文章编号:1000-5404(2012)24-2469-05

论著

LPS/CD14结合位点模拟肽对内毒素性大鼠急性肺损伤的治疗作用

徐 智[1],李昆霖[2],陈 锐[3],钱桂生[1],吴国明[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院:全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室[1],病理科[3];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所呼吸科[2])

[摘要] **目的** 观测LPS/CD14结合位点模拟肽(mimic peptides 12, MP12)对内毒素性急性肺损伤大鼠模型的治疗作用。**方法** 将30只Wistar大鼠按随机数字表法分为生理盐水对照组、LPS组和LPS+MP12组($n=10$)。另将40只Wistar大鼠分为两组,分别接受与LPS组和LPS+MP12组相同的处理方法,用于观测死亡率。采用LPS静脉注射法复制内毒素性急性肺损伤大鼠模型。LPS+MP12组在接受LPS注射后立即予MP12静脉注射。2 h后抽取静脉血用于检测血浆内毒素浓度。于12 h抽取动脉血,检测动脉血氧分压(PaO_2)。24 h后处死各组大鼠,留取右下肺用于病理检查,右上肺匀浆检测TNF-α,留取左肺行支气管肺泡灌洗并分离肺泡巨噬细胞。采用荧光显微镜检测MP12对肺泡巨噬细胞与LPS结合的抑制作用。**结果** LPS组及LPS+MP12组的血浆内毒素浓度明显高于生理盐水对照组($P<0.01$),而LPS组与LPS+MP12组间血浆内毒素浓度无显著差异($P>0.05$)。LPS组及LPS+MP12组PaO_2显著低于生理盐水对照组($P<0.01$),但LPS+MP12组PaO_2显著高于LPS组($P<0.01$)。LPS+MP12组肺组织TNF-α浓度及病理学评分显著低于LPS组($P<0.01$)。LPS+MP12组肺泡巨噬细胞与LPS的结合率显著低于LPS组($P<0.01$)。LPS+MP12组的72 h死亡率显著低于LPS组(40% *vs* 75%, $P<0.01$)。**结论** LPS/CD14结合位点模拟肽(MP12)能通过阻断内毒素与肺泡巨噬细胞的结合,减轻内毒素导致的肺部炎症及病理损害,显著提高内毒素性急性肺损伤大鼠的动脉血氧分压、减少死亡率。

[关键词] 内毒素;CD14;模拟肽;急性肺损伤
[中图法分类号] R563.05;R631;R966 [文献标志码] A

Therapeutic effects of mimic peptide of LBP/CD14 binding site on endotoxin-induced acute lung injure in rats

Xu Zhi[1], Li Kunlin[2], Chen Rui[3], Qian Guisheng[1], Wu Guoming[1] ([1]Institute of Respiratory Diseases, [3]Department of Pathology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Respiratory Diseases, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the therapeutic effect of a mimic peptide (mimic peptides 12, MP12) of LBP/CD14 binding site on LPS-induced acute lung injure (ALI) in rat model. **Methods** Thirty Wistar rats were divided randomly into control group, LPS group and LPS+MP12 group. Another forty Wistar rats were divided randomly into 2 groups and accepted the same treatment as LPS group and LPS+MP12 group respectively in order to observe the mortality. The rat ALI model was established by intravenous injection of LPS. The rats of LPS+MP12 group accepted MP12 intravenous injection immediately after LPS injection. In 2 h later, blood sample of each group rats were collected to detect the concentration of endotoxin. Arterial blood samples were collected to detect PaO_2 in 12 h after LPS injection. All rats were executed in 24 h, the right lower lung was embedded for pathological examination, and the right upper lung was used to measure TNFα content. The left lung was used for bronchoalveolar lavage and isolation of alveolar macrophages. The effect of MP12 on the binding between LPS and alveolar macrophages was observed by fluorescence microscopy. **Results** The endotoxin level in the plasma was significantly higher in LPS group and LPS+MP12 group than control group ($P<0.01$), but there was no significant difference in the former 2 groups ($P>0.05$). PaO_2 value was significantly lower in LPS group and LPS+MP12 group than in control group ($P<0.01$), and, the value was significantly higher in of LPS+MP12 group than LPS group ($P<0.01$). TNFα content in lung tissue and the pathological score were significantly lower in LPS+MP12 group than LPS group ($P<0.01$). The binding between LPS and alveolar macrophages was significantly lower in LPS+MP12 group than LPS group ($P<0.01$). The mortality of LPS+MP12 group were significantly lower than that of LPS group (40% *vs* 75%, $P<$

[基金项目] 国家自然科学基金(81070053)
[通信作者] 吴国明,E-mail:wu_guoming@yahoo.com.cn

0.01). **Conclusion** The mimic peptide of LPS/CD14 binding site blocks the binding between LPS and alveolar macrophages, thereby attenuates the LPS-induced inflammation and pathological damage in the lung, and improves PaO_2 and mortality of LPS- ALI in rat model.

[**Key words**] endotoxin; CD14; mimic peptide; acute lung injury

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81070053). Corresponding author: Wu Guoming, E-mail: wu_guoming@yahoo.com.cn

正常情况时人体内内毒素的水平很低,即使在G^-杆菌脓毒血症时,血浆中LPS浓度也仅在0.01~1 ng/ml水平。如此低水平的LPS的致炎作用需依赖于LBP/CD14增敏系统[1]。LBP/CD14增敏系统位于LPS致炎信号通路的上游,该系统具有传递及放大LPS致炎信号的作用,因此拮抗LBP/CD14增敏系统能有效地抑制LPS的致炎作用。

由于LBP的N端与LPS结合后,必须通过其C端与mCD14结合形成LPS/LBP/CD14三元复合体才能传递致炎信号[2]。因此我们推测拮抗LBP与mCD14的结合位点(以模拟肽的形式封闭mCD14上与LBP结合的功能位点)不仅可阻断LPS致炎信号通路,而且可能不会影响LBP/LPS复合物通过高密度脂蛋白途径排泄,有望提供一种新的治疗内毒素急性肺损伤的策略。我们前期找到了1条可模拟LBP/CD14结合位点的多肽,该多肽有12个氨基酸,因此命名为MP12。体外实验证实该模拟肽能封闭mCD14上的LBP结合位点,具有一定的抗内毒素致炎作用。本研究拟通过动物体内实验,观测MP12对脂多糖型急性肺损伤大鼠的保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

FITC标记LPS(*E. Coli*,0111: B4,Sigma公司,美国),TNF-α ELISA试剂盒(晶美公司,美国),其他试剂为国产分析纯。Coulter Epics XL流式细胞仪(Beckman公司,美国),荧光显微镜(Leica,德国),血气分析仪(Instrumentation Lab,美国)。

1.2 实验分组

30只3月龄PSF级Wistar大鼠,雌雄不拘,体质量(103.5±12.4)g,由第三军医大学实验动物中心提供,按随机数字表法分为生理盐水对照组、LPS组和LPS+MP12组($n=10$)。LPS组通过颈静脉注射内毒素6 mg/kg,LPS+MP12组在接受LPS注射后立即予MP12 5 mg/kg静脉注射。生理盐水对照组接受与LPS+MP12组相同容量的生理盐水静脉注射。另将40只3月龄PSF级Wistar大鼠,雌雄不拘,体质量(108.1±13.7)g,由第三军医大学实验动物中心提供,按随机数字表法分为2组:LPS死亡率观察组与LPS+MP12死亡率观察组($n=20$),分别接受与LPS组和LPS+MP12组相同的处理方法,用于观测死亡率。

1.3 血浆内毒素水平测定

将1 ml静脉血置于无菌抗凝管中,于0 ℃,3 000 r/min离心10 min,收集血浆。采用鲎试剂盒检测血浆内毒素水平。具体方法参照试剂盒说明书。

1.4 动脉血气分析

给予处理因素后12 h,于大鼠左侧颈动脉处抽取动脉血0.5 ml,采用血气分析仪进行检测。

1.5 肺组织匀浆中TNF-α浓度检测

处死大鼠后,迅速取出右上肺,用冰生理盐水清洗去除血液,滤纸吸干多余液体。采用电子秤精确称3 g肺组织,移至冰RIPA裂解液中剪碎,于4 ℃,以600×g离心10 min,弃沉淀,上清再以35 000×g离心20 min。所得沉淀悬于适量的缓冲液中,调整蛋白含量至2 g/L。TNF-α浓度检测参照TNF-α ELISA试剂盒说明书时行。

1.6 肺组织病理检查及病理评分

在光镜下观察肺组织病理形态学改变,观察其肺泡结构的完整性,是否有肺间质水肿、肺泡水肿、炎细胞浸润、肺泡出血、透明膜形成及肺不张。病理形态学半定量分析:依据肺间质水肿、肺泡水肿、炎细胞浸润、肺泡出血、透明膜形成、肺不张的等级,按程度的"无、轻、中、重"分别计"0、1、2、3分",然后累计总分。

1.7 FITC-LPS与大鼠肺泡巨噬细胞结合实验

大鼠肺泡巨噬细胞的分离按文献方法进行。于荧光显微镜下观察肺泡巨噬细胞与FITC-LPS结合率,控制相同条件荧光照相,IPP图像分析软件测量平均荧光强度(MFI)。

1.8 2组死亡率观察

LPS死亡率观察组和LPS+MP12死亡率观察组大鼠分别接受相应处理后,置动物饲养室给予正常食、水喂养。每6小时观察大鼠一般情况,连续观察72 h,并记录死亡率。

1.9 统计学处理

电泳条带密度值以灰度×面积的值表示。采用SPSS 19.0统计软件,计量数据以$\bar{x}\pm s$表示,组间均数比较采用t检验,死亡率比较采用χ^2分析。

2 结果

2.1 各组间血浆内毒素水平比较

LPS组及LPS+MP12组血浆内毒素浓度水平大约为生理盐水对照组的2倍[(1.78±0.25)、(1.82±0.26) EU/ml *vs* (0.79±0.13) EU/ml,$P<0.01$],LPS组与LPS+MP12组间血浆内毒素浓度无明显差异($P>0.05$)。

2.2 各组间PaO_2水平比较

LPS组及LPS+MP12组PaO_2显著低于生理盐水对照组[(59.83±4.45)、(69.4±4.9) mmHg *vs* (101.00±8.69) mmHg,$P<0.01$],LPS+MP12组PaO_2明显高于LPS组($P<0.05$)。

2.3 各组间肺组织匀浆中TNF-α浓度比较

LPS组和LPS+MP12组肺组织匀浆中TNF-α浓度显著高于生理盐水对照组[(446.5±66.9)、(290.7±52.3) ng/ml *vs* (163.7±54.9) ng/ml,$P<0.01$],LPS+MP12组肺组织匀浆中

TNF-α 浓度显著低于 LPS 组($P<0.01$)。

2.4 各组间肺巨噬细胞与 LPS 结合率比较

荧光显微镜下观察,可见 LPS 组肺泡巨噬细胞结合的荧光标记的 LPS 量明显高于生理盐水对照组和 LPS + MP12 组。采用 IPP 图像分析软件测量各组荧光图片结果显示:LPS 组肺泡巨噬细胞表面荧光强度明显高于生理盐水对照组[(2 744 ± 682) *vs* (1 869 ± 451),$P<0.01$],而 LPS + MP12 组(2 148 ± 516)肺泡巨噬细胞表面荧光强度与生理盐水对照组之间无明显差异($P>0.05$),但明显低于 LPS 组($P<0.01$),见图 1。

2.5 各组间肺组织病理评分比较

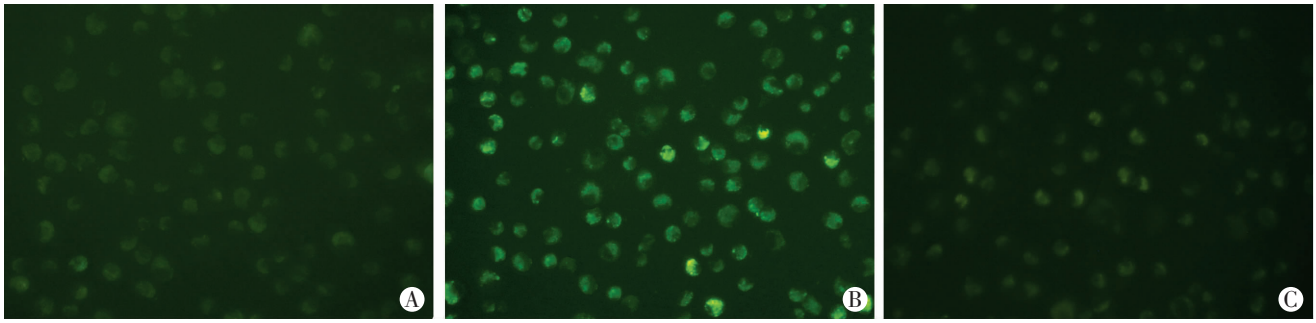
LPS 诱导的 ALI 大鼠肺组织可见严重的肺间质水肿、肺泡水肿、肺间质出血、肺泡内透明膜形成及大量的中性粒细胞浸润;而 MP12 治疗组大鼠肺水肿明显减轻,肺间质出血轻微,中性粒细胞浸润明显减少,见图 2。病理评分半定量分析结果显示,MP12 治疗组大鼠肺组织病理评分明显好于 LPS 组[4.58 ± 1.45) *vs* (7.7 ± 1.5),$P<0.01$]。

2.6 LPS 死亡率观察组与 LPS + MP12 死亡率观察组间死亡率比较

LPS 致伤后第 1 天,LPS 死亡率观察组死亡率达 35%(7/20),而 LPS + MP12 死亡率观察组死亡率仅 15%(3/20);第 2 天,LPS 死亡率观察组与 LPS + MP12 死亡率观察组的死亡率分别为 25%(5/20)及 15%(3/20);第 3 天,LPS 死亡率观察组与 LPS + MP12 死亡率观察组的死亡率分别为 15%(3/20)及 10%(2/20)。LPS + MP12 死亡率观察组的 72 h 累计死亡率显著低于 LPS 死亡率观察组(40% *vs* 75%,$P<0.05$)。

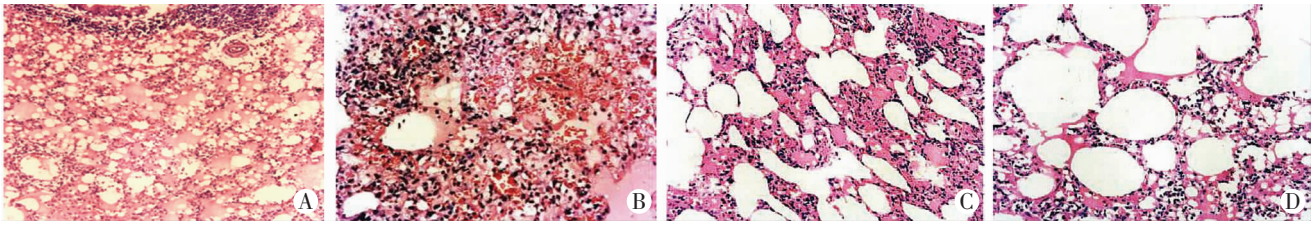
3 讨论

LBP/CD14 对 LPS 的致炎效应具有强大的增敏作用。研究表明,LBP/CD14 存在的条件下,极微量的 LPS 即可诱发炎症因子释放,而敲除 LBP/CD14 或拮抗 LBP/CD14 则可显著抑制 LPS 的致炎效应[3-4],因此 LBP/CD14 又被称为 LPS 的增敏系统。以 LBP/CD14 为靶点的抗内毒素治疗具有在早期阻断内毒素炎症信号传递的优点,已成为近年来治疗内毒素性疾病(如 ALI/ARDS、sepsis 等)较为理想的策略。近年采用抗 LBP 抗体、抗 CD14 抗体、sCD14 等方法拮抗 LBP/CD14 在抑制 LPS 诱导的炎症反应方面取得了一定的进展[5-6],但仍存在不少缺陷。问题的关键在于这些方法在拮抗 LBP/CD14 的同时也抑制了 LBP 对 LPS 的清除作用。因此,更为理想的策略是封闭 CD14,既能阻断 LPS 致炎信号通路,又不影响 LPS/LBP 复合物从 HDL 途径清除。我们前期以 CD14 为靶分子对噬菌体随机 12 肽库进行 4 轮亲和筛选,并经过与 LBP 的竞争抑制试验,最终获得 8 条不同的多肽序列,其共同序列为:FHRHPPXPTLXX,表明 12 肽中的 FHRHPPPTL 氨基酸残基可能是构成 LBP 与 CD14 结合表位的骨架结构。第 1 号多肽 FHRWPTWPLPSP 为 8 个噬菌体克隆所共有(克隆编号分别为 15、21、33、80、55、71、86、90),这 8 个克隆与 rhCD14 的结合活性一致很高($OD_{phage}/OD_{control}>25$)[7]。因此,我们选择第 1 号多肽(命名为 MP12)进行人工合成,并在前期工作中发现该多肽能在体外显著抑制 LPS 诱导单核 – 巨噬细胞($CD14^+$ U937 细胞)的 TNF-α mRNA 表达,其效应呈现浓度依赖性。以上结果表明 MP12 有潜在治疗内毒素性 ALI 的作用[8]。



A:生理盐水对照组;B:LPS 组;C:LPS + MP12 组

图 1 荧光显微镜观察各组肺泡巨噬细胞与荧光标记 LPS 结合率 (×200)



A:LPS 组 肺间质及肺泡水肿(×100);B:LPS 组 肺间质炎性细胞浸润及出血(×100);C:LPS + MP12 组 肺泡水肿减轻(×200);D:LPS + MP12 组 肺间质炎性细胞浸润减轻(×200)

图 2 LPS 组与 LPS + MP12 组肺组织病理切片 HE 染色观察

本研究采用MP12(5 mg/kg)静脉注射治疗内毒素性肺损伤大鼠,并从以下几个方面观测了MP12的抗内毒素生物学效应:①对内毒素性肺损伤大鼠血浆内毒素浓度的影响;②抑制肺泡巨噬细胞与内毒素结合的效应;③对肺组织内炎症介质释放的影响;④改善内毒素性肺损伤大鼠PaO_2的效应;⑤减轻内毒素性肺损伤大鼠肺组织病理损伤的效应;⑥对内毒素性肺损伤大鼠死亡率的影响。以期全面评估MP12对内毒素急性肺损伤的治疗作用。结果表明,大鼠正常血浆中内毒素浓度较低,仅为(0.79±0.13)EU/ml,而给予6 mg/kg LPS注射后可明显升高大鼠血浆中内毒素浓度(约为正常生理条件的2.2倍)。静脉注射MP12后血浆中内毒素浓度并没有明显改变。其原因在于MP12是针对LPS/CD14结合位点进行封闭,而不是直接与LPS进行结合的多肽,因此其不能降低血浆内毒素水平。这也表明MP12的抗内毒素效应不是通过降低血浆内毒素水平而发挥作用的。

内毒素性急性肺损伤的主要病理生理机制在于内毒素诱导肺部炎症细胞产生大量促炎症介质及炎症因子,如TNF-α、IL1-β等[9-10]。MP12是否能发挥治疗内毒素性急性肺损伤的作用,首先需观察其是否能阻断内毒素与肺泡巨噬细胞的结合及抑制肺组织内炎症介质的释放。采用荧光显微镜观察及IPP图像分析软件测量肺泡巨噬细胞表面与荧光标记LPS的结合率,其结果表明给予MP12静脉注射后,LPS+MP12组肺泡巨噬细胞结合的LPS量明显低于LPS组($P<0.01$),该组肺泡巨噬细胞结合的LPS量与正常生理盐水对照组相似,无显著统计学差异($P>0.05$)。LPS与肺泡巨噬细胞的结合是通过与LBP形成LPS/LBP复合物,然后再与肺泡巨噬细胞表面的CD14相结合。我们的前期研究结果表明MP12能与LBP特异性竞争结合CD14,具有封闭LBP与CD14结合位点的作用。因此,以上结果也印证了在体内,MP12能封闭巨噬细胞表面CD14与LBP的结合位点,从而阻断内毒素与肺泡巨噬细胞的结合。

肺组织匀浆中TNF-α浓度的检测结果表明,静脉注射LPS后,LPS+MP12组肺组织中TNF-α浓度显著低于LPS组。研究表明,内毒素致伤后,肺组织内TNF-α的产生的来源主要是肺泡巨噬细胞[11]。其中涉及信号通路上游即是LPS/LBP复合物与肺泡巨噬细胞表面的CD14相结合,从而启动LPS致炎信号通路。本实验结果表明,MP12能有效抑制内毒素对肺泡巨噬细胞的激活,从而减少TNF-α的产生。结合上述MP12阻断内毒素与肺泡巨噬细胞的结合的效应分析,MP12首先通过封闭巨噬细胞表面CD14与LBP的结合位点,进而阻断了内毒素的致炎信号通路,最终达到抗内毒素的目的。

内毒素性肺损伤的主要病理机制是肺部失控的炎症反应,导致弥漫的肺泡毛细血管膜损伤,从而引起肺间质水肿、出血,肺泡渗出及填塞,肺泡内透明膜形成及肺泡表面活性物质丧失,最终因弥散面积的损失、弥散距离的增加和通气/血流的失调,导致顽固性的低氧血症[12-13]。我们前期的实验结果已明确MP12具有阻断内毒素致炎信号通路,并抑制内毒素诱导肺泡巨噬细胞活化和释放炎症介质的作用。但这种生物学效应是否具有相应的临床保护作用?本实验观察了MP12对内毒素性急性肺损伤大鼠肺组织病理评分的影响及对PaO_2和死亡率的影响,结果表明,与LPS组相比,LPS+MP12组大鼠肺水肿明显减轻,肺间质出血轻微,中性粒细胞浸润明显减少;病理评分半定量分析结果显示,LPS+MP12组肺组织病理评分明显好于LPS组($P<0.01$)。病理形态学的改善势必带来功能方面的改善,动脉血气分析结果也表明,MP12(5 mg/kg)能显著提高ALI大鼠PaO_2。LPS+MP12组大鼠PaO_2均值大于60 mmHg,高于ALI诊断标准。而我们另设的死亡观测组的结果也显示给予MP12静脉注射后,该组的72 h死亡率仅为40%(8/20),显著低于单独使用LPS死亡观察组的死亡率(15/20,75%)。

综上,我们对前期工作筛选获得的1条LBP/CD14结合位点模拟肽(MP12)的治疗内毒素性急性肺损伤的生物学效应进行了验证。结果表明,该多肽具有与LPS/LBP复合物竞争结合CD14的生物学活性,能阻断LPS与肺泡巨噬细胞表面CD14的结合,并能明显抑制LPS诱导的TNF-α分泌,其抗内毒素活性能显著改善内毒素性急性肺损伤大鼠肺组织的氧合能力,减轻肺损伤,减少死亡率。本研究有利于我们从新的角度理解LBP/CD14在内毒素性炎症反应及其相关疾病中的作用,有望为内毒素性ALI/ARDS提供新的防治策略。

参考文献:

[1] Figueiredo M D, Salter C E, Hurley D J, *et al*. A comparison of equine and bovine sera as sources of lipopolysaccharide-binding protein activity in equine monocytes incubated with lipopolysaccharide[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2008, 121(3/4): 275-280.

[2] Mollnes T E, Christiansen D, Brekke O L, *et al*. Hypothesis: combined inhibition of complement and CD14 as treatment regimen to attenuate the inflammatory response[J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 632: 253-263.

[3] Genth-Zotz S, von-Haehling S, Bolger A P, *et al*. The anti-CD14 antibody IC14 suppresses *ex vivo* endotoxin stimulated tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic heart failure[J]. Eur J Heart Fail, 2006, 8(4): 366-372.

[4] Branger J, Florquin S, Knapp S, *et al*. LPS-binding protein-deficient mice have an impaired defense against Gram-negative but not Gram-positive pneumonia[J]. Int Immunol, 2004, 16(11): 1605-1611.

[5] Dunzendorfer S, Lee H K, Soldau K, *et al*. Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of

LBP and sCD14 in mediating LPS responses[J]. FASEB J, 2004, 18(10): 1117-1119.
[6] Arana-Mde J, Vallespi M G, Chinea G, *et al*. Inhibition of LPS-responses by synthetic peptides derived from LBP associates with the ability of the peptides to block LBP-LPS interaction[J]. J Endotoxin Res, 2003, 9(5): 281-291.
[7] 徐智, 李琦, 冯起甲, 等. 脂多糖结合蛋白/CD14结合位点的初步定位[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(7): 565-568.
[8] 徐智, 李琦, 冯起甲, 等. 三条脂多糖结合蛋白/CD14结合位点模拟肽体外抗内毒素活性的比较研究[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2008, 7(6): 435-439, 插2.
[9] Marcotorchino J, Romier B, Gouranton E, *et al*. Lycopene attenuates LPS-induced TNF-α secretion in macrophages and inflammatory markers in adipocytes exposed to macrophage-conditioned media[J]. Mol Nutr Food Res, 2012, 56(5): 725-732.
[10] Higuchi Y, Kawakami S, Oka M, *et al*. Intravenous administration of mannosylated cationic liposome/NFkappaB decoy complexes effectively prevent LPS-induced cytokine production in a murine liver failure model[J]. FEBS Lett, 2006, 580(15): 3706-3714.
[11] Joh E H, Gu W, Kim D H. Echinocystic acid ameliorates lung inflammation in mice and alveolar macrophages by inhibiting the binding of LPS to TLR4 in NF-κB and MAPK pathways[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 84(3): 331-340.
[12] Raymondos K, Martin M U, Schmudlach T, *et al*. Early alveolar and systemic mediator release in patients at different risks for ARDS after multiple trauma[J]. Injury, 2012, 43(2): 189-195.
[13] Syrja P, Saari S, Rajamaki M, *et al*. Pulmonary histopathology in dalmatians with familial acute respiratory distress syndrome (ARDS)[J]. J Comp Pathol, 2009, 141(4): 254-259.

(**收稿**:2012-08-30;**修回**:2012-10-11)
(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2012)24-2473-01

个案与短篇

回生口服液联合多西紫杉醇同期放化疗治疗60例食管癌临床分析

董华琼,刘发兰,田婕丽,王莹莹 (629000 四川 遂宁,遂宁市中心医院肿瘤科)

[**关键词**] 食管癌;回生口服液;化疗;放疗
[**中图法分类号**] R735.1 [**文献标志码**] B

食管癌是我国发病率较高的恶性肿瘤,部分患者需要通过化疗及放疗等手段来进行治疗,但是同期化疗及放疗的毒副作用较大。回生口服液联合化疗、放疗可以提高患者的生活质量,并改善患者的免疫功能[1]。我们通过同期放、化疗联合回生口服液治疗食管癌,观察近期疗效,并观察其对食管癌患者T细胞亚群的影响及同期放化疗的毒副作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择2010年1月至2011年4月经本院病理学及影像学证实的食管癌初治未行手术的患者60例,年龄60~78岁;卡氏评分(KPS)≥70。治疗前进行食管吞钡摄片、胸部CT、胃镜、食管腔内超声检查、腹部B超检查,进行临床分期。将60例食管癌患者分成2组,A组30例,其中男性17例,女性13例,中位年龄72岁;临床分期:ⅡA期13例、ⅡB期10例、Ⅲ期7例。B组30例,其中男性19例,女性11例,中位年龄70岁;临床分期:ⅡA期7例、ⅡB期12例、Ⅲ期11例。两组患者一般临床资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。两组患者均采用三维适形放射治疗,放疗设备采用瓦里安直线加速器(600CD)型6 MV X线治疗,治疗计划系统为Pinnacle v. 8.0m。总剂量60~66 Gy/30~33次。放疗过程中的第1周开始每周加用多西紫杉醇静脉化疗(多西紫杉醇25 mg/m^2),连用6周。A组在治疗中口服回生口服液,10 ml,每日3次至放疗结束;B组仅行同期放化疗。总治疗时间6~7周。在放疗第1天检测T细胞亚群,放疗结束后再次检测,并向患者介绍检测和治疗的意义。患者均签署知情同意书,研究获医院伦理委员会批准。

1.2 疗效评价

在治疗前1 d和治疗结束后1 d分别通过流式细胞仪检测外周血中的$CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD4^+/CD8^+$、NK细胞。按照RECIST 1.1疗效评价标准,治疗结束随访6个月后,结合食管CT及胃镜检查评价疗效,分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)稳定(SD)、病情进展(PD)。

1.3 治疗毒副作用评定

放射治疗副反应评价标准参照RTOG早期放射反应评价标准和RTOG/EORTC后期放射反应评价标准。

1.4 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件进行χ^2检验和Hotelling T2检验。

2 结果

2.1 免疫指标

治疗前2组$CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD4^+/CD8^+$、NK细胞比较,差异无统计学意义($F=1.685$, $P=0.516$)。治疗后2组$CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD4^+/CD8^+$、NK细胞比较,差异有统计学意义($F=16.43$, $P=0.047$)。见表1。

表1 治疗后2组患者T细胞亚群及NK细胞比较 ($n=30$, $\bar{x}\pm s$)

组别	$CD3^+$	$CD4^+$	$CD8^+$	$CD4^+/CD8^+$	NK细胞
A组	58.62±3.42	37.69±4.53	26.47±5.35	1.38±0.15	27.99±3.29
B组	55.37±4.45[a]	35.46±3.58[a]	27.73±4.18[a]	1.24±0.12[a]	25.36±4.61[a]

a: $P<0.05$,与A组比较

(下转2483页)

[**通信作者**] 董华琼,E-mail: olxll@163.com