] Uehara K, Ichida T, Sugahara S, et al. Systemic Administration of Liposome-Encapsulated OK-432 Prolongs the Survival of Rats with Hepatocellular Carcinoma Through the Induction of IFN-Gamma-Producing Hepatic Lymphocytes [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2002, 17(1): 81-90.
- [11] Nio Y, Nagami H, Tamura K, et al. Multi-Institutional Randomized Clinical Study on the Comparative Effects of Intracavitary Chemotherapy Alone Versus Immunotherapy Alone Versus Immunotherapy for Malignant Effusion [J]. Br J Cancer, 1999, 80(5-6): 775-785.
- [12] Qian J, Feng GS, Vogl TJ. Combined Interventional Therapies of Hepatocellular Carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(9): 1885-1891.
- [13] Yoshida T, Sakon M, Umeshita K, et al. Appraisal of Transarterial Immunoembolization for Hepatocellular Carcinoma: a Clinicopathologic Study[J]. J Clin Gastroenterol, 2001, 32(1): 59-65.

(收稿日期: 2005-03-10 修回日期: 2005-06-21)