维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2001)04-0372-03

高强度聚焦超声固化瘤苗的研制

付 敏[1],赖春冬[1],周 擎[1],伍 烽[2],白 晋[2],王智彪[2]

(1.重庆市第一人民医院肿瘤科 重庆 400011;2.重庆医科大学医学超声工程研究所 重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨运用高强度聚焦超声治疗系统(HIFU)制备小鼠肝癌 H_{22} 固化瘤苗的方法,并初步评价瘤苗的免疫活性。方法:应用 HIFU 治疗系统样机分别在声强 246W/cm^2 和 1054W/cm^2 下处理小鼠肝癌 H_{22} 细胞。结果:声强 1054W/cm^2 下细胞破裂成碎片状,而声强 246W/cm^2 细胞外形基本如常,前者作为瘤苗具有明显强的抗肿瘤细胞攻击作用 $P<0.05$。结论:HIFU 能一次性灭活肿瘤细胞,并在一定声强下破坏肿瘤细胞膜结构使细胞内抗原充分暴露和释放,从而增加了瘤苗免疫原性。

【关键词】HIFU;固化瘤苗;免疫

【中图图书分类法分类号】R703.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2000-12-01

The study and development of solidification vaccine against tumor with high Intensity focused ultrasound

FU Min, et al

(Tumor Department of Chongqing No. 1 Renmin Hospital)

【Abstract】 ***Objective***: To discuss the method of using High Intensity Focused Ultrasound (HIFU) System for tumor therapy to study and develop a solidification vaccine against mouse hepatic cancer H_{22} cell and to make elementary evaluation of the vaccine immunocompetence. ***Methods***: A Sample machine of HIFU System for tumor therapy with its sound intensity set as 246 W/cm^2 and 1054W/cm^2 was adopted to deal with mouse hepatic cancer H_{22} cell. ***Results***: Under the sound intensity of 1054 W/cm^2, cells were observed to fall into pieces while the cells remained the normal shape under the sound intensity of 246W/cm^2. It was discovered that the vaccine in the former situation was strongly effective in resisting the attack from tumor cells, with $P<0.05$. ***Conclusion***: HIFU can destroy tumor cells all at once, destroy cell membrane structure under certain sound intensity and make the complete explosion and release of intracellular antigen so as to enhance the immunogenicity of vaccine.

【Key words】 HIFU; Solidification vaccine against tumor; Immunity

高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)是近年新兴的一种局部治疗实体肿瘤的高新技术,它是利用超声声束具有可汇聚性、穿透性的特点,来达到准确杀灭肿瘤细胞的作用。本研究将体外肿瘤细胞用 HIFU 治疗系统灭活以期制成固化瘤苗,为进一步研究 HIFU 固化瘤苗的免疫活性提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器 HIFU 治疗系统样机(重庆医科大学医学超声工程研究所研制)、BACKMAN 离心机、高温水浴箱、高压消毒锅、倒置显微镜、聚乙烯无底有盖试管(用清洗干净的普通避孕套包扎底部)。

1.2 瘤株 小鼠肝癌 H_{22} 细胞,源自昆明系小鼠(重庆医科大学医学超声工程研究所提供)。

1.3 细胞悬液的配制 将小鼠肝癌 H_{22} 细胞复苏,接种于成年健康小鼠腹腔内,一周后在无菌操作下吸收腹水(如遇血性腹水,用比重为 1.088 的 ficoll 分离液现配成双层不连续梯度分离液,其中上层为 75%,下层为 100%,经离心除去红细胞),离心洗涤后,用 0.9% NS 调节细胞浓度至 5×10^6/ml[1]。

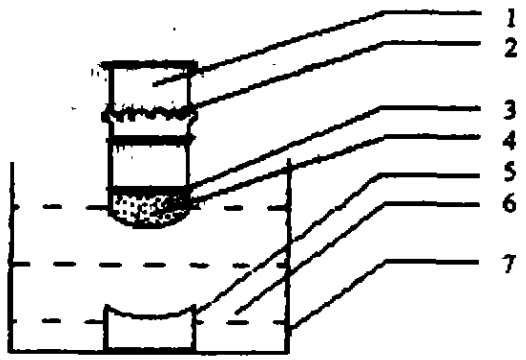
1.4 肿瘤细胞悬液的处理 将调配好的细胞悬液分装入无

作者介绍:付 敏(1968-),女,主治医师,重庆人,主要研究方向:HIFU 固化瘤苗的免疫研究

基金项目:国家"九五"重点科技攻关项目(9600905-020001)

维普资讯 http://www.cqvip.com

菌聚乙烯试管内，每管 1ml，如图 1 随机分两组用 HIFU 治疗样机采用不同超声剂量 246W/cm^2×140s 和 1054W/cm^2×40s[2]处理，其余指标相同(焦距 129mm、频率 0.8MHz)。同时将相同浓度的细胞悬液 65℃高温水浴 1h，对癌细胞进行高温固化，低温保存备用。



1.试管　2.避孕套　3.绑线　4.细胞悬液
5.换能器　6.脱气水　7.水槽

图 1　HIFU 制备瘤苗装置示意图

1.5　肿瘤细胞活性检测　将 HIFU 处理后的细胞悬液静置 1h[3]后，台盼蓝染色光镜下观察；另外取此细胞悬液 100μl 于 24 微孔板内，同时加入 RPMI1640 完全培养液和 5mg/ml MTT100μl 培养 4h，倒置显微镜下观察。相同浓度未经处理的细胞悬液和高温处理后的细胞悬液也用上述同法检测。

1.6　小鼠抗癌攻击实验　将封闭群成年昆明雌性小鼠 80 只随机分为四组，分别用上述两种超声剂量处理后的细胞悬液、生理盐水和高温处理后的细胞悬液各 0.2ml/只皮下注射，每周一次，连续四周后再用同源 H_{22} 10^6 个癌细胞攻击，连续观察 1 月内小鼠肿瘤发生率、肿瘤大小、死亡率等，四个组两两比较。

1.7　统计处理　小鼠肿瘤大小比较用 t 检验，肿瘤发生率和死亡率比较用 χ^2 检验，显著性水平定在 $P<0.05$。

2　结　果

2.1　两组 HIFU 处理后的细胞悬液，经台盼蓝染色后光镜下见 1054W/cm^2 组肿瘤细胞完全碎裂成片并着色，未见正常胞浆、胞核形态，如图 2 左，证实细胞已完全灭活，而 246W/cm^2 组和高温组肿瘤细胞保持正常细胞形态并着色。也证实细胞完全灭活，如图 2 右，未经处理的活细胞不着色；而在 MTT 实验中 HIFU 处理组和高温处理组细胞培养倒置显微镜下观察无蓝紫色结晶物沉积于细胞中，证实细胞已完全灭活，而未经处理的活细胞培养会产生结晶。

2.2　四组小鼠受 H_{22} 癌细胞攻击后 1 月肿瘤发生率、肿瘤平均体积、死亡率见表 1：

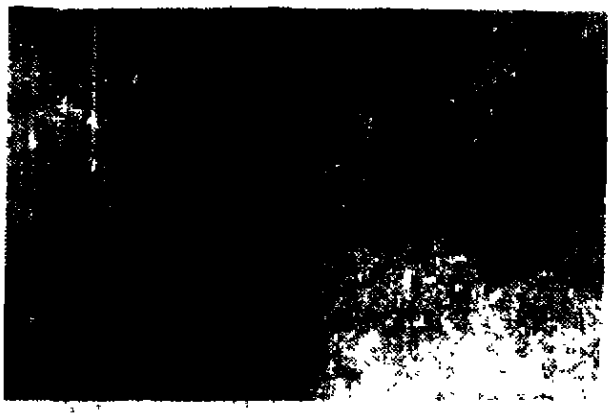


图 2　左 H_{22} 肿瘤细胞经 1054W/cm^2×40s 超声剂量处理后细胞破裂成碎片状，未见正常细胞形态。
右 H_{22} 肿瘤细胞经 246W/cm^2×140s 超声剂量处理后细胞外形大致如常，但细胞已完全灭活。(台盼蓝染色×200)

表 1　四组小鼠受 H_{22} 癌细胞攻击后 1 月情况

组别	肿瘤发生率(%)	肿瘤平均体积(cm^3)	死亡率(%)
对照组	100	85.62±22.40	85
高温组	80	56.51±20.32	65
246W/cm^2 组	45*	52.45±19.84*	40*
1054W/cm^2 组	15*▲△	9.27±3.65*▲△	10*▲△

与对照组比较 * $P<0.05$ * * $P<0.001$
与高温组比较 * $P>0.05$ * * $P<0.05$
与 246W/cm^2 组比较 △ $P<0.05$

经 HIFU 固化瘤苗免疫过的小鼠，能抵抗同源 H_{22} 10^6 个癌细胞的攻击，肿瘤发生率、肿瘤平均体积、死亡率与对照组比较均有明显降低，有显著性差异，$P<0.05$。HIFU1054W/cm^2 组比 246W/cm^2 组和高温组有更为优越的抗癌攻击作用，$P<0.05$。

2.3　对用 H_{22} 癌细胞攻击未发病的免疫鼠，经长达 5 个月的连续观察，曾注射固化瘤苗部位和接种 H_{22} 癌的局部，均未发现促癌生长或复发现象，且凡成功抵抗 H_{22} 癌攻击的免疫鼠，再次用 10^6 个 H_{22} 癌细胞攻击，仍均不发病。

3　讨　论

固化瘤苗是利用热生物效应使组织凝固坏死并释放变性的蛋白质，作为抗原物质刺激机体免疫机能。它的自主免疫抗癌作用已为动物实验和临床应用的免疫效应所证实[4]。黄皎琳[5]等发现 65℃制

维普资讯 http://www.cqvip.com

备的高温固化瘤苗具有癌特异性抗原物质，能激发特异性细胞免疫效应。本研究发现，声强 1054W/cm^2，辐照时间 40s 时，除热效应外，HIFU 的空化和机械效应使肿瘤细胞破裂，形成碎片状结构，表明 HIFU 的非热学机制在治疗肿瘤中亦发挥了重要的作用。该作用的发生可能使肿瘤细胞的免疫原性最大可能得到保留。为使细胞悬液完全或超范围被焦域覆盖，我们一次处理悬液不超过 1ml，且采用声阻抗值与人体接近，能很好透过超声波的聚乙烯试管。管底用避孕套包扎，具有无毒，抗渗透和抗冲击波的优点。

一系列研究[6,7]均显示了 HIFU 治疗肿瘤的可靠性和安全性。其中热坏死对肿瘤的局部作用显然是主要的。这是它与其它普通高温技术如电磁波和微波相同之处，也是它对肿瘤局部治疗作用之一。但 HIFU 的非热学机制可能使肿瘤细胞的细胞膜碎片状结构和因细胞破裂致细胞内结构的显露，致这些物质可以作为抗原物质刺激机体免疫机能，使机体恢复对肿瘤的免疫应答，产生特异性细胞免疫[5]，抑制肿瘤生长。黄皎琳等利用高温的热生物效应改变肿瘤细胞的抗原性，使其成为修饰抗原。对肝癌开展固化留置(瘤苗)免疫或自体癌固化瘤苗免疫，临床有效率为 76.8%，与对照组(40.5%)比较疗效差异显著。他们在系列实验研究中均证实了高温固化留置瘤苗和自体癌固化瘤苗的免疫功能，并经 LSAB 免疫组化(改良法)染色证实高温—固化瘤苗中含经高温修饰的癌细胞核内抗原。Kaketa 及其同事[8]指出 HIFU 治疗小鼠后对肿瘤的生长发生了很好的抑制作用，而且再接触 Horie's 肉瘤未见生长。Rosberger[9]等用 HIFU 治疗脉络膜黑色素瘤病人，通过测量治疗前及治疗后一周患者 CD_4/CD_8 的比率来监测其免疫功能的变化，结果发现所有病人在治疗后一周 CD_4/CD_8 的比率均发生逆转。Burov[8]等应用 HIFU 治疗种植于兔睾丸的肿瘤，发现不仅治疗部位的肿瘤被排除，而且转移的结节也消失。它们都证实了 HIFU 固化肿瘤诱发机体免疫功能的存在。

王智彪、伍烽[10,11]等研究认为 HIFU 具有传统热疗所不具备的空化效应、机械效应和其它化学效应，所以经 HIFU 处理后的细胞与高温处理后细胞有质的变化，一般 65℃ 高温水浴 1h 的细胞完全死亡，但细胞外观大致如常，而声强 1054W/cm^2 下 HIFU 将细胞撕裂，可使肿瘤细胞胞浆和细胞核内抗原充分暴露和释放，势必提高瘤苗的免疫表达率，增强瘤苗刺激主动抗肿瘤免疫产生的能力，实现了提高细胞抗原性的目的。由此也证实了在临床治疗中观察到的 HIFU 有增强患者免疫力，抑制肿瘤远处转移的作用，这正是 HIFU 的免疫远位效应所致。

初步动物实验结果提示：HIFU 制备固化瘤苗为肿瘤免疫治疗提供了新思路，但 HIFU 制备瘤苗究竟有多大的免疫活性，其增强免疫机制如何还有待进一步动物实验和免疫检测证实。

参 考 文 献

[1] Feigl T, Volklein B, Iro H, et al. Biophysical effects of high-energy pulsed ultrasound on human cells [J]. Ultrasound Med Bilo, 1996; 22: 1267-1275.

[2] 高尚梅，赖春冬，周 璧，等. 高强度聚焦超声致培养肿瘤细胞死亡的阈值量研究 [J]. 临床超声医学杂志，1999; 1: 38-40.

[3] Johannes CII Physiol [J]. 1929; 67(3): 356.

[4] 黄皎琳. 高温—固化瘤苗研究新进展 [J]. 中国肿瘤临床，1997; 24: 27-31.

[5] 黄皎琳. 高温—固化瘤苗 [J]. 中国肿瘤临床，1995; 4: 277-282.

[6] Prat f, Chapelon JY, Abou EFF, et al. Focused Liver ablation by cavation in the rabbit; A potential new method of extracorporeal therapy [J]. Gut, 1994; 35: 395-400.

[7] Madersbacher s, Pedevilla M, Vingers L, et al. Effect of high-intensity focused ultrasound on human prostate cancer in vino [J]. Cancer Res, 1995; 55(15): 3346-3351.

[8] 王文见. 超声治疗肿瘤与免疫 [J]. 国外医学肿瘤学分册，1998; 12: 347-349.

[9] Rosberger DF, Coleman DJ, Silverman R, et al. Immuno-modulatoin in Choroidal Melanoma: reversal of invertedCD_4/CD_8 ratios following treatment with ultrasonic hyperthermia [J]. Biotechnol. Ther, 1994; 5(1-2): 58-68.

[10] 伍 烽，王智彪，张 喆，等. 高强度聚焦超声对 H_{22} 肝癌组织的急性生物学效应 [J]. 中国超声医学杂志，1997; 13(3): 1-3.

[11] 王智彪，伍 烽，王芷龙，等. 高强度聚焦超声治疗 H_{22} 肿瘤的实验研究 [J]. 中国超声医学杂志，1997; 13(3): 5-7.

[12] 程树群. 高功率聚焦超声在肿瘤治疗中的应用 [J]. 国外医学肿瘤学分册，1994; 21(2): 74-77.

[13] 黄皎琳，许明贵，黄 海，等. 自体癌固化瘤的研究 [J]. 中华肿瘤杂志，1994; 16(5): 337-340.