

胃癌患者铜绿假单胞菌制剂术中腹腔置药对免疫功能的影响

郑朝旭¹, 冯 强¹, 徐 泉¹, 谢玉权², 梁建明², 袁兴华¹

(1.中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所, 北京 100021; 2.荆门市第一人民医院, 湖北 荆门 448000)

摘 要: [目的] 评价胃癌手术患者术中腹腔放置铜绿假单胞菌制剂的安全性及对免疫功能的影响。[方法] 72 例进展期胃癌患者随机分为铜绿假单胞菌制剂腹腔置药组(实验组)和对照组, 实验组术毕于原手术部位按 0.08~0.12ml/kg 放置铜绿假单胞菌注射液, 对照组予以单纯手术。全部病例均在术前及术后 10、20、30d 采集外周静脉血分别测定血常规、肝肾功能、CD19(B 细胞)计数水平, 免疫球蛋白水平(IgA、IgM 和 IgG), 并观察患者围手术期并发症及不良反应。[结果] 实验组围手术期血常规、肝肾功能均在正常值范围内。术后 30d, 实验组较对照组 IgA ($P=0.037$)、IgG ($P=0.044$) 及 CD19 计数水平 ($P=0.043$) 明显提高。实验组术后 10d IgM 较术前明显增高 ($P=0.011$)。两组均未出现明显不良反应。[结论] 铜绿假单胞菌制剂胃癌术中腹腔给药安全可行, 可增强机体体液免疫调节作用。

关键词: 胃癌; 免疫球蛋白; 铜绿假单胞菌制剂; 腹腔置药

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)05-0379-04

The Effect of Pseudomonas Aeruginous-Mannose Sensitive Haemagglutination Intraperitoneal Administration During Operation on Immunity in Patients with Gastric Cancer

ZHENG Zhao-xu, FENG Qiang, XU Quan, et al.

(Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of pseudomonas aeruginous-mannose sensitive haemagglutination (PA-MSHA) intraperitoneal administration during operation on immunity and its safety in patients with gastric cancer. [Methods] Seventy two cases with advanced gastric cancer were randomly divided into PA-MSHA treatment group (experimental group) and control group. Patients in experimental group received PA-MSHA 0.08~0.12ml per kilogram in the original surgical site at the end of operation, whereas patients in control group received surgery alone. Peripheral venous blood samples were obtained before operation and at the 10th, 20th and 30th day after operation, the blood routine examination, liver and kidney function, total B-lymphocyte count (CD19) and the immunoglobulin level were detected. The perioperative complications and toxicity were observed. [Results] The blood routine examination and liver and kidney function were normal in perioperative period. Thirty days after surgery, compared with the control group, the concentration of IgA ($P=0.037$) and IgG ($P=0.044$) and the count of CD19 cells ($P=0.043$) in experimental group increased significantly. The concentration of IgM at day 10 after surgery increased significantly in experimental group. There was no obvious toxicity in both groups. [Conclusion] The intraoperative intraperitoneal administration of PA-MSHA for patients with gastric cancer is safe and feasible, and it can enhance the patients' immunity.

Key words: gastric cancer; immunoglobulin; PA-MSHA; intraperitoneal administration

铜绿假单胞菌制剂 (pseudomonas aeruginous-mannose sensitive haemagglutination, PA-MSHA) 是通过基因克隆技术制备以绿脓杆菌为载体表达 MSHA (甘露糖敏感性) 菌毛的灭活制剂^[1]。研究显示 PA-

MSHA 制剂皮下注射或胸腔注射可显著调节细胞免疫水平^[2]。针对应用 PA-MSHA 治疗胃癌动态观察体液免疫反应的研究报道较少。本文通过对进展期胃癌手术患者术中腹腔放置铜绿假单胞菌制剂, 动态观察围手术期外周静脉血中免疫球蛋白水平, 评价铜绿假单胞菌制剂腹腔置药对胃癌手术患者免疫功

收稿日期: 2012-01-30; 修回日期: 2012-03-13

通讯作者: 袁新华, E-mail: baroldyuan@sohu.com

能的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2008年11月至2010年4月中国医学科学院肿瘤医院腹部外科收治的72例胃癌患者,术前均通过胃镜活检获得病理证据,临床分期均按照2010年第7版UICC/AJCC胃癌TNM分期方法。按随机排列表法分入铜绿假单胞菌腹腔注射组(实验组)和对照组。实验组41例,对照组31例,男女比例分别为2.4:1(29/12)和1.6:1(19/12),平均年龄分别为52.89±8.02岁和55.00±10.59岁,实验组与对照组各项临床病理特征(表1)无统计学差异,具有可比性。

1.2 手术方法

实验组和对照组均进行根治性胃癌切除术(D2/D2+),实验组实施近端胃切除术、远端胃切除及全胃切除术者分别为3例、30例及8例,对照组分别为2例、22例及7例。术中探查原发肿瘤均侵及/侵出浆膜外,切除完毕彻底止血及冲洗后,实验组于原瘤床位置(小网膜囊区、原胃小弯肝胃韧带区域、包括直肠膀胱/子宫陷窝)按照0.08~0.12ml/kg放置8~10ml铜绿假单胞菌注射液(北京万特生物制药有限公司,1.6~2×10⁹个细菌/支);对照组常规进行关腹操作。

1.3 观察指标

实验组及对照组病例均于术前和术后10、20、30d分别采集外周静脉血,测定以下项目:①血细胞分类,肝肾功能;②流式细胞术检测外周静脉血CD19计数水平(B细胞);③免疫球蛋白水平(IgA、IgM、IgG);④同时观察患者术后体温变化、排气排便

时间、伤口愈合情况等指标及不良反应。

1.4 统计学处理

计量指标用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用配对 t 检验,组间比较采用独立样本 t 检验;两组间率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学差异。

2 结果

2.1 血常规、肝肾功能

实验组围手术期(术前及术后10、20、30d)血常规和肝肾功能波动均在正常值范围内,与对照组差异无统计学意义(表2)。说明铜绿假单胞菌注射液腹腔给药方式对患者血象及肝肾功能影响较小。

表1 两组临床病理特征比较

临床特征	实验组(n=41)	对照组(n=31)	χ^2	P值
性别			0.347	0.556
男性	29	19		
女性	12	12		
年龄(岁)	52.89±8.02	55.00±10.59	0.936*	0.353
部位			0.060	0.807
胃底体癌	13	9		
胃窦癌	28	22		
Lauren分型			0.169	0.681
肠型	18	16		
弥漫型	23	15		
分化程度			0.028	0.867
高中分化	14	10		
低分化	27	21		
淋巴结转移			0.019	0.891
阳性	30	24		
阴性	11	7		
TNM分期			0.028	0.867
II	14	10		
III+IV	27	21		

*:为 t 值。

表2 两组围手术期血常规及肝肾功能情况

指 标	实验组(n=41)				对照组(n=31)				t^*	P值*
	术前	术后10d	术后20d	术后30d	术前	术后10d	术后20d	术后30d		
血常规										
WBC	6.8±2.1	8.2±2.2	6.8±2.4	5.9±1.8	6.2±1.4	9.1±3.1	6.7±1.6	5.8±1.6	0.117	0.908
RBC	4.3±0.5	4.1±0.5	4.5±0.7	4.5±0.5	4.5±0.7	4.1±0.6	3.9±0.7	4.1±0.8	0.512	0.281
PLT	254.0±108.1	250.2±76.6	272.0±98.76	236.9±70.6	223.5±61.2	211.6±93.8	212.1±78.7	209.1±77.5	1.290	0.207
HGB	127.1±25.2	117.2±18.1	124.8±15.4	125.7±15.7	135.9±24.0	120.0±20.4	125.7±18.6	120.8±15.2	1.210	0.234
肝肾功能										
ALT	16.1±8.6	21.3±15.1	19.6±10.9	17.9±8.6	26.5±20.5	21.2±14.2	21.6±10.4	22.5±15.6	1.172	0.254
AST	17.6±5.7	18.4±6.4	19.5±6.9	19.9±6.9	22.2±9.5	20.2±9.6	20.4±7.4	22.8±12.3	0.278	0.783
BUN	4.9±1.6	5.7±1.9	4.9±1.7	4.9±1.5	5.7±1.8	5.4±2.4	5.9±1.8	4.8±1.9	0.046	0.964
CRE	68.1±13.7	56.5±14.3	61.7±12.3	63.2±11.9	71.7±17.9	58.2±15.2	61.8±12.8	65.3±11.9	0.153	0.879

*:为两组术后30d相应指标比较统计分析值。

表 3 实验组与对照组外周血外周血 B 细胞(CD19)计数水平

组 别	术前	术后 10d	术后 20d	术后 30d
实验组	10.84±4.04	10.11±5.79	9.11±3.52	10.98±5.93
对照组	11.01±3.38	11.62±7.82	11.28±7.90	8.53±3.54

表 4 实验组与对照组外周血免疫球蛋白水平

项目	实验组(n=41)				对照组(n=31)			
	术前	术后 10d	术后 20d	术后 30d	术前	术后 10d	术后 20d	术后 30d
IgA	1.79±0.63	1.78±0.82	2.29±0.99	2.29±1.46	2.08±0.77	1.93±0.92	2.00±0.65	2.05±0.81
IgM	0.82±0.34	1.20±0.49	1.35±0.40	1.30±0.46	0.84±0.24	0.97±0.33	1.02±0.37	1.23±0.49
IgG	8.85±2.04	8.93±2.23	10.51±2.89	10.41±3.80	9.53±2.59	9.75±2.20	10.36±2.66	10.23±2.15

2.2 外周血 B 细胞(CD19)计数水平

实验组术后 10、20d CD19 水平与术前相比下降,至术后 30d 回升至术前水平,与术前相比无明显统计学差异 ($t=0.855, P=0.399$)。对照组术后 10d CD19 水平上升,但术后 20d 呈现下降,术后 30d 大幅度下降,与术前相比降低明显($t=2.25, P=0.038$)。实验组与对照组术后 30d CD19 水平相比较存在统计学差异($t=2.701, P=0.043$)。见表 3。

2.3 免疫球蛋白水平

实验组术后 10d 与术前相比 IgA 无明显降低($t=0.799, P=0.430$),术后 20d 较术前明显上升,至术后 30d 仍处于较高水平,较术前上升明显($t=2.341, P=0.025$)。对照组术后 10、20、30d IgA 水平较术前无明显变化($P>0.05$)。实验组与对照组间术后 30d IgA 比较有显著性差异($t=1.973, P=0.037$)。

实验组术后 10d IgM 水平较术前明显上升 ($t=2.079, P=0.011$),术后 20d 维持高水平,但术后 30d 呈下降趋势。对照组术后 10d 外周血 IgM 水平无明显升高($t=1.903, P=0.074$)。两组术后 10d IgM 水平存在统计学差异 ($t=2.393, P=0.021$),两组术后 30d IgM 水平差异无统计学意义($t=1.423, P=0.162$)。

实验组术后 10d 外周血 IgG 水平与术前相比无明显变化,术后 20、30d 显著上升,术后 30d 与术前相比具有显著性差异($t=2.399, P=0.022$)。对照组术后外周血 IgG 水平缓慢升高,术后 30d 与术前相比无显著性差异($t=1.997, P=0.062$)。两组术后 30d IgG 水平比较有显著性差异($t=2.068, P=0.044$),见表 4。

2.4 不良反应

实验组术后排气时间平均为 4.6 ± 1.2 d,对照组为 4.3 ± 1.3 d,差异无统计学意义。7 例患者术后第 1d 至第 3d 出现发热反应,均超过 38.5°C ,其中实验组 4 例,对照组 3 例。实验组发生血小板一过性下降 2

例,经相应对症处理术后 7~10d 血小板计数恢复正常。对照组出现 1 例术后粘连性梗阻,实验组无梗阻患者出现。两组各发生 1 例吻合口瘘,均经对症治疗痊愈。两组各发生 2 例伤口延迟愈合。无一例患者因不良反应而终止治疗。

3 讨 论

研究表明,癌细胞可以通过改变其

表面的特异性分子来逃避机体免疫系统的监视,同时自身也分泌一些免疫抑制因子,导致机体对肿瘤免疫排斥作用减弱,为术后残存肿瘤的复发转移提供了机会^[3]。因此,改善机体的免疫状态是减少术后复发转移提高肿瘤生存率的重要手段之一。

铜绿假单胞菌制剂(PA-MSHA)是我国自主研发的以普通绿脓杆菌为载体表达 MSHA 菌毛的灭活制剂,基础研究显示 PA-MSHA 可直接改变肿瘤细胞膜结构和功能,使肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移能力降低,从而启动凋亡程序,使肿瘤细胞凋亡^[4,5]。临床研究表明铜绿假单胞菌制剂能明显提高机体免疫应答水平,起到免疫监视、抑制和杀伤癌细胞的作用^[6]。

研究发现,使用 PA-MSHA 制剂组患者较对照组化疗耐受性好,肝肾功能影响较小^[7]。本研究显示,实验组肝肾功能各项指标波动均在正常值范围内,显示铜绿假单胞菌注射液对患者血象及肝肾功能影响较小,安全可行。

文献报道 PA-MSHA 皮下注射可导致注射局部皮肤的红、肿、热、痛以及硬结,其次是高热寒颤,发生率为 43.3%^[8],而本研究未出现类似的不良反应,表明腹腔给药具有一定优越性,可根据肿瘤部位,淋巴引流途径进行给药,具有高选择性区域治疗特点^[9]。本研究将药物注射入胶原蛋白海绵载质放置瘤床的方式,既可以避免药物在体腔内随意流动造成局部区域药物浓度减低,又可避免通过引流管随腹腔渗液流失,并可随胶原蛋白海绵的逐步降解缓慢释放,使效应时间延长;且置于瘤床使局部区域脱落或残存肿瘤细胞可直接持续受到高浓度药物的作用。

CD19 计数代表机体 B 淋巴细胞水平,而 B 细胞是分泌多种抗体完成体液免疫反应的浆细胞的前

体。本研究显示 PA-MSHA 可提高恢复由于手术打击造成免疫抑制导致的 B 淋巴细胞水平的下降。研究报道铜绿假单胞菌注射液使 T 细胞活化^[10],而 B 细胞增殖分化一方面有赖于 T 细胞,T 细胞也可产生大量 TGF- β 、IL-4 和 IL-10 来促进 B 细胞增殖、分化成分泌型 B 细胞^[11]。其中多种 Th2 样因子参与了诱导部位 B 细胞增殖、分化。另一方面腹腔还分布非 T 细胞依赖的 B-1 细胞,依赖活化的树突状细胞(DC)释放的增生诱导因子促进其增殖分化,而 PA-MSHA 可诱导 DC 成熟^[12],从而刺激 B 细胞生成。

既往研究抗肿瘤免疫主要是集中在细胞免疫起作用^[13],对体液免疫抗肿瘤功能少见报道。Falk 等^[14]报道,胃癌患者 B 细胞增殖及产生抗体能力减弱,说明肿瘤的存在不仅抑制机体细胞免疫功能,也抑制体液免疫功能。体液免疫系统主要由免疫球蛋白(IgA、IgG、IgM)和补体组成,而抗体和补体同样具有抗肿瘤作用,防止肿瘤的生长和转移:①与肿瘤细胞结合,通过经典途径激活补体,溶解肿瘤细胞;②介导 K 细胞、NK 细胞、巨噬细胞等细胞以 ADCC 方式杀伤肿瘤细胞;③抗体和补体通过调理粘附作用增强巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的作用。④调节肿瘤细胞膜表面结构,使肿瘤细胞粘附特性改变甚至丧失。

血 IgA 为单体,为分泌型 IgA(sIgA)组成部分,能够与组织抗原和蛋白抗原相结合。sIgA 由两个 IgA 单体构成,主要由黏膜相关淋巴样组织产生,进入黏膜行使重要的免疫调节作用,以保护肠道屏障的完整^[15],是机体黏膜免疫最重要的抗体^[16]。本研究中,实验组术后 20d 及 30d 血 IgA 水平较术前明显升高,且明显高于对照组,说明铜绿假单胞菌制剂对提高胃肠道黏膜局部免疫水平有明确意义。IgM 是初次体液免疫应答早期阶段产生的主要 Ig,可激活补体经典途径抗肿瘤效应。本研究中,实验组患者于术后 10d 即出现 IgM 升高,早于对照组,符合通过 PA-MSHA 调节 IgM 升高,并呈现出现较早、持续时间较短的特点。IgG 是再次体液免疫应答产生的主要 Ig,通过调理作用和 ADCC 效应杀伤肿瘤细胞。文献报道,PA-MSHA 菌毛株疫苗免疫后所产生的抗体经 SPA 吸收实验证实,其主要成分为 IgG^[17]。本研究中,实验组和对照组 IgG 升高均较晚(术后 20d),且持续存在,但实验组术后 IgG 水平均明显高于对照组,说明铜绿假单胞菌制剂能够升高手术患者机体 IgG 水平,以提高体液免疫应答水平。

综上所述,铜绿假单胞菌注射液腹腔给药安全可行,可增强机体的体液免疫调节作用。但仍值得注意的是,实验组术后增高的 Ig 各项指标,术后 30d

与 20d 相比,均已呈持平或下降趋势,提示 PA-MSHA 单次腹腔给药效果的持续性可能存在缺陷,也为我们进行序贯给药的最佳时机提供了相应临床依据。

参考文献:

- [1] 李涛,薛琼,周建玮.绿脓杆菌制剂抑制肝细胞肝癌生长转移的实验研究[J].中华肝胆外科杂志,2009,15(11):848-851.
- [2] 杨彦卓,齐大亮,张帆,等.铜绿假单胞菌注射液对非小细胞肺癌患者术后免疫功能的影响[J].中华肿瘤防治杂志,2010,17(6):464-466.
- [3] Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth [J]. *Oncogene*, 2008, 27 (45): 5904-5912.
- [4] Klumpp DJ, Ryecyk MT, Chen MC, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* induces extrinsic and intrinsic cascades to initiate urothelial apoptosis[J]. *Infect Immun*, 2006, 74(9): 5106-5113.
- [5] 凌伟,刘骅,曹晖,等.铜绿假单胞菌注射液对胃癌细胞体外杀伤作用的观察 [J]. 中华肿瘤防治杂志,2008,15 (18): 1381-1385.
- [6] 毛启新,张敏,郝晓莹,等.铜绿假单胞菌注射液联合新辅助化疗治疗乳腺癌的临床研究 [J]. 中国肿瘤临床,2010,37(2): 117-120.
- [7] 谢普耀,富丽,毛裕芳.绿脓杆菌 MSHA (甘露糖敏感血凝)菌毛株疫苗对白血病患者抗感染效应的初步观察[J].大连医学院学报,1994,16(3): 198-200.
- [8] 陈卫东,唐中华,徐峰. TAC 方案联合使用铜绿假单胞菌注射液在乳腺癌新辅助化疗中的应用[J]. 南方医科大学学报,2009,29(6): 1204-1207.
- [9] 刘奎杰,赵华,雷三林.铜绿假单胞菌注射液对胃肠道肿瘤患者围手术期 NK 细胞调节 [J]. 中南药学,2009,7 (5): 392-394.
- [10] 廖伟娇,朱彤,郑曲波,等.绿脓杆菌菌毛制剂对人 PBMC 表达 CD2、CD25、CD69 抗原的促进作用[J]. 广州医学院学报,2003,31(1): 46-48.
- [11] Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines[J]. *Nat Med*, 2005, 11(4 Suppl): s45-s53.
- [12] Srivastava S, Lundqvist A, Childs RW. Natural killer cell immunotherapy for cancer: a new hope [J]. *Cytotherapy*, 2008, 10(8): 775-783.
- [13] Labarriere N, Bretaudeau L, Gervois N, et al. Apoptotic body-loaded dendritic cells efficiently cross-prime cytotoxic T lymphocytes specific for NA17-A antigen but not for Melan-A/MART-1 antigen [J]. *Int J Cancer*, 2002, 101(3): 280-286.
- [14] Falk S, Seipelt G, Muller H, et al. Immunohistochemical assessment of splenic lymphocyte and macrophage subpopulations in patients with gastric cancer [J]. *Cancer*, 1989, 64(8): 1646-1651.
- [15] Rey J, Garin N, Spertini F, et al. Targeting of secretory IgA to Peyer's patch dendritic and T cells after transport by intestinal M cells[J]. *J Immunol*, 2004, 172(5): 3026-3033.
- [16] Woof JM, Kerr MA. The function of immunoglobulin A in immunity[J]. *J Pathol*, 2006, 208(2): 270-282.
- [17] 孙文平,付红文,刘妮.铜绿假单胞菌注射液对三种癌症患者免疫疗效的临床观察[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2000,20(4): 373-376.