

文章编号: 0258-7025(2008)04-0631-04

# 光动力法制备抗小鼠 H22 肝癌的肿瘤疫苗

张红雨<sup>1</sup> 马文江<sup>2</sup> 邹朝晖<sup>1</sup> 高卫平<sup>1</sup> 薛志孝<sup>1</sup> 李迎新<sup>1</sup>

(天津医科大学<sup>1</sup> 生物医学工程系激光医学实验室, <sup>2</sup> 眼科中心检验科, 天津 300070)

**摘要** 研究了光动力疗法(PDT)制备的抗小鼠 H22 肝癌肿瘤疫苗的抗瘤效应。将昆明鼠 60 只,随机分为 2 组,每组 30 只。实验组取 6~12 周龄的昆明鼠背部皮下接种光动力疗法产生的疫苗,每 3 天注射一次,每次注射 50  $\mu\text{L}$  (相当于  $3 \times 10^5$  个细胞),连续两周。隔一周于第 22 天注射 H22 肿瘤细胞悬液 0.1 mL ( $1 \times 10^6$  个细胞);对照组:每周每次注射 50  $\mu\text{L}$  生理盐水,连续两周。隔一周于第 22 天注射 H22 肿瘤细胞悬液 0.1 mL ( $1 \times 10^6$  个细胞)。比较两组的抑瘤率、生存率以及两组之间免疫学的相关指标。结果表明,实验组小鼠具有显著的抑瘤效果,抑瘤率、生存率较对照组有显著提高。实验组肿瘤抑瘤率最高可达 60% 且长期有效,100 天生存率达 56%。说明光动力疗法产生的抗小鼠 H22 肝癌疫苗可以有效地抑制肿瘤生长,提高荷瘤小鼠的生存率,具有明显的抗瘤效应。该方法可能成为一种辅助性治疗肿瘤的手段而应用于临床。

**关键词** 医用光学;光动力疗法;肿瘤疫苗;免疫调节;昆明鼠

**中图分类号** R 735.7;R 730.57 **文献标识码** A

## Generation of Antitumor Vaccines for H22 Tumor on Mouse Using Photodynamic Therapy

Zhang Hongyu<sup>1</sup> Ma Wenjiang<sup>2</sup> Zou Zhaohui<sup>1</sup>  
Gao Weiping<sup>1</sup> Xue Zhixiao<sup>1</sup> Li Yingxin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Laser Medicine Laboratory of Biomedical Engineering Department, <sup>2</sup>Clinical Laboratory of Eye Centre, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract** To test the contribution of the direct effects of photodynamic therapy (PDT) on tumor cells, we examined the immunogenicity of PDT-generated murine tumor cell lysates in a preclinical vaccine model. Sixty Kunming mice (H22 tumor host) were divided into two groups randomly and equally. Six to twelve-week-old Kunming mice were vaccinated intradermally on the right shoulder with 50  $\mu\text{L}$  lysates ( $3 \times 10^5$  cell equivalents) for experimental group or medium control for control group every three days during two weeks. The mice rested a week and then inoculated on the flank with  $1 \times 10^6$  tumor cells harvested from exponentially growing cultures. And then we compared antitumor rate, survival rate and relevant indicators of immunology between two groups. PDT vaccines could inhibit the tumor growth rate compared to the contrast group. The tumor inhibition rate of PDT vaccines group was 60% and long-term available. The survival rate of PDT vaccines group at 100 day was 56% which was significantly higher than contrast group. Our studies suggest that PDT-generated vaccines could effectively inhibit tumor growth, improve survival rate of mice in experimental group, and enhance antitumor immune response significantly. PDT-generated vaccines may have well clinical potential as an adjuvant therapy.

**Key words** medical optics; photodynamic therapy; tumor vaccine; immune regulation; Kunming mouse

## 1 引 言

光动力疗法(PDT)是将一定波长的激光和光敏

剂相结合的治疗肿瘤的方法<sup>[1]</sup>。国外大量的临床实验研究表明光动力疗法可以增强机体的免疫反应,

收稿日期:2007-09-21;收到修改稿日期:2007-10-31

作者简介:张红雨(1976—),男,山西人,博士研究生,主要从事光动力治疗肿瘤的研究。

E-mail: hongyushen2008@yahoo.com.cn

导师简介:李迎新(1959—),男,教授,博士生导师,主要从事激光医学方面的研究。

E-mail: yingxinli@tjmu.edu.cn (通信作者)

但是机制尚不清楚<sup>[1,2]</sup>。国内也有关于光动力疗法可以调节 Louis 肿瘤小鼠免疫功能的研究<sup>[3]</sup>。另有研究报道,光动力疗法可以刺激一些炎性因子的表达,其中包括肿瘤坏死因子  $\alpha$ , 白介素 6 和白介素 1 等<sup>[1,4~7]</sup>。

虽然,目前大多数的研究主要集中在应用基因工程技术或者肿瘤相关抗原诱导 DC 制备肿瘤疫苗<sup>[8~11]</sup>。但是基因工程技术或者肿瘤相关抗原诱导 DC 制备的肿瘤疫苗大部分仍处于实验研究阶段,而且 Bancheau 等<sup>[8]</sup>指出这些方法大规模实现免疫是不切实际的。而光动力疗法是一种治疗肿瘤的新方法,光动力疗法制备肿瘤疫苗越来越展现出良好的应用前景,已经逐渐成为肿瘤治疗领域一个新的研究热点。而激光光源、光敏剂的选择和剂量等参数对光动力疗法效果有着至关重要的影响<sup>[12,13]</sup>。

## 2 材料与方法

昆明种小鼠 60 只,清洁级。鼠龄 6~12 周,体重 18~20 g,雌雄各半,天津动物实验中心提供。小鼠肝癌瘤株从中国医学科学院肿瘤研究所引进。血卟啉单甲醚(HMME)为上海红绿光敏剂研究所有限公司产品。半导体激光器,波长 630 nm,石英光纤传输,光纤芯径 400  $\mu\text{m}$ ,天津医科大学激光医学实验室研制。

用 1640 加 10% 胎牛血清和抗生素,体外培养 H22 肿瘤细胞,向细胞培养液中加入 150  $\mu\text{g}$  HMME 浓度 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,经过 3 h 培养;随后将细胞  $1 \times 10^7/\text{mL}$  移入不含有 HMME 的培养液中培养 20~30 min;将肿瘤细胞置入不含有血清的培养液中,采用 630 nm 的激光照射肿瘤细胞(激光的能量密度约 0.8~1  $\text{J}/\text{cm}^2$ )培养 24 h 后,将收集到的细胞和上清液离心去除细胞碎片和任何残留活着的细胞,得到的液体冷冻 -70  $^{\circ}\text{C}$  保存,以供疫苗注射使用。

昆明鼠随机分为 2 组,每组 30 只。实验组光动力疗法产生的疫苗每 3 天注射一次,每次注射 50  $\mu\text{L}$  (相当于  $3 \times 10^5$  个细胞),连续两周。一周以后再注射 H22 肿瘤细胞悬液 0.1 mL ( $1 \times 10^6$  个细胞);对照组每周每次注射 50  $\mu\text{L}$  生理盐水,连续两周。一周以后再注射 H22 肿瘤细胞悬液 0.1 mL ( $1 \times 10^6$  个细胞)。

每天观察各组小鼠瘤体的生长情况。每 2~3 天测定计算一次瘤体体积,观察 100 天或者瘤体体积大于 400  $\text{mm}^3$ 。测量方法为用游标卡尺按直角测

量肿瘤的长轴和短轴,最后计算肿瘤体积  $V = \frac{1}{2}ab^2$ ,  $a$  为长轴,  $b$  为短轴。根据  $V$  计算出肿瘤体积抑瘤率

抑瘤率 =

$$\frac{\text{对照组肿瘤体积} - \text{实验组肿瘤体积}}{\text{对照组肿瘤体积}} \times 100\%$$

准确记录每只小鼠死亡时间,计算各组小鼠的生存率。

在最后一次接种疫苗一周后,分别对实验组和对照组的 15 只小鼠眼眦血 1 mL 进行流式细胞分析,然后处死。分别检测  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD8}^+$ ,  $\text{CD19}^+$  细胞,实验结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{X} \pm s$ ) 表示,观察两组的免疫学指标。

## 3 结果

### 3.1 体积抑瘤率曲线

图 1 为抑瘤率变化曲线,表明在动物肿瘤模型中光动力疗法制备的疫苗对肿瘤动物模型具有很好的保护性,在很大程度上可以有效抑制肿瘤的生长,体积抑瘤率最高可以达到 60%,而且抑瘤时间持续长久。

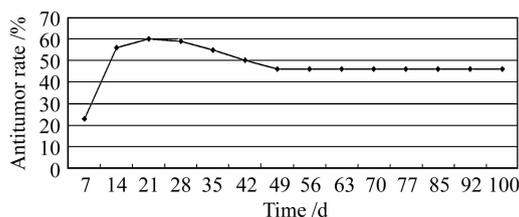


图 1 体积抑瘤率随时间的变化曲线

Fig. 1 Real-time variation curve of antitumor rate

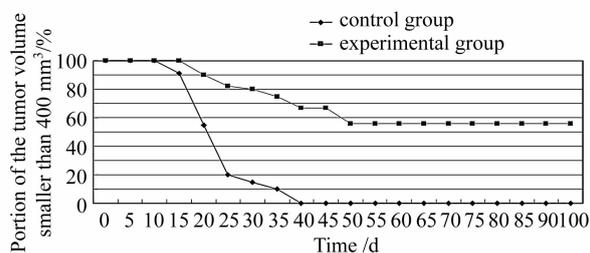


图 2 肿瘤体积小于 400  $\text{mm}^3$  小鼠的百分比随时间的变化曲线

Fig. 2 Real-time variation curve of the portion of the tumor volume smaller than 400  $\text{mm}^3$

### 3.2 实验组和对照组生存率曲线

对照组 15 只小鼠均于 40 天左右死亡;而实验组小鼠生存期明显延长,至 100 天生存率为 56% (见图 2)。

为了检测光动力疗法制备的肿瘤疫苗是否具有特异性,用抗 H22 肿瘤疫苗免疫小鼠后,接种 S180 瘤株,发现其对接种 S180 瘤株的小鼠没有任何抑制作用,表明光动力疗法制备的肿瘤疫苗具有特异性。

### 3.3 实验组和对照组流式细胞分析结果

为了进一步了解机体经过光动力疗法制备的疫苗处理后的反应,采用流式细胞仪对小鼠的眼眦血进行免疫学细胞计数分析,实验结果以 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> 细胞所占百分比表示,如表 1 所示。采用方差分析的方法比较实验组和对照组 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> 细胞数百分比之间的差异,所有统计学分析采用统计分析软件 SPSS11.0 完成,假设检验水准为 0.05。

表 1 实验组和对照组免疫学指标检测值 ( $\bar{X} \pm s$ )

Table 1 Immunological index of experimental group and control group ( $\bar{X} \pm s$ )

Index	Experimental group /%	Control group /%
CD4 <sup>+</sup>	39.15 ± 3.18	28.67 ± 2.87
CD8 <sup>+</sup>	23.18 ± 3.39	14.79 ± 1.72
CD19 <sup>+</sup>	36.11 ± 3.35	24.79 ± 3.02

Note:  $P < 0.05$ .

## 4 讨论

实验组的 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> 细胞数明显高于对照组,分别提高了 36.5%, 56.7%, 45.6%, 且差别具有统计学意义。我们知道,细胞免疫对肿瘤的排斥占有极其重要的地位,其中 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 淋巴细胞都能识别肿瘤细胞,而 CD8<sup>+</sup> 淋巴细胞还可通过溶解作用直接杀伤许多肿瘤细胞,因此是抗肿瘤的主要效应细胞。实验组 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞数高于对照组,说明在光动力疗法条件下制备的肿瘤疫苗启动了机体的细胞免疫系统,而 CD19<sup>+</sup> 升高可能是 T 淋巴细胞活化、增殖和分化为效应辅助细胞 (TH)。TH 细胞可以通过抗原桥与 B 细胞相互作用,促使 B 细胞活化,增殖分化。实验组小鼠体内 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> 细胞数的增加,证明小鼠机体免疫力增高,从而达到抑制肿瘤生长的目的,使得实验组小鼠的抑瘤率、生存率明显高于对照组。

## 5 结论

Sandra O. Gollnick, Mladen Korbelik 等采用血卟啉衍生物 (HpD) 制备肿瘤疫苗也显示出一定的抗肿瘤效应,由于 48~72 h 的时候 HpD 在肿瘤细胞内的浓度最高,所以这种光动力疗法制备的肿

瘤疫苗需要 72 h 左右<sup>[14,15]</sup>,本文选择 HMME 作为光敏剂可以缩短肿瘤疫苗制备时间在 4 h 左右。HMME 属于国产第二代光敏剂,价格便宜且更加符合理想光敏剂的特点,而且对肿瘤细胞更有选择性,与国外的第二代光敏剂相似,表现为光敏期短,作用的光波波长较长,因而增加了作用的深度,产生的单态氧较多,而单态氧浓度的高低对光动力疗法的效果有着直接的影响<sup>[16]</sup>。因此选择 HMME 为光敏剂,以波长 630 nm 激光作为光源,制备抗 H22 肝癌小鼠肿瘤疫苗,观察实验组的抗瘤效应。结果显示,光动力疗法制备的肿瘤疫苗具有明显的抗肿瘤效果,可以明显抑制肿瘤生长。

光动力疗法制备的肿瘤疫苗,在不久的将来也许可以作为一种治疗手段应用在肿瘤治疗方面。实验研究应用光动力疗法制备肿瘤疫苗,并将其应用于小鼠肝癌实验且获得了成功,为进一步临床实验提供了重要的参数和依据。但是疫苗的制备以及进一步纯化是一个很复杂的问题,值得进一步深入研究。

## 参 考 文 献

- 1 Thomas J. Dougherty, Charels J. Gomer, Barbara W. Henderson *et al.*. Photodynamic therapy [J]. *Journal of National Cancer Institute*, 1998, **90**(12):889~905
- 2 Mladen Korbelik, Graeme J. Dougherty. Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors [J]. *Cancer Research*, 1999, **59**:1941~1946
- 3 Luo Ronghui, Chen Xiangcai, Liu Wanhua *et al.*. Injurious and immune effect of photodynamic therapy on mice bearing lousis lung cancer [J]. *Chinese J. Lasers*, 2002, **A29**(8):763~765  
罗荣辉,陈香才,刘婉华等. 光动力疗法对 Louis 肺癌鼠的杀伤及免疫效应[J]. *中国激光*, 2002, **A29**(8):763~765
- 4 Sandra O. Gollnick, Xiaonan Liu, Barbara Owczarczak *et al.*. Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy in vivo [J]. *Cancer Research*, 1997, **57**:3904~3909
- 5 Mladen Korbelik, Jinghai Sun, Ivana Cecic. Photodynamic therapy-induced cell surface expression and release of heat shock proteins: relevance for tumor response [J]. *Cancer Research*, 2005, **65**:1018~1026
- 6 Ivana Cecic, Mladen Korbelik. Mediators of peripheral blood neutrophilia induced by photodynamic therapy of solid tumors [J]. *Cancer Letters*, 2002, **183**:43~51
- 7 S. O. Gollnick, S. S. Evans, H. Baumann *et al.*. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation [J]. *British Journal of Cancer*, 2003, **88**:1772~1779
- 8 Jacques Banchereau, Beatrice Schuler-Thurner, A. Karolina Palucka *et al.*. Dendritic cells as vectors for therapy [J]. *Cell*, 2001, **106**:271~274
- 9 Niu Hongquan, Dong Zhen, Dong Fangyong *et al.*. Experimental and clinical research of dendritic cell and syngeneic immunotherapy of brain glioma [J]. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 2004, **3**(3):147~150
- 10 Bingya Liu, Xuehua Chen, Qinlong Gu *et al.*. Antitumor

- effects of vaccine consisting of dendritic cells plused with tumor RNA from gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2004, **10**(5): 630~633
- 11 Bela Bodey, Bela Bodey JR, Stuarde Siegel *et al.*. Failure of cancer vaccines; the significant limitations of their approach to immunotherapy [J]. *Anticancer Research*, 2000, **20**: 2665~2676
- 12 Cheng Gang, Zhong Qiuhai, Liu Fanguang *et al.*. Modeling and simulation of the acting factors on vascular selectivity of photodynamic therapy [J]. *Chinese J. Lasers*, 2005, **32**(6): 864~868  
程 刚, 钟秋海, 刘凡光 等. 鲜红斑痣光动力治疗模型仿真初步研究[J]. *中国激光*, 2005, **32**(6): 864~868
- 13 Gao Bowen, Meng Jing, Fang Yun *et al.*. Transient-grating of hypocrellin in photodynamic therapy based on three-dimensional degenerative four-wave mixing [J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(6): 1071~1075  
高博文, 孟 婧, 方 芸 等. 基于三维简并四波混频的 PDT 光敏剂 HA 瞬态光栅特性研究[J]. *光学学报*, 2007, **27**(6): 1071~1075
- 14 Sandra O. Gollnick, Lurine Vaughan, Barbara W. Henderson. Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy [J]. *Cancer Research*, 2002, **62**: 1604~1608
- 15 Mladen Korbelik, Jinghai Sun. Photodynamic therapy-generated vaccine for cancer therapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2006, **55**: 900~909
- 16 Cheng Gang, Zhong Qiuhai, Huang Naiyan *et al.*. Mathematics modeling and clinic experiment of photodynamic therapy for port wine stain [J]. *Chinese J. Lasers*, 2006, **33**(6): 857~862  
程 刚, 钟秋海, 黄乃艳 等. 鲜红斑痣光动力治疗数学模型及临床验证[J]. *中国激光*, 2006, **33**(6): 857~862