

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.12.004

咪喹莫特联合高强度聚焦超声治疗小鼠黑色素瘤实验研究

陈英华¹, 伍烽¹, W. R. Chen², 卫佳¹, 吴丽美¹, 李星星¹, 周兰^{1△}

(1. 重庆医科大学生物医学工程系·重庆市生物医学工程学重点实验室·重庆市超声医学工程重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 重庆 400016; 2. Biomedical Engineering Program, Department of Physics and Engineering, College of Math and Science, University of Central Oklahoma, USA 73034)

摘要:目的 探讨咪喹莫特(imiquimod, IMQ)联合高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)治疗荷B16黑色素瘤小鼠的效果及其机制。方法 采用黑色素瘤细胞B16皮下接种小鼠建模,设荷瘤对照组(A组)、IMQ组(B组)、HIFU组(C组)及IMQ联合HIFU组(D组)。观察各组小鼠肿瘤生长情况及小鼠生存时间;制备小鼠脾淋巴细胞,与B16细胞共培养,台盼蓝拒染法检测小鼠脾淋巴细胞对B16细胞的细胞毒性,酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测培养上清液中 γ 干扰素(IFN- γ)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平。结果 A组、B组、C组小鼠中位生存时间分别为29 d, 65 d, 29 d, 均明显短于D组的113 d($P < 0.01$); A组、B组、C组脾淋巴细胞毒性分别为(23.00 ± 1.73)%, (35.33 ± 5.03)%, (37.50 ± 2.21)%, 均明显低于D组的(55.33 ± 7.64)% ($P < 0.01$); A组、B组、C组培养上清液中IFN- γ 质量浓度分别为(427.57 ± 42.55) pg/mL, (778.45 ± 27.85) pg/mL, (756.26 ± 81.33) pg/mL, 明显低于D组的(965.56 ± 46.29) pg/mL ($P < 0.01$); A组、B组、C组培养上清液中TNF- α 质量浓度分别为(278.45 ± 21.72) pg/mL, (399.37 ± 35.29) pg/mL, (365.86 ± 36.95) pg/mL, 均明显低于D组的(565.56 ± 46.29) pg/mL ($P < 0.01$)。结论 IMQ联合HIFU治疗能有效延长黑色素瘤小鼠生存期,提高其抗肿瘤免疫功能,其机制可能与Th2向Th1逆转增强有关。

关键词:咪喹莫特;高强度聚焦超声;黑色素瘤;小鼠;免疫;作用机制

中图分类号:R965.2;R986

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)12-0013-04

Experimental Study on Imiquimod Combined with HIFU in the Treatment of Melanoma in Mice

Chen Yinghua¹, Wu Feng¹, W. R. Chen², Wei Jia¹, Wu Limei¹, Li Xingxing¹, Zhou Lan¹

(1. Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Biomedical Engineering, Chongqing Key Laboratory of Ultrasonic Medical Engineering, Co-Construction Cultivation Base of the State Key Laboratory by Province, Chongqing, China 400016; 2. Biomedical Engineering Program, Department of Physics and Engineering, College of Math and Science, University of Central Oklahoma, Oklahoma, USA 73034)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of imiquimod(IMQ) combined with high intensity focused ultrasound(HIFU) in the treatment of BALB/c mice bearing B16 melanoma. **Methods** The B16 melanoma cells were inoculated subcutaneously to establish the models, and the mice were randomly divided into tumor bearing control group(group A), IMQ group(group B), HIFU group(group C) and IMQ combined HIFU group(group D). The volume of tumor and survival time of mice in each group were observed. Splenic lymphocytes were extracted and co-cultured with B16 cells to assess the cytotoxic activity against B16 tumor cells by trypan blue dye exclusion method. Furthermore, the levels of IFN- γ and TNF- α were detected in the supernatant of culture by ELISA. **Results** The average survival time of groups A(29 d), group B(65 d) and group C(29 d) were shorter than 113 d in group D ($P < 0.01$). The lymphocyte cytotoxicity of group A, group B and group C was (23.00 ± 1.73)%, (35.33 ± 5.03)% and (37.50 ± 2.21)%, which was lower than (55.33 ± 7.64)% of group D ($P < 0.01$). The levels of IFN- γ of culture supernatant in group A, group B and group C were (427.57 ± 42.55) pg/mL, (778.45 ± 27.85) pg/mL and (756.26 ± 81.33) pg/mL, which were lower than (965.56 ± 46.29) pg/mL in group D ($P < 0.01$). The levels of TNF- α of culture supernatant in group A, group B and group C were (278.45 ± 21.72) pg/mL, (399.37 ± 35.29) pg/mL and (365.86 ± 36.95) pg/mL, which were lower than (565.56 ± 46.29) pg/mL in group D ($P < 0.01$). **Conclusion** IMQ combined with HIFU in the treatment of melanoma in mice can effectively prolong the survival time and enhance its anti-tumor immune function. The mechanism may be related to the reverse enhancement of Th2 to Th1.

Key words: imiquimod; high intensity focused ultrasound; melanoma; mouse; immunity; mechanism

目前,恶性黑色素瘤在我国发病率逐年上升^[1-2]。其恶性程度极高、侵袭性强,极易发生局部进展及转移,易失去手术机会,且传统放射治疗(简称放疗)、化学治疗(简称化疗)效果不佳,免疫治疗虽在一定程度上延长

了患者的生存时间,但治疗反应率较低^[3]。咪喹莫特(imiquimod, IMQ)为非核苷类异环咪唑啉胺类免疫调节剂,对人和动物的病毒性微生物和肿瘤具有显著的治疗作用,其与物理治疗的联合应用可以降低单纯物理治

第一作者:陈英华,女,硕士研究生,主治医师,研究方向为肿瘤的分子生物学及免疫治疗,(电话)023-63692182(电子信箱)115093774@qq.com。

△通信作者:周兰,教授,博士研究生导师,研究方向为肿瘤分子生物学,(电话)023-68485023(电子信箱)zhoulan0111@fox-mail.com。

疗后的复发率^[4]。还有研究发现,IMQ乳膏经皮给药与瘤内注入树突状细胞联合治疗皮肤恶性黑色素瘤效果较好^[5]。Redondo等^[6]在冷冻手术联合IMQ治疗黑色素瘤小鼠模型中发现,小鼠的干扰素 α (IFN- α)诱导和T细胞免疫反应均有增加,增加了自身免疫的抗肿瘤能力,为其临床治疗黑色素瘤提供了免疫学依据。高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)是一种无创治疗方法,在实体肿瘤的治疗中已得到广泛应用^[7-9],但目前临床仍未将黑色素瘤列为HIFU的适应证。李欢等^[10]的研究结果表明,HIFU处理能抑制黑色素瘤原发灶的生长,并减少原发灶残留的瘤细胞脱落入血和减少血循环中瘤细胞在肺部的定植。另有研究表明,HIFU除可以杀灭肿瘤细胞、破坏肿瘤组织外,还可增加宿主抗肿瘤免疫功能^[11]。本研究中采用IMQ联合HIFU治疗恶性黑色素瘤,旨在为获得更理想的治疗方案提供理论依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

动物及细胞株:无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雌性C57BL/6小鼠60只,4周龄,购自重庆医科大学动物中心(动物生产许可证编号为SCXK 2007-0001);小鼠黑色素瘤细胞株B16细胞株,购自中国典型培养物保藏中心(编号为MCC017)。实验获得重庆医科大学实验动物伦理委员会的批准;饲养条件为屏障环境(SPF级动物设施);实验过程按照重庆医科大学动物实验中心的流程操作。

仪器及试剂:CZF-1型聚焦超声治疗仪(重庆海扶技术有限公司);小鼠TNF- α ELISA试剂盒(批号为555268),小鼠IFN- γ ELISA试剂盒(批号为555138),均购自BD Biosciences公司。咪喹莫特(IMQ)购自3M Health Care Limited公司(批号为H20160079)。

1.2 方法

建模及分组:4周龄C57BL/6系雌性小鼠皮下接种黑色素瘤细胞株B16 1×10^7 个/mL的单细胞悬液0.1 mL。此时记为第1天,观察瘤体生长,瘤体平均直径第5天为3 mm,第7天为5 mm。荷瘤对照组(A组)15只。IMQ组(B组)15只,第5天开始外用IMQ,分别于第5,6,8,9天各擦1次,均匀涂抹,每个肿瘤每次5 mg。HIFU组(C组)15只,第7天进行HIFU处理,每只小鼠用HIFU处理1次,治疗头频率为9.5 MHz,声功率为4.5 W;焦距为6~8 mm,施治20 s,停20 s,重复9次。IMQ联合HIFU组(D组)15只,第5天开始外用IMQ,方法同前;第7天进行HIFU处理1次,方法同前。

肿瘤生长曲线及疗效分析:每组取10只小鼠,观察各组小鼠治疗后的生存时间,并绘制曲线。

小鼠脾淋巴细胞提取:治疗后14 d,每组取5只小

鼠,采用“眼球摘除法”获取外周血后,使小鼠处于失血性休克状态,置75%乙醇中浸泡2 min,在无菌环境下取3组荷瘤小鼠的脾脏。取出的脾脏立即置200目铜网上碾碎,采用RPMI 1640液冲洗铜网,并收集细胞悬液。采用Ficoll-Paque梯度离心法得到脾脏淋巴细胞^[12]。在37℃及5% CO₂培养箱中孵育,并在培养液中加入鼠白细胞介素2(mIL-2),终浓度为200 U/mL。培养3 h后取悬浮细胞,弃除贴壁细胞,用RPMI 1640完全培养液调细胞密度为 2×10^6 /mL,待用。

测定脾脏淋巴细胞细胞毒性:96孔培养板每孔加入密度分别为 1×10^5 个/mL和 2×10^6 个/mL的B16肿瘤细胞及脾细胞液各0.1 mL,细胞混匀后,在37℃及5% CO₂、饱和湿度条件下共孵育48 h后采用台盼蓝排斥法染色计数活细胞,计算,淋巴细胞细胞毒性=(对照组活细胞数-试验组活细胞数)/对照组活细胞数 $\times 100\%$ ^[13]。试验设3个复孔,重复3次。

培养上清液细胞因子检测:将各组脾淋巴细胞与肿瘤细胞共培养48 h后离心,留取培养上清液,于-80℃冰箱保存。ELISA法^[14]检测上清液中IFN- γ 和TNF- α 含量。按试剂盒说明书操作,重复3次。

1.3 统计学处理

采用SAS 8.0统计学软件分析。计量资料用 $\bar{X} \pm s$ 表示,采用方差分析,组间两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

结果见表1至表3。各组中位生存时间及95%置信区间(CI)分别为:A组,29 d和(27.8~30.5)d;B组,65 d和(61.2~67.8)d;C组,29 d和(26.3~31.5)d;D组,113 d和(105~127)d。D组的小鼠生存率高于其他组。

表1 各组脾淋巴细胞对B16细胞的细胞毒性比较($n=15$)

组别	细胞毒性 ($\bar{X} \pm s, \%$)	与A组比较		与D组比较	
		t 值	P 值	t 值	P 值
A组	23.00 \pm 1.73	-	-	-	-
B组	35.33 \pm 5.03	-8.9777	4.92×10^{-10}	8.4682	1.65×10^{-9}
C组	37.50 \pm 2.21	-20.0094	2.00×10^{-18}	8.6827	9.87×10^{-10}
D组	55.33 \pm 7.64	-15.9845	6.59×10^{-16}	-	-

表2 各组脾淋巴细胞与B16细胞共培养后上清液TNF- α 水平变化比较($n=15$)

组别	质量浓度 ($\bar{X} \pm s, \text{pg/mL}$)	与A组比较		与D组比较	
		t 值	P 值	t 值	P 值
A组	278.45 \pm 21.72	-	-	-	-
B组	399.37 \pm 35.29	-10.4604	1.77×10^{-11}	11.0578	5.00×10^{-12}
C组	365.86 \pm 36.95	-7.0853	5.21×10^{-8}	13.0584	9.89×10^{-14}
D组	565.56 \pm 46.29	-21.0652	5.18×10^{-19}	-	-

3 讨论

机体的免疫功能与肿瘤的发生、发展有密切关系,

表3 各组脾淋巴细胞与 B16 细胞共培养后上清液 IFN- γ 水平变化比较 (n = 15)

组别	质量浓度 ($\bar{X} \pm s, \text{pg/mL}$)	与 A 组比较		与 D 组比较	
		t 值	P 值	t 值	P 值
A 组	472.57 \pm 42.55	-	-	-	-
B 组	778.45 \pm 27.85	-24.057 1	1.52×10^{-20}	12.697 5	1.94×10^{-13}
C 组	756.26 \pm 81.33	-12.350 0	3.77×10^{-13}	8.289 7	2.54×10^{-9}
D 组	965.56 \pm 46.29	-30.367 3	2.82×10^{-23}	-	-

当宿主免疫功能低下或受抑制时,肿瘤发病率高,而在肿瘤进行性生长时,患者的免疫功能受抑制,两者互为因果。恶性肿瘤患者免疫功能低下,机体处于免疫功能抑制状态。尽管多数的肿瘤都表达了一种或多种肿瘤相关抗原(TAA),但却能通过多种机制逃脱免疫系统的监视和攻击。理想的肿瘤治疗方法应是既能精确破坏局部和全身的肿瘤细胞,又能全面恢复机体的免疫功能,使已失常的抗肿瘤免疫功能重新恢复正常,形成治疗肿瘤和恢复机体正常功能的良性循环,减少肿瘤的复发和转移^[15-17]。

辅助性 T 淋巴细胞(t-helper lymphocyte, Th)及其分泌的细胞因子在免疫调节中具有重要作用。体内 Th1 免疫活性下降而 Th2 升高,将导致细胞免疫障碍、基因突变、癌基因被激活及端粒酶活性改变等,导致受感染的细胞异常增生,最终发展为癌症^[18-19]。另外,分化的 Th1 和 Th2 两个细胞亚群,各自分泌不同的细胞因子,均能刺激自身分化和发展而抑制对方的分化和发展,相互影响。Th1 型细胞因子 IL-2 和 IFN- γ ,能刺激 CTL 的增殖和分化,IFN- γ 可增强 NK 细胞的杀伤能力,TNF 等可直接杀伤肿瘤细胞等,从而抑制肿瘤的发展^[20-21]。

IMQ 对肿瘤细胞的作用主要是通过免疫调节机制诱导多种免疫相关细胞的细胞因子表达和分泌,增强机体的天然与获得性免疫应答来发挥的,其作用于单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞等细胞的 TLR7,促进细胞分泌 IL-12, IL-1 β , TNF- α , IFN1 等细胞因子,参与固有和适应性免疫应答,可增强机体抗病毒和抗肿瘤效应;研究表明,TLR4, TLR2, TLR7/8 等受体的活化性配体可直接或间接调节 Treg 的功能,可逆转 DC 诱导的 Th2 细胞型免疫应答,促进 Th1 细胞型免疫应答可增强机体抗病毒和抗肿瘤效应^[22-23]。

HIFU 治疗肿瘤现已应用于多种实体肿瘤的临床治疗,除可杀灭肿瘤细胞、破坏肿瘤组织外,还可增加宿主抗肿瘤免疫功能。Rosberger 等^[24]发现,HIFU 治疗外周血 CD₄⁺/CD₈⁺ 比值低下的脉络膜黑色素瘤患者后,该比值升高并恢复正常。孔凡斌等^[25]发现,HIFU 治疗后宿主特异抗肿瘤免疫功能明显活化,宿主全身抗肿瘤免疫功能明显改善;HIFU 可使一些生物活性物质如 IFN- γ , IL-2, TNF- α 等表达增高,从而改善肝癌患者体内 Th1 向 Th2 漂移的状态等^[26]。

本研究结果显示,IMQ 和 HIFU 联合治疗能够延长荷瘤小鼠的生存时间;能促进小鼠脾淋巴细胞对 B16 细胞的细胞毒作用,治疗后荷瘤鼠脾淋巴细胞与肿瘤共培养时,脾 T 淋巴细胞所分泌的 IFN- γ 水平和 TNF- α 水平均增高(即 Th2 向 Th1 逆转),其作用大于两种方法单独治疗时的免疫增强作用。因此,推测 Th2 向 Th1 逆转是可能是两种治疗方法联合后可抑制局部肿瘤的生长及延长小鼠生存时间的机制之一。

参考文献:

- [1] CSCO 黑色素瘤专家委员会. 中国黑色素瘤诊治指南(2011 年版)[J]. 临床肿瘤学杂志,2012,17(2):519-530.
- [2] 唐志柳. 中国皮肤黑色素瘤发病及其影响因素分析[J]. 中国肿瘤,2014,23(10):829-833.
- [3] Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma[J]. The New England Journal of Medicine, 2015, 373(1):23-34.
- [4] Garland SM, Sellors JW, Wikstom A, et al. Imiquimod 5% cream is a safe and effective self-applied treatment for anogenital warts: results of an open label multicentre Phase III B Trial[J]. Int J STD AIDS, 2001, 12(11):722-729.
- [5] Lee JR, Shin JH, Park JH, et al. Combined treatment with intratumoral injection of dendritic cells and topical application of imiquimod for murine melanoma[J]. Clin Exp Dermatol, 2007, 32(5):541-549.
- [6] Redondo P, del Olmo J, López-Díaz de Cerio A, et al. Imiquimod enhances the systemic immunity attained by local cryosurgery destruction of melanoma lesions[J]. The Journal of Investigative Dermatology, 2007, 127(7):1673-1680.
- [7] 毛英, 方廖琼, 刘隆兴, 等. 高强度聚焦超声联合吉西他滨对裸鼠胰腺癌皮下移植瘤的疗效[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(12):1713-1717.
- [8] Ge HU, Miao LY, Xiong LL, et al. High-intensity focused ultrasound treatment of late-stage pancreatic body carcinoma: optimal tumor depth for safe ablation[J]. Ultrasound in Medicine & Biology, 2014, 40(5):947-955.
- [9] Blana A, Walter B, Rogenhofer S, et al. High-intensity focused ultrasound for the treatment of localized prostate cancer: 5-year experience[J]. Urology, 2004, 63(2):297-300.
- [10] 李欢, 袁世梅, 杨敏, 等. 高强度聚焦超声抑制小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 在体内的转移[J]. J South Med Univ, 2015, 35(2):223-228.
- [11] Wu F, Zhou L, Chen WR. Host antitumour immune responses to HIFU ablation[J]. International Journal of Hyperthermia, 2007, 23(2):165-171.
- [12] 陈嵘祯, 阿采岭, 周英, 等. 两种方法分离小鼠脾淋巴细胞效果比较[J]. 中国热带医学, 2013, 13(5):540-542.
- [13] 庄志祥, 段莹莹, 周剑影, 等. 树突状细胞活化的特异性细胞毒性 T 淋巴细胞对大鼠原发性肝癌细胞的体外杀伤作用研究[J]. 苏州医学院学报, 2001, 21(1):19-22.
- [14] Jung T, Schauer U, Rieger C, et al. Interleukin-4 and inter-