

生物电技术与肿瘤微创治疗研究进展—— 来自第 11 届国际生物电年会

陈新华, 张雪明, 殷胜勇, 郑树森

浙江大学医学院附属第一医院肝胆胰外科 卫生部多器官联合移植研究重点实验室
浙江省器官移植重点研究实验室, 浙江 杭州 310003

[关键词] 肿瘤/放射疗法; 外科手术, 微创性; 纳米技术; 导管消融术; 会议
[中图分类号] R73 [文献标志码] A

Bioelectric-technology in tumor minimally invasive therapy—— from the 11th International Bioelectrics Symposium

CHEN Xin-hua, ZHANG Xue-ming, YIN Sheng-yong, ZHENG Shu-sen (Department
of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, First Affiliated Hospital, Zhejiang University
School of Medicine, Hangzhou 310003, China)

Corresponding author: ZHENG Shu-sen, E-mail: shusenzheng@zju.edu.cn

[Key words] Neoplasms/radiotherapy; Surgical procedures, minimally invasive;
Nanotechnology; Catheter ablation; Congresses

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2015, 44(1):108-111.]

第 11 届国际生物电年会于 2014 年 10 月 13 日—16 日在美国密苏里州哥伦比亚大学举行, 此次学术论坛的内容非常丰富, 涵盖脉冲电场在医学、环境、食品、电场发生器研发、肿瘤治疗、灭菌、动植物生长以及基础研究等方面的最新进展。其中生物电技术在肿瘤治疗中的应用成为会议讨论热点, 各项临床试验数据引人瞩目, 标志着生物电技术快速发展, 或将改变肿瘤治疗模式。本文择其要者介绍于下。

1 电消融能直接毁损肿瘤并激发肿瘤免疫反应

美国加利福尼亚生物电医疗公司 (BioElectroMed) 的 Nuccitelli 教授是首位使用纳秒级别脉冲电场消融肿瘤的科学家^[1], 他报道了纳秒脉冲临床治疗肿瘤患者的效果^[2], 揭示了电场脉冲消融是非致热消融手段, 与传统的射频消融截然不同^[3]。在本次会议上他介绍了利用纳秒电消融治疗技术激发肿瘤免疫反应来切除肿瘤

收稿日期: 2014-12-23 接受日期: 2014-12-30

基金项目: 国家自然科学基金 (81372425); 浙江省自然科学基金 (LY13H180003); 教育部留学回国人员科研启动基金 (J20120279); 新疆科技厅合作项目 (2013911131; 2014KL002)。

第一作者: 陈新华 (1975 -), 女, 博士, 副研究员, 主要从事肝胆胰外科肿瘤外科微创治疗; E-mail: xinhua_chen@zju.edu.cn

通讯作者: 郑树森 (1950 -), 男, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事肝移植及肝胆胰外科工作; E-mail: shusenzheng@zju.edu.cn

的研究。美国《科学》(*Science*)杂志将“肿瘤免疫疗法”作为2013年六大科学领域最值得关注的方向之一^[4]。电场脉冲本身不是免疫疗法,但它的非致热效应却可以激活机体的免疫系统。此疗法可通过电极向靶组织提供持续时间极短(100 ns)、强度为30 kV/cm的电脉冲。当施加至少100个脉冲后,靶组织发生免疫原性的细胞凋亡,特点是细胞发生固缩、DNA片段化、钙网蛋白膜转位磷脂酰丝氨酸外翻。这些分子作为“吃我”的信号被外周的抗原提呈细胞识别,依次启动产生效应性细胞毒性T细胞,最后消除残留的肿瘤细胞或继发性肿瘤。最令人振奋的发现是,纳秒电消融能刺激处理过的肿瘤发生免疫应答。对B6白化小鼠皮下注射同源小鼠肿瘤细胞,而在消融这些移植肿瘤1~4周后,注射的继发性肿瘤表现出生长抑制,并且在继发性肿瘤中发现CD8⁺T细胞,表明纳秒电消融可通过全身性免疫反应攻击并消灭继发肿瘤。Nuccitelli教授介绍说文献中已经报道钙网蛋白膜转运这一变化是免疫原性细胞死亡引起免疫应答的必要条件,而他们的实验发现,在经过15个脉冲、25 kV/cm治疗后的人胰腺癌细胞和鳞状细胞癌的细胞中,钙网蛋白膜转运的比例高达30%。他们先使用了两针电极烧蚀大鼠肝脏的小片区域来标记消融区,接着消融原位肝肿瘤,监测它们对纳秒脉冲电场的反应,发现用400个纳秒脉冲(参数为30 kV/cm,100 ns)可以达到完全切除肝脏肿瘤的目的。如果3周后在肝脏不同肝叶中第二次注射肿瘤,那么与第一个肿瘤的1周生长情况相比,第二个肿瘤的1周增长受到90%的抑制。但是,如果通过注射OX-8抗体的干扰素诱导蛋白耗尽细胞毒性CD8⁺T细胞,那么第二个肿瘤的生长速度与第一个肿瘤一样快。最后Nuccitelli教授总结称,实验证据表明,纳秒电消融治疗技术激活了适应性免疫应答,产生了细胞毒性CD8⁺T细胞攻击肿瘤以达到治疗效果。

2 电转染调控内皮糖进入细胞进行血管靶向治疗

斯洛文尼亚卢布尔雅那肿瘤研究所(the Institute of Oncology Ljubljana, Slovenia)的Sersa教授报告了内皮糖作为癌症治疗的一个有效靶向的证据。斯洛文尼亚卢布尔雅那肿瘤研究所是世界上首个进行生物电联合顺铂治疗肿瘤的研究

所^[5],他们首次研究发现可利用电场脉冲冲击打细胞膜提高化疗药物的渗透,由此奠定了一门新的学科——电化学疗法^[6]。该研究所在世界上率先开展脉冲电场联合博来霉素或顺铂治疗皮肤癌的临床试验。全世界已经有超过4000例患者使用电化学治疗,多个国家如澳大利亚、奥地利、比利时、保加利亚、丹麦、法国、德国、希腊、匈牙利、爱尔兰、意大利、日本、墨西哥、尼加拉瓜、波兰、葡萄牙、斯洛文尼亚、西班牙、瑞典、英国、美国已经允许电化学疗法应用于临床^[7]。最近,通过外科手术、内窥镜或经皮穿刺方法已经将电化学疗法用于体内肿瘤的治疗^[8]。在本次会议上,Sersa教授汇报了使用电转染方法进行肿瘤血管靶向治疗。他们摸索出一种新的治疗手段,采用内皮糖—肿瘤生长因子 β 共受体这个靶标,构建了编码内皮糖蛋白的shRNA的质粒DNA,并用基因电转染方法来确定其抗肿瘤血管的靶向作用。体外和体内的数据提供了通过沉默内皮糖蛋白达到血管靶向作用的证据。首先由体外数据支持了沉默内皮糖的血管靶向作用,主要包括减少内皮细胞增殖和血管形成。在接种TS/A乳腺癌细胞系的小鼠乳腺癌模型中,肿瘤细胞不表达内皮糖蛋白,观察到肿瘤生长抑制和血管数量的变化。活体显微镜观察结果支持了血管破坏和抗血管生成的作用。最后Sersa总结称,他们的研究结果提供了内皮糖作为癌症治疗的一个有效靶向的证据,并支持进一步发展这种治疗方法,尤其是与基因电转染方法相结合,可以有效提高血管靶向给药的效率。

3 电化学治疗促进博来霉素渗透进入肿瘤

Sersa教授还介绍说,他们进行了第一次大肠癌肝转移的电化学疗法的临床试验,这是一项前瞻性临床I/II期研究,目的是评估电化学疗法在大肠癌肝转移治疗中的可行性、安全性和功效^[8]。他们在2009—2014年期间选择18例大肠癌肝转移患者进行电化学疗法。电化学在开放手术中进行,采用个体化的治疗方案,通过在肿瘤内部和周围插入电极,使足够强的电场覆盖整个肿瘤区域和正常组织的边缘。在博来霉素静脉内给药(15 000 IU/m²)之后,进行电脉冲,与心电图同步。结果没有观察到术中和/或手术后的严重不良事件。所有治疗转移灶的放射学评估显示

85% 完全反应,15% 部分反应。组织学分析表明肿瘤组织显著减小。在 147 d(中位数)后进行的第二次放射学评价表明有 4 个转移灶出现、发展。最后 Sersa 教授得出结论:大肠癌肝转移治疗中的电化学疗法具有可行性、安全性和一定疗效,尤其对于那些位于肝脏血管周围、不适合手术或射频消融的肿瘤也是可行的。Sersa 教授还认为,有必要提出规范的方法,制定标准操作步骤,制作精准电极来提高基于电极技术的靶向性和准确度^[9]。

4 钙离子可以取代博来霉素用于电化学治疗

丹麦哥本哈根大学医院的 Gehl 教授首先将生物电联合化疗治疗范围从皮肤癌扩展到转移性肿瘤^[10]和乳腺癌临床试验^[11],他还研发了新的治疗设备,将该技术用于颅内肿瘤的治疗^[12-14]。在本次会议上他报告了钙离子电化学治疗皮肤转移肿瘤的随机双盲 II 期临床试验:采用电穿孔的方法使电脉冲暂时通透细胞膜,从而使正常情况下靠渗透作用方法穿透细胞膜的大分子进入细胞;而在癌症治疗中则是促进化疗药物(如博来霉素)进入癌细胞(电化学治疗)。体外和体内研究表明,钙和电穿孔的组合增加了细胞内钙离子浓度,从而导致肿瘤细胞死亡。这显示了利用钙离子(不是博来霉素)在电化学治疗中的可能性。不同种类肿瘤转移患者均分为两个治疗组:①电穿孔后向瘤内注射钙离子;②电穿孔后向瘤内注射博来霉素。这是一次性的处理,半年后显示随机码,然后通过肿瘤反应、不良事件监测和组织样本对疗效和安全性进行评估。目前该研究仍在进行中,15 例患者中有 5 例已经接受治疗,26 个转移灶正在进行疗效评价。目前数据表明,钙离子电穿孔对皮肤转移癌有效果:以前没有接受过治疗的转移灶出现完全反应,而以前接受过治疗的转移灶出现混合反应。同时,生物电治疗联合钙离子治疗肿瘤较之联合博来霉素治疗,优点在于色素沉着较少。治疗至今患者未出现严重的不良反应。研究得到的初步数据表明,钙离子电化学治疗是一种安全、高效的治疗,同时能够在低收入国家中推广使用。但最终结果还有待进一步观察和分析。

5 电化学治疗联合免疫刺激剂能激活肿瘤免疫

法国巴黎大学擅长使用生物电技术进行基因

转染^[15]和肿瘤免疫治疗^[16]。本次会议上法国巴黎大学的 Mir 博士介绍了博来霉素电化学治疗可以在小鼠大肠癌肿瘤细胞治疗中诱导免疫原性标志物产生。电化学用于去除皮肤和皮下肿瘤的局部肿瘤治疗已经二十多年。若干证据支持免疫系统在发挥抗癌疗效过程中具有重要作用。数年前出现的免疫原性细胞死亡理论强调一些抗癌治疗会产生危险相关分子,其能触发适应性免疫反应的抗肿瘤作用。因此,死亡的肿瘤细胞表现为治疗性的疫苗,并产生针对剩余肿瘤细胞的细胞毒性免疫反应。Mir 博士试图通过研究来评估电化学致具有免疫原性细胞死亡特性的癌性细胞死亡的能力。他们的实验小组定量研究了钙网蛋白转位到死亡细胞的细胞膜后三磷酸腺苷及高迁移率族蛋白 1 的释放,最终发现透化细胞膜而非杀伤性的电脉冲可引起细胞表面钙网蛋白暴露和三磷酸腺苷释放。然而,电脉冲与博来霉素联合产生的高迁移率族蛋白 1 释放是由细胞死亡诱导的。在免疫功能完整的小鼠身上进行的疫苗接种方案得到的数据支持了上述结论,即通过注射死去的经电化学处理过的肿瘤细胞可以产生抗肿瘤免疫反应,抑制后续接种的肿瘤细胞的生长。另外 Mir 博士还证实电化学治疗对免疫功能完整动物的抗肿瘤效果比对免疫缺陷动物好,也就是说在前者能达到肿瘤完全消退,但在后者中不能达到相同效果。最后 Mir 博士总结称电化学不仅具有针对肿瘤细胞的固有杀伤特性,还能通过引起免疫原性细胞死亡起到激活全身(虽然有限)抗肿瘤的免疫反应。另外,他认为如果可以通过联合免疫刺激剂应用来提高全身性免疫反应,电化学可以作为一个在防止肿瘤复发和转移同时治疗实体肿瘤的方法。此外,利用施加电脉冲过程中产生的危险相关分子制造 DNA 疫苗这一方案也很有意思,因为三磷酸腺苷可以介导抗原提呈细胞在疫苗接种部位的招募和成熟,而钙网蛋白的暴露可以促进靶细胞的吞噬,表达目的抗原。

6 结 语

这次会议上报告的多个生物电技术抗击肿瘤的临床试验均获得可喜的结果:与对照相比,显著延长了患者总体生存时间,部分接受生物电治疗的患者获得长久生存,接近临床治愈;生物电技术治疗肿瘤的优点是效果持久,毒副作用少,并对转

移病灶有效。而分子靶向治疗药物尽管患者应答率较高,短期效果显著,但多数1年之内产生耐药。因此,在晚期肿瘤患者中,利用生物电技术提高化疗药物给药效率,或直接消融原位肿瘤及转移肿瘤,可在短期内明显减少肿瘤患者肿瘤负荷。生物电技术治疗肿瘤的临床应用值得期待。

参考文献:

- [1] NUCCITELLI R, PLIQUETT U, CHEN X, et al. Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct [J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2006, 343(2): 351-360.
- [2] NUCCITELLI R, WOOD R, KREIS M, et al. First-in-human trial of nanoelectroablation therapy for basal cell carcinoma: proof of method [J]. **Exp Dermatol**, 2014, 23(2): 135-137.
- [3] PLIQUETT U, NUCCITELLI R. Measurement and simulation of Joule heating during treatment of B-16 melanoma tumors in mice with nanosecond pulsed electric fields [J]. **Bioelectrochemistry**, 2014, 100: 62-68.
- [4] Breakthrough of the year 2013. Notable developments [J]. **Science**, 2013, 342(6, 165): 1435-1441.
- [5] SERSA G, MIKLAVCIC D. Electrochemotherapy of tumours [J]. **J Vis Exp**, 2008, (22): 1038.
- [6] CAMPANALG, MALI B, SERSA G, et al. Electrochemotherapy in non-melanoma head and neck cancers: a retrospective analysis of the treated cases [J], **Br J Oral Maxillofac Surg**, 2014, 52(10): 957-964.
- [7] CEMAZAR M, JARM T, SERSA G. Cancer electrogene therapy with interleukin-12 [J]. **Curr Gene Ther**, 2010, 10(4): 300-311.
- [8] EDHEMOVIC I, BRECELI E, GASLJEVIC G, et al. Intraoperative electrochemotherapy of colorectal liver metastases [J]. **J Surg Oncol**, 2014, 110(3): 320-327.
- [9] YARMUSH M L, GOLBERG A, SERŠA G, et al. Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges [J]. **Annu Rev Biomed Eng**, 2014, 16: 295-320.
- [10] MATTHIESSEN L W, JOHANNESSEN H H, HENDEL H W, et al. Electrochemotherapy for large cutaneous recurrence of breast cancer: a phase II clinical trial [J]. **Acta Oncol**, 2012, 51(6): 713-721.
- [11] MATTHIESSEN L W, CHALMERS R L, SAINSBURY D C, et al. Management of cutaneous metastases using electrochemotherapy [J]. **Acta Oncol**, 2011, 50(5): 621-629.
- [12] LINNERT M, IVERSEN H K, GEHL J. Multiple brain metastases-current management and perspectives for treatment with electrochemotherapy [J]. **Radiol Oncol**, 2012, 46(4): 271-278.
- [13] AGERHOLM-LARSEN B, IVERSEN H K, IBSEN P, et al. Preclinical validation of electrochemotherapy as an effective treatment for brain tumors [J]. **Cancer Res**, 2011, 71(11): 3753-3762.
- [14] MAHMOOD F, GEHL J. Optimizing clinical performance and geometrical robustness of a new electrode device for intracranial tumor electroporation [J]. **Bioelectrochemistry**, 2011, 81(1): 10-16.
- [15] MIR L M. Electroporation-based gene therapy: recent evolution in the mechanism description and technology developments [J]. **Methods Mol Biol**, 2014, 1121: 3-23.
- [16] CALVET C Y, FAMIN D, ANDRÉ F M, et al. Electrochemotherapy with bleomycin induces hallmarks of immunogenic cell death in murine colon cancer cells [J]. **Oncoimmunology**, 2014, 3: e28131.

[本文编辑 沈敏 蒋婉洁]