

• 实验研究 Experimental research •

不可逆电穿孔消融术联合 PD-1 抑制剂治疗小鼠肝癌效果初步研究

侯思楠, 王卫东, 钟泽龙, 倪嘉延, 陈耀庭, 许林锋

【摘要】 目的 探讨不可逆电穿孔(IRE)消融术联合程序性细胞死亡蛋白(PD)-1 抑制剂治疗小鼠肝癌效果及肿瘤微环境变化。**方法** 构建小鼠皮下肝癌模型,随机分为对照组、IRE 组、PD-1 组和 IRE 联合 PD-1 组。采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)和免疫组化分析不同组别不同时间点肿瘤组织 CD8 和 Foxp3 细胞表达,流式细胞学检测外周血 T 细胞分群,并描绘肿瘤生长曲线。**结果** IRE 消融术联合 PD-1 抑制剂治疗后,小鼠肿瘤体积明显缩小,外周血和肿瘤组织 CD8⁺T 细胞表达均增多,调节性 T 细胞(Treg)水平明显下降。**结论** IRE 消融术联合 PD-1 抑制剂能有效减少肿瘤负荷,引起肿瘤微环境改变,为肝癌消融联合免疫治疗提供了新的方向。

【关键词】 不可逆电穿孔消融术; PD-1 抑制剂; 肝癌; 肿瘤微环境

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2019)-05-0454-05

The efficacy of irreversible electroporation ablation combined with PD-1 inhibitor in the treatment of hepatocellular carcinoma in experimental mice: preliminary study HOU Sinan, WANG Weidong, ZHONG Zelong, NI Jiayan, CHEN Yaoting, XU Linfeng. Department of Interventional Radiology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong Province 510120, China

Corresponding author: XU Linfeng, E-mail: xu_linfeng0216@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the efficacy of irreversible electroporation (IRE) ablation combined with programmed cell death protein-1 (PD-1) inhibitor in the treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) in experimental mice, and to discuss the changes in tumor microenvironment. **Methods** The subcutaneous HCC model was established in mice. The mouse models were randomly divided into the following four groups: control group, IRE group, PD-1 inhibitor group and IRE combined with PD-1 inhibitor group (combination group). The real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and immunohistochemistry were used to determine the expressions of CD8⁺T cell and regulatory T cell (Treg) in tumor tissue of the mice of all groups at different point of time. By using flow cytometry, the T cell subgroups in peripheral blood were tested, and the growth curves of tumor were drawn. **Results** In combination group, after receiving IRE combined with PD-1 inhibitor therapy, the tumor volume of the mice was obviously reduced, the expressions of CD8⁺T cell in peripheral blood and tumor tissue were increased and the Treg levels were significantly decreased. **Conclusion** In treating HCC of experimental mice, the combination use of IRE and PD-1 inhibitor can effectively reduce the tumor load and induce the changes of tumor microenvironment, which provides a new direction for ablation and immunotherapy of HCC. (J Intervent Radiol, 2019, 28; 454-458)

【Key words】 irreversible electroporation ablation; PD-1 inhibitor; hepatocellular carcinoma; tumor microenvironment

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2019.05.011

作者单位: 510120 广州 中山大学孙逸仙纪念医院介入放射科

通信作者: 许林锋 E-mail: xu_linfeng0216@163.com

不可逆电穿孔(irreversible electroporation, IRE)作为新型不依赖热能的肿瘤消融手段,在癌症治疗中的应用越来越广泛^[1-4]。近年研究表明IRE 消融术后可引起比射频消融和冷冻消融更强烈的免疫反应^[5-6],但不能有效抑制肿瘤进展和复发^[7]。程序性细胞死亡蛋白(programmed death-1, PD)-1 抑制剂可通过阻断 PD-1/PD-L1 通路抑制肿瘤免疫逃逸,增加机体抗肿瘤免疫效应,但在肝癌患者中有效率低于 30%^[8]。本研究旨在通过小鼠肝癌模型探讨IRE 消融术联合 PD-1 抑制剂治疗效果及治疗后肿瘤微环境变化,为肝癌消融联合免疫治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 实验动物和器材

本实验已通过中山大学动物伦理中心审核批准。实验所用 4~5 周龄、无特定病原体(SPF)级 BALB/C 小鼠 60 只购自中山大学动物实验中心。实验材料主要包括抗小鼠 CD3 流式抗体(25-0031-82)、CD8 流式抗体(12-0081-82)、调节性 T 细胞(Treg)染色试剂盒(88-8111-40)、红细胞裂解液(00-4300-54)(美国 eBioscience 公司)、免疫组化 CD8 抗体(98941S)、Foxp3(12653S)抗体(美国 CST 公司)、TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司)、逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司)、PD-1 抑制剂(clone: J43)(美国 BioXcell 公司)以及 ECM830 型细胞电穿孔仪(美国 BTX 公司)。

1.2 细胞培养和动物模型建立

H22 小鼠肝癌细胞(武汉普诺赛生命科技公司)置于 37℃、5%CO₂ 温箱内孵育,采用 1 640 培养基+10%血清进行细胞培养。60 只 BALB/C 小鼠随机分为对照组、IRE 组、PD-1 组和 IRE 联合 PD-1 组,每组 12 只,每组分为术后 1、3、7、14 d 共 4 个时点。取 H22 细胞 1×10⁶/mL 皮下注入小鼠右侧背部皮下,每 2 天检测小鼠肿瘤生长情况,用游标卡尺测量并记录肿瘤最大径(a)和最短径(b),肿瘤体积按公式 $a \times b^2/2$ 计算。肿瘤最大径达 10 mm 时行 IRE 术,并于不同时间点采取小鼠外周血,以过量戊巴比妥钠腹腔注射处死小鼠,获取肿瘤组织。

1.3 IRE 术和 PD-1 抑制剂注射

小鼠固定于操作台,1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,手术区备皮、消毒、铺巾;IRE 治疗电穿孔仪 2 根单极针沿肿瘤长轴插入(设备参数设定为 1 500 V/cm, 50A, 90 次脉冲, 70 μs 波长, 100 ms 间隔, 针距根据肿瘤大小进行调整);腹腔注射 PD-1 抑制剂 200 μg,

1 次/3 d 共 4 次。

1.4 流式细胞学检测

分别从不同组别不同时间点抽取小鼠外周血 1 mL,提取外周血单核细胞,并与抗 CD3-PE-Cy7、抗 CD4-FITC、抗 CD8-PE、抗 CD25-APC、抗 Foxp3-PE 流式抗体进行孵育,步骤按照流式抗体试剂盒说明进行,流式数据分析采用 FlowJo 软件。

1.5 免疫组化检查

取小鼠肿瘤组织标本,固定于 4%甲醛溶液,石蜡包埋、切片、脱蜡、修复后,按照免疫组化试剂盒说明进行,加入一抗 CD8(1:500)和 FoxP3(1:100), 4℃ 孵育抗体过夜;用含 Tween® 20 磷酸盐缓冲液(PBST)洗涤 4 次,加入二抗,室温孵育 15 min;PBST 洗涤 4 次,二氨基联苯胺(DAB)显色 20 s,冲洗后苏木精-伊红(HE)染核,终止染色,中性树脂胶封片并在显微镜下观察。肿瘤组织标本中选取 5 个 T 细胞明显浸润的视野进行计数,取平均值作统计分析^[9]。

1.6 实时荧光定量聚合酶链反应检测

采用 SYBR Green 染色法,以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参基因,对小鼠肿瘤组织 CD8、Foxp3 表达量进行检测。收集肿瘤组织,将其剪为约 0.3 cm×0.3 cm×0.3 cm 大小块状,加入 TRIzol 试剂提取总 RNA,用 Moloney 鼠白血病病毒(MMLV)-逆转录酶,按说明书合成 cDNA,按试剂说明书配好反应体系(20 μL),进行实时聚合酶链反应(PCR)扩增和检测。PCR 引物序列为:β-actin(forward)GGGA-AATCGTGCGTGAC, (reverse)AGGCTGGAA AAG-AGCCT;CD8(forward)CAAACACGCTTTTCGG CTCC-TG, (reverse)CGGATTGGACTTCGCCTGTGA;Foxp3(forward)GGCTCCTCTTCTTGCGAAACTC, (reverse)TCACCTATGCCACCCTTATCCG;采用 2^{-ΔΔCt} 法分析其结果。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件分析实验结果,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间数据比较用 *t* 检验,多组数据比较用单因素方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。每组实验均进行 3 次,取平均值进行比较。图表采用 GraphPad Prism 5 软件绘制。

2 结果

所有实验鼠在 IRE 消融术操作过程中均存活,未见术后并发症。鼠外周血流式细胞学检测结果显示,术后 3、7、14 d IRE 联合 PD-1 组 Treg 比例与对照组、IRE 组、PD-1 组相比均下降,占比分别为(6.54±

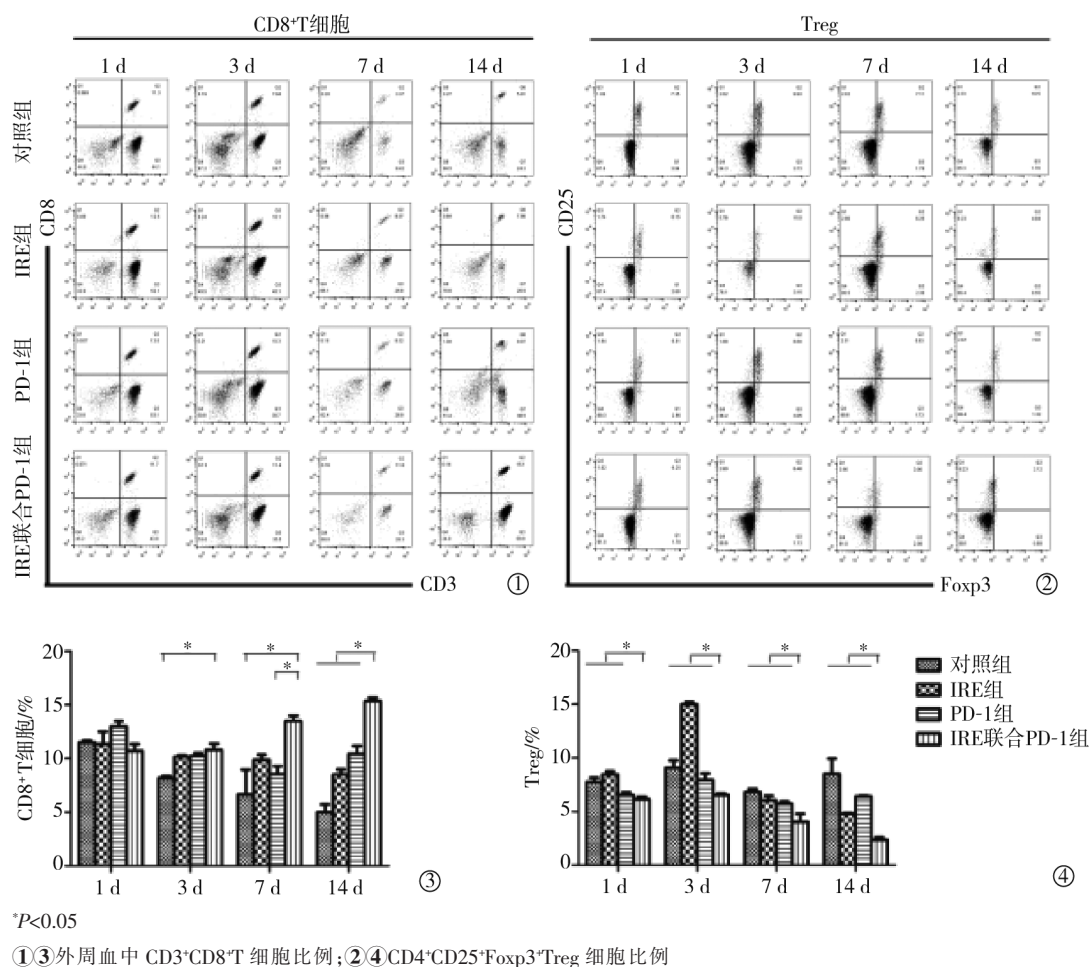


图 1 小鼠外周血流式细胞学检测结果

0.18)%、(4.03±0.75)%、(2.37±0.25)% ($P<0.05$); 术后 CD8⁺T 细胞占比明显增加,为(15.40±0.30)% ($P<0.05$),见图 1。

肿瘤组织免疫组化检测结果表明,术后 1、3、7、14 d CD8⁺T 细胞表达,IRE 联合 PD-1 组分别为(92.00±3.27)个、(154.40±16.05)个、(133.00±22.22)个、(89.00±7.26)个,对照组分别为(29.25±6.38)个、(29.25±6.76)个、(21.25±3.42)个、(15.75±3.77)个,IRE 组分别为(32.00±7.35)个、(138.00±10.68)个、(87.00±1.00)个、(33.33±1.69)个,PD-1 组分别为(30.33±6.13)个、(43.67±6.65)个、(68.50±4.50)个、(27.00±10.12)个,IRE 联合 PD-1 组显著高于其它各组 ($P<0.05$);术后 1、3、7、14 d IRE 联合 PD-1 组 Foxp3 阳性细胞分别为(13.00±1.00)个、(32.00±4.08)个、(31.67±4.50)个、(9.00±1.00)个,显著低于对照组、IRE 组、PD-1 组;IRE 组术后 3、7 d Foxp3⁺T 细胞显著增多,分别为(109.00±15.77)个、(105.00±4.90)个,并于术后 14 d 降至(9.33±5.25)个 ($P<0.05$),见图 2。

肿瘤组织实时荧光定量 PCR 检测显示,IRE 联

合 PD-1 组 CD8 mRNA 表达为(15.57±0.90)个,显著高于其它 3 组 ($P<0.05$),Foxp3 mRNA 显著下调为(0.27±0.60)个 ($P<0.05$),见图 3。在控制肿瘤生长方面,IRE 联合 PD-1 组小鼠肿瘤体积为(24.27±30.47) mm³,与对照组(2 184.05±384.71) mm³、IRE 组(386.45±43.31) mm³、PD-1 组(1 064.86±193.95) mm³ 相比显著缩小 ($P<0.05$),见图 4。

3 讨论

IRE 通过高频短脉冲在细胞膜磷脂双分子层中形成不可逆孔道,导致细胞内外环境失衡,使得不能被免疫系统识别的细胞内抗原溢出至细胞外,并刺激机体免疫系统,介导 T 细胞免疫,活化肿瘤抗原特异性 CD8⁺T 细胞^[10],通过直接杀伤肿瘤细胞和间接引起 T 细胞免疫应答增强抗肿瘤免疫反应,但是并不能有效抑制肿瘤复发和进展。

肿瘤通过调节免疫抑制机制,形成免疫逃逸,促进肿瘤发生发展。其中 PD-1/PD-L1 免疫检查点在肿瘤生长过程中发挥重要作用,单克隆抗体阻断 PD-1/PD-L1 间相互作用,增强 T 细胞毒性,使机体

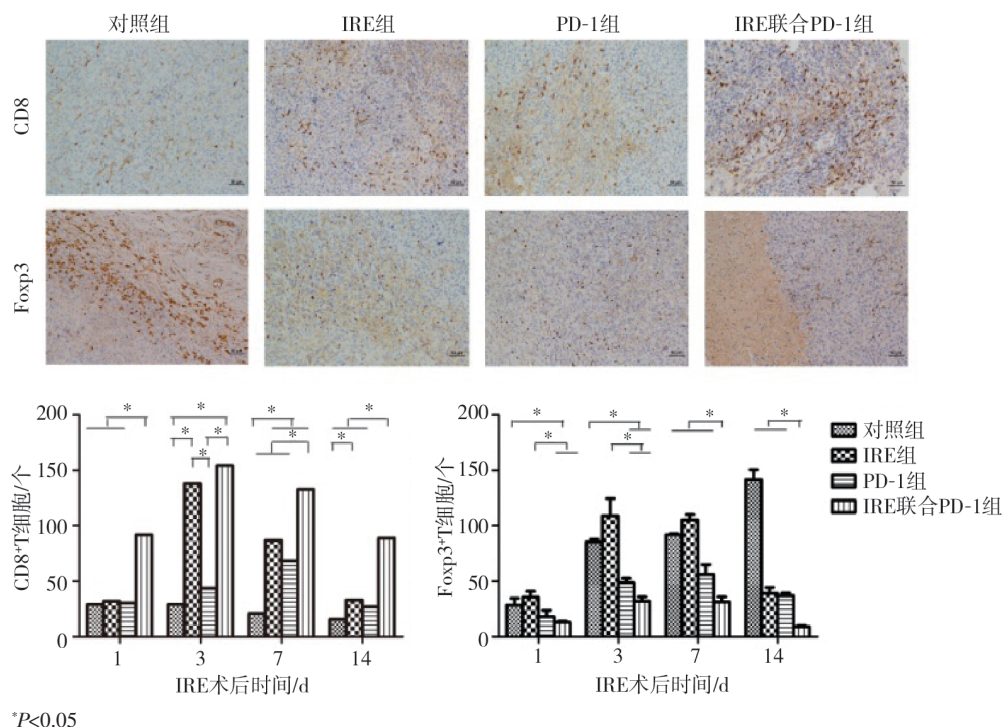


图 2 小鼠肿瘤组织免疫组化检测结果

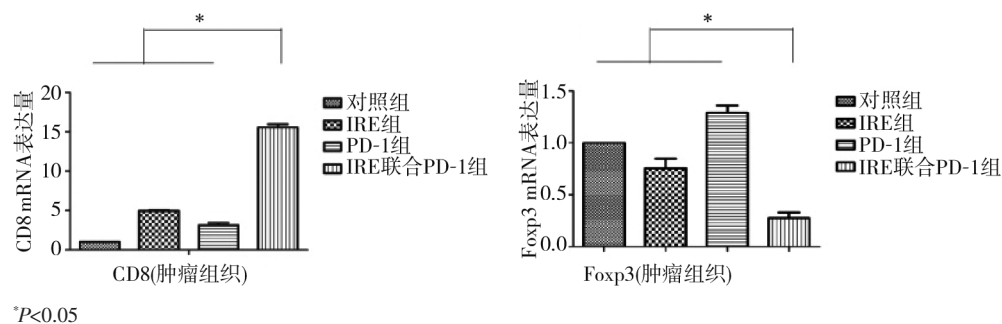


图 3 小鼠肿瘤组织实时荧光定量 PCR 分析结果

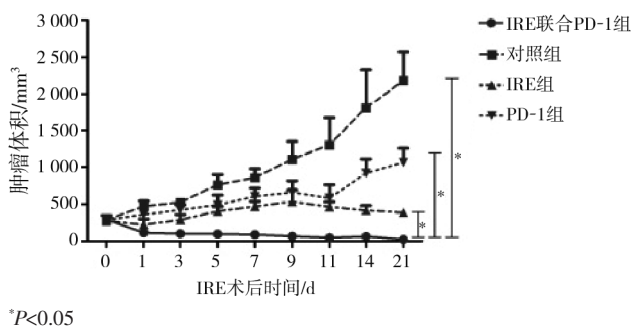


图 4 小鼠肿瘤体积生长曲线

恢复对肿瘤的免疫监视和免疫清除功能,防止 CD8⁺T 细胞向 Treg 转化。针对 PD-1/PD-L1 的免疫检查点抑制剂已应用于临床,并取得较好疗效^[11]。但是对肝癌的治疗有效率低于 30%^[8],这可能与肝癌免疫微环境耐受、肿瘤抗原暴露不够、T 细胞浸润不足有关^[12]。肿瘤微环境中 CD8⁺T 细胞可通过分泌有效的细胞因子,驱动抗肿瘤免疫反应,释放细胞毒性

分子(如颗粒酶素 B 和穿孔素),导致肿瘤细胞凋亡。近期研究表明,肿瘤浸润性 CD8⁺T 细胞与 PD-1 抑制剂疗效相关^[13]。Treg 是 CD4⁺T 细胞中 Foxp3 阳性亚群,已证实可抑制机体产生抗肿瘤免疫应答,诱导肿瘤免疫逃逸发生,许多免疫抑制剂功效与直接或间接抑制 Treg 能力有关。IRE 通过凋亡诱导细胞死亡,是一种更具有免疫源性的死亡方式,可能影响 T 细胞表型^[14],已有文献证明 IRE 消融相比射频消融和冷冻消融,可引起更强烈的免疫反应。在此背景下,本研究进行 IRE 联合 PD-1 抑制剂治疗小鼠肝癌的效果分析,并观察外周血和肿瘤组织中 CD8⁺T 细胞和 Treg 变化。

本研究记录术后 1~14 d 不同分组各项数据,发现随着观察时间延长,IRE 联合 PD-1 组相比于其它处理组,CD8⁺T 细胞浸润明显增多,Treg 数明显减少,小鼠肿瘤体积明显缩小甚至消失,提示 IRE

联合 PD-1 组引起的免疫应答更为强烈,并在降低肿瘤负荷方面作用最为明显;IRE 组术后 3、7 d 发现 Treg 细胞增多,出现一过性波动,这一现象的原因可能在于大量肿瘤抗原释放,免疫系统被激活,机体处于应激状态,为避免过度免疫导致自身损伤启动了免疫抑制信号,以降低免疫应答程度,而 IRE 联合 PD-1 组未观察到类似情况,说明 PD1 抑制剂有效地阻断了免疫抑制机制的启动,并调节了 CD8⁺T 细胞与 Treg 转换,使得 CD8⁺T 细胞增多的同时 Treg 细胞数下降。

肿瘤进展与复发和免疫状态密切相关,消融术导致原位肿瘤细胞死亡的同时^[15-16]增加肿瘤抗原暴露,刺激炎症反应,抑制或促进肿瘤生长^[17]。目前针对 IRE 引起免疫反应的结论仍存在争议,这可能与肿瘤模型选择以及 IRE 参数设置不同有关。2007 年,Al-Sakere 等^[18]最先报道 IRE 术后小鼠肉瘤组织内免疫细胞变化,发现 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞于术后 2 h 出现下降,6 h 下降更明显,得出 IRE 术后肿瘤组织中未发现免疫细胞浸润的结论。2017 年,Chen 等^[19]研究发现 IRE 治疗小鼠肝癌后 14 d 内细胞因子变化,有利于 Th2 细胞向 Th1 细胞转化,并发现巨噬细胞向消融区内募集。Nuccitelli 等^[10]研究发现 IRE 术引起的 CD8⁺T 细胞免疫反应,可抑制远处肿瘤生长。本研究与这些研究结果结论相符合,IRE 术可增加抗肿瘤免疫应答。IRE 通过增加肿瘤抗原释放,刺激机体局部和全身免疫反应,增加外周血和肿瘤组织内 T 细胞浸润,弥补 PD-1 抑制剂疗效欠佳,两者联合治疗使肿瘤组织内 CD8⁺T 细胞数明显增加,与此同时降低 Treg 比例,使机体抗肿瘤免疫反应更加显著,明显减少肿瘤体积,降低肿瘤负荷。

IRE 联合 PD-1 抑制剂在直接杀伤肿瘤的同时,打破了肿瘤微环境中免疫耐受状态,增强了抗肿瘤免疫应答,为肝癌治疗提供了新的方向。

[参 考 文 献]

- [1] 孙 钢. 不可逆电穿孔技术消融肿瘤研究进展[J]. 介入放射学杂志, 2015, 24: 277-281.
- [2] 刘树鹏, 秦子淋, 陈继冰, 等. 不可逆电穿孔消融治疗前列腺癌进展[J]. 介入放射学杂志, 2018, 27: 386-389.
- [3] 李 鑫, 刘凤永, 袁宏军, 等. 纳米刀治疗肝癌[J]. 介入放射学杂志, 2017, 26: 939-943.
- [4] Ansari D, Kristoffersson S, Andersson R, et al. The role of irreversible electroporation (IRE) for locally advanced pancreatic cancer: a systematic review of safety and efficacy[J]. Scand J Gastroenterol, 2017, 52: 1165-1171.
- [5] White SB, Zhang Z, Chen J, et al. Early immunologic response of irreversible electroporation versus cryoablation in a rodent model of pancreatic cancer[J]. J Vasc Interv Radiol, 2018, 29: 1764-1769.
- [6] Bulvik BE, Rozenblum N, Gourevich S, et al. Irreversible electroporation versus radiofrequency ablation: a comparison of local and systemic effects in a small-animal model[J]. Radiology, 2016, 280: 413-424.
- [7] Distelmaier M, Barabasz A, Heil P, et al. Midterm safety and efficacy of irreversible electroporation of malignant liver tumors located close to major portal or hepatic veins[J]. Radiology, 2017, 285: 1023-1031.
- [8] El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial[J]. Lancet, 2017, 389: 2492-2502.
- [9] Shi L, Chen L, Wu C, et al. PD-1 blockade boosts radiofrequency ablation-elicited adaptive immune responses against tumor[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22: 1173-1184.
- [10] Nuccitelli R, Berridge JC, Mallon Z, et al. Nanoelectroablation of murine tumors triggers a CD8-dependent inhibition of secondary tumor growth[J]. PLoS One, 2015, 10: e0134364.
- [11] Schachter J, Ribas A, Long GV, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006)[J]. Lancet, 2017, 390: 1853-1862.
- [12] Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance[J]. Nature, 2014, 515: 568-571.
- [13] Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: mechanisms, response biomarkers, and combinations[J]. Sci Transl Med, 2016, 8: 328rv4.
- [14] Inoue H, Tani K. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments[J]. Cell Death Differ, 2014, 21: 39-49.
- [15] 徐晓林, 朱争艳, 经 翔. 肝细胞癌患者射频消融前后的免疫状态研究进展[J]. 介入放射学杂志, 2017, 26: 87-91.
- [16] 韩宗宏, 曹建民, 史东宏. 肿瘤冷冻消融免疫效应研究的进展[J]. 介入放射学杂志, 2013, 22: 1055-1058.
- [17] Rozenblum N, Zeira E, Scaiewicz V, et al. Oncogenesis: an "off-target" effect of radiofrequency ablation[J]. Radiology, 2015, 276: 426-432.
- [18] Al-Sakere B, Bernat C, Andre F, et al. A study of the immunological response to tumor ablation with irreversible electroporation[J]. Technol Cancer Res Treat, 2007, 6: 301-306.
- [19] Chen X, Ren Z, Yin S, et al. The local liver ablation with pulsed electric field stimulate systemic immune reaction against hepatocellular carcinoma (HCC) with time-dependent cytokine profile[J]. Cytokine, 2017, 93: 44-50.

(收稿日期:2019-01-17)

(本文编辑:边 佑)