

姑息性热消融联合PD-1抑制剂治疗肝细胞性肝癌的动物实验研究

王福安¹, 马园¹, 季杰¹, 吕朋华¹, 李贵玲²

1. 江苏省苏北人民医院介入科, 江苏 扬州, 225001; 2. 江苏省苏北人民医院医学检验科, 江苏 扬州, 225001

通信作者: 李贵玲, E-mail: liguiling728@163.com

【摘要】 目的 探讨姑息性热消融联合免疫检查点抑制剂PD-1治疗不可切除肝细胞性肝癌HCC的安全性及有效性。**方法** 使用6~8周龄雌性SPF级C57BL/6J小鼠,在皮下植入Hepa1-6肝癌细胞株,建立皮下肝转移瘤模型,并在肿瘤长径达到9~10mm时进行分组实验。将45只成瘤小鼠随机分为3组,每组15只,包括空白对照组、姑息消融组和姑息消融联合PD-1给药组。1月后处死实验鼠,通过ELISA检测外周血中Th1类细胞因子(IL-2、IFN- γ 、TNF- α)的浓度;处死小鼠后解剖并取出肿瘤组织,游标卡尺测量其大小并进行苏木精-伊红染色(HE染色);采用免疫组化检测Ki67、PD-1和PD-L1在肿瘤组织中的表达情况。**结果** 与对照组相比,姑息消融组和姑息消融+PD-1组中小鼠肿瘤体积和重量有所降低,其中姑息消融+PD-1组的肿瘤体积和质量降低最明显。与对照组相比,姑息消融组和姑息消融+PD-1组小鼠的血液中IL-2有升高的趋势,但差异无统计学意义,姑息消融组小鼠血液中IFN- γ 有升高的趋势,但差异无统计学意义,姑息消融+PD-1治疗组TNF- α 有下降的趋势,但差异无统计学意义。对照组和姑息消融组小鼠肿瘤组织中PD-1和PD-L1蛋白表达差异不显著,与对照组相比,姑息消融+PD-1组小鼠肿瘤组织中的PD-1和PD-L1蛋白显著降低。**结论** 对于小鼠HCC皮下成瘤模型,姑息性消融联合PD-1抑制剂抗肿瘤效果优于单纯的姑息消融及空白对照,并且不会引起明显的免疫不良反应。

【关键词】 癌;肝细胞;姑息疗法;消融;免疫治疗;

【文章编号】 2095-834X(2024)07-28-05

本文著录格式: 王福安, 马园, 季杰. 姑息性热消融联合PD-1抑制剂治疗肝细胞性肝癌的动物实验研究[J]. 当代介入医学电子杂志, 2024, 1(7): 28-32.

Animal experimental study on the therapeutic effect of palliative thermal ablation combined with PD-1 inhibitors in HCC treatment

Wang Fuan¹, Ma Yuan¹, Ji Jie¹, Lyu Penghua¹, Li Guiling²

1. Department of Interventional Radiology, Northern Jiangsu People's Hospital, Yangzhou 225001, Jiangsu, China;

2. Department of Laboratory Medicine, Northern Jiangsu People's Hospital, Yangzhou 225001, Jiangsu, China

Corresponding author: Li Guiling, E-mail: liguiling728@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the safety and efficacy of palliative thermal ablation combined with immune checkpoint inhibitor PD-1 in the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma. **Methods** Female SPF C57BL/6J mice aged 6-8 weeks were subcutaneously implanted with Hepa1-6 hepatocellular carcinoma cell lines to establish a subcutaneous liver metastasis model, and grouping experiments were performed when the tumor length reached 9-10 mm. Forty-five tumor-forming mice were equally divided into three groups, including a blank Control group (Control), a palliative ablation group, and a palliative ablation combined with a PD-1 treatment group. One month later, the mice were sacrificed, and the concentrations of Th1 cytokines (IL-2, IFN- γ , TNF- α) in peripheral

收稿日期: 2024-10-07

基金项目: 江苏省医学会介入医学第二期科研专项资金项目青年项目(SYH-3201140-0042(2022007))

blood were detected by ELISA. After the mice were sacrificed, the tumor tissues were dissected and removed. The size of the tumor tissues was measured by vernier calipers and hematoxylin and eosin staining (HE staining) was performed. In addition, immunohistochemistry was used to detect the expression of Ki67, PD-1, and PD-L1 in tumor tissues. **Results** Compared with the control group, the tumor volume and weight of the mice in the palliative ablation group and the palliative ablation +PD-1 group were reduced, and the reduction of tumor volume and weight in the palliative ablation +PD-1 group was the most obvious. Compared with the control group, the level of IL-2 in the blood of the palliative ablation group and the palliative ablation +PD-1 group showed an increasing trend, but the difference was not statistically significant; the level of IFN- γ in the blood of the palliative ablation group also showed an increasing trend, but the difference was not statistically significant. There was no significant difference in the expression of PD-1 and PD-L1 proteins in the tumor tissue of the control group and the palliative ablation group. Compared with the control group, the expression of PD-1 and PD-L1 protein in the tumor tissue of the palliative ablation + PD-1 group was significantly decreased. **Conclusions** For the HCC subcutaneous tumor model in mice, palliative ablation combined with PD-1 inhibitor has a better anti-tumor effect than palliative ablation or blank control alone, and does not cause obvious immune adverse reactions.

【Keywords】 Carcinoma; Hepatocellular; Palliative care; Ablation; Immunotherapy

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)约占所有原发性肝脏病例的 90%,是全球癌症相关死亡的第二大原因,每年新发病例为 85 万例^[1]。HCC 发病率高,早期诊断率低,预后较差。高达 70%~80%的患者在肝癌确诊时已处于中晚期,5 年生存率仅为 18%^[2]。外科手术及消融治疗(射频、微波、冷冻等)是早期肝癌常用的治疗策略^[1]。但我国大部分肝癌患者为中晚期时确诊,失去了外科手术、消融等根治性治疗机会。近年来免疫检查点的抑制剂(immune checkpoint inhibitors, ICIs)通过解除肿瘤对 T 细胞的免疫抑制,使得 T 细胞重新获得杀死癌细胞的能力,得到广泛的临床应用。有报道局部消融治疗可以促进抗原释放,激活免疫细胞,有免疫增效作用^[3-5]。本研究通过动物实验模拟临床姑息性消融联合免疫检查点抑制剂 PD-1 抗体,验证姑息性消融联合免疫治疗肝癌的安全性及有效性,探讨该治疗模式的可行性。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器 小鼠白细胞介素 2(interleukin-2, IL-2) ELISA 科研试剂(MB-2903 B 江苏酶标生物科技有限公司);小鼠 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ) ELISA 科研试剂盒(MB-2918 B 江苏酶标生物科技有限公司);小鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α) ELISA 科研试剂盒(MB-2868 B 江苏酶标生物科技有限公司);PD-1 抑制剂(美国 MCE 公司);4%多聚甲醛(碧云天生物技术有限公司);苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司);无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司);二甲苯(国药集团化学试剂有限公司);anti-Ki67(美国 abcam 公司);anti-PD-1(美国 CST 公司);anti-

PD-L1(美国 CST 公司);病理切片机(德国 leica 公司);CX33 显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 动物与模型建立 6~8 周龄雌性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠,体重 20~22 g 左右,购买于常州卡文斯实验动物有限公司。单发皮下肝转移瘤模型的建立:Hepa1-6 肝癌细胞株购于武汉普诺赛公司,用含 10%胎牛血清和 1%双抗 DMEM 培养基,在 37℃、5% CO₂ 孵育箱中培养并传代。将对数生长期的细胞浓度调至 1×10^7 /ml。首先,使用腹腔注射方法给予小鼠 1%戊巴比妥(剂量为 60 mg/kg)进行麻醉处理。随后,将小鼠固定在操作台上,对腹股沟区域的实施局部脱毛操作,之后使用碘伏进行消毒。接下来,采用 1 ml 注射器,将 200 μ l 重悬后的 Hepa1-6 肿瘤细胞精确地接种到小鼠腹股沟皮下。手术后,小鼠继续在 SPF 环境下进行饲养。在实验期间,每隔 3 d 对小鼠的肿瘤生长情况以及体重变化进行 1 次观察记录。大约 1 周后,可以在小鼠腹股沟处触摸到肿瘤结节。当肿瘤的长径增长至 9~10 mm 时,即可开始实验。从初次触摸到肿瘤开始,每隔 3 d 测量 1 次肿瘤的大小,其中肿瘤的最长径记为 a,垂直于最长径的测量值记为 b。根据这些数据,计算肿瘤体积 V,公式为 $V=ab^2/2$,并据此绘制出肿瘤体积的生长曲线。

小鼠皮下肿瘤微波姑息消融及免疫治疗。将 45 只 C57BL/6J 成瘤小鼠平均分成 3 组:对照组、姑息消融组、姑息消融联合 PD-1 给药组。小鼠植瘤 4 周后进行姑息消融,实验方法:小鼠腹腔注射 1%戊巴比妥麻醉及皮肤消毒,术者直视下将 17 G 微波消融针(亿高,南京)刺入皮下肿瘤一侧,以 5 W 功率消融 30 s,远离电极针一侧的肿瘤组织不被毁损,模拟临床姑息消融。治疗结束后对穿刺点压迫止血。对照组仅将电极针刺入肿瘤组织内,不通电。姑息消融+PD-1 给

药组:小鼠姑息消融术后 10 d 开始 PD-1 给药,给药方式:给予 PD-1 抑制剂 200 μg +生理盐水 1 ml,腹腔注射,每 1 次/3 d,连续 3 次。收集血清,处死小鼠,剥离肿瘤组织。所有标本一半置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,一半置于 -80°C 冰箱保存,操作在 30 min 内完成。

1.3 血清获取及 ELISA 检测血清中 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 的含量 小鼠处死前采用眼球取血法获取 1.0~1.5 ml 外周血,将其收集于不含热原和内毒素的试管中。室温静置 30 min 后, 4°C 离心 5000 rpm, 15 min 后吸取上层血清。取完血后的小鼠,ELISA 试剂盒检测血清中 Th1 类细胞因子(IL-2、IFN- γ 、TNF- α)浓度。

1.4 苏木素-伊红染色及免疫组化检测 Ki67、PD-1、PD-L1 小鼠处死后剖出肿瘤组织,测量肿瘤大小和重量后,泡 4% 多聚甲醛溶液,石蜡包埋,进行常规苏木精伊红染色(HE 染色)。对肿瘤组织采用免疫组化检测 Ki67、PD-1、PD-L1 表达。

1.5 统计学方法 所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据

2 结果

2.1 不同组别小鼠体重、肿瘤体积及肿瘤的变化 数据结果显示,与对照组相比,姑息消融组和姑息消融+PD-1 组中小鼠肿瘤体积和重量降低,其中姑息消融+PD-1 抑瘤效果最好。与对照组相比,手术后姑息消融组和姑息消融+PD-1 组中小鼠体重开始降低,可能是由于手术后肿瘤组织部分消融所导致。但姑息消融组和姑息消融+PD-1 组之间体重差异无统计学意义(图 1)。

2.2 不同组别中外周血细胞因子变化 与对照组相比,姑息消融组和姑息消融+PD-1 组中 IL-2 有升高的趋势,但差异无统计学意义,姑息消融组中 IFN- γ 有升高的趋势,但差异无统计学意义,姑息消融+PD-1 中 TNF- α 有下降的趋势,但差异无统计学意义(图 2)。

2.3 不同组别中肿瘤组织病理学 HE 染色光镜变化 对照组中肿瘤细胞排列整齐,紧密相连。姑息消融组和姑息消融+PD-1 组中肿瘤细胞中细胞核固缩,呈坏死状,姑息消融+PD-1 组中坏死区域最大。说明

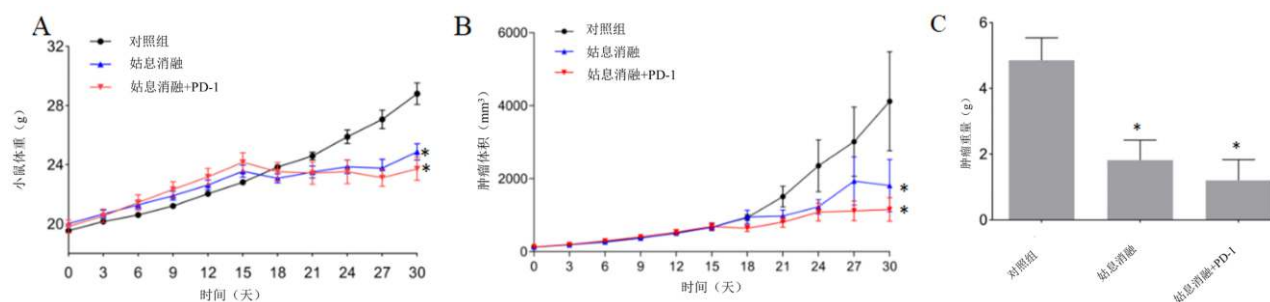


图 1 小鼠体重、肿瘤体积及肿瘤的变化

注:A为各组小鼠体重;B为各组小鼠肿瘤体积;C为各组小鼠肿瘤重量;与对照组相比,* $P<0.05$ 。

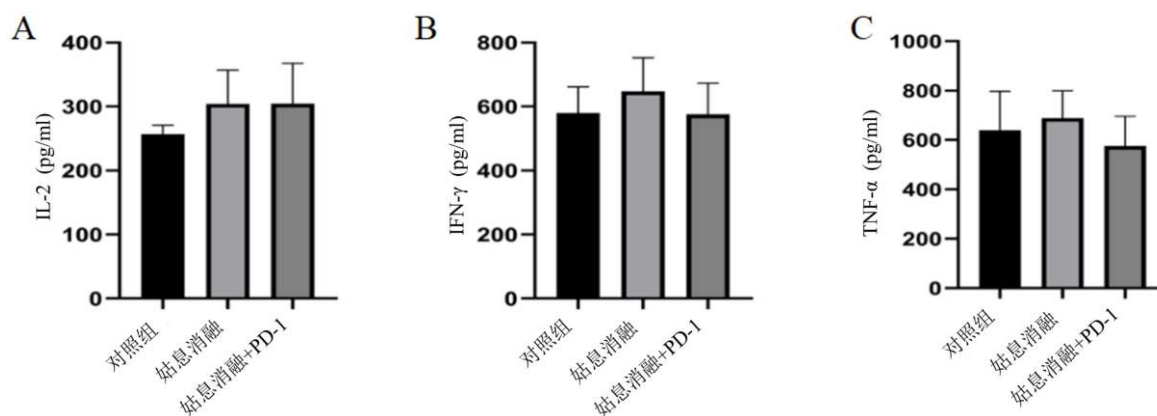


图 2 姑息消融+PD-1 对小鼠外周血三种不同炎症因子释放的影响

注:A为各组血清中 IL-2 含量;B为各组血清中 IFN- γ 含量;C为各组血清中 TNF- α 含量。

采用单因素 ANOVA 方差分析,后采用 Fisher LSD's test 检验组间差异。两组数据之间采用 t 检验分析组间差异。使用 Graph Pad Prism (5.0 版;Graph Pad 软件公司,圣迭戈,加利福尼亚州,美国)进行统计分析。 $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

PD-1 能够增大肿瘤组织的损伤程度(图 3)。

2.4 不同组别中肿瘤组织中 Ki67、PD-1、PD-L1 的表达 对照组 Ki67 蛋白表达最高,姑息消融组和姑息消融+PD-1 组 Ki67 蛋白表达降低,其中姑息消融+PD-1 组表达最低。对照组和姑息消融组中 PD-1 和

PD-L1 蛋白表达差异不显著,与对照组相比,姑息消融+PD-1 组中 PD-1 和 PD-L1 蛋白降低(图 4)。

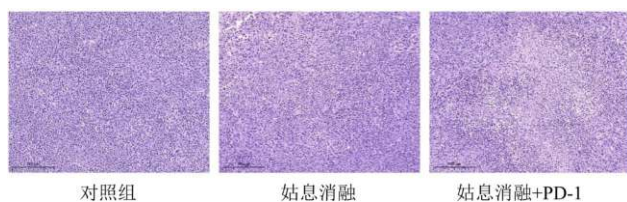


图 3 姑息消融+PD-1 对肿瘤小鼠肿瘤组织的影响(H&E 染色,标尺为 100 μm)

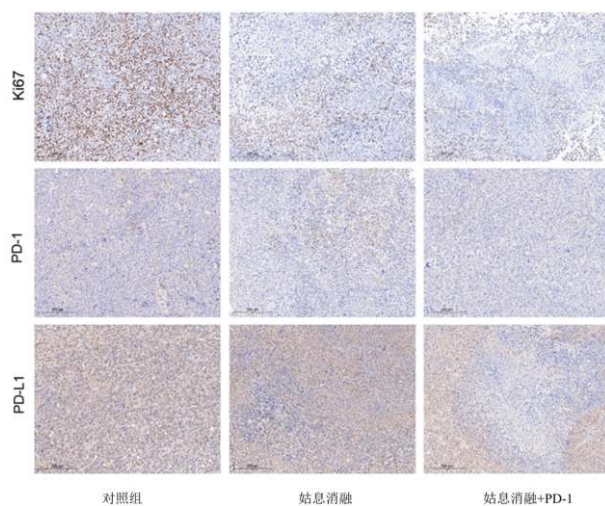


图 4 姑息消融+PD-1 抑制肿瘤组织 Ki67、PD-1、PD-L1 的表达(标尺为 100 μm)

3 讨论

我国肝癌患病和死亡人数均居全球第一,2020 年中国肝癌新发病例 41 万,占全球新发肝癌 45.3%;死亡病例 39.1 万,占全球肝癌死亡 47.1%,肝癌的早期症状往往较为隐匿,导致许多病人在首次确诊时已经处于中晚期阶段。遗憾的是,大约有 80% 的初次诊断患者已经错过了接受外科手术切除的最佳时机^[6]。

热消融治疗作为早期 HCC 一线治疗方法已被各大指南推荐^[3,7]。但当肿瘤较大、临近大血管、高危部位时,可能会出现肿瘤残留。近年来发现免疫检查点的抑制剂通过解除肿瘤对 T 细胞的免疫抑制,使得 T 细胞重新获得杀死癌细胞的能力,并得到广泛的临床应用^[1,5,8]。

据研究报道,微波消融在治疗肿瘤的过程中,能够激发机体的免疫反应,产生免疫增强的效果^[9,10]。研究表明,肝癌患者在接受微波消融治疗后,生存率有所提升,复发率则有所下降。此外,患者的生存率与消融部位 T 细胞、NK 细胞以及巨噬细胞的浸润程度呈正相关,这进一步证实了微波消融对肿瘤具有正向的免疫刺激作用。有报道局部消融治疗、靶向治疗、免疫治

疗在肝癌的治疗中可以产生协同作用,而介入联合综合治疗则被视为未来不可切除肝癌治疗的一个重要趋势^[6]。细胞毒性温度($>43^{\circ}\text{C}$)时,能够直接导致肿瘤细胞死亡,并促使肿瘤内部抗原释放,从而诱导机体产生正向的肿瘤免疫反应^[12],在微波消融过程中,由于高温的作用,细胞膜脂质层的流动性会增强,这使得肿瘤抗原的暴露概率增加,或者特异性肿瘤抗原决定簇发生变化,进而增强了肿瘤的抗原性。这种变化有利于机体产生抗体和补体,与肿瘤抗原结合,促进机体内抗原提呈细胞(antigen-presenting cells, APC)摄取后递呈给细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)从而发挥杀灭肿瘤的作用^[13]。

有研究表明微波消融与抗 PD-1/抗 CTLA-4 联合治疗诱导 Th1 型免疫反应,表现出特异性抗肿瘤免疫效应^[14]。微波的热效应为免疫治疗带来的获益也被应用于临床治疗肺癌并获得了较好的临床获益^[15]。有研究者在小鼠结肠癌肝转移的实验模型中观察到,采用抗 PD-1 抗体联合射频消融治疗的方法成功地打破了免疫耐受状态,激发了全身系统性的免疫反应^[16]。值得注意的是,肿瘤细胞本身具有分泌抑制性免疫因子的能力。然而,在热消融治疗后,肿瘤组织会发生凝固性坏死,这导致肿瘤细胞分泌免疫抑制因子的水平在肿瘤微环境乃至整个机体中都有所降低,进而使得机体的免疫系统能够重新获得识别和清除肿瘤组织的能力^[17]。本研究的目的在于通过动物实验模拟临床上较大肿瘤的姑息消融联合免疫治疗,验证其安全性及有效性。本实验结果显示,姑息消融组和姑息消融+PD-1 组中小鼠肿瘤体积和重量低于对照组,其中姑息消融+PD-1 组降低最为明显,并有统计学差异,说明姑息消融联合 PD-1 抑制剂有协同抗肿瘤作用。

肝脏特殊的免疫微环境以及肝细胞癌的免疫原性,因此肝癌局部热消融联合免疫治疗仍需要进一步探索。据研究^[18]显示,微波消融术不仅能够提升 APC、T 细胞和 NK 等免疫细胞的活性,还能增加如 IL-12、IFN- γ 、TNF- α 等正向免疫因子的表达量,进而增强肿瘤放疗和化疗的治疗效果。在本实验中,外周血免疫相关指标检测显示:与对照组相比,姑息消融组和姑息消融+PD-1 组中 IL-2 有升高的趋势,姑息消融组中 IFN- γ 有升高的趋势,但差异无统计学意义,姑息消融+PD-1 中 TNF- α 有下降的趋势,但差异无统计学意义。同时本动物实验显示,姑息消融组和姑息消融+PD-1 组中小鼠体重稍有降低但 3 组之间无统计学意义。说明在本实验中,针对实验小鼠采用 5 W \times 30 s 的局部微波消融模式及 200 μg PD-1 抑制剂 \times 3 次腹腔注射的免疫治疗使用对小鼠全身免疫的影响不大,不会诱导严重的免疫相关副作用。

在本研究中,微波姑息消融联合 PD-1 免疫抑制

剂显示出更好的抗肿瘤效果,姑息消融组和姑息消融+PD-1 组中肿瘤细胞中细胞核固缩,呈坏死状,姑息消融+PD-1 组中坏死区域最大。对照组 Ki67 蛋白表达最高。姑息消融组和姑息消融+PD-1 组 Ki67 蛋白表达降低,其中姑息消融+PD-1 组最低。说明姑息消融组和姑息消融+PD-1 具有联合抑制肿瘤细胞中 Ki67 蛋白表达的作用。与对照组相比,姑息消融+PD-1 组中 PD-1 和 PD-L1 蛋白降低明显,说明姑息消融+PD-1 组能够降低肿瘤细胞中 PD-1 和 PD-L1 蛋白的水平。

综上所述,姑息性微波消融所展现的免疫效应对肿瘤细胞的清除具有一定的促进作用,这表明微波消融不仅仅是一种依赖热效应来消灭肿瘤的方法。实际上,经过微波消融处理的肿瘤组织还能激发机体的免疫系统,产生积极的免疫应答。因此,微波消融在临床研究和应用方面展现出巨大的潜力。对于 C57BL/6J 皮下 Hepa1-6 肝癌成瘤小鼠,采用姑息消融+PD-1 抑制剂的治疗效果优于单纯姑息消融,并且不会引起严重的全身不良免疫反应,对于临床上大肝癌的姑息消融联合免疫抑制剂治疗有一定的指导作用,但有待更为精细的动物实验及相关临床研究进一步证实。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2018, 391(10127): 1301–1314.
- [2] Jemal A, Ward EM, Johnson CJ, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2014, Featuring Survival[J]. J Natl Cancer Inst, 2017, 109(9): dx030.
- [3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗指南(2022 年版)[J]. 中国实用外科杂志, 2022, 42(3): 241–273.
- [4] Li Q, Han J, Yang Y, Chen Y. PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitors in advanced hepatocellular carcinoma immunotherapy[J]. Front Immunol, 2022, 13:1070961.
- [5] Finn RS, Qin S, Ikeda M, et al. Atezolizumab plus bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2020, 382(20): 1894–1905.
- [6] 竺瑾怡, 吴文泽. 大肝癌微波消融联合靶免疫治疗的研究进展[J]. 医学理论与实践, 2023, 36(5): 749–752.
- [7] 罗盛男, 陶冀. 微波消融术联合免疫治疗在肿瘤治疗中的应用及进展[J]. 现代肿瘤医学. 2022, 30(1): 159–162.
- [8] Ganesan P, Kulik LM. Hepatocellular carcinoma: new developments[J]. Clin Liver Dis, 2023, 27(1): 85–102.
- [9] Bäcklund M, Freedman J. Microwave ablation and immune activation in the treatment of recurrent colorectal lung metastases: a case report[J]. Case Rep Oncol, 2017, 10(1): 383–387.
- [10] Yang X, Ye X, Zhang L, et al. Microwave ablation for lung cancer patients with a single lung: clinical evaluation of 11 cases[J]. Thoracic cancer, 9(5): 548–554.
- [11] Dong BW, Zhang J, Liang P, et al. Sequential pathological and immunologic analysis of percutaneous microwave coagulation therapy of hepatocellular carcinoma[J]. Int J Hyperthermia, 2003, 19(2): 119–133.
- [12] Zhang H, Hou X, Cai H, et al. Effects of microwave ablation on T-cell subsets and cytokines of patients with hepatocellular carcinoma[J]. Minim Invasive Ther Allied Technol, 2017, 26(4): 207–211.
- [13] Li L, Wang W, Pan H, et al. Microwave ablation combined with OK-432 induces Th1-type response and specific antitumor immunity in a murine model of breast cancer[J]. J Transl Med, 2017, 15(1): 23.
- [14] Duan X, Wang M, Han X, et al. Combined use of microwave ablation and cell immunotherapy induces nonspecific immunity of hepatocellular carcinoma model mice[J]. Cell Cycle, 2020, 19(24): 3595–3607.
- [15] Wei Z, Yang X, Ye X, et al. Camrelizumab combined with microwave ablation improves the objective response rate in advanced non-small cell lung cancer[J]. J Cancer Res Ther, 2019, 15(7): 1629–1634.
- [16] Slovak R, Ludwig JM, Gettinger SN, et al. Immunothermal ablations – boosting the anticancer immune response[J]. J Immunother Cancer, 2017, 5(1): 78.
- [17] Takaki H, Cornelis F, Kako Y, et al. Thermal ablation and immunomodulation: From preclinical experiments to clinical trials[J]. Diagn Interv Imaging, 2017, 98(9): 651–659.
- [18] Wu F. Heat-based tumor ablation: role of the immune response[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 880: 131–153.

(本文编辑: 马萌萌, 许超)