

# 肝癌瘤苗在 DENA 诱发 Wistar 大鼠 肝癌过程中阻断作用的研究

## Inhibitory Effect of the Liver Cancer Vaccines on the Development of Wistar Rat's Primary Liver Cancer Induced by DENA

李挺 刘剑勇 黄卓正 秦伟新 朱华展  
Li Ting Liu Jianyong Huang Zhuozheng Qin Weixin Zhu Huazhan

(广西肿瘤研究所 南宁市滨湖路 6 号 530021)

(Guangxi Cancer Institute, 6 Binhu Road, Nanning, Guangxi, 530021)

**摘要** 肝癌瘤苗用体外冷冻方法制备,并应用于 DENA 诱发原发性肝癌 Wistar 大鼠。结果显示:该瘤苗能提高 Wistar 大鼠的细胞免疫和体液免疫功能,并能阻断由 DENA 诱发的 Wistar 大鼠原发性肝癌。

**关键词** 肝癌瘤苗 肝癌 体外冷冻方法 免疫

**Abstract** The liver cancer vaccines were made by extrinsic cryodestorying method and used in Wistar rat with primary liver cancer induced by DENA. The results show that the liver cancer vaccines can enhance the cyto- and humoral immunity of the Wistar rat and, the development of the Wistar rat's primary liver cancer induced by DENA might be blocked by inoculating with the liver cancer vaccines.

**Key words** Liver cancer vaccine, liver cancer, extrinsic cryodestorying method, immunity

当代的许多基础和临床研究表明,恶性肿瘤的冷冻治疗除能直接破坏受冻癌灶外,经冷冻灭活的癌组织可激发荷瘤宿主的机体产生对该癌瘤的免疫效应,使机体抗该癌瘤的免疫力明显提高<sup>[1]</sup>。冷冻免疫具有种属和组织特异性,肿瘤冷冻免疫具有严格的肿瘤特异性<sup>[1]</sup>。我国山东省的元前军首先提出了体外冷冻概念<sup>[2]</sup>,并用体外冷冻方法制备了多种“冷冻抗癌制剂粗品(CAAP)”。其特异性抗癌作用与原肿瘤抗原所引起的抗癌作用有类同关系,且所激发的免疫强度明显高于后者。广西肿瘤研究所自 1988 年开始从事肝癌瘤苗对原发性肝癌的防治研究。本实验的肝癌瘤苗应用于 DENA 诱发 Wistar 大鼠肝癌过程,表现出显著的免疫动力学效应,有明显的阻断原发性肝癌发生的作用,现将结果报告如下。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

1.1.1 动物:由广西肿瘤研究所动物室提供 75 只纯种雄性 Wistar 大鼠,体重 250~400g。

1.1.2 二乙基亚硝酸胺 (DENA):由第二军医大学提供。

1.1.3 培养液:RPMI 1640 粉 (SIGMA 公司产品) 10.4 g, HEPES 粉 2.385 g, L-谷氨酰胺 0.292 g, NaHCO<sub>3</sub> 2.25 g, 加双蒸水 100 mL 混匀,调整 pH 7.2~7.6, G-6 滤器过滤除菌后低温保存。临用前配成完全液 (青-链霉素、卡那霉素的浓度均为 250 u/mL, 含 15% 小牛血清)。

1.1.4 <sup>3</sup>H-TdR:北京原子能研究所提供。

1.1.5 闪烁液:500 mL 甲苯中加入 3 g PPO (2,5 二苯基恶唑) 和 0.2 g POPOP [1,4 双 (5-苯基恶唑基-2)]。

1.1.6 刀豆素 A (Con A):SIGMA 公司产品。

1.1.7 醋酸-1-萘酯:上海试剂一厂产品。

#### 1.2 方 法

1.2.1 将 75 只 Wistar 大鼠随机分为 A、B、C 三组,每组 25 只。A 组为瘤苗实验组, B 组为佐剂对照组, C 组为生理盐水对照组。三组实验环境条件完全相同。

1.2.2 佐剂制备:按羊毛脂:液体石蜡油=1g:3 mL 的比例取羊毛脂 60 g, 石蜡油 180 mL, 在研钵中不断研磨混匀,分装于 10 mL 的小玻璃瓶中,高压灭菌后,放冰箱保存备用。使用前加入经热灭活的 BCG (每毫升加 0.5 mg BCG) 混匀即成完全佐剂。

1.2.3 肝癌疫苗的制备：先用 DENA（浓度为 100 ppm）喂养（自由饮用）Wistar 大鼠，诱发肝癌，取其肝癌组织（经病理证实），应用体外冷冻方法制成肝癌疫苗（内含佐剂）。

1.2.4 A、B、C 三组实验方法设计：A、B、C 三组动物同时开始给予浓度为 100 ppm 的 DENA 自由饮用，直至最后处死动物时为止。分别于开始饮用 DENA 后第 14、21、28、35、63、91 天给予 A 组动物腹腔注射肝癌疫苗 0.5 mL（含瘤悬液 0.25 mL，佐剂 0.25 mL）。同时给予 B 组动物腹腔注射佐剂 0.25 mL+生理盐水 0.25 mL。使用佐剂时，第一次用的为完全佐剂，以后各次用的均为不完全佐剂（即无 BCG）。另外同时给予 C 组动物腹腔注射生理盐水 0.5 mL。于开始给予 DENA 饮用后第 135 天同时处死全部动物（处死动物前抽血作免疫指标检测）。

1.2.5 T 细胞增殖反应<sup>[3]</sup>。

1.2.6 酸性  $\alpha$ -醋酸萘酯酶（ANAE）的测定<sup>[4]</sup>。

1.2.7 脾细胞玫瑰花结试验<sup>[4]</sup>。

1.2.8 对大白鼠的肝、脾、胸腺等行病理切片组织学检查（HE 染色）。

1.2.9 数理统计方法：数据以绝对值或  $\bar{x} \pm SD$  表示，实验结果按需要行 *t* 检验、 $\chi^2$  检验或秩和检验。

## 2 结果

### 2.1 T 细胞增殖反应结果

A、B、C 三组动物的刺激指数，从绝对值来看， $A > B > C$ 。经统计学处理，三组间有极显著性差异， $A : B$ 、 $A : C$ 、 $B : C$  的 *P* 值均  $< 0.001$ 。说明 A 组的 T 细胞增殖反应显著高于 B 组和 C 组，而 B 组又显著高于 C 组。见表 1、图 1。

### 2.2 酸性 $\alpha$ -醋酸萘酯酶（ANAE）的测定结果

A、B、C 三组动物的 T 淋巴细胞数  $A > B > C$ ，经统计学处理， $A : B$ 、 $A : C$  *P* 值均  $< 0.001$ ； $B : C$  *P*  $< 0.02$ ，即 A 组动物 T 细胞数显著高于 B 组和 C 组，而 B 组又高于 C 组。见表 2、图 2。

### 2.3 脾细胞玫瑰花结试验结果

从 A、B、C 三组动物的脾玫瑰花结绝对值来看， $A > B$ ， $A > C$ ， $B < C$ ，但统计学上尚无显著性差异（*P*  $> 0.05$ ）。

### 2.4 A、B、C 三组病理学检查结果

A、B、C 三组肝癌发生情况及病

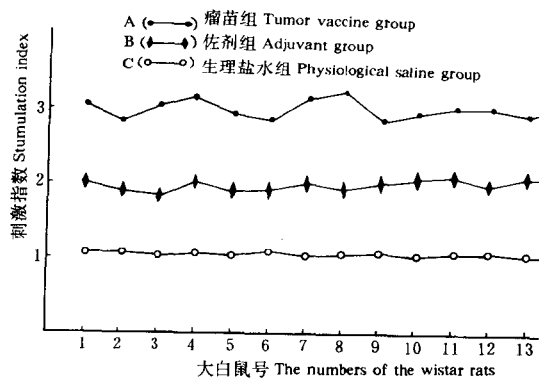


图 1 T 淋巴细胞增殖反应

Fig. 1 T-lymphocytes proliferation reaction

表 1 T 细胞增殖反应结果

Table 1 Results of T-lymphocytes proliferation reaction

	A (n=15)	B (n=14)	C (n=15)
刺激指数 Stimulation index ( $\bar{x} \pm SD$ )	3.004 $\pm$ 0.108	2.009 $\pm$ 0.073	1.039 $\pm$ 0.015
<i>P</i>	$< 0.001$ (A : B, A : C, B : C)		

表 2 酸性  $\alpha$ -醋酸萘酯酶活性测定结果

Table 2 Results of acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase determination

	A (n=15)	B (n=14)	C (n=15)
阳性淋巴细胞 百分率 Positive lymphocytes (%) ( $\bar{x} \pm SD$ )	67.67 $\pm$ 5.12	58.14 $\pm$ 2.57	54.40 $\pm$ 4.75
<i>P</i>	$< 0.001$ (A : B, A : C); $< 0.02$ (B : C)		

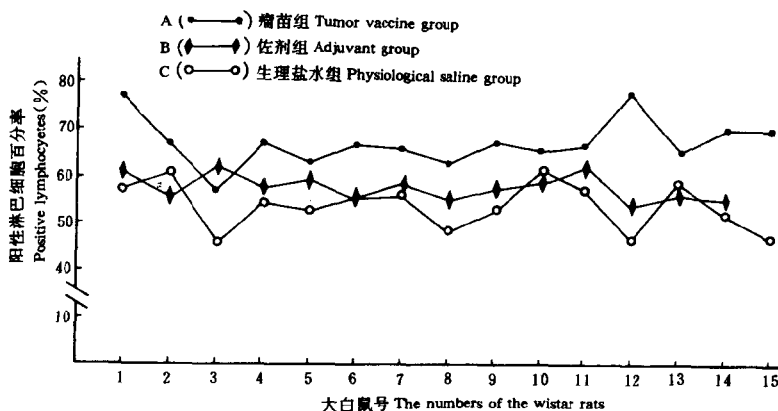


图 2 酸性  $\alpha$ -醋酸萘酯酶测定

Fig. 2 Acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase determination

理学检查结果分别见表 4、表 5。因 B 组有 4 只大鼠在未足诱癌时间 (120 天) 之前死亡 (经病理解剖发现均死于肺部感染, 无肝癌等癌肿), 所以 B 组肝癌发生率按 21 只动物数计算。A、B、C 三组肝癌发生率分别为 24.00%、52.38%、52.00%, 其中最大的肝癌结节分别为: 1.4cm×1.4cm、4cm×4cm、2cm×2cm。A 组中有 1 例出现转移性肺部肿瘤。B 组中有 2 例出现转移性肺部肿瘤, 有 1 例出现转移性肾脏肿瘤。所有大鼠的胸腺光镜下均未见有明显的病理学改变。

表 3 玫瑰花结试验结果

Table 3 Results of rosette test

	A (n=15)	B (n=15)	C (n=15)
玫瑰花结形成率 Rosette forming rate ( $\bar{x} \pm SD$ )	14.17±8.70/500	9.30±4.88/500	10.60±3.97/500
P	>0.05 (A:B, A:C); >0.1 (B:C)		

表 4 肝癌发生率

Table 4 The incidence rate of liver cancer

	A	B	C
肝癌发生率 The incidence rate of liver cancer	24.00% (6/25)	52.38% (11/21)	52.00% (13/25)
P	<0.05 (A:B, A:C); >0.05 (B:C)		

表 5 病理检查结果

Table 5 Results of pathological examination

	A (n=25)	B (n=21)	C (n=25)	P
肝细胞异型增生的例数 Cases of the liver cells' dysplasia	11	7	13	>0.05 (A:B, A:C, B:C)
肝脏增生结节形成的例数 Cases of hyperplastic node in the liver	15	13	23	>0.05 (A:B) <0.05 (A:C, B:C)
肝细胞坏死的例数 Cases of the liver cells' necrosis	12	18	14	>0.05 (A:B, A:C, B:C)
脾脏生发中心减少 或/和萎缩的例数 Cases of decrease or/and atrophy in germinal center of the spleen	4	10	13	<0.05 (A:B) <0.01 (A:C) >0.05 (B:C)

## 2.5 以上结果经重复试验结果相同。

## 3 讨论

在很长一个时期, 人们认为恶性肿瘤的生长是不受限制的, 携瘤宿主对它是没有免疫力的<sup>[5]</sup>。近年来, 随着免疫学的发展, 动物实验与临床观察均已证实, 宿主对肿瘤的存在能产生针对性的免疫应答<sup>[5]</sup>。

本实验是通过冷冻免疫的作用来提高实验组动物抗肿瘤能力的, 我们使用体外冷冻方法制备肝癌瘤苗, 应用于 DENA 诱发 Wistar 大鼠

肝癌过程, 结果表明, 肝癌发生率 A 组 (实验组) 低于 B 组、C 组 ( $P < 0.05$ ), 而 B 组、C 组间经统计学处理, 无显著性差异。结果显示, 应用肝癌瘤苗能降低 A 组动物的原发性肝癌发生率, 而单纯应用佐剂或生理盐水无此作用。

T 细胞增殖反应、ANAE 测定的结果均提示, A 组动物的细胞免疫反应最好, B 组次之, C 组最差。从而显示出, 在提高细胞免疫方面, 使用肝癌瘤苗优于单纯应用佐剂, 而使用佐剂又优于单纯使用生理盐水。在抗肿瘤免疫中是以细胞免疫反应为主<sup>[5]</sup>, 而 T 细胞在其中起着重要作用。本实验结果与其他作者的报道相符<sup>[6,7]</sup>。这可能是阻断 Wistar 大鼠原发性肝癌发生的重要因素之一。

脾细胞玫瑰花结试验结果表明, A 组动物的抗体形成细胞数 (绝对数) 比 B、C 两组高, 但尚无统计学意义。但至少可以看出, 应用肝癌瘤苗除能提高细胞免疫功能外还有增强体液免疫功能的趋势。本实验的结果与高美华等报道的实验结果相符<sup>[8]</sup>。

病理学检查结果表明, 在肝细胞异型增生方面, 经统计学处理, A、B、C 三组间无显著性差异。而肝细胞异型增生属于癌前病变, 所以, 这就提示, 肝癌瘤苗阻断肝癌发生的作用很可能在癌前病变发展为肝癌这一环节上。机理可能是: 肝癌瘤苗使机体的免疫系统激活, 而具有抗肝癌细胞的免疫力。当机体内一旦出现肝癌细胞时, 则机体的免疫系统出现对该细胞的免疫效应, 从而使肝癌细胞损伤、破坏。在肝组织增生结节形成方面, C 组的发生率最高, 它与 A、B 组相比较均有显著性差异, 而 A 组与 B 组相比较则无显著性差异, 其中原因尚待进一步研究。在肝细胞坏死方面, A、B、C 三组之间无显著性差异。考虑肝细胞坏死是由于诱癌物 DENA 引起, 而肝癌瘤苗或佐剂不能降低其发生率。然而肝细胞的反复坏死、再生会导致出

现癌前病变,这里进一步提示了前面所述的肝癌瘤苗阻断肝癌发生的可能的环节所在。在脾脏生发中心减少或萎缩方面,A组发生率最低(与脾细胞玫瑰花结试验结果相符),它与B、C组相比较有显著性差异。原因可能是: DENA及肝癌本身对机体的免疫系统有损害作用,它们能使Wistar大鼠脾脏的生发中心减少或萎缩,而肝癌瘤苗可作为抗原刺激脾脏白髓的淋巴小结中的生发中心生长,使A组动物的脾脏生发中心减少或萎缩的发生率较低。A组中最大的肝癌结节较B、C组中的最大结节为小,这一点也提示肝癌瘤苗具有抗肝癌作用。

综上所述,在DENA诱发Wistar大鼠肝癌过程中应用肝癌瘤苗能提高该鼠的细胞免疫功能,亦提示有提高体液免疫功能的趋势。肝癌瘤苗可能主要在肝脏的癌前病变发展为肝癌这一环节上起作用,从而使实验组动物的肝癌发生率降低。

过去,对原发性肝癌行冷冻外科治疗已有不少报道。但采用体外冷冻方法制备肝癌瘤苗进行防治原发性肝癌的研究,除广西肿瘤研究所外还未见报道。本实验采用体外冷冻方法制备肝癌瘤苗并应用于阻断DENA诱发Wistar大鼠肝癌过程中的研究,取得了良

好的效果,为原发性肝癌的冷冻免疫防治研究的可行性提供了有力的证据,从而有可能为人类原发性肝癌的防治探索出一条新的有效的途径。

#### 参考文献

- 1 郭玉德主编. 实用冷冻疗法. 北京: 人民卫生出版社, 1990. 51~74.
- 2 元前军. 冷冻外科新进展. 山东: 中国制冷学会第六委员会, 1988. 14~19.
- 3 赵长春, 王庭桂, 杨春生主编. 临床免疫检验学. 天津: 天津科学技术出版社, 1990, 353~354.
- 4 上海市医学化验所主编. 临床免疫学检验上册. 上海: 上海科学技术出版社, 1983, 44~48.
- 5 顾长海. 临床细胞免疫学. 重庆: 重庆出版社, 1990, 285~300.
- 6 Gage-AA. Gynosurgery in the treatment of cancer. surg-Gynecol-Obstet, 1992, 174 (1): 73~92.
- 7 曲云英, 高美华, 邱世翠. 液氮冷冻对小鼠免疫功能的影响. 中国应用生理学杂志, 1991, 7 (1): 89~90.
- 8 高美华, 曲云英, 邱世翠等. 液氮冷冻对免疫功能影响的实验观察. 中华理疗杂志, 1990, (2): 82~83.

(责任编辑: 梁积全、蒋汉明)

(上接第28页 Continue from page 28)

#### 致谢

龙胜县里骆生态站及本院生态室的部分同志参加野外观测工作, 在此致谢!

#### 参考文献

- 1 温远光等. 广西不同生态地理区域杉木人工林的生物生产力. 广西农学院学报, 1988, 7 (2): 55~66.
- 2 中华人民共和国国家标准局. 森林土壤水分—物理性质的测定. GB7855~87. 1988.
- 3 黄承标. 里骆林区不同森林类型对大气降水的再分配. 广西林业科技, 1988, (1): 8~12.
- 4 黄承标等. 广西不同植被类型地表径流的研究. 林业科学, 1991, 27 (5): 490~497.
- 5 卢俊培等. 热带亚热带森林水文学研究综述. 热带林业科技, 1987, (2): 1~8.
- 6 中野秀章著. 森林水文学. 李云森译. 北京: 中国林业出版社, 1983, 121~124, 212~213.
- 7 康文星等. 杉木人工林水量平衡和蒸散的研究. 植物生态学与地植物学学报, 1992, 16 (2): 187~195.
- 8 马雪华. 杉木、马尾松人工林径流特征的研究. 林业科学研究, 1992, 5 (3): 284~289.
- 9 刘醒华. 中国西南高山暗针叶林森林土壤生态的动力学研究与方法. 见: 国际林联山地森林保护与管理学术会议论文集, 北京: 科学出版社, 1992, 70~73.

(责任编辑: 蒋汉明)