(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103610667 A
(43)申请公布日 2014.03.05

(21)申请号 201310549490.6

(22)申请日 2013.11.07

(71)申请人 广东药学院
地址 510006 广东省广州市广州大学城外环东路

(72)发明人 刘晓波 胡质毅 张萃 周树录 陈本哲 陈佳 朱江 肖笑荣 刘晓芬 刘云 王丽京

(74)专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限公司 44001
代理人 刘明星

(51)Int.Cl.
A61K 31/045(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61K 31/04(2006.01)

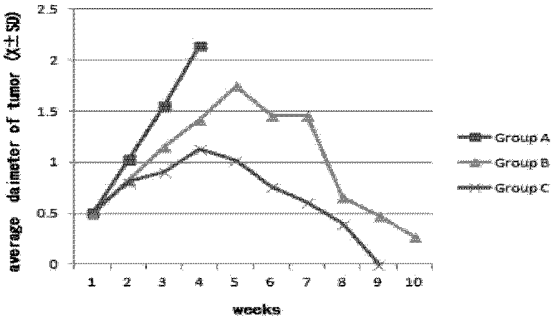
权利要求书1页 说明书9页 附图8页

(54)发明名称

一种肿瘤治疗的新型制剂DNCB/无水乙醇溶液

(57)摘要

本发明公开了一种肿瘤治疗的新型制剂DNCB/无水乙醇溶液。本发明的肿瘤治疗的新型制剂DNCB/无水乙醇溶液，其特征在于，由2,4-二硝基氯苯(DNCB)和无水乙醇组成。本发明将DNCB溶于无水乙醇制备DNCB/无水乙醇溶液，将DNCB/无水乙醇溶液代替单纯无水乙醇制剂进行PEI治疗肿瘤，在无水乙醇发挥其物理性杀伤肿瘤细胞时，DNCB也在肿瘤部位诱导产生强大的DTH免疫学效应，DNCB/无水乙醇溶液制剂应用于肿瘤处既具有无水乙醇的凝固坏死物理效应，又能引发肿瘤局部强大的抗肿瘤细胞免疫效应，实现无水乙醇的物理性杀伤肿瘤细胞作用与DNCB的抗肿瘤免疫效应的有机结合，达到了增效的效果，较单纯的无水乙醇治疗具有更优越的疗效。



CN 103610667 A

1. 一种肿瘤治疗的新型制剂DNCB/无水乙醇溶液，其特征在于，由2,4-二硝基氯苯（DNCB）和无水乙醇组成。

2. 根据权利要求1所述的肿瘤治疗的新型制剂DNCB/无水乙醇溶液，其特征在于，所述的肿瘤为肝癌或骨髓瘤或黑色素瘤。

3. 根据权利要求1或2所述的肿瘤治疗的新型制剂DNCB/无水乙醇溶液，其特征在于，所述的肿瘤治疗的新型制剂DNCB/无水乙醇溶液，包括致敏用制剂和治疗用制剂，所述的致敏用制剂是由2,4-二硝基氯苯和无水乙醇按照20～40mg：1ml混合而成，所述的治疗用制剂是由2,4-二硝基氯苯和无水乙醇按照1～5mg：1ml混合而成。

4. 根据权利要求3所述的肿瘤治疗的新型制剂DNCB/无水乙醇溶液，其特征在于，所述的致敏用制剂是由2,4-二硝基氯苯和无水乙醇按照40mg：1ml混合而成，所述的治疗用制剂是由2,4-二硝基氯苯和无水乙醇按照1mg：1ml混合而成。

5. DNCB/无水乙醇溶液在制备肿瘤治疗药物中的应用，所述的DNCB/无水乙醇溶液是由2,4-二硝基氯苯和无水乙醇组成。

6. 根据权利要求5所述的应用，其特征在于，所述的肿瘤为肝癌或骨髓瘤或黑色素瘤。

7. 根据权利要求5或6所述的应用，其特征在于，所述的DNCB/无水乙醇溶液，包括致敏用制剂和治疗用制剂，所述的致敏用制剂是由2,4-二硝基氯苯和无水乙醇按照20～40mg：1ml混合而成，所述的治疗用制剂是由2,4-二硝基氯苯和无水乙醇按照1～5mg：1ml混合而成。

8. 根据权利要求7所述的应用，其特征在于，所述的致敏用制剂是由2,4-二硝基氯苯和无水乙醇按照40mg：1ml混合而成，所述的治疗用制剂是由2,4-二硝基氯苯和无水乙醇按照1mg：1ml混合而成。

一种肿瘤治疗的新型制剂 DNCB/ 无水乙醇溶液

技术领域：

[0001] 本发明属于生物医药领域，具体涉及一种肿瘤治疗的新型制剂 DNCB/ 无水乙醇溶液。

背景技术：

[0002] 经皮穿刺瘤内注射无水乙醇(percutaneous ethanol injection,PEI) 是治疗肝癌等实体瘤的常规方法，有效、安全、简便易行是其特点。它是通过乙醇的物理作用，使癌细胞脱水固化，蛋白质凝固变性从而破坏肿瘤细胞，同时，乙醇能使肿瘤血管收缩，使血管壁内皮细胞变性、坏死，继而导致血栓形成，致肿瘤缺血坏死。然而无水乙醇抗瘤作用仅是一种单纯的物理作用，其疗效依赖于它在肿瘤中的渗透范围。由于无水乙醇在肿瘤中渗透能力有限，不可能杀灭全部肿瘤细胞(尤其对较大的肿瘤效果差)，未被乙醇接触的肿瘤细胞仍可继续生长，导致肿瘤的复发，这是单纯无水乙醇治疗肿瘤的主要局限。如果在应用无水乙醇凝固坏死大部分肿瘤细胞的同时，于肿瘤局部引入免疫学机制参与抗肿瘤，以进一步消灭残存的肿瘤细胞，可克服单纯无水乙醇治疗肿瘤的不足，具有重要的临床意义。研究证明：肿瘤局部有淋巴细胞等免疫细胞的浸润及侵润细胞的数量同疗效和预后呈密切正相关，肿瘤组织有大量免疫细胞浸润的个体预后良好。

[0003] DNCB(Dinitrochlorobenzen) 是一种化学合成的小分子半抗原，化学名称为 1 氯 -2,4 二硝基氯苯，简称 2,4 二硝基氯苯。DNCB 接触机体时，能与机体蛋白质结合形成完全抗原，该完全抗原具有极强的免疫原性，能诱发机体产生强大的迟发型超敏反应(delayed-type hypersensitivity，DTH；也称 IV 型超敏反应)，表现为 DNCB 致敏过的机体再次接触 DNCB 时，DNCB 接触局部有大量淋巴细胞、单核细胞等免疫细胞侵润，伴有 IL-2，IFN-γ，TNF-α，IL-3，GM-CSF，MCP-1 等多种细胞因子的释放，其作用类似于卡介苗(BCG)。DNCB 的丙酮溶液或制剂早已用于临床检测和治疗中。DNCB 皮肤斑贴试验用于测定机体细胞免疫；DNCB 用于临床治疗的疾病主要包括：黑色素瘤等皮肤癌及其它恶性肿瘤皮肤转移癌；皮肤病毒性疣；斑秃；HIV 感染等，这些治疗已取得了肯定或者显著的疗效。

[0004] 基于 DNCB 强大的诱导 DTH 能力，DNCB 制剂治疗皮肤肿瘤等疾病已有 20-30 年的时间，均取得显著或肯定疗效。但这些临床实践及研究中一般将 DNCB 溶于丙酮制备 DNCB/ 丙酮溶液或制剂进行治疗，丙酮对机体有毒性作用，应用于临床治疗存在很大风险。目前未见将 DNCB 溶解于无水乙醇，制成无水乙醇 /DNCB 制剂用于临床实践的报道，也未见 DNCB/ 无水乙醇溶液经皮穿刺介入治疗肝癌的临床应用和研究的报道。虽然 DNCB 含苯环结构，推测其有潜在的致突变性，但临床应用多年，没有发现一例因使用 DNCB 而导致肿瘤产生的报道。

发明内容：

[0005] 本发明的第一个目的是提供一种用于肿瘤治疗的新型制剂 DNCB/ 无水乙醇溶液。

[0006] 本发明通过实验发现，DNCB/ 无水乙醇溶液能诱导荷 SP2/0 肿瘤的小鼠与荷 H22

肝癌的小鼠的 DTH 反应。DNCB/ 无水乙醇溶液治疗荷 SP2/0 肿瘤的小鼠与荷 H22 肝癌的小鼠，其疗效显著优于单纯无水乙醇治疗，具体见实施例部分的疗效实验部分。

[0007] 本发明的肿瘤介入治疗的新型制剂 DNCB/ 无水乙醇溶液，其特征在于，由 2,4- 二硝基氯苯（DNCB）和无水乙醇组成。

[0008] 所述的肿瘤可以为各种实体肿瘤，如肝癌和骨髓瘤等深部组织器官肿瘤、以及涂抹或注射治疗黑色素瘤等皮肤肿瘤。还可以是尖锐湿疣等性传染性疣 / 瘤皮肤疾病。

[0009] 所述的肿瘤治疗的新型制剂 DNCB/ 无水乙醇溶液，包括致敏用制剂和治疗用制剂，所述的致敏用制剂是由 2,4- 二硝基氯苯和无水乙醇按照 20 ～ 40mg :1ml 混合而成，所述的治疗用制剂是由 2,4- 二硝基氯苯和无水乙醇按照 1 ～ 5mg :1ml 混合而成。进一步优选所述的致敏用制剂是由 2,4- 二硝基氯苯和无水乙醇按照 40mg :1ml 混合而成，所述的治疗用制剂是由 2,4- 二硝基氯苯和无水乙醇按照 1mg :1ml 混合而成。

[0010] 本发明的第二个目的是提供 DNCB/ 无水乙醇溶液在制备肿瘤治疗药物中的应用，所述的 DNCB/ 无水乙醇溶液是由 2,4- 二硝基氯苯和无水乙醇组成。

[0011] 所述的肿瘤可以为各种实体肿瘤，如肝癌和骨髓瘤等深部组织器官肿瘤、以及涂抹或注射治疗黑色素瘤等皮肤肿瘤。还可以是尖锐湿疣等性传染性疣 / 瘤皮肤疾病。

[0012] 所述的 DNCB/ 无水乙醇溶液，包括致敏用制剂和治疗用制剂，所述的致敏用制剂是由 2,4- 二硝基氯苯和无水乙醇按照 20 ～ 40mg :1ml 混合而成，所述的治疗用制剂是由 2,4- 二硝基氯苯和无水乙醇按照 1 ～ 5mg :1ml 混合而成。进一步优选所述的致敏用制剂是由 2,4- 二硝基氯苯和无水乙醇按照 40mg :1ml 混合而成，所述的治疗用制剂是由 2,4- 二硝基氯苯和无水乙醇按照 1mg :1ml 混合而成。

[0013] 本发明将 DNCB 溶于无水乙醇制备 DNCB/ 无水乙醇溶液，将 DNCB/ 无水乙醇溶液代替单纯无水乙醇制剂进行 PEI 治疗肿瘤，在无水乙醇发挥其物理性杀伤肿瘤细胞时，DNCB 也在肿瘤部位诱导产生强大的 DTH 免疫学效应，DNCB/ 无水乙醇溶液制剂应用于肿瘤处既具有无水乙醇的凝固坏死物理效应，又能引发肿瘤局部强大的抗肿瘤细胞免疫效应，实现无水乙醇的物理性杀伤肿瘤细胞作用与 DNCB 的抗肿瘤免疫效应的有机结合，达到了增效的效果，较单纯的无水乙醇治疗具有更优越的疗效。

附图说明：

[0014] 图 1 是各组小鼠肿瘤经治疗后的生长情况，Group A :生理盐水组 ;Group B :无水乙醇组 ;Group C :DNCB/ 无水乙醇溶液组 ;

[0015] 图 2 是生理盐水组小鼠肿瘤细胞生长旺盛（HE 染色，X40）;

[0016] 图 3 是无水乙醇组小鼠肿瘤细胞大片变性坏死，坏死灶周围肿瘤细胞仍然生长（HE 染色，X40）;

[0017] 图 4 是 DNCB/ 无水乙醇组小鼠肿瘤细胞大片变性、坏死，坏死程度较无水乙醇组广泛、严重（HE 染色，X40）;

[0018] 图 5 是 DNCB/ 无水乙醇组免疫组化照片，瘤内可见 $CD4^+T$ 细胞大量浸润（++）（免疫组化染色，X200）;

[0019] 图 6 是无水乙醇组免疫组化照片，瘤内未见 $CD4^+T$ 细胞浸润（-）（免疫组化染色，X200）;

[0020] 图 7 是生理盐水组免疫组化照片，瘤内未见 $CD4^+T$ 细胞浸润（-）（免疫组化染色，X200）；

[0021] 图 8 是三组小鼠经治疗后肿瘤组织中 NO 含量比较；Group A：生理盐水组；Group B：无水乙醇组；Group C：DNCB/ 无水乙醇溶液组；

[0022] 图 9 是各组小鼠肿瘤经治疗后的生长情况；Group A：生理盐水组；Group B：无水乙醇组；Group C：DNCB/ 无水乙醇溶液组；

[0023] 图 10 是生理盐水组小鼠肿瘤细胞生长旺盛（HE 染色，X40）；

[0024] 图 11 是无水乙醇组小鼠肿瘤细胞大片变性坏死，坏死灶周围肿瘤细胞仍然生长（HE 染色，X40）；

[0025] 图 12 是 DNCB/ 无水乙醇组小鼠肿瘤细胞大片变性、坏死，坏死程度较无水乙醇组广泛、严重（HE 染色，X40）；

[0026] 图 13 是 DNCB/ 无水乙醇组免疫组化照片，瘤内可见 $CD4^+T$ 细胞大量浸润（++）（免疫组化染色，X200）；

[0027] 图 14 是无水乙醇组免疫组化照片，瘤内未见 $CD4^+T$ 细胞浸润（-）（免疫组化染色，X200）；

[0028] 图 15 是生理盐水组免疫组化照片，瘤内未见 $CD4^+T$ 细胞浸润（-）（免疫组化染色，X200）。

具体实施方式：

[0029] 以下实施例是对本发明的进一步说明，而不是对本发明的限制。

[0030] 实施例 1：

[0031] 一、DNCB/ 无水乙醇溶液治疗荷 SP2/0 骨髓瘤小鼠的实验

[0032] （一）DNCB/ 无水乙醇溶液致敏荷 SP2/0 肿瘤的小鼠模型建立

[0033] 1、主要实验材料：肿瘤细胞株（SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞，第三军医大学微生物学教研室提供）；实验动物（BALB/C 小鼠，购自重庆医科大学实验动物中心）；DNCB（分析纯，上海化学制剂厂产品）；无水乙醇（分析纯，上海化学试剂一厂产品）。

[0034] 2、DNCB/ 无水乙醇制剂：称取 4g DNCB 置于 100ml 无水乙醇中，混匀即为 40mg/ml 浓度，该浓度为致敏用浓度；用无水乙醇稀释 40 倍，即为 1mg/ml 浓度，为治疗用浓度。

[0035] 3、DNCB/ 无水乙醇溶液致敏的荷瘤小鼠模型的建立

[0036] （1）肿瘤细胞接种：将培养状态良好的肿瘤细胞，用 Hanks 液洗涤，其悬液以 $5-10\times10^6$/0.2ml/ 只接种小鼠背部皮下或腹部皮下。接种约 7d 左右，此时小鼠皮下已长出可触及的肿瘤结节。

[0037] （2）DNCB/ 无水乙醇溶液致敏：将上述长出肿瘤结节的小鼠背部剃毛成约 1cm 直径圆斑，在圆斑处皮肤滴加致敏浓度（40mg/ml）DNCB/ 无水乙醇溶液（0.05ml/ 只）（实验组），设置对照组（仅滴加无水乙醇作同样处理）。

[0038] （3）DTH 的判定：当 DNCB/ 无水乙醇溶液致敏后 15d，以 1mg/ml 浓度的 DNCB/ 无水乙醇溶液（0.05ml/ 只）对实验组小鼠和对照组小鼠进行皮肤攻击，48h 后观察皮肤反应，判断标准：[-] 无反应；[±] 皮肤隐隐发红，或红肿面积 <1/2 涂布面；[+] 红肿硬结至少为涂布面积 1/2；[++] 涂布范围内皮肤均有红肿、硬结；[+++] 涂布范围内皮肤均有红肿、硬结，

并有少数小水泡。

[0039] 4、结果

[0040] 实验组小鼠的皮肤攻击部位有明显红肿硬结，程度可达 [+] 和 [++]，而无水乙醇攻击的对照组小鼠在攻击部位未见皮肤局部反应，表明 DNCB/ 无水乙醇溶液能诱导 DTH 反应。

[0041] （二）DNCB/ 无水乙醇溶液治疗荷 SP2/0 骨髓瘤的疗效

[0042] 1、主要实验材料：肿瘤细胞株（SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞）；其余同前。

[0043] 2、DNCB/ 无水乙醇制剂：致敏用 DNCB/ 无水乙醇溶液（40mg/ml）、治疗用 DNCB/ 无水乙醇溶液（1mg/ml），其余同前。

[0044] 3、实验动物分组与处理：将皮下荷瘤小鼠，前述方法经 DNCB/ 无水乙醇溶液（40mg/ml）致敏，15d 后随机分成 3 组，每组 10 只小鼠：生理盐水组（A 组）：第 0 天，第 3 天分别于瘤内注射生理盐水 0.1ml/ 只。无水乙醇组（B 组）：第 0 天，第 3 天分别于瘤内注射无水乙醇 0.1ml/ 只。DNCB/ 无水乙醇（1mg/ml）溶液组（C 组）：第 0 天，第 3 天分别于瘤内注射 DNCB/ 无水乙醇溶液 0.1ml/ 只。

[0045] 4、指标检测

[0046] ①动物经治疗后，每周用卡尺测量瘤体一次，测相互垂直的横径 a，长径；b，计算平均值；并观察动物瘤体变化，记录动物存活时间（观察期为 70 天）。

[0047] ②治疗 70 天时仍然存活的小鼠，在其皮下再次接种 SP2/0 瘤细胞，并取 10 只正常小鼠同样接种作为对照，观察肿瘤生长情况，观察期为 20 天。

[0048] 5、实验结果

[0049] ①经不同治疗后荷瘤小鼠的生存情况

[0050] 生理盐水组（A 组）的平均存活时间为 27.5 天（<70 天），无长期存活小鼠；无水乙醇组（B 组）有 2 只小鼠长期存活（>70 天），余下 8 只小鼠平均存活时间为 38.75 天，DNCB/ 无水乙醇溶液组（C 组）7 只小鼠长期存活（>70 天），余下 3 只小鼠平均存活时间为 46.33 天。经统计学处理，DNCB/ 无水乙醇溶液组较无水乙醇组和生理盐水组的小鼠平均存活时间及 70 天存活率存在显著差异（$p<0.01$）（表 1）。

[0051] 表 1：三组荷 SP2/0 骨髓瘤小鼠经治疗后的存活率及存活时间

[0052]

分组	动物数（只））	治疗后 70 天存活率（%）	死亡小鼠存活时间 (X±SD) 天
A 组	10	0	27.5±3.2
B 组	10	20	38.7±6.9Δ
C 组	10	70*#	46.3±3.5*#

[0053] 注：*C 组与 B 组比较有非常显著差异（$p<0.01$），#C 组与 A 组比较有非常显著差异（$p<0.01$），ΔB 组与 A 组比较有非常显著差异（$p<0.01$）

[0054] ②经不同治疗后荷瘤小鼠的瘤体变化情况

[0055] 生理盐水组（A 组）小鼠肿瘤呈进行性生长，5 周内全部死亡；无水乙醇组（B 组）小鼠肿瘤经注射无水乙醇后短期内生长减慢，在无水乙醇注射处出现坏死灶，但周围的肿

瘤组织仍继续生长，5 周时有 2 只小鼠肿瘤缩小，至 9-10 周消退，余下 8 只小鼠瘤体继续增大直至小鼠死亡；DNCB/ 无水乙醇溶液组小鼠经治疗后，肿瘤生长明显减慢，在注射处有坏死灶出现，第 5 周时有 3 只小鼠肿瘤持续增大，余 7 只则缩小，至 8-9 周完全消退。经统计学处理，DNCB/ 无水乙醇溶液组与无水乙醇组比较其瘤体大小自第 3 周起有显著差异（$p<0.05$），第 4 周起有非常显著差异（$p<0.01$）且 DNCB/ 无水乙醇溶液组存活小鼠肿瘤消退较无水乙醇组存活小鼠迅速；这两组小鼠与生理盐水组比较其肿瘤大小第三周起有显著差异（$p<0.01$）（图 1）。

[0056] ③长期存活小鼠再次接种肿瘤后，肿瘤生长情况

[0057] 5×10^6 个肿瘤细胞接种小鼠后，记录皮下长出肿瘤结节（横、长径均 >0.2cm）的时间，观察期为 20 天。无水乙醇组（B 组）两只存活小鼠接种肿瘤细胞 1 周后长出可触及的肿瘤结节，DNCB/ 无水乙醇溶液组（C 组）7 只存活小鼠接种肿瘤细胞 2 周内有 3 只长出肿瘤结节，4 只未见肿瘤结节长出（20 天内），正常对照组 10 只全部于 1 周内长出肿瘤结节。DNCB/ 无水乙醇溶液组小鼠平均成瘤时间较对照组明显延长（$p<0.01$），成瘤率降低（$p<0.05$）（表 2）。

[0058] 表 2：三组荷 SP2/0 骨髓瘤小鼠经治疗后再次皮下接种成瘤情况

[0059]

分组	接种细胞数（10^6 个 / 只）	肿瘤生长率	肿瘤出现天数 (X±SD)
正常对照组	5	10/10	6.2±1.03
B 组	5	2/2	6.5±2.12
C 组	5	3/7#	13.7±1.52*

[0060] 注：*C 组与 B 组比较有非常显著差异（$p<0.01$），#C 组与 A 组比较有非常显著差异（$p<0.01$），ΔB 组与 A 组比较有非常显著差异（$p<0.01$）

[0061] （三）DNCB/ 无水乙醇溶液抗瘤作用机制观察

[0062] 1、主要实验材料：肿瘤细胞株（SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞）；其余同前。

[0063] 2、DNCB/ 无水乙醇制剂：致敏用 DNCB/ 无水乙醇溶液（40mg/ml）、治疗用 DNCB/ 无水乙醇溶液（1mg/ml），其余同前。

[0064] 3、主要试剂：抗 L3T4Mab（Rat IgG，北京邦定公司）；二抗 SP Kit（美国 Maxim 公司产品）

[0065] 4、实验动物选择与处理：将皮下荷瘤小鼠，前述方法经 DNCB/ 无水乙醇溶液（40mg/ml）致敏，15d 后随机分成 3 组，每组 10 只小鼠：生理盐水组（A 组）：第 0 天，第 3 天分别于瘤内注射生理盐水 0.1ml/ 只。无水乙醇组（B 组）：第 0 天，第 3 天分别于瘤内注射无水乙醇 0.1ml/ 只。DNCB/ 无水乙醇溶液组（C 组）：第 0 天，第 3 天分别于瘤内注射 DNCB/ 无水乙醇（1mg/ml）溶液 0.1ml/ 只。

[0066] 5、指标及检测方法

[0067] ①标本获取：治疗 10 天时，取肿瘤标本和血样。

[0068] ②组织学检查：新鲜肿瘤标本用 10% 中性福尔马林溶液固定，石蜡包埋切片后，常

规 HE 染色，于光镜下观察其组织形态变化。

[0069] ③肿瘤组织中 $CD4^+T$ 细胞检测：新鲜肿瘤标本用锡箔纸包后，置液氮中保存。恒温冰冻切片，置于涂乳胶的玻片上，常规免疫组化染色。大致为：切片室温干燥 2h，丙酮固定 10min；置于 0.3%H_2O_2/ 甲醇液浸泡 20min，消除内源性过氧化物酶活性；用封闭液（1% 小牛血清）室温下孵育 25min，弃封闭液；滴加 L_3T_4 抗体（1:250 稀释），置 37℃孵育 1h；洗涤后，滴加二抗（兔抗大鼠 IgG，1:300 稀释），同前置 37℃孵育 1h；洗涤后按 Kit 说明加入 SP（Streptavidin-Peroxidase，1:300 稀释），同前置 37℃孵育 30min，洗涤后加入显色液（DAB+H_2O_2）室温下避光显色 8-10min，显色满意后终止显色；苏木素复染 1min，清水冲洗，二甲苯透明，树胶封片。以细胞呈棕黄色为阳性细胞，未着色为阴性细胞。

[0070] ④瘤组织中 NO 含量测定：按罗向东化学间接测定法。大致为：将新鲜肿瘤组织 0.1g/ 只剪碎、匀浆，10000rpm 离心 15min，取上清于 -20℃保存。测定时按试剂盒方法进行（试剂盒由第三军医大学西南医院检验科提供）。建立回归方程，计算出样品 NO 含量，结果以 mmol/ml 表示。

[0071] 6、实验结果

[0072] ①经不同治疗后小鼠肿瘤组织的形态学观察

[0073] 取肿瘤组织作切片，常规 HE 染色观察：

[0074] 生理盐水组（A 组）：瘤细胞增殖旺盛，核分裂相多见，瘤内偶见可见散在微小局限型癌灶坏死，程度轻微（图 2）。

[0075] 无水乙醇组（B 组）：范围较大的瘤组织变性、坏死，坏死区周围瘤细胞仍生长旺盛，程度较对照严重，周界清楚（图 3）。

[0076] DNCB/ 无水乙醇溶液组（C 组）：大片瘤组织坏死，坏死区范围较无水乙醇组广泛，程度更严重，周界清楚（图 4）。

[0077] ②小鼠肿瘤组织中 $CD4^+T$ 细胞的浸润情况

[0078] 光镜下免疫组化结果：

[0079] DNCB/ 无水乙醇溶液组（C 组）小鼠肿瘤瘤内浸润的 $CD4^+T$ 细胞较无水乙醇组（B 组）和生理盐水组（A 组）明显增多，DNCB/ 无水乙醇溶液组 80% 为 ++（图 5），无水乙醇组 70% 为 -（图 6），生理盐水组，80% 为 -（图 7），经统计学处理，DNCB/ 无水乙醇溶液组与无水乙醇组和生理盐水组存在非常显著差异（$p<0.01$），而无水乙醇组与生理盐水组间差异不明显（$p>0.01$）（表 3）。

[0080] 表 3：荷 SP2/0 骨髓瘤小鼠经治疗后肿瘤标本中 $CD4^+T$ 细胞免疫组化结果

[0081]

分组	标本数	阳性强度 - + ++	阳性例数	阳性率（%）
A 组	10	8 2 0	2	20
B 组	10	7 2 1	3	30
C 组	10	1 1 8	9	90*#

[0082] 注：*C 组与 B 组比较有非常显著差异（$p<0.01$），#C 组与 A 组比较有非常显著差异

(p<0.01),

[0083] ③小鼠肿瘤组织中单核巨噬细胞的浸润情况

[0084] 单核巨噬细胞浸润是迟发型超敏反应的重要特征,也是 NO 产生的主要细胞,因此 NO 量的测定可反应单核巨噬细胞浸润情况。DNCB/ 无水乙醇溶液组(C 组)NO 量(7.55mmol/ml)较无水乙醇组(B 组)(3.338mmol/ml)、生理盐水组(A 组)(3.483mmol/ml)为高,存在非常显著差异(p<0.01)(图 8),无水乙醇组与生理盐水组则无显著差异(p>0.05),表明 DNCB/ 无水乙醇溶液组肿瘤处单核巨噬细胞浸润明显增多,是由于 DNCB 激发的迟发型超敏反应所致。

[0085] 应用 DNCB 在肿瘤局部诱导迟发型超敏反应(DTH),以达到免疫细胞的大量浸润,从而获得抗肿瘤免疫效应是一种先进的抗肿瘤免疫治疗的策略。

[0086] 二、DNCB/ 无水乙醇溶液治疗荷 H22 肝癌小鼠的实验

[0087] (一) DNCB/ 无水乙醇溶液致敏荷 H22 肿瘤的小鼠模型建立

[0088] 1、主要实验材料 :H22 小鼠肝癌细胞(广州外显子生物技术公司购买);实验动物(BALB/C 小鼠,广州中医药大学实验动物中心产品);DNCB、无水乙醇等试剂同前。

[0089] 2、DNCB/ 无水乙醇制剂 :按前述方法称取 DNCB 溶于无水乙醇中,配制致敏用浓度(40mg/ml)和治疗用浓度(1mg/ml)的 DNCB/ 无水乙醇溶液。

[0090] 3、DNCB/ 无水乙醇溶液致敏荷 H22 肿瘤的小鼠模型建立

[0091] (1) 肿瘤细胞接种 :将 H22 小鼠肝癌细胞接种 BALB/c 小鼠腹腔,于 10 天左右,小鼠腹腔产生 H22 腹水,取腹水细胞计数,以 $5-10\times10^{6}$/0.2ml/ 只接种小鼠背部皮下或腹部皮下。接种约 10d 左右,此时小鼠皮下长出可触及的肿瘤结节。

[0092] (2) DNCB/ 无水乙醇溶液致敏 :同前方法处理。

[0093] (3) DTH 的判定 :前述方法判定。

[0094] 4、结果

[0095] 实验组小鼠的皮肤攻击部位有明显红肿硬结,程度可达 [+] 和 [++],而无水乙醇攻击的对照小鼠在攻击部位未见皮肤局部反应。也表明 DNCB/ 无水乙醇溶液能诱导 DTH 反应。

[0096] (二) DNCB/ 无水乙醇溶液治疗荷 H22 肝癌小鼠的疗效

[0097] 1、主要实验材料 :肿瘤细胞株(H22 小鼠骨髓瘤细胞);其余同前。

[0098] 2、DNCB/ 无水乙醇制剂 :致敏用 DNCB/ 无水乙醇溶液(40mg/ml)、治疗用 DNCB/ 无水乙醇溶液(1mg/ml),其余同前。

[0099] 3、实验动物分组与处理 :除所用肿瘤细胞为 H22 小鼠肝癌细胞外,其余处理同前。

[0100] 4、指标检测

[0101] 按前述方法计算瘤体大小,观察动物存活情况。

[0102] 5、实验结果

[0103] ①经不同治疗后荷瘤小鼠的生存情况

[0104] 生理盐水组(A 组)的平均存活时间为 20.5 天(<70 天),无长期存活小鼠 ;无水乙醇组(B 组)有 4 只小鼠长期存活(>70 天),余下 6 只小鼠平均存活时间为 42 天,DNCB/ 无水乙醇(1mg/ml)溶液组(C 组)8 只小鼠长期存活(>70 天),余下 2 只小鼠平均存活时间为 56.5 天。经统计学处理,DNCB/ 无水乙醇溶液组较无水乙醇组和生理盐水组的小鼠平均存

活时间及 70 天存活率存在显著差异（p<0.01）（表 4）。

[0105] 表 4：三组荷 H22 肝癌的小鼠经治疗后的存活率及存活时间

[0106]

分组	动物数（只）)	治疗后 70 天存活率（%）	死亡小鼠存活时间 (X±SD)天
A 组	10	0	20.5±5.2
B 组	10	40	42±6.5Δ
C 组	10	80*#	56.5±4.5*#

[0107] 注：*C 组与 B 组比较有非常显著差异（p<0.01），#C 组与 A 组比较有非常显著差异（p<0.01），ΔB 组与 A 组比较有非常显著差异（p<0.01）

[0108] ②经不同治疗后荷瘤小鼠的瘤体变化情况

[0109] 生理盐水组小鼠肿瘤呈进行性生长，4 周内全部死亡；无水乙醇组小鼠肿瘤经注射无水乙醇后短期内生长减慢，在无水乙醇注射处出现坏死灶，但周围的肿瘤组织仍继续生长，5 周时有 4 只小鼠肿瘤缩小，至 10 周消退，余下 6 只小鼠瘤体继续增大直至小鼠死亡；DNCB/ 无水乙醇溶液组小鼠经治疗后，肿瘤生长明显减慢，在注射处有坏死灶出现，5 周时有 2 只小鼠肿瘤持续增大，余 8 只则缩小，至 10 周完全消退。经统计学处理，DNCB/ 无水乙醇溶液组与无水乙醇组比较其瘤体大小自第 5 周起有显著差异（p<0.05），第 6 周起有非常显著差异（p<0.01）且 DNCB/ 无水乙醇溶液组存活小鼠肿瘤消退较无水乙醇组存活小鼠迅速；这两组小鼠与生理盐水组比较其肿瘤大小第 4 周起有显著差异（p<0.01）（图 9）。

[0110] （三）DNCB/ 无水乙醇溶液抗 H22 肝癌作用机制观察

[0111] 1、主要实验材料：肿瘤细胞株（H22 小鼠肝癌细胞株）；其余同前。

[0112] 2、DNCB/ 无水乙醇制剂：致敏用 DNCB/ 无水乙醇溶液（40mg/ml）、治疗用 DNCB/ 无水乙醇溶液（1mg/ml），其余同前。

[0113] 3、主要试剂

[0114] 大鼠抗小鼠 CD4 单抗（北京翰谱医药生物研究所）；SABC 免疫组化检测试剂盒（武汉博士德公司）

[0115] 4、实验动物选择与处理：将皮下荷 H22 肝癌小鼠，按前述方法处理

[0116] 5. 指标及检测方法

[0117] ①标本获取：同前取肿瘤标本和血样。

[0118] ②组织学检查：同前方法进行肿瘤组织固定，石蜡包埋切片后，常规 HE 染色，于光镜下观察其组织形态变化。

[0119] ③肿瘤组织中 $CD4^+$T 细胞检测：同前方法及按试剂盒方法进行免疫组化染色。经二甲苯透明，树胶封片后，以细胞呈棕黄色为阳性细胞，未着色为阴性细胞。

[0120] 6、实验结果

[0121] ①经不同治疗后小鼠肿瘤组织的形态学观察

[0122] 取肿瘤组织作切片，常规 HE 染色观察：

[0123] 生理盐水组（A 组）：瘤细胞增殖旺盛，核分裂相多见（图 10）。

[0124] 无水乙醇组(B 组):范围较大的瘤组织变性、坏死,但坏死区周围瘤细胞仍生长旺盛(图 11)。

[0125] DNCB/ 无水乙醇溶液组(C 组):瘤组织坏死区域和程度较无水乙醇组更广泛,更严重(图 12)。

[0126] ②小鼠肿瘤组织中 $CD4^+T$ 细胞的浸润情况

[0127] 光镜下免疫组化结果 :

[0128] DNCB/ 无水乙醇溶液组(C 组)瘤内浸润的 $CD4^+T$ 细胞较无水乙醇组(B 组)和生理盐水组(A 组)明显增多,DNCB/ 无水乙醇溶液组 80% 为 ++(图 13),无水乙醇组 80% 为 -(图 14),生理盐水组,90% 为 -(图 15),经统计学处理,DNCB/ 无水乙醇溶液组与无水乙醇组和生理盐水组存在非常显著差异($p<0.01$),而无水乙醇组与生理盐水组间差异不明显($p>0.01$)(表 5)。

[0129] 表 5 :荷 H22 肝癌小鼠经治疗后肿瘤标本中 $CD4^+T$ 细胞免疫组化结果

[0130]

分组	标本数	阳性强度 - + ++	阳性例数	阳性率(%)
A 组	10	9 1 0	1	10
B 组	10	8 1 1	2	20
C 组	10	1 1 8	9	90*#

[0131] 注 :*C 组与 B 组比较有非常显著差异($p<0.01$);#C 组与 A 组比较有非常显著差异($p<0.01$)。

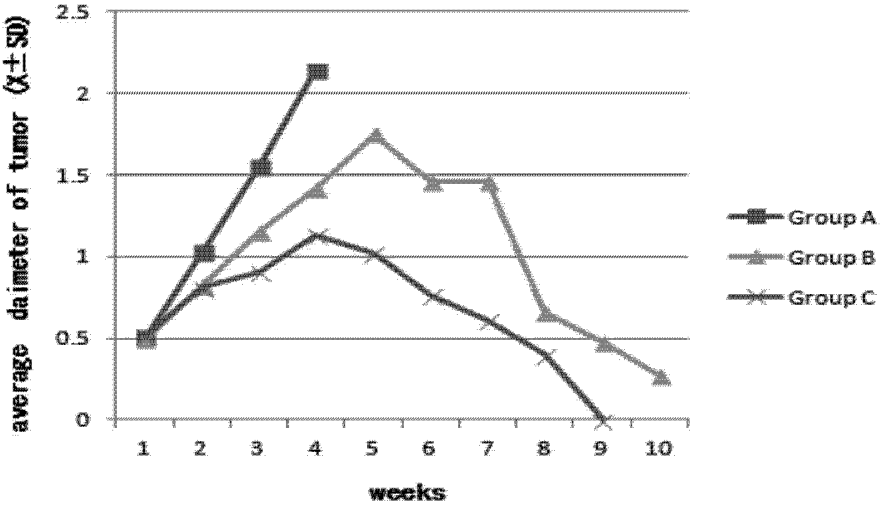

average daimeter of tumor (x±SD)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
weeks
Group A
Group B
Group C

图 1

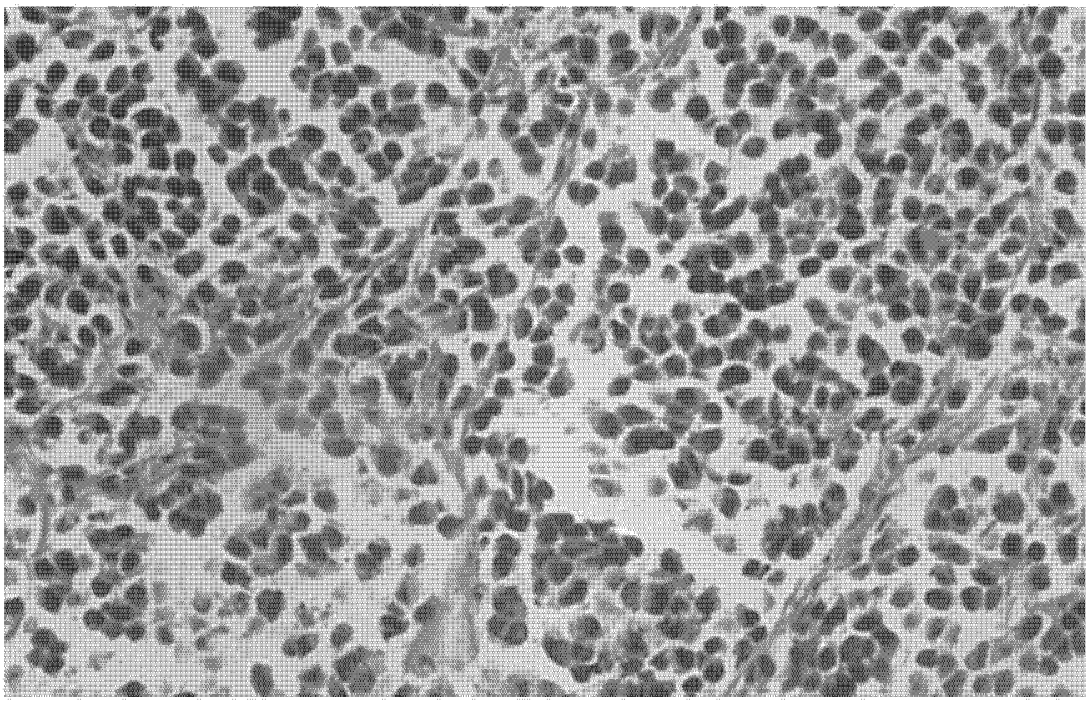


图 2

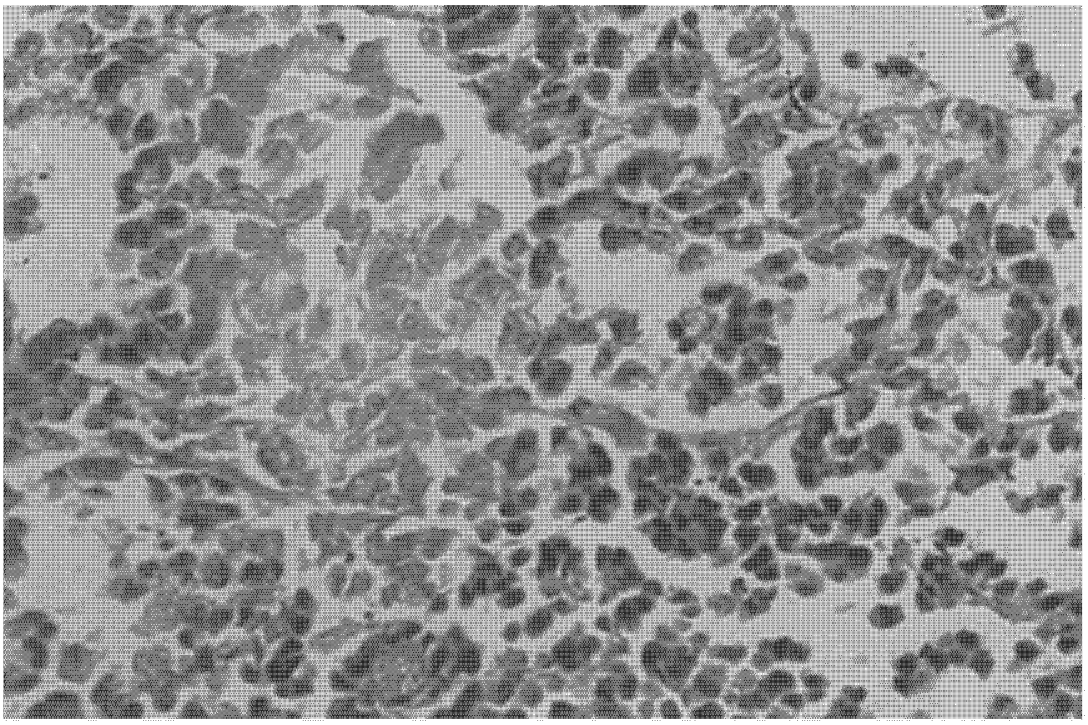


图 3

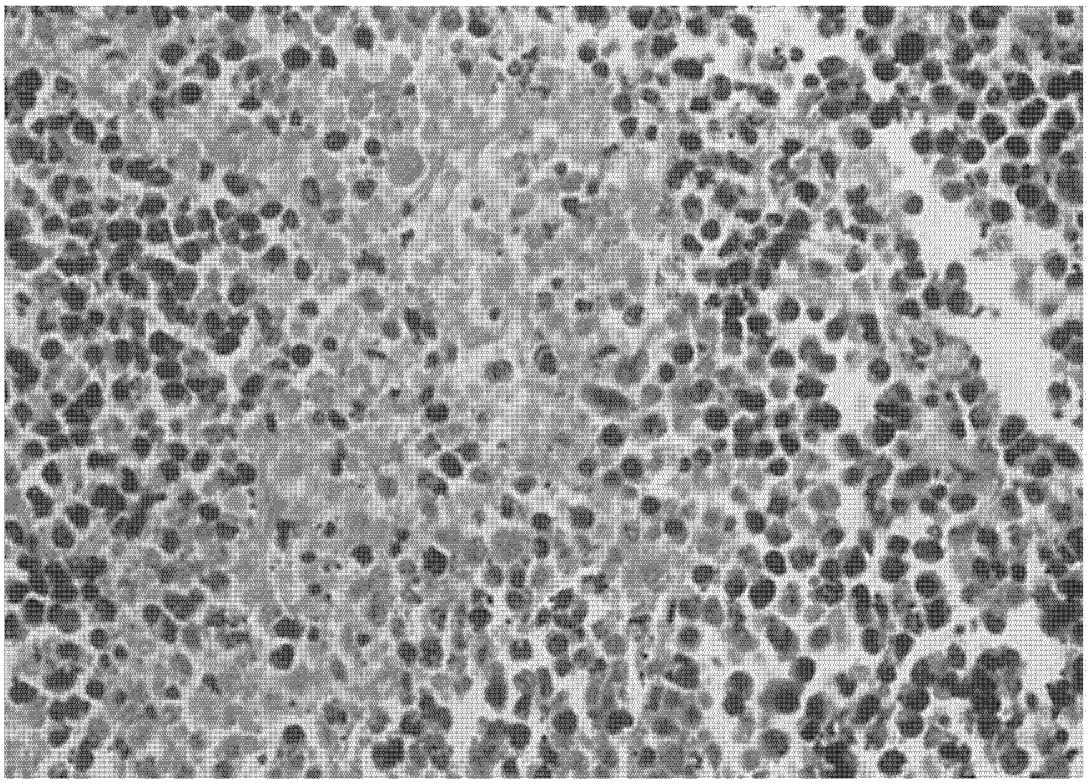


图 4

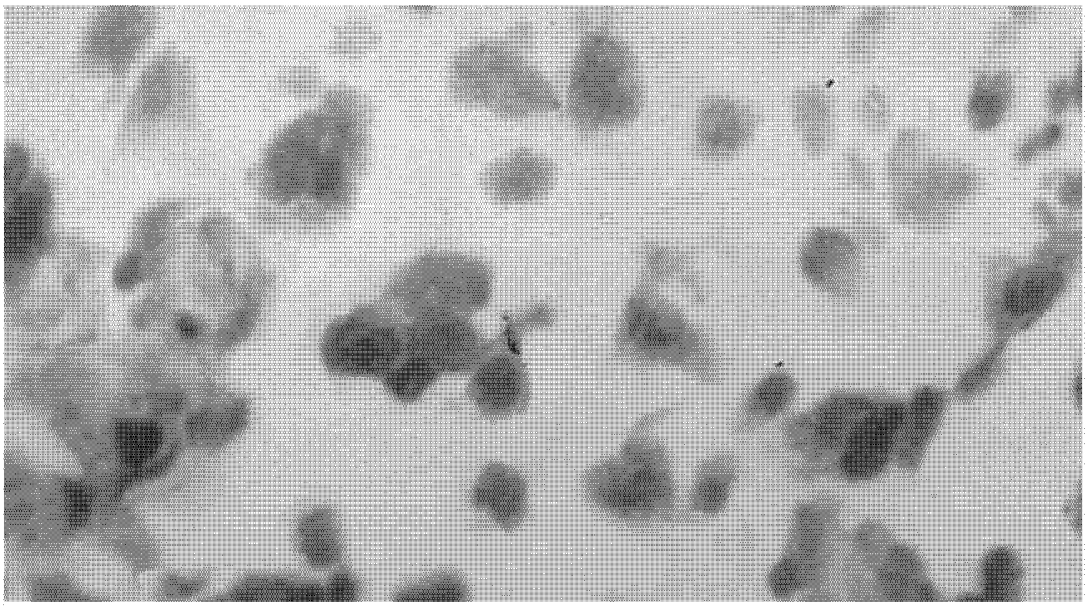


图 5

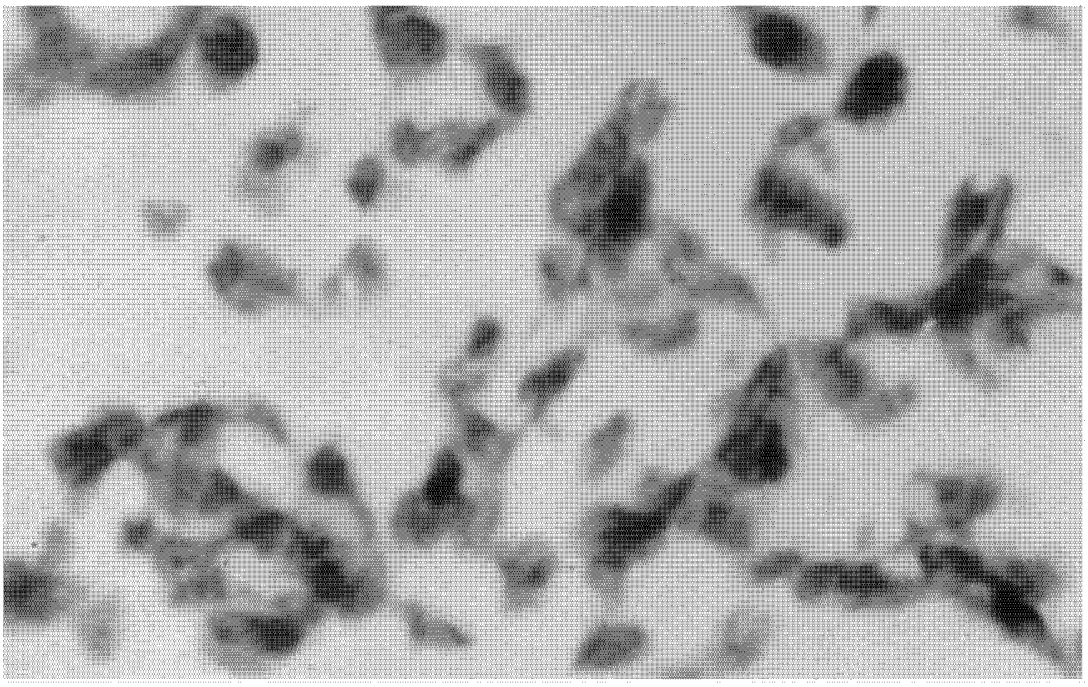


图 6

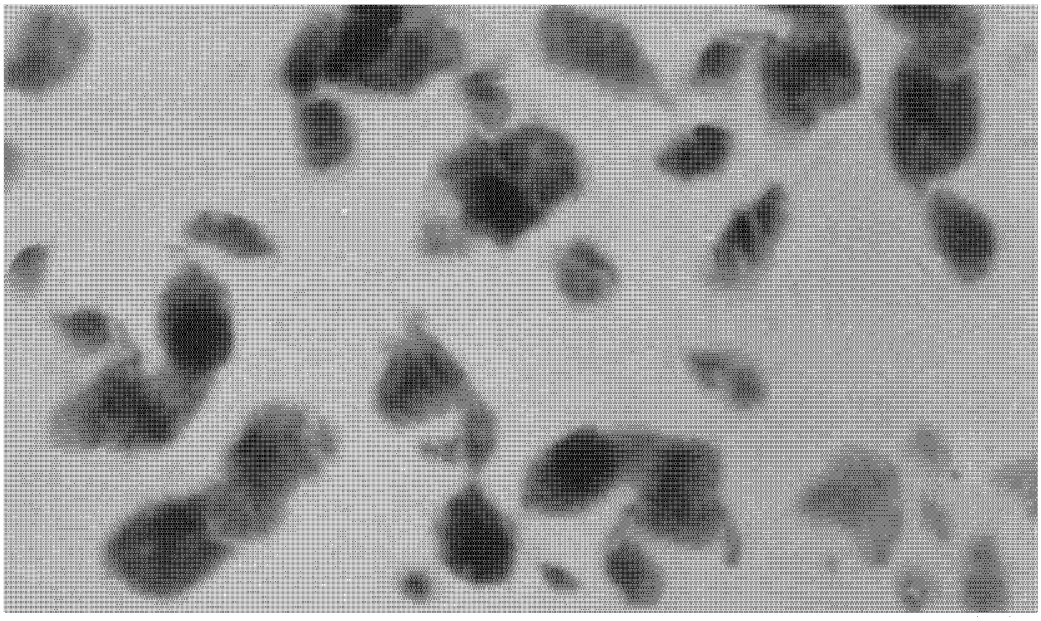


图 7

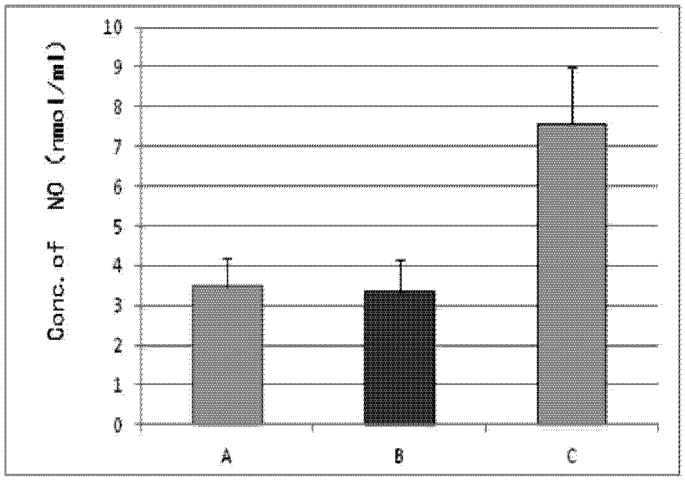


图 8

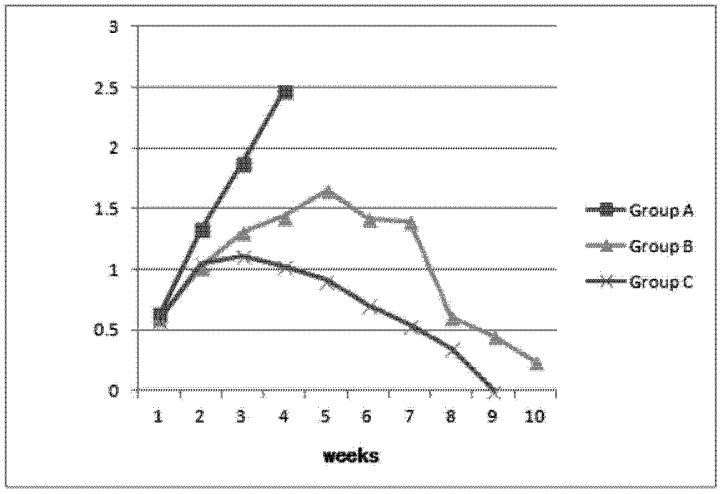


图 9

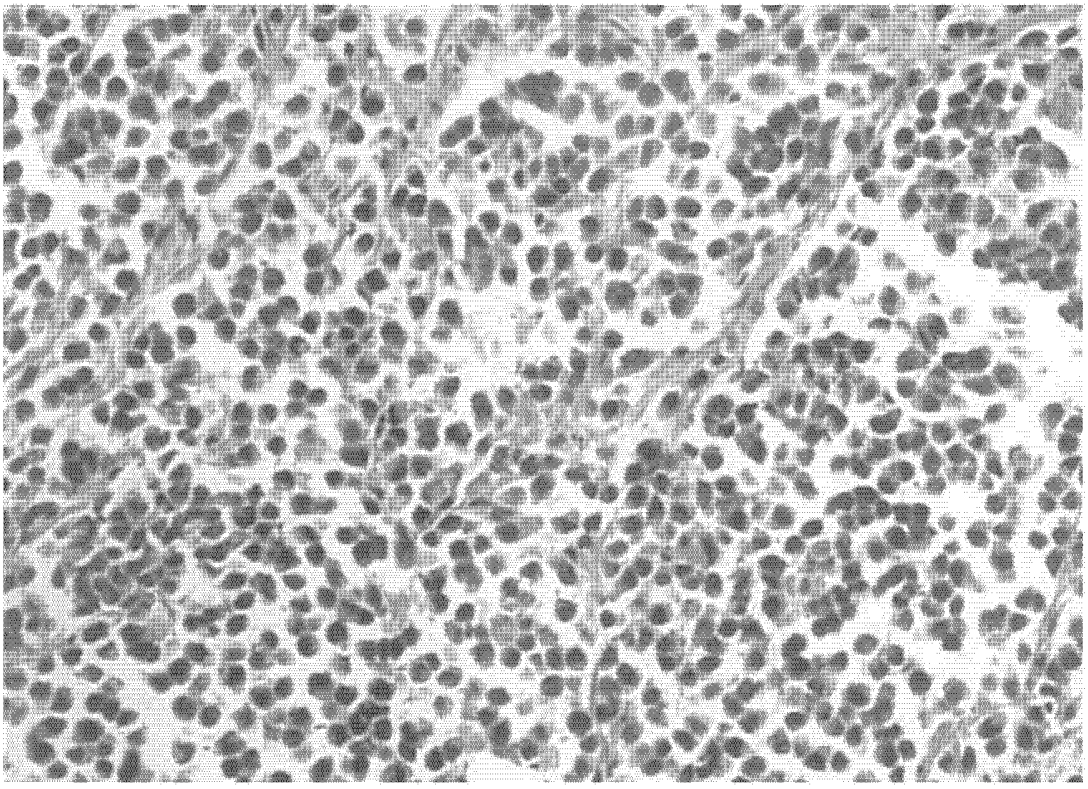


图 10

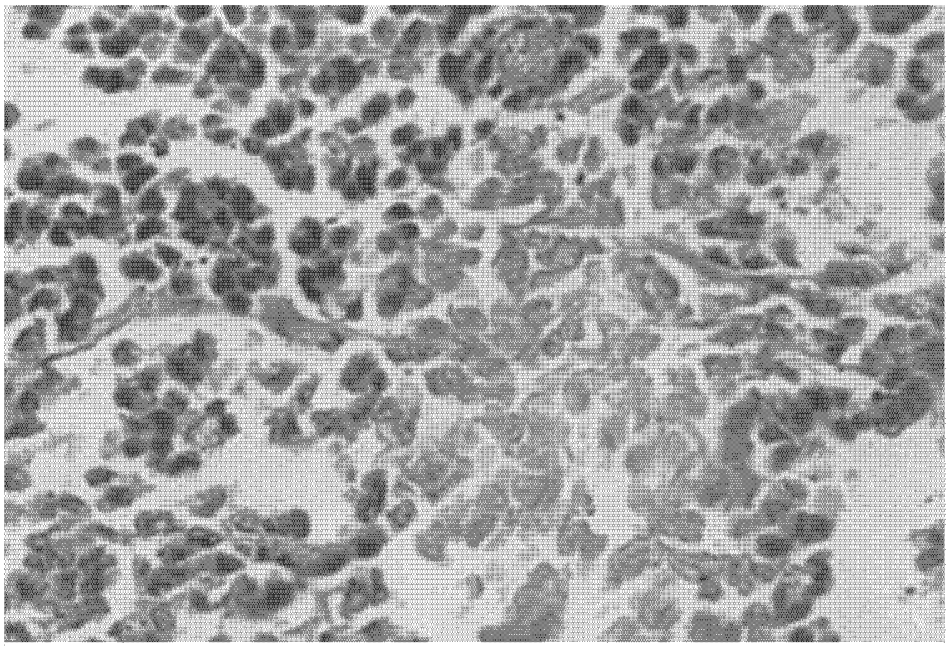


图 11

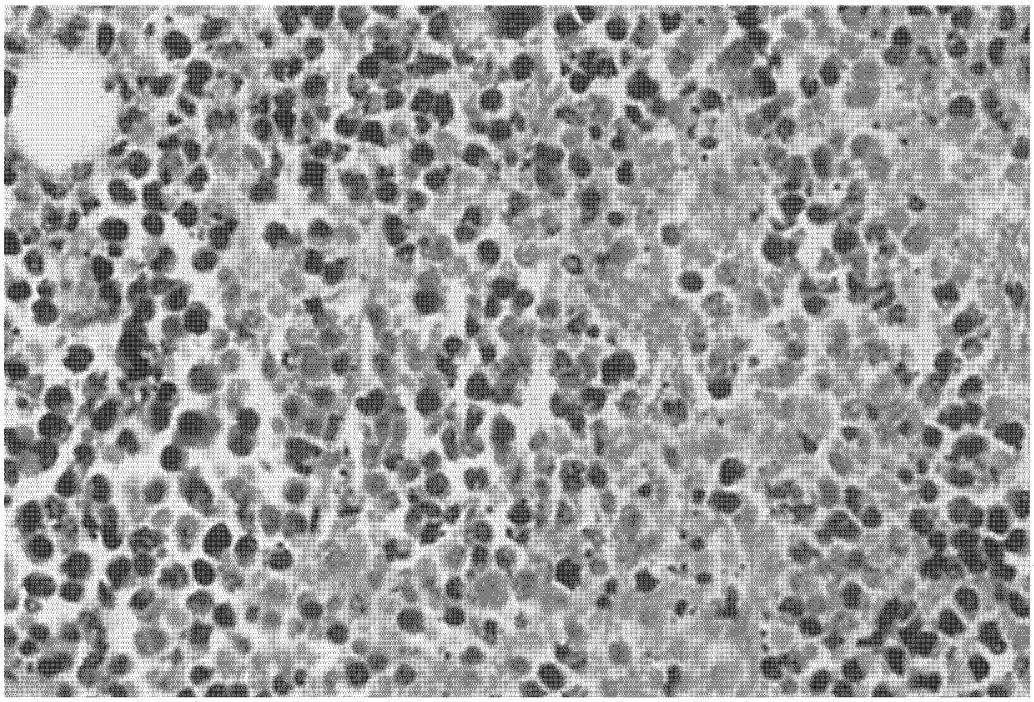


图 12

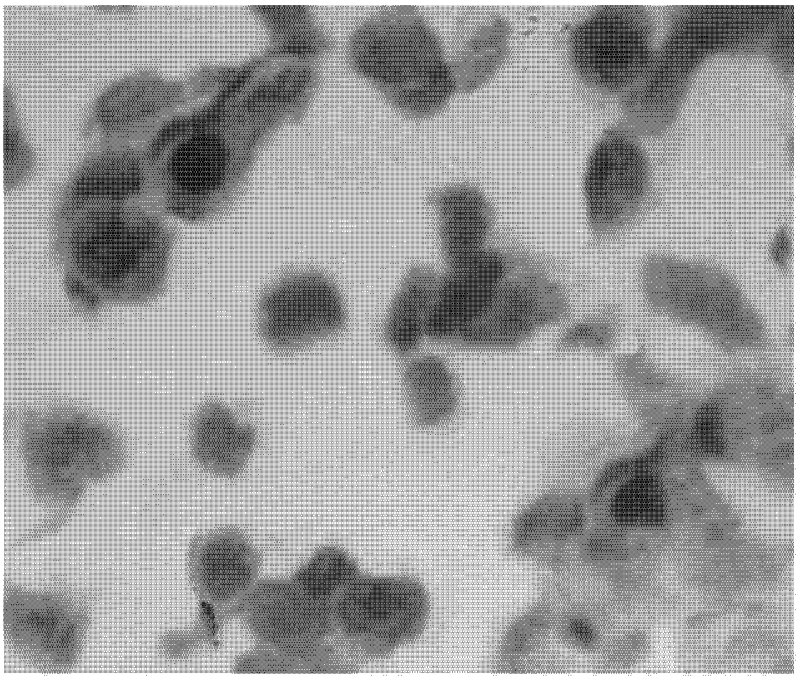


图 13

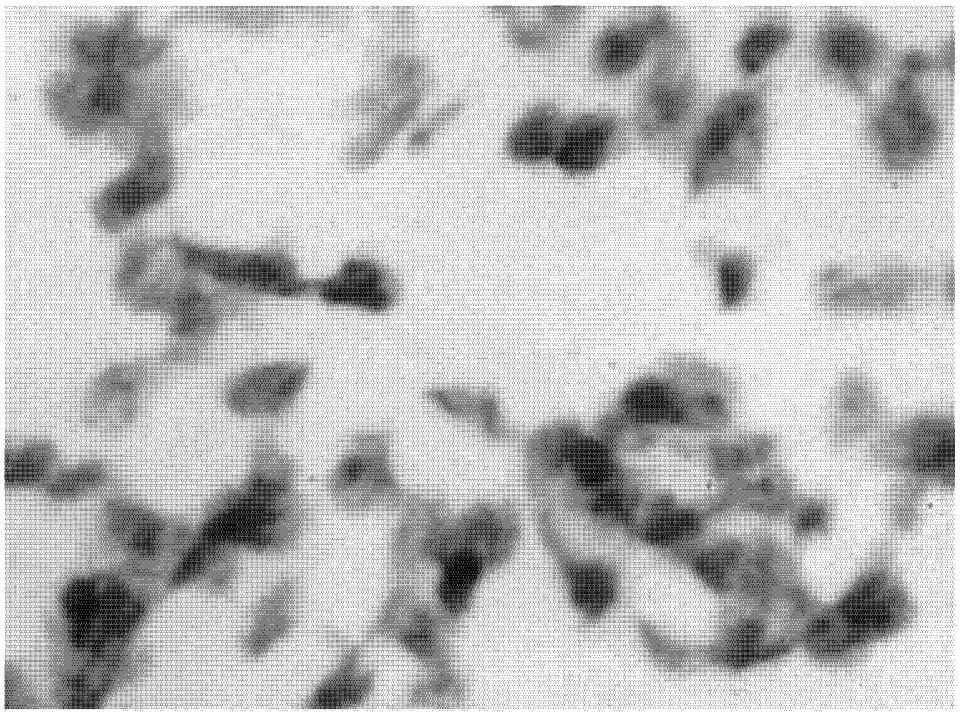


图 14

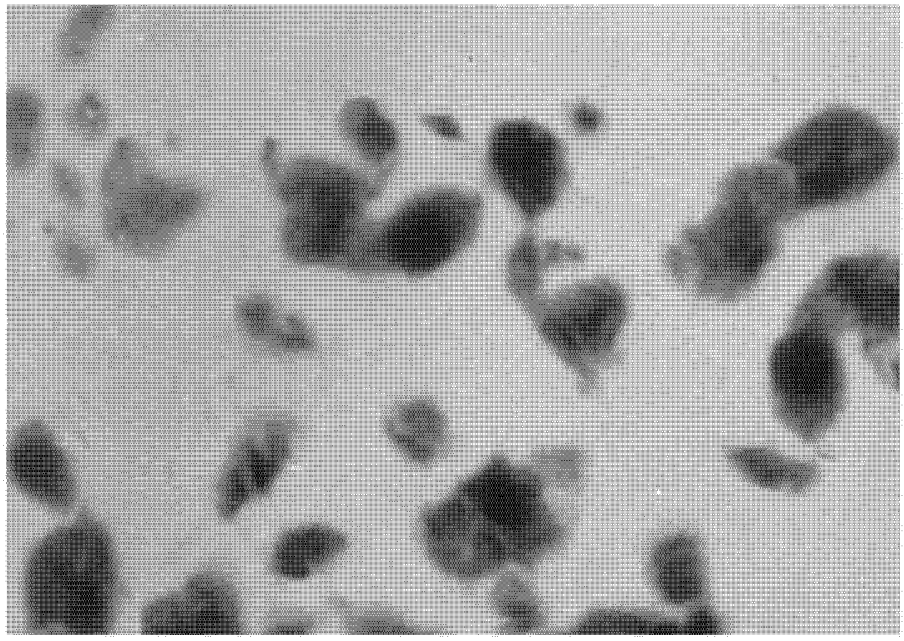


图 15