

## 胸腔热灌注治疗对肺癌胸水患者 Th1/Th2 免疫反应状态的影响

康明强<sup>1</sup>, 曹颖平<sup>2</sup>, 邓帆<sup>1</sup>, 朱勇<sup>1</sup>, 王梅华<sup>2</sup>, 林若柏<sup>1</sup>

### Impact of Intrapleural Hyperthermic Perfusion on Immunologic Reaction State of Cytokines Th1/Th2 of Lung Carcinoma Patients with Malignant Pleural Effusion

KANG Ming-Qiang<sup>1</sup>, CAO Ying-Ping<sup>2</sup>, DENG Fan<sup>1</sup>, ZHU Yong<sup>1</sup>, WANG Mei-Hua<sup>2</sup>, LIN Ruo-Bai<sup>1</sup>

1. 福建医科大学附属协和医院  
胸外科,  
福建 福州 350001  
2. 福建医科大学附属协和医院  
检验科,  
福建 福州 350001

1. Department of Thoracic Surgery,  
The Affiliated Union Hospital,  
Fujian Medical University,  
Fuzhou, Fujian, 350001,  
P. R. China

2. Department of Laboratory,  
The Affiliated Union Hospital,  
Fujian Medical University,  
Fuzhou, Fujian, 350001,  
P. R. China

通讯作者:康明强

Correspondence to:KANG Ming-Qiang  
Tel:86-591-83357896-8414  
Fax:86-591-83302299  
E-mail:kangmingqiang@sina.com

基金项目:福建省自然科学基金  
项目(No. C0310025,  
No. C0510016)

Grant: Natural Science Foundation  
of Fujian Province  
(No. C0310025, No. C0510016)

收稿日期:2007-09-03  
修回日期:2007-11-05

[ABSTRACT] **BACKGROUND & OBJECTIVE:** Intrapleural hyperthermic perfusion is the distinctive therapy of malignant pleural effusion (MPE) caused by lung carcinoma. The expression pattern of T helper type 1 (Th1)/Th2 is an important index that reflects antitumor immunologic function. This study was to evaluate the therapeutic effect of intrapleural hyperthermic perfusion on MPE, and to investigate the impact of intrapleural hyperthermic perfusion on the immunologic reaction state of lung carcinoma patients with MPE by observing the expression pattern of cytokines Th1/Th2. **METHODS:** A total of 24 lung carcinoma patients with MPE underwent intrapleural hyperthermic perfusion with 43°C warmed normal saline for 60 min under video-assisted thoracoscopic surgery (VATS). The responses of pleural effusion, adverse events, life quality and survival time were observed. The concentrations of Th1/Th2-related cytokines interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), interleukin-2 (IL-2)/IL-4, and IL-10 in peripheral blood and pleural effusion were detected by ELISA, and their mRNA expression was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **RESULTS:** Neither operation-related death nor postoperative complication occurred. The total response rate of pleural effusion control was 100%, including 23 cases of complete remission (CR) and 1 case of partial remission (PR). No recurrence of MPE occurred. The quality of life of all patients had been improved. The median survival time was 18.3 months. The 1- and 2-year survival rates were 91.7% and 16.7%. The concentrations and positive rates of IL-2 and IFN- $\gamma$  were significantly lower and those of IL-4 and IL-10 were significantly higher in peripheral blood and pleural effusion before hyperthermia than in those after hyperthermia ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSIONS:** Intrapleural hyperthermic perfusion under VATS is a safe and effective treatment for MPE caused by lung carcinoma. It can convert the predominant state of Th2 cytokines in lung carcinoma patients with MPE to that of Th1 cytokines.

**KEYWORDS:** Lung neoplasm; Pleural effusion; Intrapleural hyperthermia; Cytokine Th1; Cytokine Th2; Immunity

【摘要】背景与目的:胸腔热灌注术是治疗肺癌胸水的独特方法,辅助性T细胞亚群(Th1/Th2)的平衡消长是反映机体抗肿瘤免疫功能的重要指标。本研究评价胸腔热灌注治疗肺癌胸水的临床综合疗效,同时观察胸腔热灌注治疗对肺癌胸水患者Th1/Th2免疫反应状态的影响。方法:在电视胸腔镜辅助下用43°C温盐水循环胸腔灌注60 min,治疗24例肺癌胸水患者,观察随访胸水控制效果、副作用和生存时间。收集热疗前后患者外周血和胸水,用酶联免疫吸附法(ELISA)检测Th1型

细胞因子白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2)、 $\gamma$ -干扰素 (interferon-gamma, IFN- $\gamma$ ) 和 Th2 型细胞因子白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 10 (IL-10) 的浓度,同时用 RT-PCR 方法检测这些细胞因子 mRNA 的表达。结果:无手术死亡,无明显并发症。全组胸水控制总有效率达 100%,完全缓解率为 95.8%(23/24),部分缓解率为 4.2%(1/24)。热疗后无胸水复发,生活质量有明显提高。全组中位生存期达 18.3 个月,1 年生存率 91.7%,2 年生存率 16.7%。与热疗前比较,热疗后肺癌胸水患者外周血或胸水中 Th1 型细胞因子浓度和 mRNA 阳性率均显著升高,而 Th2 型细胞因子则相反 ( $P < 0.05$ )。结论:电视胸腔镜辅助下胸腔热灌注术是一种安全、有效、微创的肺癌胸水治疗方法。胸腔热灌注治疗可促使肺癌胸水患者 Th2 免疫反应优势向 Th1 方向逆转。

关键词:肺肿瘤;胸腔积液;胸腔热疗;Th1 型细胞因子;Th2 型细胞因子;免疫效应

中图分类号:R734.2 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2008)02-0210-04

我科自 2003 年 6 月至 2005 年 3 月在电视胸腔镜辅助下,采用 43℃温盐水循环胸腔灌注法治疗 24 例肺癌胸水患者,取得满意疗效。迄今,局部胸腔热灌注对机体免疫功能的影响仍不明了。辅助性 T 细胞亚群(Th1/Th2)的平衡消长是反映机体抗肿瘤免疫功能的重要指标<sup>[1]</sup>。本研究用 ELISA 方法检测肺癌胸水患者热疗前后外周血和胸水中 Th1/Th2 型细胞因子的浓度,同时用 RT-PCR 方法检测这些细胞因子 mRNA 的表达,观察胸腔热灌注对肺癌胸水患者体内 Th1/Th2 免疫反应状态的影响。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

24 例经组织病理学证实的肺癌胸水患者,其中腺癌 20 例,鳞癌 4 例。年龄 35~71 岁,中位年龄 59 岁,男性 19 例,女性 5 例。热疗前(术前和术中)共抽排胸水总量 0.1~1 L 10 例,1~5 L 9 例,5~10 L 5 例。红色积液 19 例,黄色积液 5 例。

### 1.2 治疗方法

均采用全麻双腔气管插管,健侧卧位,分别取第 7 肋间和第 3 肋间腋中线胸壁 1.0 cm 小口,置入胸腔镜探查,吸尽胸腔积液,取 2~3 处的胸膜结节活检,送快速冰冻切片病理检查。病理检查明确为胸膜转移癌后,分别于上述两个切口处各安置一条直径 1~1.5 cm 的硅胶胸引流管,引流管与无菌的体外循环专用管道(直径 8 mm)连接成闭合环路,并与体外循环泵连接好,用 40℃温盐水预充管道,在体外循环泵的驱动下,将胸腔内灌注液引入

体外热交换器进行热交换,再将加温过的灌注液泵入胸腔,如此循环胸腔热灌注,每隔 10 min 改变转流方向一次,使胸内水温均匀一致。经皮胸腔内插入电子温度监测探头(误差 $\leq 0.5^{\circ}\text{C}$ ),实时监测胸内水温。调节体外循环泵流量,保持胸内水温为  $(43\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ ,时间 60 min。热疗毕吸净胸水,留置低位胸腔引流管 1 根。术中监测心率、血压、心电图、末梢血氧饱和度、血气分析,通过电子数字温度计连续监测鼻温和肛温。热灌注设备采用天津市医疗器械研究所生产的 XF4C 型人工心肺机和体外循环监视仪。

### 1.3 临床疗效观察

随访患者的主观症状、副作用、生活质量以及生存期,术后定期行胸部 B 超、X 线或 CT 检查,术后 4 周内每周 1 次、术后 1~6 个月内每月 1 次、术后 6 个月后每 3 个月 1 次检查胸水量,以了解胸水变化。胸水疗效评定标准:完全缓解(complete remission, CR)为胸水完全消失,持续 4 周以上;部分缓解(partial remission, PR)为胸水显著减少( $> 1/2$ ),持续 4 周以上;无效(no change, NC)为未达上述标准者。

### 1.4 实验检测指标和试剂

采集热疗前、热疗后第 3 天的外周血和胸水 2 mL,取其上清液备查。分别测定 IL-10、IL-4、IL-2、IFN- $\gamma$  的浓度及其 mRNA 的表达。细胞因子 IL-10、IL-4、IL-2、IFN- $\gamma$  标准品以及这些因子的检测试剂盒均购自 Genzyme 公司。提取 RNA 及 RNA 逆转录为 cDNA 的检测试剂盒由 Gibco 公司提供。PCR 引物由美国的 Dr.Dong 等提供。

### 1.5 实验检测方法与步骤

1.5.1 外周血和胸水中 Th1/Th2 相关细胞因子含量的检测 按 ELISA 试剂盒操作说明书进行,简要步骤如下:(1)包被:将鼠抗人 IL-2、IL-10 和 IFN- $\gamma$  单抗按 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,抗人 IL-4 按 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的浓度溶于 pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液中,每孔加 50  $\mu\text{L}$  至 96 孔板中,4℃过夜; PBS-T 洗涤,每孔加 100  $\mu\text{L}$  5%灭活的新生牛血清(FCS),37℃封闭 1 h。(2)加样:在各孔中分别加入 50  $\mu\text{L}$  稀释的标准品、血清,37℃孵育 60 min。(3)加二抗:IL-2、IL-10 和 IFN- $\gamma$  按 1:500 稀释,IL-4 按 1:400 稀释,每孔加入 50  $\mu\text{L}$ ,37℃孵育 60 min。(4)加入 HRP 标记的亲合素 50  $\mu\text{L}$ ,37℃孵育 15 min。(5)每孔加入底物 A、B 各 50  $\mu\text{L}$ ,37℃孵育 10 min 后加终止液 50  $\mu\text{L}$ 。在波长 450nm 处用空白孔调零,测每孔吸光度值。

(6)制作标准曲线,根据标准曲线求出每测定孔的细胞因子浓度。

1.5.2 外周血和胸水中单个核细胞各细胞因子 mRNA 的表达检测 按 Gibco 公司提供的 RNA 试剂盒提取总 RNA, -80℃ 保存, 按试剂说明书逆转录为 cDNA, 产物 -20℃ 保存, 之后进行 PCR 扩增。PCR 引物由美国的 Dr. Dong 等提供, PCR 50 μl 反应体系: 10×PCR Buffer 5 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3 μL, 10 mmol/L dNTPs 1 μL, 引物 7 pmol, 0.1 μg cDNA, 2U Taq 酶, 加水至 50 μL。94℃ 5 min, 而后进行 30 个循环: 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 68℃ 60 s。最后 PCR 产物上琼脂糖凝胶电泳。同时做 β-actin 的外标, 引物量为 10 pmol, 94℃ 60 s, 60℃ 60 s, 68℃ 60 s, 30 个循环。

IL-2 5' 端引物: -ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTT-458 bp, 3' 端引物: -GTTAGTGTGAGATGATGCTT TGAC-; IFN-γ 5' 端引物: -TCGTTTTGGGTTCTCTTGGC-477 bp, 3' 端引物: -GCAGGCAGGACAACCATT AC-; IL-4 5' 端引物: -CTGCAAATCGACACCTATTA-499 bp, 3' 端引物: -GATCGTCTTTAGCC TTTC-; IL-10 5' 端引物: -ATGCCCAAGCTGAGAACAAGACCCA-249 bp, 3' 端引物: -GTTTCGTATCTTCATTGTCAT-; β-actin 5' 端引物: -CGGGAAATCGTGCGTGACAT, 3' 端引物: -GAACCTTTGGGGGATGCTCGC。

### 1.6 统计处理

胸腔热疗前后 Th1/Th2 细胞因子浓度的差别

比较用配对设计的差值均数与总体均数比较的 *t* 检验。胸腔热疗前后 Th1/Th2 细胞因子 mRNA 阳性率的差别比较用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

### 2.1 临床疗效

随访截止时间为 2007 年 6 月 30 日, 随访率 100%。无手术死亡患者, 无明显并发症。全组胸水控制总有效率达 100%, CR 率为 95.8% (23/24), PR 率为 4.2% (1/24)。无胸水复发患者。全组患者热疗后生活质量均有明显提高, Karnofsky 行为评分均超过 80 分。全组中位生存期达 18.3 个月, 1 年生存率达 91.7% (22/24), 2 年生存率达 16.7% (4/24), 其中 4 例分别生存 25、27、30、37 个月。

### 2.2 胸腔热疗前后外周血和胸水中 Th1/Th2 相关细胞因子的浓度

肺癌胸水患者胸腔热疗后外周血或胸水中 Th1 型因子 IL-2、IFN-γ 的浓度明显升高 ( $P < 0.05$ ), 而 Th2 型因子 IL-4、IL-10 浓度较胸腔热疗前则明显降低 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

### 2.3 胸腔热疗前后外周血或胸水中 Th1/Th2 相关细胞因子 mRNA 的表达

肺癌胸水患者热疗后外周血或胸水中 Th2 型因子 IL-4、IL-10 mRNA 阳性率较热疗前显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而 Th1 型因子 IL-2、IFN-γ 则显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 1 24 例肺癌胸水患者热疗前后外周血和胸水中 Th1/Th2 相关细胞因子的浓度

Table 1 The concentration of Th1/Th2-related cytokines in the peripheral blood and pleural effusion from 24 lung cancer patients before and after hyperthermia

Material	Before hyperthermia (ng/L)				After hyperthermia (ng/L)			
	IL-2	IFN-γ	IL-4	IL-10	IL-2	IFN-γ	IL-4	IL-10
Peripheral blood	20±12	25±15	40±12	53±11	87±12 <sup>a</sup>	125±16 <sup>a</sup>	18±6 <sup>a</sup>	13±4 <sup>a</sup>
Pleural effusion	21±7	29±6	50±11	64±9	104±12 <sup>b</sup>	173±19 <sup>b</sup>	23±8 <sup>b</sup>	24±7 <sup>b</sup>

Th, T helper cytokine; IL, interleukin; IFN, interferon. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs. that before hyperthermia.

表 2 热疗前后外周血和胸水中各细胞因子 mRNA 表达情况

Table 2 The mRNA positive rates of Th1/Th2-related cytokines in peripheral blood and pleural effusion from 24 lung cancer patients before and after hyperthermia

Material	Before hyperthermia (%)				After hyperthermia (%)			
	IL-2	IFN-γ	IL-4	IL-10	IL-2	IFN-γ	IL-4	IL-10
Peripheral blood	8.33	12.50	37.50	41.67	75.00 <sup>a</sup>	87.50 <sup>a</sup>	20.83 <sup>a</sup>	16.67 <sup>a</sup>
Pleural effusion	8.33	4.17	45.83	50.00	87.50 <sup>b</sup>	91.67 <sup>b</sup>	25.00 <sup>b</sup>	12.50 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs. that before hyperthermia.

## 3 讨论

癌性胸水是进展期肺癌常见的并发症, 是局部

晚期肺癌的体现。癌性胸水的产生不仅会丢失大量的白蛋白和血细胞, 而且会导致呼吸困难等痛苦症状, 影响肺癌患者的生活质量和预后。肺癌胸

水临床治疗困难,我们创立的循环胸腔热灌注疗法为肺癌胸水治疗提供了一种独特的新手段<sup>[2,3]</sup>,目前已有 200 余例的癌性胸水患者完成治疗,临床疗效令人鼓舞。起初许多病例是剖胸后再施行热灌注的,本组研究均是在电视胸腔镜辅助下完成的,同样达到了缓解症状、减轻痛苦、提高生活质量、延长生命、改善预后的治疗目的,而且创伤更小、术后恢复更快。可见,电视胸腔镜辅助下胸腔热灌注术是一种安全、有效、微创的肺癌胸水治疗方法。

肿瘤的发生发展与机体的免疫功能有密切关系。机体的抗肿瘤免疫效应机制包括细胞免疫和体液免疫两个方面,其中细胞免疫是抗肿瘤免疫的主力。辅助性 T 细胞(Th 细胞)是机体重要的免疫调节细胞。人类 Th 细胞存在 Th1、Th2 两个不同的功能亚群,其中以分泌 IL-2、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  为主的称为 Th1,主导机体的细胞免疫功能,对抗肿瘤免疫反应十分重要;而 Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6 及 IL-10,主要介导体液免疫和过敏反应。Th1/Th2 的平衡消长是机体免疫反应调节的基本方式,机体内 Th1/Th2 两个亚群相互作用,相互制约,藉此维持着正常机体内 Th1/Th2 两个亚群细胞因子的动态平衡,当 Th1/Th2 细胞因子的平衡失调,即所谓的 Th1/Th2 漂移,会导致机体免疫调节功能的紊乱。研究表明,肺癌患者发生了 Th1/Th2 细胞因子的平衡失调,呈现 Th2 型细胞因子优势状态,发生 Th1 向 Th2 的异常漂移<sup>[4-6]</sup>,本组肺癌胸水患者也出现类似现象。Th2 型细胞因子优势状态将导致机体抗肿瘤免疫功能的减弱,将保护肿瘤逃逸免疫监视和免疫攻击,这可能是肺癌发生和无限发展的免疫机制之一。Th1 向 Th2 的漂移现象为肺癌的治疗提供新的思路,如果能纠正失衡的 Th1/Th2 细胞因子网络,逆转肺癌细胞或其宿主机体的 Th1/Th2 的异常漂移,将非常有利于以细胞免疫为主的抗肿瘤免疫能力的恢复。

肿瘤热疗主要有体腔热灌注、射频和微波等手段。体内外实验研究表明,43℃温热能诱导肺癌细胞凋亡,凋亡介导的癌细胞热杀伤作用是癌性胸水

热疗有效的重要机制<sup>[3,7]</sup>,但热疗与 Th1/Th2 相关肿瘤免疫关系的研究甚少。动物实验研究表明,射频治疗能增强荷 H22 肝癌小鼠脾淋巴细胞增殖活性,明显促进 Th1 型细胞因子 IL-2、IFN- $\gamma$  的表达<sup>[8]</sup>。本临床研究结果说明,局部胸腔热灌注治疗能促进肺癌胸水患者体内 Th1 型细胞因子 IL-2 和 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达和蛋白质分泌,抑制 Th2 型细胞因子 IL-4 和 IL-10 mRNA 的表达和蛋白质分泌。由此可见,胸腔热灌注治疗可促使肺癌胸水患者 Th2 免疫反应优势向 Th1 方向逆转,Th1/Th2 偏移的纠正及机体免疫功能的改善是局部胸腔热疗有效治疗肺癌胸水的重要治疗机制。局部胸腔热疗纠正 Th1/Th2 偏移的确切机制尚不清楚,可能原因有:一是 43℃温热能通过凋亡介导有效杀伤肺癌细胞,可减轻肿瘤对机体的免疫抑制;二是肿瘤细胞的凋亡产物会主动激活 Th1。

#### [参 考 文 献]

- [1] Ikeda H, Chamoto K, Tsuji T, et al. The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy [J]. *Cancer Sci*, 2004,95(9):697-703.
- [2] 康明强,周 嵩,陈志哲,等. 温热疗法治疗肺癌癌性胸水及其机制的临床研究 [J]. *福建医科大学学报*, 1999,33(4):389-391.
- [3] 康明强,周 嵩,林培裘,等. 循环胸腔热灌注治疗肺癌胸水及其机制探讨 [J]. *中华医学杂志*, 2001,81(19):1176-1179.
- [4] 曹颖平,康明强,张 旸,等. 肺癌患者的 Th1/Th2 免疫反应状态 [J]. *福建医科大学学报*, 2007,41(2):150-151.
- [5] Yamazaki K, Yano T, Kameyama T, et al. Clinical significance of serum TH1/TH2 cytokines in patients with pulmonary adenocarcinoma [J]. *Surgery*, 2002,131(1 Suppl):S236-S241.
- [6] Okamoto M, Hasegawa Y, Hara T, et al. T-helper type 1/T-helper type 2 balance in malignant pleural effusions compared to tuberculous pleural effusions [J]. *Chest*, 2005,128(6):4030-4035.
- [7] 康明强,周 嵩,陈志哲,等. 热诱导人肺腺癌细胞凋亡的实验研究 [J]. *中华医学杂志*, 1999,79(11):843-844.
- [8] 张俊平,潘宏铭,方 勇,等. 射频治疗对荷 H22 肝癌小鼠脾淋巴细胞免疫功能的影响 [J]. *癌症*, 2006,25(1):34-39.

[编辑:钟均行;校对:张 菊]