DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.03.030

表浅膀胱癌患者卡介苗膀胱灌注后尿液中 IL-2 TNF监测的预后价值

卢根生* 金锡御 宋 波 熊恩庆 (第三军医大学附属西南医院泌尿外科) 重庆, 400038

提 要 目的: 观察卡介苗(BCG)膀胱灌注后尿液中 IL-2 TNF含量与临床预后的关系。方法: 32例表浅膀胱癌患者术后 BCG膀胱灌注治疗,采用 CTLL-^{3}H-TdR掺入法和夹心法酶联免疫吸附试验分别测定尿液中 IL-2和 TNF浓度,随访 43.5(26~67)个月。结果: 32例患者中有6例复发(18.7%),复发患者灌注后尿液中 IL-2 TNF含量分别为(14.34±6.83) U/ml (78.63±37.45) ng/L,未复发患者含量分别为(21.41±9.23) U/ml (106.76±49.13) ng/L,复发患者与未复发患者间 IL-2 TNF水平均差异显著($P<0.01$或0.05)。结论: 尿液中 IL-2 TNF含量监测对判断表浅膀胱癌术后 BCG灌注治疗的预后有重要的参考价值。

关键词 膀胱肿瘤;预后;卡介苗膀胱灌注;白介素-2;肿瘤坏死因子
中图法分类号 R737.14

近10年来,作为生物反应调节剂的卡介苗(BCG)被广泛地用于治疗膀胱癌,取得了显著效果,在预防表浅膀胱癌术后复发方面,BCG免疫治疗优于其它化疗[1,2]。但是 BCG治疗方案和剂量仍有争议,而且个体对 BCG反应有明显差异,因此需要有一些精确指标去早期判断 BCG免疫治疗的效果,以便及时调整治疗方案,或改用或联合其它药物治疗。为此,我们进行了前瞻性研究,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 临床资料

1991年 12月至 1995年 5月在我院住院手术的表浅膀胱癌患者 32例,男 23例,女 9例;年龄 28岁~77岁,平均 56.7岁。25例初发,7例复发。膀胱部分切除 19例,经尿道肿瘤电切 13例。经病理证实均为膀胱移行细胞癌,其中Ⅰ级 12例,Ⅱ级 17例,Ⅲ级 3例。临床分期: 0期 5例,A期 18例,B$_1$期 9例。

术后 7 d~14 d开始 BCG膀胱灌注,BCG 120 mg(含活菌数 6×10^8),溶于 50 ml生理盐水中,经导尿管注入膀胱,保留 2 h后排出。每周 1次,6次为 1疗程。半年后接受第 2疗程治疗。术后每 3个月行膀胱镜和(或)B超检查至 1年,此后每半年复查 1次。

1.2 标本收集

分别于灌注前、第 6次灌注后 4 h收集尿液于玻璃瓶中,立即低温离心,1500 r/min 10 min去掉细胞,然后以 5000 r/min 10 min去掉细胞碎片,0.1 mol/L氢氧化钠调整 pH值至 7.2,低温(-20℃)保存待测。

1.3 主要试剂及来源

BCG为兰州生物制品研究所产品。CTLL细胞株由天津泌尿外科研究所提供。标准品 IL-2由第三军医大学免疫教研室提供。TNF试剂盒为中国军事医学科学院产品。RPMI-1640细胞培养液为美国 GIBC公司产品。

1.4 IL-2测定

用 CTLL-^{3}H-TdR掺入法测定: 取传代第 2天生长旺盛的 CTLL-2细胞,用 RPMI1640培养液清洗,10%小牛血清、5×10^{-5} mol/L 2-巯基乙醇的 RPMI1640培养液配成 1×10^5/ml细胞悬液。96孔细胞培养板,每孔加入 100 μl不同稀释度的标准品和待测样品,同时设置培养液对照,向各孔加入 100 μl IL-2依赖细胞株 CTLL-2,置 37℃、5% CO_2中培养 24 h,每孔加入 50 μl 18.5 kBq ^{3}H-TdR,继续培养 4 h,用 β计数仪检测细胞[^{3}H]掺入值。采用概率单位分析法计算 IL-2值,结果以活性单位(U/ml)表示。

1.5 TNF测定

采用夹心法酶联免疫吸附试验进行测定: TNF单抗 T_3和 E_6经包被缓冲液稀释后混合加入酶联板中,4℃放置 12 h,包被缓冲液清洗 3次后加封闭缓冲液 37℃、放置 30 min,加标准 TNF或待测样品,室温放置 1 h,加 1:1000稀释兔抗 TNF体。室温反应 1 h,加 1:1000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔单克隆抗体反应 1 h,0.5 mol/L H_2SO_4终止反应,酶标读数仪上测 D值(OD)值。由第三军医大学数学教研室建立的数学模型计算出标本 TNF含量。

1.6 数据处理

测定结果以 $\bar{x}\pm s$表示。灌注前、后尿液中 IL-2 TNF变化采用配对 t检验,肿瘤复发患者和未复发患者尿液中 IL-2 TNF含量比较采用非配对 t检验。

2 结果

32例患者中 23例坚持了 2~4个疗程的 BCG灌注治疗,9例患者由于严重膀胱刺激症状或其它原因只接受了一个疗程 BCG治疗。全部患者被随访 26~67个月,平均随访时间为 43.5个月。共有 6例患者复发,复发率为 18.7%,其中 1例复发 2次并

* 卢根生,男,32岁,主治医师,讲师,博士研究生

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

远处转移,于第 1次术后 27个月死于膀胱癌,1例复发 3次,目前仍在随访之中。另外还有 1例患者于第 1次术后 34个月死于其它疾病。

灌注前 IL-2、TNF含量分别为(3.12± 1.47) U/ml、(19.65± 8.67) ng/L,灌注后分别为(20.61± 8.73) U/ml和(96.30± 43.24) ng/L,灌注后 IL-2、TNF含量分别较灌注前有非常显著性的升高($P < 0.001$)。灌注后 6例复发患者尿液中 IL-2含量为(14.34± 6.83) U/ml,26例未复发患者尿液中 IL-2含量为(21.41± 9.23) U/ml,复发患者尿液中 IL-2水平非常显著低于未复发患者($P < 0.01$)。复发与未复发患者尿液中 TNF含量分别为(78.63± 37.45) ng/L和(106.76± 49.13) ng/L,两者间差异显著($P < 0.05$)。

3　讨论

自从 1976年 Morales[3]首次应用 BCG治疗膀胱癌以来,BCG被广泛用于预防表浅膀胱癌术后复发,取得了令人瞩目的效果,表浅膀胱癌术后 5年复发率由原来的 40%～ 70%下降至 9%～ 21.5%[4]。尽管如此,BCG不能完全阻止表浅膀胱癌术后复发,对于 BCG治疗反应不理想的患者能否通过检测某些指标而将其筛选出来,尽早调整治疗方案而不延误病情,一些学者已致力于这方面的研究,其结果不尽人意,在 BCG腔内灌注治疗期间,不同免疫参数可以被监测,有的研究者报告,膀胱壁淋巴肉芽肿存在或皮肤 PPD反应阳性转化同临床反应有关,但是这两种指标的预测指数对于个体来讲并不高,通过膀胱镜检查及病理活检来了解淋巴肉芽肿的情况要受到取标本等多种因素的影响,与此同时,PPD皮肤反应试验测定全身免疫反应缺乏免疫特异性[5]。

人们在探讨 BCG抗肿瘤作用机制的同时,试图将尿液中细胞因子及受体水平与患者对 BCG免疫治疗的临床反应联系起来。Haaff等[6]第 1次发现 BCG灌注治疗后尿液中 IL-2的存在,而且在无肿瘤复发患者尿液中可以测到较高水平 IL-2。我们的研究进一步发现:灌注前尿液中 IL-2、TNF含量分别为(3.12± 1.47) U/ml、(19.65± 8.67) ng/L,灌注后分别为(20.61± 8.73) U/ml、(96.30± 43.24) ng/L,灌注后较灌注前两者均有显著性升高($P < 0.001$)。IL-2是 T细胞在特殊抗原刺激下而分泌的一种细胞因子,它能激活自然杀伤细胞、巨噬细胞、细胞毒 T淋巴细胞,并加强 T细胞介导的免疫反应。TNF是由 T淋巴细胞和巨噬细胞分泌的,它能激活巨噬细胞、刺激 T细胞增殖且具有较强的抗肿瘤活性。本实验进一步证实了 BCG抗肿瘤作用的免疫反应机制,其中 T淋巴细胞、巨噬细胞及其分泌的 IL-2、TNF细胞因子起着重要作用,这与我们以前的免疫组织化学实验结果相一致[7]。

我们的资料还显示:32例患者随访 26～ 67个月,共有 6例复发,复发率为 18.7%,6例复发患者尿液中 IL-2、TNF含量分别为(14.34± 6.83) U/ml、(78.63± 37.45) ng/L,23例未复发患者灌注后尿液中 IL-2、TNF含量分别为(21.41± 9.23) U/ml、(106.76± 49.13) ng/L,复发患者尿液中 IL-2、TNF含量显著低于未复发患者(P值分别小于 0.01和 0.05)。我们认为:IL-2、TNF是两种重要的细胞因子,其含量变化能反映机体的免疫功能状态,通过了解 BCG灌注治疗后尿液中 IL-2、TNF水平,我们可以即时掌握患者对 BCG治疗的效果,并调整治疗方案,为临床工作提供一定的指导作用。

参考文献

1 Lamm D L, Griffith G, Pettit L L *et al*. Current perspectives on diagnosis and treatment of superficial bladder cancer. Urology, 1992; 39: 301

2 Witjes J A, Mulders P F, Debruyne F M. Intravesical therapy in superficial bladder cancer. Urology, 1994; 43(2 Supple): 2

3 Morales A, Eidinger D, Bruce A W. Intracavitary bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder bumors. J Urol, 1976; 116: 180

4 Irie A, Lee K E, Kadowaki K. Long-term results and complications of intravesical instillation of bacillus Calmettle-Guerin for prophylaxis of bladder cancer recurrence. Hinyokika-kiyo, 1994; 40(10): 873

5 Reijke T M, Boer E C, Kurth K H. Urinary cytokines during intravesical BCG for surperficial bladder cancer: processing, stability and prognostic value. J Urol, 1996; 155: 477

6 Haaff E O, Catalona W J, Ratliff T L. Detsction of interleukin-2 in the urine of patients with superficial bladder tumors after treatment with intravesical BCG. J Urol, 1986; 136: 970

7 卢根生,金锡御,宋　波. BCG膀胱灌注对局部免疫细胞功能的影响.中华泌尿外科杂志, 1996; 17(4): 210

(收稿: 1997-09-11;修回: 1998-03-18)

(编辑　王　红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Prognostic significance of monitoring of urinary IL-2 and TNF levels after intravesical BCG instillation in patients with superficial bladder carcinoma

Lu Gensheng, Jin Xiyu, Song Bo, Xiong Enqing (Department of Urology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To explore the relationship between the levels of urinary IL-2 and TNF and prognosis after intravesical BCG instillation in patients with superficial bladder carcinoma. Methods: The level of urinary IL-2 and that of urinary TNF were respectively determined with CTLL-3H-TdR endosmosis and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 32 patients with superficial bladder carcinoma. The patients were then followed up for 43.5 months. Results: Six out of the 32 (18.7%) patients had recurrence. The levels of urinary IL-2 and TNF were significantly lower in patients with recurrence than in those without. Conclusion: The monitoring of levels of urinary IL-2 and TNF after intravesical BCG instillation in patients with superficial bladder carcinoma is of great prognostic value.

Key words bladder neoplasm; immunity; prognosis

(上接236页)

分析仪 405 nm检测 A值。标准品直线回归相关系数 V=0.996,用直线回归方程将所测样品 A值代入计算得样品 sIL-2R含量。

TNF酶联检测试剂盒:军事医学科学院基础医学研究所生产。按试剂盒说明书操作。标准品指数回归相关系数 V=0.92~0.96,用指数回归方程将所测样品 A值代入计算得样品 TNF含量。

2 结果

健康献血员血清 sIL-2R含量:10例男性献血员血清 sIL-2R含量为(126.2±76.4) pmol/L;10例女性献血员为(142.3±73.7) pmol/L,两者相差不显著($P>0.05$)。全部20例健康献血员血清 sIL-2R含量为(134.2±76.5) pmol/L。

健康献血员血清 TNF含量:10例男性献血员血清 TNF含量为(0.62±0.21) ng/ml;10例女性献血员为(0.62±0.23) ng/ml,两者相差不显著($P>0.05$)。全部20例健康献血员血清 TNF含量为(0.63±0.20) ng/ml。

头颈部肿瘤患者血清 sIL-2R TNF含量见附表。

附表 头颈部肿瘤患者血清 sIL-2R TNF含量($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	sIL-2R[C_B/(pmol·L^{-1})]	TNF[ρ_B/(ng·ml^{-1})]
健康献血员	20	134.2±76.5	0.63±0.20
头颈部肿瘤患者	15	253.7±163.4**	2.03±0.75*

*:$P<0.05$,**:$P<0.001$与健康献血员比较

3 讨论

有人报道,肺、胃、宫颈,乳腺等实体肿瘤患者血清 sIL-2R水平显著高于正常上,在发生转移的患者增高更为明显[2]。我们的实验结表明:头颈肿瘤患者血清中 sIL-2R明显高于正常人。其升高的机制大多数学者认为可能与活化 mIL-2R p55蛋白阳性细胞数目增加引起 sIL-2R释放增多有关[3]。Lai等[1]认为鼻咽癌患者的血清 sIL-2R水平升高可能局限于鼻咽部的淋巴组织增殖紊乱所致。也有研究表明,头颈部肿瘤患者细胞免疫功能低下,而其 sIL-2R水平却显著增高,这很可能是因为 sIL-2R与 IL-2结合使 IL-2廓清加速,活化的 T淋巴细胞静息下来,其次大量的 sIL-2R从细胞膜上脱落,使活化的淋巴细胞功能处于衰竭状态所致[3]。

有关正常人血清 TNF含量国内少见报道,我们检测20例健康献血员血清 TNF含量为(0.63±0.20) ng/ml,显著低于头颈部肿瘤患者,Vonbiber等[4]对头颈部鳞状细胞癌的癌组织标本测定,发现 TNF的两种受体 RⅠ和 RⅡ在肿瘤组织中均明显增多,认为 TNF受体在肿瘤细胞的表达增多,可能是为了在肿瘤微环境中,调控肿瘤细胞中的 TNF及其活性。

关键词 头颈部肿瘤;受体;白细胞介素-2;肿瘤坏死因子
中图法分类号 R739.91

参考文献

1 Lai K N, Frep M D, Mphil S H *et al*. Soluble interleukin-2 receptors in patients with nasopharyngeal carcinoma. Cancer, 1991; 67(8): 2180

2 Lissoni P, Barni S, Rovelli F *et al*. The biological significance of soluble interleukin-2 receptors in solid tumors. Eur J Cancer, 1990; 26(1): 33

3 马玲国,刘学仁.可溶性白细胞介素-2受体与头颈肿瘤.国外医学:耳鼻咽喉科学分册,1994; 18(1): 14

4 Vonbiber Stein S E, Spiro J D, Lindquist R *et al*. Enhanced tumor cell expression of tumor necrosis factor receptors in head and neck squamous cell carcinoma. Am J Surg, 1995; 170(5): 416

(收稿:1997-07-04;修回:1997-12-17)
(编辑 汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net