

• 实验研究 •

浅表膀胱癌灌注 BCG 细胞壁骨架后 尿 IL-2 和 TNF- α 的检测^①

戴宇平 梅 骅 欧阳颖敏

(中山医科大学附属第一医院泌尿外科; 广州, 510080)

摘要 目的: 为了解 BCG-CWS(细胞壁骨架)对膀胱局部免疫抗肿瘤机理而进行研究。**方法:** 通过酶联免疫吸附法(ELISA), 检测浅表膀胱癌患者 BCG-CWS 灌注后, 尿中细胞因子(IL-2 和 TNF- α)的变化情况。**结果:** IL-2 灌注前(36.9 \pm 15.9) ng/L, 灌注后(154.0 \pm 31.9) ng/L; TNF- α 灌注前(47.8 \pm 24.1) μ g/L, 灌注后(609.9 \pm 239.8) μ g/L。灌注前后比较有显著性差异($P < 0.001$)。**结论:** BCG-CWS 能激活巨噬细胞致敏淋巴细胞分泌细胞因子 IL-2 和 TNF- α , 发挥局部免疫抗肿瘤作用, 对防治浅表膀胱癌的复发起重要作用。

主题词 膀胱肿瘤; 细胞壁骨架/治疗应用; 白细胞介素 2/尿; 肿瘤坏死因子/尿

中图分类号 R 737.14; 378.911

DETECTION OF URINARY INTERLEUKIN-2 AND TUMOR NECROSIS FACTOR LEVELS IN PATIENTS WITH SUPERFICIAL BLADDER TUMORS AFTER INTERAVESICAL BCG-CWS IMMUNOTHERAPY

Dai Yuping Mei Hua Ouyang Yingmin

(Department of Urology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

Abstract Objective: To address the antitumor mechanism and to monitor the immunological response of patients following interavesical (BCG-CWS skeleton) treatment. **Methods:** The local secretion of IL-2 and TNF- α was examined in the urine of patients before and after intravesical instillation of BCG-CWS. By using an enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) technique to determine the levels of cytokines the difference between pre- and post-CWS mean urinary levels of IL-2 and TNF- α . **Results:** It showed that the levels of IL-2 and TNF- α increased significantly from (36.9 \pm 15.9) ng/L and (47.8 \pm 24.1) μ g/L to (154.0 \pm 31.9) ng/L and (609.9 \pm 239.8) μ g/L, respectively ($P < 0.001$). **Conclusions:** The BCG-CWS can induce T lymphocytes and activated macrophages to cytokines in response to a specific antigenic stimulation. Prophylactic intravesical treatment with BCG-CWS is an effective therapy method for recurrent superficial bladder carcinoma.

Subject headings bladder neoplasms; cell wall skeleton/therapeutic; interleukin 2/urine; tumor necrosis factor/urine

BCG-CWS(细胞壁骨架)是从 BCG 活菌中精制出来的生物反应调节剂, 具有明显的免疫学活性, 能激发机体的细胞免疫。作者研究了浅表膀胱癌患者, BCG-CWS 膀胱内灌注后尿中细胞因子(IL-2 和 TNF- α)的变化情况。通过细胞因子的检测, 进一步了解 BCG-CWS 抗肿瘤免疫学机理。

1 材料与方方法

1.1 临床资料

经病理证实的浅表膀胱癌患者 10 例(分期 Ta~T1, 分级 G1~G3)。男 8 例, 女 2 例, 平均年龄 57.5 岁。经

TURbt 或肿瘤切除加电灼术后, 第 10~14 天尿液变清, 用 5 mg BCG-CWS(BCG 菌株为丹麦 1 号, 由广东省生物制品研究所提供)加无菌生理盐水 50 mL, 经 F12 导尿管注入膀胱, 保留 2 h, 然后经尿道排出。每周 1 次, 连续 6 周为诱导治疗期。随后每月 1 次, 连续 2 年为维持治疗期。每 3 个月复查 1 次膀胱镜。

1.2 尿中细胞因子的测定

1.2.1 尿标本的收集与处理 患者自行排尿收集在洁净的玻璃容器内, 分别收集 BCG-CWS 第 6 次灌注前以及灌注后第 5 小时(预试验显示为最适时段)的尿液。标本立即置入 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存待用。标本解冻后离心(2 000 r/min,

5 min, 离心半径 15 cm), 除去上清细胞及碎片, 滤菌器过滤调节至 pH 7.2 左右。将标本置入 -20 °C 冷冻, 待测定尿中细胞因子。

1.2.2 尿中 IL-2 和 TNF- α 的测定 尿标本解冻后, 在室温下用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)测定尿 IL-2 和 TNF- α 的含量。IL-2 的测定使用 IL-2 酶联免疫检测药盒(由伊利康生物技术有限公司提供), TNF- α 的测定使用 TNF- α 酶联检测药盒(由北京邦定生物医学公司提供)。其操作按检测药盒规程进行。

1.2.3 统计学处理 采用治疗前后的配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 考虑为显著性意义。

2 结果

BCG-CWS 第 6 次灌注后尿中 IL-2 和 TNF- α 测定结果见表 1。BCG-CWS 灌注前与后尿中 IL-2 和 TNF- α 含量比较有明显升高。IL-2 从灌注前平均(36.9 \pm 15.9) ng/L ($\bar{x} \pm s$) 上升到灌注后平均为(154.0 \pm 31.9) ng/L ($\bar{x} \pm s$); TNF- α 灌注前平均(47.8 \pm 24.1) μ g/L ($\bar{x} \pm s$) 上升到灌注后平均(609.9 \pm 239.8) μ g/L ($\bar{x} \pm s$)。灌注前后 IL-2 和 TNF- α 含量比较有明显性差异(*t* 检验, $P < 0.001$)。BCG-CWS 灌注后尿 IL-2 和 TNF- α 含量, 在个体间存在着明显差别。IL-2 最高达 193.4 ng/L, 最低为 107.3 ng/L; TNF- α 最高达 895.2 μ g/L, 最低为 210.3 μ g/L。

表 1 灌注前后尿中 IL-2 和 TNF- α 的测定结果

Table 1 Urinary levels of IL-2 and TNF- α with interavesical CWS among patients

patients	IL-2 (ng/L)		TNF- α (μ g/L)	
	pre-cws	post-cws	pre-cws	post-cws
1	20.2	107.3	22.5	586.2
2	32.1	154.6	35.8	607.5
3	57.2	175.3	38.2	572.1
4	36.3	144.2	33.8	682.3
5	62.7	193.4	80.7	850.2
6	21.4	110.9	40.5	655.2
7	43.8	185.5	76.2	831.3
8	50.5	191.2	87.2	895.2
9	21.6	120.6	27.3	210.3
10	23.5	156.5	36.1	208.5
$\bar{x} \pm s$	36.9 \pm 15.9	154.0 \pm 31.9	47.8 \pm 24.1	609.9 \pm 239.8
<i>P</i>	<0.001		<0.001	

3 讨论

BCG 是治疗和预防浅表性膀胱癌复发的一种有效生物反应调节剂^[1,2], 许多研究成功地证实了它与免疫反应有

关^[3]。

3.1 BCG 依赖 T 细胞的作用机制

这一观点得到许多研究的支持^[4]。作为抗原提呈细胞的巨噬细胞一经激活, 就会引起一连串反应, 不仅其自身的细胞毒作用大大增强, 还可将 BCG 抗原提呈给对 BCG 敏感的 T 淋巴细胞, 增强其活性。巨噬细胞与致敏 T 淋巴细胞分泌许多单核因子和淋巴因子。现已发现许多细胞因子均与 BCG 抗肿瘤作用有关。经膀胱灌注 BCG 治疗浅表膀胱癌后, 尿液中 IL-1、IL-2、IL-2R、IL-6、TNF 和 IFN 等升高^[5,6]。IL-2 能促进 T 细胞的增殖和分化, 是 T 淋巴细胞分泌的一种淋巴因子, 具有活化并扩增淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK 细胞)的作用。LAK 细胞既不同于 NK 细胞, 又不同于细胞毒性 T 细胞, 具有很强的抗肿瘤作用。经研究发现, 病人尿中有无 IL-2 与 BCG 抗肿瘤作用相关。IL-2 滴度愈高, BCG 治疗效果愈好。TNF 是巨噬细胞分泌的一种蛋白质, 它对肿瘤细胞和肿瘤血管有直接细胞毒作用^[7]。

3.2 BCG-CWS 灌注后尿中细胞因子升高的意义

本研究用 BCG-CWS 灌注防治浅表膀胱癌复发, 检测尿中 IL-2 和 TNF- α 的水平。灌注后比灌注前的滴度有明显升高, 具有显著性差异($P < 0.001$)。说明 BCG-CWS 能有效地激活巨噬细胞和致敏淋巴细胞, 分泌细胞因子(IL-2 和 TNF- α)发挥其抗肿瘤作用^[8]。然而, 在个体之间灌注后存在着明显的差别。根据 BCG 灌注后尿中细胞因子分泌的动力学研究, 最大分泌量在第 6 次灌注后的第 2~8 小时之间^[9]。因此, 本研究检测尿中细胞因子定在第 6 次灌注 BCG-CWS 后的第 5 小时。测定 IL-2 和 TNF- α 的意义可能在于: ①阐明 BCG-CWS 膀胱内灌注后的免疫学机理。②尿中细胞因子水平升高, 可能有助于临床预后的判断, 或提示患者需要灌注的次数及维持治疗时间的长短。

3.3 有待深入研究的问题

根据 BCG-CWS 灌注前后 IL-2 和 TNF- α 的变化, 影响预测肿瘤复发的因素有: ①个体间灌注前后细胞因子水平存在着明显的差异②多种细胞因子及其受体间有着复杂的生物学关系。如果能找到细胞因子水平与患者的预后关系, 就能帮助我们临床医生决定 BCG-CWS 灌注的次数, 明确需要维持治疗时间的长短, 为判断预后提供一种新的方法。

参 考 文 献

- 1 De Boer E C, De Jong W H, Van der Meijden A P M, *et al*. Leukocytes in the urine after intravesical BCG treatment for superficial bladder cancer: a flow cytometric analysis. *Urol Res*, 1991, 1:45
- 2 De Boer E C, De Jong W H, Van der Meijden A P M, *et al*. Presence of activated lymphocytes in the urine of superficial bladder cancer patients after intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guerin. *Cancer Immunol Immunother*, 1991, 33:411

- 3 Bohle A, Gerdes A, Ulmer A J, *et al*. Effects of local BCG therapy in patients with bladder carcinoma on immunocompetent cells of the bladder wall. *J Urol*, 1990, 144:53
- 4 De Reijke T M, De Boer E C, Kurth K H, *et al*. Uring cytokines during intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer: processing, stability and prognostic value. *J Urol*, 1996, 155:477
- 5 Bohle A, Nowe CH, Ulmer A, *et al*. Elevations of cytokines interleukin-1, interleukin-2 and tumor necrosis factor in the urine of patients after intravesical bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *J Urol*, 1990, 144:59
- 6 De Jong W H, De Boer E C, Van Der Meijden A P M, *et al*. Presence of interleukin-2 in urine of superficial bladder cancer patients after intravesical treatment with bacillus Calmette-Guerin. *Cancer Immunol Immunother*, 1990, 31:182
- 7 Balbay D, Ozen H, Ozkardes H, *et al*. Detection of urinary interleukin-2, interleukin-2 receptor, and tumor necrosis factor levels in patients with superficial bladder tumors after interavesical BCG immunotherapy. *Urology*, 1994, 43:187
- 8 Prescott S, James K, Hargreave T B, *et al*. Radio-immunoassay detection of interferon gamma in urine after intravesical Evans BCG therapy. *J Urol*, 1990, 144:1248
- 9 De Boer E C, De Jong W H, Steerenteg P A, *et al*. Induction of urinary interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-6, and tumor necrosis factor during intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guerin in superficial bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 1992, 34:306

(1997-12-09 收稿 1998-04-28 修回)

·简 讯·

本刊目录和稿约业已通 INTERNET

《中山医科大学学报》现已以光纤直接接通 Internet 网。本刊的 1997 年第 1、2、3、4 期和增刊以及 1998 年第 1、2 期及增刊的所有中英文目录都可以在网上浏览而得到,上网途径是连入广州中山医科大学的主页后,选择“出版物”再选择“学术刊物(期刊中心出版的)”,或者选择“院系设置”后再选择“中心”,可见到“期刊中心”,选中后可以看到中山医科学期刊中心出版的所有学术刊物,包括本刊,选中本刊后则可以任意浏览本刊自 1997 年以来的各期目录。以后本刊的各期目录都将及时地加载入网上,请读者及时留意观看。

《中山医科大学学报》稿约亦已上网,作者投稿时可随时随地参看本部稿约。上网途径同上。

读者或作者上网后,可以依据网上提供的电子邮件地址(xuebao@gzsums.edu.cn)直接给本部发电子邮件。

注意,若中文字显示比较乱,则注意选择文件解码(Document Encoding)为简体中文(Simplified Chinese);若选择“院系设置”后的“中心”后只见表格不见文字则有可能是显示器的颜色设置太少,可以设为 256 色,再进入则可。

(本刊编辑部)