

rhu-TNF 腔内治疗恶性胸腔积液的疗效与可能机制探讨

朱梅, 吕皎, 李艳芳, 李倩, 姜海英

(徐州市肿瘤医院, 江苏 徐州 221005)

摘要: [目的] 研究注射用重组人改构肿瘤坏死因子(rhu-TNF)腔内注射治疗恶性胸腔积液的疗效并探讨其可能机制。[方法] 将 60 例恶性胸腔积液患者随机分为对照组(29 例)和观察组(31 例), 对照组给予顺铂(DDP)治疗, 观察组在对照组基础上给予 rhu-TNF。收集并对比治疗前后各组胸水的 *Bcl-2* mRNA 和 *Bax* mRNA 表达, 以及治疗后的疗效(RR)、临床获益反应(CBR)、不良反应、疾病进展时间(TTP)。[结果] 治疗前, 两组 *Bcl-2* mRNA 和 *Bax* mRNA 的表达无显著差异($P>0.05$), 治疗后, 两组 *Bcl-2* mRNA 均降低($P<0.05$), *Bax* mRNA 的表达增高($P<0.05$); 与对照组比, 观察组的 *Bcl-2* mRNA 明显降低($P<0.05$), *Bax* mRNA 的表达明显增高($P<0.05$)。对照组 RR、CBR 分别为 41.38% 和 48.28%, 观察组 RR、CBR 分别为 70.97% 和 77.41%, 两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。随访 3~12 个月, 对照组 TTP 为 5.1 个月, 观察组 TTP 为 7.1 个月, 差异有统计学意义($P<0.05$)。两组不良反应无显著差异。[结论] rhu-TNF 治疗恶性胸腔积液的机理之一在于降低胸腔脱落细胞 *Bcl-2* 表达, 升高 *Bax* 表达, 促进肿瘤细胞凋亡, 且无明显的不良反应。

关键词: 恶性胸腔积液; 注射用重组人改构肿瘤坏死因子; *Bcl-2*; *Bax*

中图分类号: R73 文献标识码: A 文章编号: 1671-170X(2016)08-0658-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.08.B010

Efficacy of Malignant Pleural Effusion Treated by Intrapleural Perfusion with Recombinant Human Mutant Tumor Necrosis Factor and Its Possible Mechanism

ZHU Mei, LV Jiao, LI Yan-fang, et al.

(Xuzhou Tumor Hospital, Xuzhou 221005, China)

Abstract: [Objective] To explore the clinical effect and the possible mechanism of recombinant human mutant tumor necrosis factor (rhu-TNF) in the treatment of malignant pleural effusion. [Methods] 60 cases with malignant pleural effusion were randomly divided into 2 groups, 29 cases in control group who accepted cisplatin (DDP) and 31 cases in observation group who accepted DDP combined with rhu-TNF. *Bcl-2* mRNA and *Bax* mRNA were detected before and after treatment. The effective rate, responding time and adverse reaction were observed in 2 groups after treatment. [Results] Before treatment, *Bcl-2* mRNA and *Bax* mRNA expression had no significant difference in 2 groups. After treatment, expression of *Bcl-2* mRNA decreased, expression of *Bax* mRNA increased in 2 groups. Compared with the control group, expression of *Bcl-2* mRNA decreased, expression of *Bax* mRNA increased in the observation group significantly ($P<0.05$). The RR and CBR were 41.38% and 48.28% in control group, while 70.97% and 77.41% in observation group, respectively. TTP were 5.1 and 7.1 months in the control group and the observation group, respectively. Compared with the control group, the RR, CBR and TTP increased in the observation group significantly ($P<0.05$). [Conclusion] The rhu-TNF is a valid option for the treatment of malignant pleural effusion by decreasing *Bcl-2* expression and increasing *Bax* expression, with a good tolerability.

Subject words: malignant pleural effusion; rhu-TNF; *Bcl-2*; *Bax*

恶性胸腔积液(malignant pleural effusion, MPE)是多种晚期恶性肿瘤患者疾病复发或进展的临床表

现, 表现为胸闷、气急、呼吸困难和心肺功能衰竭等相关急症, 预后很差, 严重影响患者生活质量, 是临床医师迫切需要解决的难题之一。近年研究表明, 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)可特异地杀伤肿瘤细胞, 但存在严重的不良反应而限制了临床

基金项目: 国家十二五科技支撑计划资助项目(2013BAI06B04H008)
通讯作者: 姜海英, 主任医师, 学士; 徐州市肿瘤医院肿瘤科, 江苏省徐州市鼓楼区环城路 131 号(221005); E-mail: jianhaiyinghu@sina.com

收稿日期: 2016-02-23; 修回日期: 2016-04-19

应用。rhu-TNF (recombinant human mutant Tumor necrosis factor)是重组人改构肿瘤坏死因子,经蛋白质工程技术改造获得,与自然存在的 TNF 相比,rhu-TNF 具有活性高、毒性低和溶解肿瘤细胞活性强等优点^[1]。基于上述研究,前期研究发现 rhu-TNF 胸腔内注入治疗恶性胸腔积液,可明显控制胸腔积液生长速度,提高患者的生活质量并延长疾病进展时间,但 rhu-TNF 的治疗可能机理尚不清晰。体外试验显示 rhu-TNF 可影响胃癌细胞 BGC-823 的 B 细胞淋巴瘤白血病 2 基因 (B-cell lymphoma-leukemia-2 gene, *Bcl-2*)与 *Bax* 表达^[2]。*Bcl-2* 与 *Bax* 是肿瘤发生发展相关的重要蛋白,那么 rhu-TNF 对于恶性胸腔积液中肿瘤细胞表达 *Bcl-2* 与 *Bax* 是否也有影响,若有影响,该影响对于探讨 rhu-TNF 的可能作用机理是否具有提示效应?本课题旨在回答上述疑问,现将我院相关科室 2013 年 1 月至 2015 年 1 月采用 rhu-TNF 治疗 60 例恶性胸腔积液患者的资料总结如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

经院内伦理委员会同意,收集恶性胸腔积液患者 60 例,其中男性 29 例,女性 31 例,年龄 36~78 岁,平均 54.5 岁。其中肺癌 33 例,乳腺癌 27 例。所有病例均为病理组织学或细胞学确诊的恶性胸腔积液,KPS 评分>60 分,心脏、肝脏、肾脏常规检查正常。无食物药物过敏史,估计生存期>3 个月,其胸腔积液量均经 B 超确证,均为中等量以上。近 1 个月内未接受过化疗,拒绝全身化疗。根据入院顺序将所有患者随机分为对照组(29 例)和观察组(31 例)。对照组中,男性 12 例,女性 17 例,年龄≤55 岁 16 例,>55 岁 13 例,乳腺癌 12 例,肺癌 17 例;观察组中,男性 17 例,女性 14 例,年龄≤55 岁 16 例,>55 岁 15 例,乳腺癌 15 例,肺癌 16 例,两组一般情况有可比性($P>0.05$)。

1.2 治疗药物

注射用重组人改构肿瘤坏死因子 (rhu-TNF),上海赛达生物药业有限公司生产,规格:50 万 U/支,批号:20130101;顺铂注射剂(DDP),江苏恒瑞医药股份

有限公司生产,规格:30mg/支,批号:20130302。

1.3 治疗方法

对照组给予 DDP 治疗,在 B 超定位下行胸腔穿刺,置入深静脉管保留引流,2~3d 内将胸水尽量引流干净,再将 DDP 60mg 用 0.9%氯化钠注射液 50ml 稀释后注入胸腔,并同时给予止吐、水化和利尿治疗,2 次/w,共 2w。观察组在对照组基础上给予 rhu-TNF 治疗,将 rhu-TNF 300 万 U 溶于 0.9%氯化钠注射液 20ml 中,经引流管将药液注入胸腔,封管留置,2 次/w,共 2w。治疗后 4w 复查 B 超评价疗效。

1.4 指标检测

1.4.1 RT-PCR 检测 *Bcl-2* mRNA 和 *Bax* mRNA

于治疗前及治疗后收集胸水 500ml,采用低渗氯化钠溶液去除红细胞,静置 30min,3000rpm 离心 10min,收集沉淀细胞,以逆转录—聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 *Bcl-2* mRNA 和 *Bax* mRNA 表达。采用一步法提取细胞总 RNA,采用 1.5%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法分别鉴定 RNA 完整、纯度和含量。吸取 2μg RNA 进行逆转录,20μl 反应体系:Oligo (dT)0.1μg、2mmol/L dNTPs 2.5μl、Rnasin 0.1μg 与 MMLV 200U;反应条件:42℃ 1h、95℃ 5min。PCR 反应参数:96℃预变性 4min,94℃变性 30s,58℃退火 30s,72℃延伸 30s,以上循环进行 30 次,末次 72℃延伸反应 5min,*GAPDH* 为内参照,RT-PCR 产物以目的基因与 *GAPDH* 的比值表示其 mRNA 水平(Table 1)。

Table 1 Primer sequences

Primer	Primer sequences	Length (bp)
<i>Bcl-2</i>	Upstream:5'-AGAGGGCTACGAGTGGGAT-3'	373
	Downstream:5'-TCAAAGAAGGCCA-CAATCCTCC-3'	
<i>Bax</i>	Upstream:5'-TTGCT-TCAGGGTTTCATCCAG-3'	353
	Downstream:5'-AAGTCCAATGTCCAGCCCAT-3'	
<i>GAPDH</i>	Upstream:5'-ACCACAGTCCATGCCAT-CAC-3'	452
	Downstream:5'-TCCACCACCCTGTTGCTG-3'	

1.4.2 胸水评估标准

患者治疗前均行胸腔积液彩超检查,记录积液最大深度。按照诊疗规范行胸腔穿刺,置管引流胸水,观察胸水颜色、混浊度、是否夹杂絮状物。治疗后 1 个月复查胸腔积液彩超,再次记录积液最大深度。参照 WHO 标准,完全缓解(complete response, CR):胸水完全消失,维持>1 个月;部分缓解(partial re-

sponse, PR): 胸水减少>50%, 维持>1 个月; 无变化(no change, NC): 胸水减少<50%, 无增加趋势; 恶化(progress disease, PD): 胸水增多; 以(CR+PR)计算有效率(response rate, RR)。

1.4.3 临床获益反应(clinical beneficial response, CBR)
对身体状况(KPS 法)、疼痛(VAS 法)及体重进行综合评估。其中疼痛强度减轻大于 50%或镇痛药量减少大于 50%, 至少持续 4w 为有效; 身体状况提高大于 20 分持续 4w 为有效; 非水钠滞留的体重增加大于 7%持续 4w 为有效。CBR 评估: 3 项指标中 1 项有效, 其他 2 项稳定为有效; 3 项均稳定为稳定; 只要 1 项无效则为无效。

1.4.4 不良反应观察

观察两种药物腔内注射的不良事件发生情况, 按照 NCCN 指南不良事件分级标准记录。

1.4.5 预后指标观察

疾病进展时间 (time to progression, TTP)。

1.5 统计学处理

使用 SPSS20.0 软件进行统计学处理, 率的比较采用 χ^2 检验, Kaplan-Meier 法绘制生存率曲线, 生存率分析采用

Log-rank 检验。P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组患者治疗前后胸腔积液的 Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 的表达

治疗前, 两个组别 Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 的表达无显著差异(P>0.05), 治疗后, 两个组别 Bcl-2 mRNA 降低 (P<0.05), Bax mRNA 的表达增高 (P<0.05), 与对照组比, 观察组的 Bcl-2 mRNA 明显降低 (P<0.05), Bax mRNA 的表达明显增高(P<0.05)(Table 2, Figure 1)。

Table 2 The expressions of Bcl-2 mRNA and Bax mRNA in pleural effusion of 2 groups before and after treatment

Groups	N	Before/after treatment	Bcl-2 mRNA	Bax mRNA
Control group	29	Before treatment	0.51±0.09	0.29±0.11
	29	After treatment	0.29±0.20	0.49±0.21
t			5.40	4.70
P			<0.000	<0.000
Observation group	31	Before treatment	0.51±0.11	0.28±0.12
	31	After treatment	0.20±0.09*	0.79±0.22*
t			12.14	11.33
P			<0.000	<0.000

Note: Compared with the control group, *P<0.05.

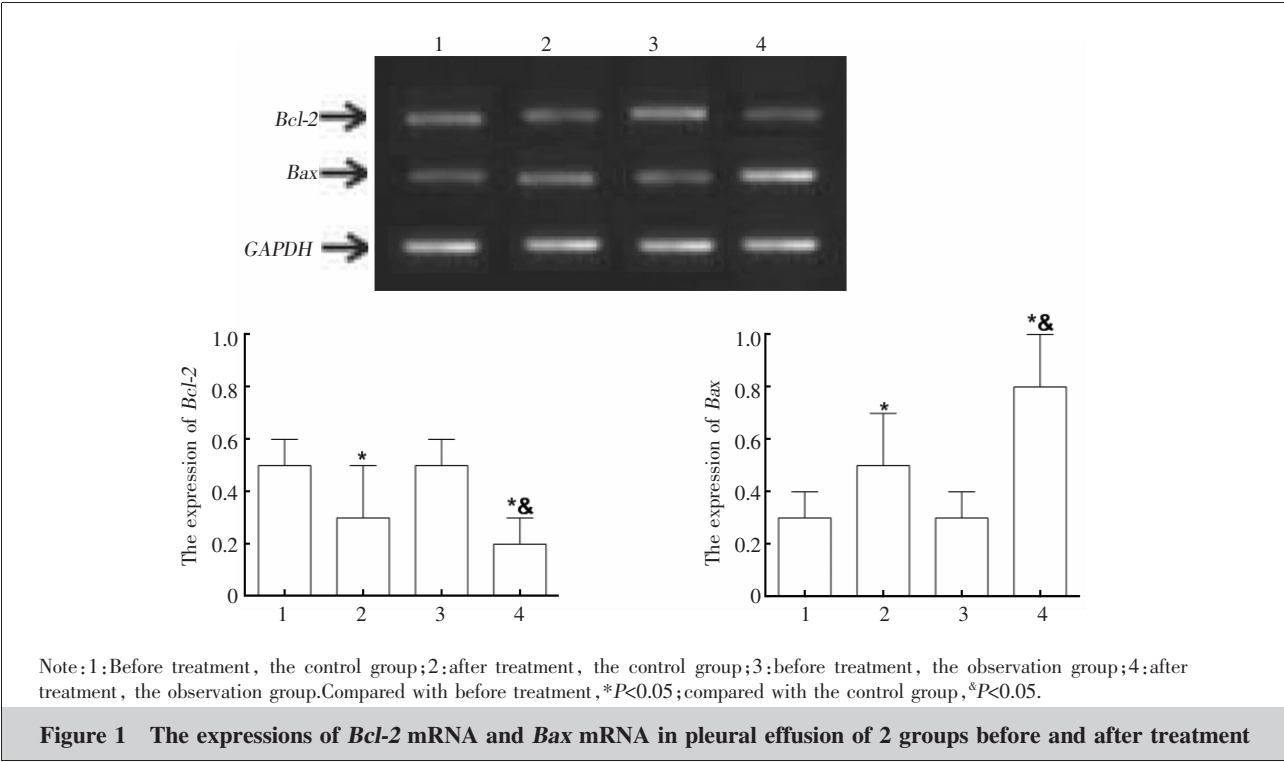


Figure 1 The expressions of Bcl-2 mRNA and Bax mRNA in pleural effusion of 2 groups before and after treatment

2.2 两组临床疗效评估

对照组 CR 3 例,PR 9 例,NC 6 例,PD 11 例,RR 12 例 (41.38%)。观察组 CR 7 例,PR 15 例,NC 5 例,PD 4 例,RR 22 例 (70.97%),与对照组比,观察组的 PD 例数较少,RR 例数较多(Table 3)。

2.3 两组临床获益反应评估

对照组 KPS 有效 10 例,疼痛改善有效 10 例,体重增加 4 例,CBR 为 48.28%(14/29),观察组 KPS 有效 18 例,疼痛减轻 50%以上 13 例,体重增加 7%以上 10 例,CBR 为 77.41%(24/31),与对照组比,观察组的 CBR 较高($P<0.05$)(Table 4)。

2.4 两组不良反应监测

对照组 5 例出现恶心、纳差,2 例出现呕吐,经止吐、支持治疗后症状改善,未见发热、寒颤、过敏等不良反应出现。观察组出现 2 例一过性 I~II 度发热,体温均 $<38.5^{\circ}\text{C}$,给予消炎痛栓纳肛后缓解,无寒颤、过敏反应、皮肤瘙痒、胸痛加剧,无心、肝、肾功能损害和血液系统不良反应,未出现胸腔感染、低血压等,两组发生的不良反应例数无显著差异。

2.5 两组 TTP 比较

两组均无脱落病例,随访时间约为 3~12 个月。对照组治疗后至胸水进展时间(TTP)为 5.1 个月,观察组为 7.1 个月,与对照组比,观察组的 TTP 时间较长($P=0.006$)(Figure 2)。

3 讨 论

恶性胸腔积液是晚期恶性肿瘤常见并发症,主要临床症状为呼吸困难、胸痛、咳嗽和营养不良等,确诊后的中位生存期约 4 个月^[3],严重影响恶性肿瘤患者生活质量与生存时间。在诸多恶性胸腔积液局部治疗方法中,留置胸腔引流管及胸腔内注药效果好,且操作简单。通过胸腔内注入化疗药物,如铂类、博来霉素、氟尿嘧啶、氮芥和阿霉素等,刺激胸膜产生化学性胸膜炎,引起胸膜粘连,具有直接杀灭肿瘤细胞的作用,但常伴随严重的消化道反应、发热、胸痛、骨髓抑制,致使患者的依从性较差^[4-6]。

近些年来,越来越多研究显示采用生物免疫制

Table 3 The clinical effects of 2 groups after treatment

Groups	CR	PR	SD	PD	RR(%)
Control group (n=29)	3	9	6	11	12(41.38)
Observation group (n=31)	7	15	5	4	22(70.97)
χ^2	1.62	1.88	0.21	5.01	5.34
P	0.13	0.08	0.24	0.02	0.01

Table 4 The CBR of 2 groups after treatment

Groups	Effective	Stable	Null	CBR(%)
Control group (n=29)	5	9	15	14(48.28)
Observation group (n=31)	12	12	7	24(77.41)
χ^2	3.40	0.39	5.48	5.48
P	0.06	0.19	0.01	0.01

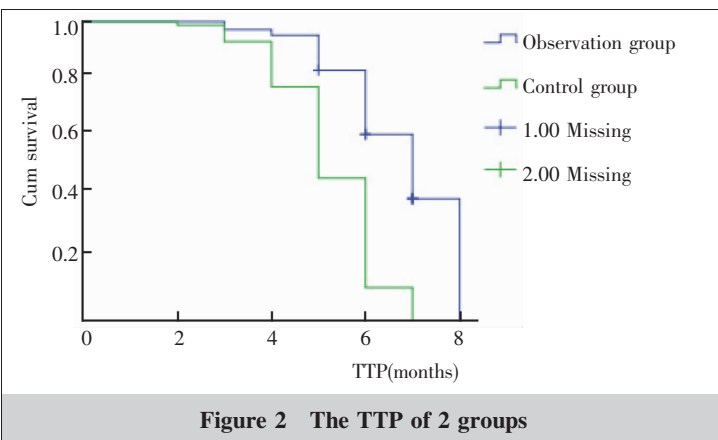


Figure 2 The TTP of 2 groups

剂腔内注射治疗恶性胸腔积液,借助生物免疫制剂诱导机体产生免疫效应细胞,发挥抗肿瘤作用,同时还可降低胸膜的化学性炎症粘连、闭塞胸膜腔和积液产生,减轻了患者不适症状,提高生活质量。rhu-TNF 是天然 TNF 经结构改造后得到的衍生物,与体内诱生的 TNF 具有相同的抗肿瘤作用,rhu-TNF 最显著的活性特征在于体内外均可杀伤肿瘤细胞,而对正常细胞无明显的毒性作用,即具备了高效与低毒的双重特点,是一个具有明显前景的理想抗肿瘤生物制剂,rhu-TNF 抗肿瘤作用机制较为复杂,但有三点是明确的:①直接细胞毒作用杀伤肿瘤细胞。作为炎性介质,rhu-TNF 可增强 NK 细胞及巨噬细胞的细胞毒作用,直接对肿瘤细胞起到杀伤和溶瘤作用^[7];②抗肿瘤血管生成。rhu-TNF 可作用于血管内皮细胞,改变血管内皮细胞反应性,使肿瘤血管变形受损或血栓形成,阻断肿瘤血供,促进肿瘤细胞坏死消退^[8];③诱导肿瘤细胞凋亡。rhu-TNF 可通过诱导肿瘤细胞凋亡来抑制细胞增殖^[9],临床研究已显示 rhu-TNF 对多种肿瘤如肺癌、结肠癌、乳腺癌、肝癌等具有很

好的抗癌效果,因此 rhu-TNF 又是一种广谱抗肿瘤生物制剂^[10-13]。

除了上述三种作用机制,本课题结果显示患者接受 rhu-TNF 治疗后胸腔脱落细胞 *Bcl-2* 表达降低, *Bax* 表达升高。*Bcl-2* 是由 *bcl-2* 基因编码的一组抗凋亡蛋白,其功能在于过抑制细胞色素 C 释放而抑制凋亡发生,参与主要细胞的凋亡、坏死与自噬过程,在肿瘤发生通路中起重要作用。*Bcl-2* 高表达提示机体对化疗药物的敏感性降低,耐受性增高。*Bax* 是目前研究较为深入的促凋亡蛋白,通过增强线粒体外膜通透性,诱导细胞色素 C 等促凋亡分子释放,活化 Caspase。凋亡抑制蛋白 *Bcl-2* 与具有促凋亡功能的 *Bax* 结合成为 *Bcl-2/Bax* 异二聚体,两者比例越高,细胞存活占主导,比例越低,细胞凋亡占主导,因此 *Bcl-2/Bax* 比例有助于判断肿瘤细胞接受信号后是否发生凋亡。肿瘤细胞的显著特点在于逃避凋亡^[11-14,15]。rhu-TNF 治疗后胸腔脱落细胞 *Bcl-2* 表达降低, *Bax* 表达升高,提示 rhu-TNF 可通过调控凋亡相关蛋白表达而促进肿瘤细胞凋亡,周艳艳等^[2]人进行的宫颈癌细胞 5-Fu 耐药株 Hela-Bal-2 (+) 结果也显示,给予 rhu-TNF 可显著抑制 *Bcl-2* 在线粒体凋亡途径的作用,促进宫颈癌细胞凋亡,这可能是 rhu-TNF 治疗恶性胸腔积液的机理,但具体机制尚待深入研究。

临床实践中我们对不同原发灶引起的恶性胸腔积液腔内注射 rhu-TNF,并对比临床常用胸腔灌注细胞毒药物 DDP,研究发现 rhu-TNF 具有显著的控制胸水的疗效优于给予 DDP 治疗,提示腔内注射 rhu-TNF 有利于改善局部治疗效果,患者临床获益反应及疾病进展时间上均有显著优势,未出现不可控制的不良反应,说明 rhu-TNF 在控制恶性胸腔积液症状同时,还可改善机体状况,提高患者生活质量,安全性较好。但是本项临床对照研究观察样本例数偏少,难以消除个体差异的干扰因素,尚需要扩大样本数进行前瞻性研究进一步证实。

综上所述, rhu-TNF 治疗恶性胸腔积液的机理之一在于降低胸腔脱落细胞 *Bcl-2* 表达,升高 *Bax* 表达,促进肿瘤细胞凋亡,且该治疗方法无明显的不良反应。

参考文献:

[1] Li Q, Sun W, Yuan D, et al. Efficacy and safety of recom-

binant human tumor necrosis factor application for the treatment of malignant pleural effusion caused by lung cancer[J]. Thorac Cancer, 2016, 7(1): 136-139.

[2] Zhou YY. The effect of recombinant mutant human tumor necrosis factor for injection on human gastric cancer and possible mechanism[D]. Zhongnan College, 2010. [周艳艳. 注射用重组改构人肿瘤坏死因子治疗人胃癌主要药效学及作用机制[D]. 中南大学, 2010.]

[3] Abusedera M, Alkady O. Ultrasound-guided pleural effusion drainage with a small catheter using the single-step trocar or modified seldinger technique [J]. J Bronchology Interv Pulmonol, 2016, 23(2): 138-145.

[4] Jiang L, Li P, Gong Z, Hu B, et al. Effective treatment for malignant pleural Effusion and ascites with combined therapy of bevacizumab and cisplatin [J]. Anticancer Res, 2016, 36(3): 1313-1318.

[5] Li H, Tang Z, Zhu H, et al. Proteomic study of benign and malignant pleural effusion [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2016. [Epub ahead of print]

[6] Zhang L, He M. A review of study of malignant pleural effusion [J]. Medical Review, 2013, 19(22): 4145-4148. [张磊, 何明. 恶性胸腔积液治疗的研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(22): 4145-4148.]

[7] Rasolzadeh S, Haji Fatahaliha M, Hosseini M, et al. Recombinant LPG3 stimulates IFN- γ and TNF- α secretion by human NK cells[J]. Iran J Parasitol, 2015, 10(4): 554-560.

[8] Hong H, Jiang L, Lin Y, et al. TNF- α promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis of gallbladder cancer through the ERK1/2/AP-1/VEGF-D pathway [J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 240.

[9] Basso FG, Pansani TN, Turroni AP, et al. Tumor necrosis factor- α and interleukins il-1 β , il-6, and il-8 impair in vitro migration and induce apoptosis of gingival fibroblasts and epithelial cells, delaying wound healing[J]. J Periodontol, 2016. [Epub ahead of print]

[10] Rosière R, Van Woensel M, Mathieu V, et al. Development and evaluation of well-tolerated and tumor-penetrating polymeric micelle-based dry powders for inhaled anti-cancer chemotherapy[J]. Int J Pharm, 2016, 501(1-2): 148-159.

[11] Szyberg L, Janiczek M, Popiel A, et al. Expression of COX-2, IL-1 β , TNF- α and IL-4 in epithelium of serrated adenoma, adenoma and hyperplastic polyp [J]. Arch Med Sci, 2016, 12(1): 172-178.

[12] Maemura K, Natsugoe S, Takao S. Molecular mechanism of cholangiocarcinoma carcinogenesis [J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2014, 21(10): 754-760.

[13] Zhu D, Chen C, Purwanti YI, et al. Induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells transduced with baculovirus encoding CD40 ligand for immunogene therapy in mouse models of breast cancer[J]. Hum Gene Ther, 2014, 25(8): 747-758.

[14] Li Q, Sun W, Yuan D, et al. Efficacy and safety of recombinant human tumor necrosis factor application for the treatment of malignant pleural effusion caused by lung cancer[J]. Thorac Cancer, 2016, 7(1): 136-139.

[15] Meichner K, Fogle JE, English L, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins *Bcl-2* and *Bax* in lymph node aspirates from dogs with lymphoma[J]. J Vet Intern Med, 2016. [Epub ahead of print]