

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)05-0481-06

家兔膀胱黏膜下注射卡介菌多糖核酸的免疫效应

孙世平*, 张玉峰, 岳晓龙, 王海平(哈尔滨医科大学 第二临床医学院 泌尿外科, 哈尔滨 150081)

[摘 要] 目的: 探讨家兔膀胱黏膜下注射卡介菌多糖核酸(polysaccharide nucleic acid fraction of *Bacillus Calmette-Guerin*, BCG-PSN) 所致的免疫效应变化, 并寻求最合适注射的药物剂量。方法: 将实验家兔随机分成 5 组, 分别为 BCG-PSN 大、中、小(0.35、0.175、0.0875 mg/ml) 剂量膀胱黏膜下注射组, BCG(0.35 mg/ml) 膀胱黏膜下注射对照组和 BCG-PSN(0.35 mg/ml) 膀胱灌注对照组。分别在用药前和用药后 1 周、2 周、1 和 3 个月应用流式细胞术和酶联免疫吸附测定法(ELISA) 对家兔外周血中 T 淋巴细胞亚群(CD4⁺、CD8⁺) 和细胞因子(IL-2、TNF- α 、IFN- γ) 进行测定; 通过 H-E、Masson 染色对家兔膀胱壁组织进行病理检查。结果: (1) 注射 BCG-PSN 各组 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的数量随用药剂量增加而增加, 同时随时间延长逐步增加, 用药后 2 周达到高峰, 用药后 3 个月基本恢复至原水平; BCG 注射对照组变化趋势与之相同, BCG-PSN 灌注对照组的 CD4⁺ T 细胞数量明显低于大剂量 BCG-PSN 注射组($P < 0.05$), 各组的 CD4⁺/CD8⁺ 变化趋势相似。(2) 注射 BCG-PSN 各组的细胞因子(IL-2、TNF- α 、IFN- γ) 变化与 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的变化趋势相同, BCG-PSN 灌注对照组的细胞因子数量明显低于大、中剂量 BCG-PSN 注射组($P < 0.05$)。(3) 各用药组膀胱黏膜下均见大量淋巴细胞浸润, BCG 注射对照组家兔膀胱壁组织出现纤维化改变。结论: 膀胱黏膜下注射 BCG-PSN 所致的免疫效应与注射 BCG 相似, 优于 BCG-PSN 膀胱灌注, 且不引起膀胱壁纤维化; 以 0.35 mg/ml 注射效果最明显。

[关键词] 卡介菌多糖核酸; 膀胱黏膜下注射; T 淋巴细胞亚群; 细胞因子; 膀胱癌

[中图分类号] R392.5; R737.14

[文献标志码] A

Immune response after injecting polysaccharide nucleic acid of *Bacillus Calmette-Guerin* under mucous membrane of bladder in rabbits

SUN Shi-ping, ZHANG Yu-feng, YUE Xiao-long, WANG Hai-ping (Department of Urology, The Second Clinical College, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

[Abstract] Objective: To investigate the immune response after injecting polysaccharide nucleic acid of *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG-PSN) under the mucous membrane of bladder in rabbits and to search for the most suitable dose of BCG-PSN. **Methods:** The rabbits were randomly divided into 5 groups: high dose (0.35 mg/ml) BCG-PSN group, middle dose (0.175 mg/ml) BCG-PSN group, low dose (0.0875 mg/ml) BCG-PSN group, BCG (0.35 mg/ml) control group and BCG-PSN (0.35 mg/ml) intra-bladder perfusion control group. T lymphocyte subsets (CD4⁺, CD8⁺) in the peripheral blood were determined by flow cytometry before and 1 week, 2 weeks, 1 month and 3 months after the treatment; the levels of IL-2, TNF- α , and IFN- γ of peripheral blood were determined by enzyme-linked immunosorbent assay; H-E and Masson staining was used for the pathological examination of the bladder. **Results:** (1) BCG-PSN injection increased the number of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in a time- and dose-dependent manner, with the peak numbers appeared 2 weeks after BCG-PSN injection; the numbers restored to the normal levels 3 months after BCG-PSN injection. BCG control group had a similar changing pattern to the BCG-PSN injection group. The number of CD4⁺ T cells BCG-PSN perfusion group was significantly lower than that in the high-dose BCG-PSN injection group ($P < 0.05$). The changing tendencies of CD4⁺/CD8⁺ were similar in both groups. (2) The changes of IL-2, TNF- α , and IFN- γ levels in BCG-PSN injection groups were similar to those of CD4⁺ and CD8⁺ T cells; and the levels in BCG-PSN perfusion group were significantly lower than those of the high- and median-dose of BCG-PSN injection groups ($P < 0.05$). (3) T lymphocytes infiltration of mucous membrane under bladder was observed in all groups after the treatment. The BCG injection control group had

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金资助项目(No. D0207). Supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (No. D0207)

[作者简介] 孙世平(1953 -), 男, 黑龙江哈尔滨人, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 主要从事泌尿生殖系肿瘤的研究

* Corresponding author: E-mail: sunshipingdr@163.com

fibrosis of the bladder wall. **Conclusions:** The immune response of BCG-PSN injection under the mucous membrane of bladder can cause similar immune response to that of BCG; the response is superior to that of BCG-PSN perfusion; and BCG-PSN causes no bladder wall fibrosis. The optimal dose of BCG-PSN is 0.35 mg/ml.

[**Key words**] polysaccharide nucleic acid fraction of *Bacillus Calmette-Guerin*; submucous injection; T lymphocyte subsets; cell factors; bladder carcinoma

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(5): 481-486]

卡介苗(*Bacillus Calmette-Guerin*, BCG)是最早用于肿瘤治疗的生物制剂,尤其在浅表性膀胱癌的治疗与防止膀胱癌术后复发中有显著疗效^[1]。但BCG膀胱内灌注所致膀胱局部与全身并发症使其应用受到一定的限制^[2]。因此,国内外学者不断研究从BCG中提取有效的成分,使其既具有BCG所具有的免疫调节作用,又没有其所带来的不良反应。卡介菌多糖核酸(polysaccharide nucleic acid fraction of *Bacillus Calmette-Guerin*, BCG-PSN)是采用酚醇梯度法从卡介苗中提取的多糖和核酸,配以生理盐水制成的一种注射剂,临床上广泛用于病毒感染性疾病、自身免疫性疾病等的辅助治疗,证明其有很好的疗效^[3]。本课题采用流式细胞仪和酶联免疫吸附测定法(ELISA)对膀胱黏膜下注射BCG-PSN的家兔外周血中T淋巴细胞亚群(CD4⁺、CD8⁺)和细胞因子(IL-2、TNF- α 、IFN- γ)进行测定,并通过病理学检查观察膀胱壁组织病理变化,以研究膀胱黏膜下注射BCG-PSN所致的免疫效应,为BCG-PSN临床应用用于膀胱癌的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及其分组

50只健康家兔,雄性,体重(1.25 \pm 0.20)kg,由哈尔滨医科大学第二临床医学院实验动物中心提供,动物合格证书为SCXK(黑)2006-010。随机分成5组(每组10只),根据膀胱黏膜下注射BCG-PSN剂量的不同分3个实验组,A组:大剂量BCG-PSN组(0.35 mg/ml);B组:中剂量BCG-PSN组(0.175 mg/ml);C组:小剂量BCG-PSN组(0.0875 mg/ml);对照组2组,D组:BCG注射对照组,膀胱黏膜下注射BCG 0.35 mg/ml;E组:BCG-PSN灌注对照组,膀胱灌注BCG-PSN 0.35 mg/ml。

1.2 主要试剂

卡介菌多糖核酸(BCG-PSN,批号20040304,商品名为斯奇康)规格为0.35 mg/支,由湖南长沙九芝堂生物制药有限公司生产。卡介苗(BCG,批号20013057)规格为0.3 mg/支,由成都生物制品研究所生产。IL-2单抗、TNF- β 单抗、IFN- γ 单抗由Sero-

tec公司提供。FITC-CD4单抗、CD8单抗(一抗)、RPE-IgG(二抗)由BPB Biomedicals公司提供。流式细胞仪FACSsort型为Becton Dickinson公司产品。

1.3 经腹膀胱黏膜下注射药物方法

用2%戊巴比妥钠(30 mg/kg)行耳缘静脉麻醉,动物仰卧固定手术台,取下腹部正中切口,长约4 cm,显露膀胱,纵行切开膀胱前壁2 cm;将相应药物2 ml/只注入膀胱黏膜下,注射点为膀胱左右侧壁、底、前壁,每处注射2针,共计8针,使膀胱黏膜隆起呈水泡样,然后5-0羊肠线缝合膀胱切口,1号丝线缝合肌层、皮肤,术后连续给予庆大霉素腹腔注射,必要时予以营养支持。

1.4 膀胱灌注药物方法

用2%戊巴比妥钠(30 mg/kg)行耳缘静脉麻醉,动物仰卧固定手术台,经尿道插入F3硅胶管,膀胱内注入BCG-PSN 0.35 mg/ml,共2 ml,灌注后拔出硅胶管,用小血管夹夹住家兔阴茎2 h。

1.5 外周血CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞亚群及细胞因子IL-2、TNF- α 、IFN- γ 的测定

各组分别于术前、术后第1、2周及第1、3个月清晨采静脉血4 ml,其中1 ml加EDTA抗凝,当天采用FACSsort型流式细胞仪检测外周血中CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞百分比;其余3 ml静脉血不加抗凝剂,静置凝固后3 000 r/min离心20 min,取上清液保存于-20 $^{\circ}$ C冰箱内,术后第3个月用ELISA双抗体夹心法检测IL-2、TNF- α 、IFN- γ 的含量,具体步骤按试剂盒说明书操作。

1.6 实验兔膀胱壁组织病理学检查

各组分别于术前、术后第1、2周及第1、3个月行手术取部分膀胱壁组织,4%中性甲醛固定,常规石蜡包埋、切片,通过H-E染色观察膀胱黏膜下是否有淋巴细胞积聚增生,通过Masson染色观察膀胱黏膜有无纤维化。

1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS13.0统计软件,组间比较采用方差分析,组内比较采用 t 检验, $\alpha=0.05$ 作为差异有统计学意义的检验标准。

2 结果

2.1 膀胱黏膜下注射 BCG-PSN 对实验兔 T 淋巴细胞亚群的影响

结果见表 1、表 2。各组 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞数于用药后开始升高,在第 2 周达到高峰,以后逐渐下降;并且不同时间点随着 BCG-PSN 剂量的增加数值随之增加。与用药前相比,各组用药后第 2 周 CD4⁺ T 淋巴细胞数均明显增高($P < 0.05$);与用药前相比,大剂量 BCG-PSN 组和 BCG 注射对照组用

药后第 2 周 CD8⁺ T 淋巴细胞百分数明显增高($P < 0.05$)。与 BCG 注射对照组相比,各 BCG-PSN 组 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞百分数无显著差异($P > 0.05$);与 BCG-PSN 灌注对照组相比,大剂量 BCG-PSN 组 CD4⁺ T 淋巴细胞百分数有显著增加($P < 0.05$),CD8⁺ T 淋巴细胞百分数无显著差异($P > 0.05$)。由表 3 可见,各组 CD4⁺/CD8⁺ 比值于用药后开始升高,在用药后第 2 周达到高峰,以后逐渐下降。与 BCG 和 BCG-PSN 对照组相比,各 BCG-PSN 注射组无差异($P > 0.05$)。

表 1 BCG-PSN 膀胱黏膜下注射致家兔 CD4⁺ T 淋巴细胞的变化($n = 10, \bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 1 Variation of CD4⁺ T lymphocyte numbers in rabbits after injecting BCG-PSN under mucous membrane of bladder

Groups	Before treatment	After treatment			
		1 week	2 weeks	1 month	3 months
A [△]	28.10 ± 4.69	38.42 ± 6.38 [*]	44.85 ± 7.19 ^{**}	40.96 ± 6.99 [*]	29.43 ± 4.86
B	28.72 ± 4.96	32.17 ± 4.78	38.09 ± 5.41 [*]	33.94 ± 4.56	28.82 ± 4.35
C	27.64 ± 4.42	29.87 ± 4.50	34.44 ± 4.23 [*]	30.42 ± 4.53	28.53 ± 4.50
D	28.21 ± 4.60	33.43 ± 5.05	40.31 ± 5.42 ^{**}	35.36 ± 5.86	28.74 ± 4.42
E	27.82 ± 4.18	29.78 ± 4.52	33.85 ± 3.98 [*]	30.50 ± 5.14	28.48 ± 4.46

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs before treatment; [△] $P < 0.05$ vs E group

表 2 BCG-PSN 膀胱黏膜下注射致家兔 CD8⁺ T 淋巴细胞的变化($n = 10, \bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 2 Variation of CD8⁺ T lymphocyte numbers in rabbits after injecting BCG-PSN under mucous membrane of bladder

Groups	Before treatment	After treatment			
		1 week	2 weeks	1 month	3 months
A	13.23 ± 2.69	16.81 ± 3.24	19.26 ± 3.71 [*]	17.65 ± 3.12 [*]	13.42 ± 2.57
B	13.54 ± 3.13	14.72 ± 2.71	16.49 ± 3.29	15.00 ± 2.41	13.44 ± 2.40
C	13.14 ± 2.89	13.87 ± 2.15	15.63 ± 2.94	14.19 ± 2.76	13.44 ± 2.76
D	13.34 ± 2.60	15.32 ± 2.43	17.91 ± 3.26 [*]	16.32 ± 3.06	13.50 ± 2.28
E	13.24 ± 1.93	13.91 ± 2.08	14.79 ± 2.49	14.21 ± 2.50	13.47 ± 2.01

* $P < 0.05$ vs before treatment

表 3 BCG-PSN 膀胱黏膜下注射致家兔 CD4⁺/CD8⁺ 的变化($n = 10, \bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 3 Variation of CD4⁺/CD8⁺ in rabbits after injecting BCG-PSN under mucous membrane of bladder

Groups	Before treatment	After treatment			
		1 week	2 weeks	1 month	3 months
A	2.14 ± 0.11	2.30 ± 0.14	2.34 ± 0.19	2.32 ± 0.10 [*]	2.20 ± 0.13
B	2.15 ± 0.15	2.20 ± 0.14	2.33 ± 0.16	2.27 ± 0.08	2.15 ± 0.13
C	2.12 ± 0.16	2.15 ± 0.07	2.23 ± 0.19	2.16 ± 0.15	2.14 ± 0.17
D	2.13 ± 0.09	2.19 ± 0.12	2.27 ± 0.18	2.18 ± 0.17	2.13 ± 0.08
E	2.10 ± 0.06	2.14 ± 0.09	2.31 ± 0.14 [*]	2.16 ± 0.15	2.11 ± 0.06

* $P < 0.05$ vs before treatment

2.2 膀胱黏膜下注射 BCG-PSN 对细胞因子(IL-2、TNF- α 、IFN- γ)的影响

结果见表 4 ~ 6。各组细胞因子(IL-2、TNF- α 、IFN- γ)于用药后开始升高,在用药后第 2 周达到高峰,以后逐渐下降,并且,不同时间点随着 BCG-PSN 剂量的增加数值随之增加。与用药前相比,各组用

药后第 2 周细胞因子(IL-2、TNF- α 、IFN- γ)明显增高($P < 0.05$)。与 BCG 注射对照组相比,各 BCG-PSN 组细胞因子(IL-2、TNF- α 、IFN- γ)均无显著差异($P > 0.05$)。与 BCG-PSN 灌注对照组相比,大、中剂量 BCG-PSN 组细胞因子(IL-2、TNF- α 、IFN- γ)均有显著增加($P < 0.05$)。

表 4 BCG-PSN 膀胱黏膜下注射致家兔外周血 IFN- γ 的变化($n = 10, \bar{x} \pm s, \rho_B / \text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$)

Tab. 4 Variation of IFN- γ levels in rabbits after injecting BCG-PSN under mucous membrane of bladder

Groups	Before treatment	After treatment			
		1 week	2 weeks	1 month	3 months
A $^{\Delta}$	9.25 \pm 1.96	14.79 \pm 2.54**	18.90 \pm 3.75**	15.68 \pm 3.08**	10.27 \pm 1.77
B $^{\Delta}$	9.57 \pm 1.71	13.80 \pm 2.25*	15.65 \pm 3.13**	14.80 \pm 2.27**	10.06 \pm 1.85
C	9.54 \pm 2.14	11.93 \pm 2.39	13.49 \pm 2.49*	12.82 \pm 2.81	9.30 \pm 1.44
D	9.60 \pm 1.40	14.02 \pm 2.04**	16.68 \pm 2.44**	14.81 \pm 2.43**	9.49 \pm 1.69
E	9.80 \pm 1.06	11.08 \pm 1.49	12.63 \pm 1.69*	11.67 \pm 2.07	9.17 \pm 1.53

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs before treatment; $^{\Delta}P < 0.05$ vs E group

表 5 BCG-PSN 膀胱黏膜下注射致家兔外周血 IL-2 的变化($n = 10, \bar{x} \pm s, \rho_B / \text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$)

Tab. 5 Variation of IL-2 levels in rabbits after injecting BCG-PSN under mucous membrane of bladder

Groups	Before treatment	After treatment			
		1 week	2 weeks	1 month	3 months
A $^{\Delta}$	98.51 \pm 18.04	153.07 \pm 19.76**	191.36 \pm 41.15**	144.44 \pm 18.88**	104.76 \pm 23.02
B $^{\Delta}$	97.31 \pm 15.35	144.86 \pm 17.28**	175.17 \pm 23.49**	134.30 \pm 14.03**	101.80 \pm 14.23
C	98.76 \pm 18.69	129.71 \pm 14.40*	147.97 \pm 15.26**	124.87 \pm 12.78*	95.06 \pm 16.96
D $^{\Delta}$	100.25 \pm 18.52	142.12 \pm 12.59**	173.20 \pm 15.66**	133.39 \pm 11.87*	100.56 \pm 17.12
E	100.12 \pm 17.07	123.52 \pm 12.32*	140.80 \pm 18.24**	121.39 \pm 10.61	99.56 \pm 14.13

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs before treatment; $^{\Delta}P < 0.05$ vs E group

表 6 BCG-PSN 膀胱黏膜下注射致家兔外周血 TNF- β 的变化($n = 10, \bar{x} \pm s, \rho_B / \text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$)

Tab. 6 Variation of TNF- β levels in rabbits after injecting BCG-PSN under mucous membrane of bladder

Group	Before treatment	After treatment			
		1 week	2 weeks	1 month	3 months
A $^{\Delta}$	16.38 \pm 2.70	23.36 \pm 3.17**	29.60 \pm 3.04**	23.50 \pm 3.87*	15.81 \pm 1.75
B $^{\Delta}$	15.88 \pm 1.83	21.13 \pm 2.13**	26.18 \pm 2.77**	22.37 \pm 2.63**	15.11 \pm 1.81
C	15.43 \pm 1.92	19.52 \pm 2.95*	22.67 \pm 2.76**	19.86 \pm 2.67*	15.09 \pm 2.24
D	15.33 \pm 2.31	20.78 \pm 1.93**	25.81 \pm 2.53**	22.35 \pm 2.60**	16.08 \pm 2.31
E	15.39 \pm 2.23	17.67 \pm 1.74	21.90 \pm 2.29**	18.70 \pm 1.62*	16.00 \pm 2.27

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs before treatment; $^{\Delta}P < 0.05$ vs E group

2.3 膀胱黏膜下注射 BCG 和 BCG-PSN 致膀胱黏膜的病理改变

各组病理可见,于用药后第 1 周出现黏膜下水肿,血管扩张,血管周围有散在、小灶状淋巴细胞浸

润;于用药后第2周可见黏膜下水肿,血管扩张,黏膜下大量淋巴细胞聚集,在大剂量 BCG-PSN 组较其他组更明显(图 A~C)。在用药后第1个月黏膜下淋巴细胞较用药后第2周有所减少,在用药后第3

个月各组可见少量散在淋巴细胞;BCG 注射对照组用药后第3个月可见膀胱黏膜出现纤维样改变,BCG-PSN 黏膜下注射及膀胱灌注组均无纤维样改变(图 D~F)。

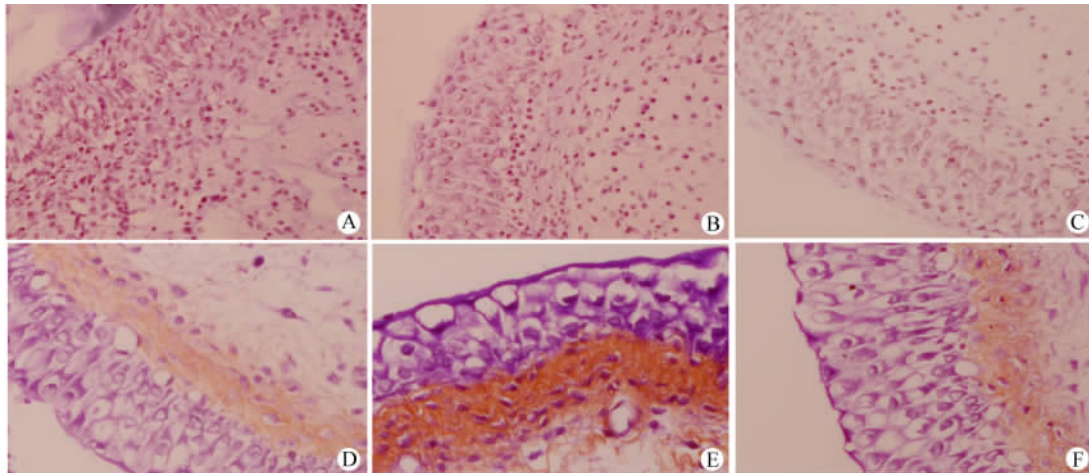


图1 膀胱黏膜下注射 BCG-PSN 后的病理变化(H-E, $\times 200$)

Fig.1 Pathologic changes after BCG-PSN injection under mucous membrane of bladder(H-E, $\times 200$)

A: Pathologic examination of A group 2 weeks after treatment; B: Pathologic examination of D group 2 weeks after treatment; C: Pathologic examination of E group 2 weeks after treatment; D: Pathologic examination of A group 3 months after treatment; E: Pathologic examination of D group 3 months after treatment; F: Pathologic examination of E group 3 months after treatment

3 讨论

机体维持正常免疫功能状态,有赖于各种免疫细胞(特别是各类 T 淋巴细胞亚群)之间的相互作用或相互制约,以产生适度的免疫应答,使之既能清除异物抗原,又不致损伤机体自身组织。这种免疫应答主要为细胞介导的免疫,其中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 系统起着重要作用^[4]。现代免疫学认为, $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 的数量和 $CD4^+$ / $CD8^+$ 比值测定是评估机体免疫调节平衡状态最有意义的参数之一^[5-6]。Zlotta 等^[7]分离提取卡介苗的细胞壁、质膜、多糖(葡聚糖、阿拉伯聚糖)等成分,并刺激结核菌素纯蛋白衍生物试验阳性健康人外周血单个核细胞,发现这几种成分均可以促进 $CD4^+$ T 细胞的增殖与活化。而卡介菌多糖核酸作为卡介苗的提取物,其主要成分正是多糖与核酸的混合物。Deng 等^[8]报道,腹腔注射 BCG-PSN 可以提高正常小鼠外周血中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞的比例,并可以维持两者间的平衡,使 $CD4^+$ / $CD8^+$ 值保持在正常水平。本实验膀胱黏膜下注射 BCG-PSN 所致的免疫效应结果表明,注射后不仅黏膜下出现淋巴细胞浸润,同时,外周血中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞增高,两者在用药后第2周

同步达到高峰,特别是外周血中 $CD4^+$ T 淋巴细胞增高明显(与用药前相比, $P < 0.05$),而 $CD4^+$ / $CD8^+$ 比值一直没有明显差异(与用药前相比, $P > 0.05$),说明外周血中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞数是成比例地发生变化,从而使免疫调节指数一直处于正常水平。

细胞因子由免疫细胞产生,在免疫调节中起着非常重要的作用。IL-2、TNF- β 、IFN- γ 等由激活的 T 淋巴细胞分泌,具有明显的免疫调节及抗肿瘤作用。IL-2 能激活淋巴细胞形成杀伤细胞(LAK 细胞),具有很强的溶瘤活性;它促进 T 细胞自身分化成长,转化为 CTL(杀伤性细胞毒细胞),同时还可以使 NK 细胞前体转化为 NK 细胞^[9];它还可以刺激 $M\phi$ 合成 mIL-2R,可诱导 $M\phi$ 分泌 TNF、IL-1、NO,增强其细胞毒作用,并能激活 $M\phi$,形成循环网络效应。TNF 能在细胞内产生自由基,肿瘤细胞无分泌 SOD(超氧歧化酶)能力,因而被 TNF 选择性杀伤;它可以损伤细胞骨架蛋白,干扰间隙连接形成,显示毒性效应;它还可以选择性地破坏肿瘤组织中血管,使之发生血栓后缺血性坏死^[10]。IFN- γ 可以非特异地增强 $M\phi$ 的杀伤功能,也可促进 IL-12 的合成和分泌,后者可以促进激活的 T 细胞和 NK 细胞

的增殖^[11],增强 TH 细胞、NK 细胞、LAK 细胞及 CTL 的生物学活性。本实验结果显示,膀胱黏膜下注射 BCG-PSN 后外周血中细胞因子(IL-2、TNF- α 、IFN- γ)有不同程度提高,变化趋势同 CD4⁺ T 淋巴细胞,并在用药第 2 周都达到高峰(与术前相比, $P < 0.05$)。这说明膀胱黏膜下注射 BCG-PSN 可使正常家兔外周血中 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞百分数和细胞因子(IL-2、TNF- α 、IFN- γ)同时增加,共同发挥免疫调节作用,从而可对膀胱癌起到免疫治疗作用。

膀胱黏膜下用药有不受尿液影响、药物可浸润整个膀胱壁、局部药物浓度高、药物用量小、毒性作用少的特点^[12-14]。目前,关于膀胱黏膜下注射 BCG-PSN 的研究国内外尚无相关报道。吴荣杨等^[15]经动物实验证明,膀胱黏膜下注药后,24 h 膀胱壁及膀胱周围组织水肿,药液分布于整个膀胱及膀胱周围组织。张卫星等^[16]报道,膀胱黏膜下注药时加入美蓝液进行观察,注完后即见药物自注射部位向周边扩散,说明药液注射后可通过黏膜下层疏松组织向整个膀胱黏膜下层弥散。1 周后复查膀胱镜,可见整个膀胱充血水肿,与单纯膀胱内药物灌注者有明显的区别。国内学者^[17-18]报道,膀胱黏膜下注射抗癌药较膀胱内灌注预防膀胱癌用药复发效果好。本实验结果显示,应用同等剂量 BCG-PSN 膀胱灌注,CD4⁺ T 淋巴细胞数和细胞因子(IL-2、TNF- α 、IFN- γ)的增加均低于黏膜下注射组($P < 0.05$),提示膀胱黏膜下注药的效果优于膀胱灌注方法。

BCG-PSN 作为 BCG 的提取物,保留了 BCG 的免疫调节作用,减轻了不良反应。本实验发现,大剂量 BCG-PSN 黏膜下注射组与 BCG 对照组相比,CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞数和细胞因子(IL-2、TNF- α 、IFN- γ)均无显著变化($P > 0.05$),但是 BCG 对照组用药第 3 个月可见膀胱黏膜出现纤维化改变,而 BCG-PSN 黏膜下注射及膀胱灌注组均无纤维化改变。提示 BCG-PSN 较 BCG 用药安全。

综上所述,膀胱黏膜下注射 BCG-PSN 所致的免疫效应与注射 BCG 相似,优于 BCG-PSN 膀胱灌注,且不引起膀胱壁纤维化,以 0.35 mg/ml 注射效果最明显,实验结果为 BCG-PSN 临床用于膀胱癌的治疗提供了实验依据。

【参考文献】

[1] 蒋翥翎,单保恩. 卡介苗治疗膀胱癌的免疫机制与研究进展[J]. 中国热带医学, 2005, 5(3): 640-642.

- [2] 李志,任明,刘禄成. 卡介苗(BCG)治疗膀胱移行细胞癌的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2004, 24(3): 278-280.
- [3] 邓云华,陈兴平,陈映玲,等. 卡介菌多糖核酸对生殖器疱疹病人血 CD4⁺ T 细胞细胞因子表达影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2005, 24(10): 805-808.
- [4] Guidotti LG, Rochford R, Chung J, et al. Vital clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection[J]. Science, 1999, 284(5415): 825-829.
- [5] McMichael AJ, Fabre JUS. Monoclonal antibodies in clinical medical[M]. London: Academic Press INC ltd, 1982: 230.
- [6] Syrjala H, Surcel HM, Ilonen J. Low CD4/CD8 T lymphocyte ratio in acute myocardial infarction[J]. Clin Exp Immunol, 1991, 83(2): 326-328.
- [7] Zlotta AR, Van Vooren JP, Denis O, et al. What are the immunologically active components of bacille Calmette-Guerin in therapy of superficial bladder cancer[J]. Int J Cancer, 2000, 87(6): 844-852.
- [8] Deng Y, Chen Y, Chen X, et al. A comparative study on the effect of BCG-PSN and thymopeptides on T-lymphocyte subsets of normal and immunosuppressed mice[J]. Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2003, 23(4): 339-343, 347.
- [9] 龙惠民,李仲宜,杨燮樵,等. 检测白细胞介素预测卡介苗灌注预防膀胱癌术后复发的疗效[J]. 临床泌尿外科杂志, 2002, 17(5): 211-213.
- [10] 范晓东. BCG 治疗膀胱肿瘤的分子免疫机制[J]. 国外医学: 泌尿外科分册, 2004, 24(6): 748-752.
- [11] Suttman H, Jacobsen M, Reiss K, et al. Mechanisms of bacillus calmette-guerin mediated natural killer cell activation[J]. J Urol, 2004, 172(4): 1490-1495.
- [12] 李海潮,魏秀举,周长霖. 膀胱癌术后黏膜下注射丝裂霉素预防膀胱癌术后复发[J]. 现代泌尿外科杂志, 1999, 4(1): 39-40.
- [13] 吴成章. 膀胱灌注、黏膜下定期注射丝裂霉素 C 预防膀胱癌术后复发疗效观察[J]. 青海医药杂志, 2003, 33(11): 8-9.
- [14] 马卫海,刘春雷,李金庆. 膀胱癌手术时行膀胱黏膜下药物注射及术后药物灌注的疗效观察[J]. 河北医学, 2004, 10(3): 237-239.
- [15] 吴荣杨,詹炳炎,王玲珑,等. 膀胱黏膜下注射抗癌药物的实验研究与临床观察[J]. 中华泌尿外科杂志, 1993, 14(2): 108-119.
- [16] 张卫星,陈尧康,何小祥. 黏膜下定期注射抗癌药预防膀胱癌复发远期疗效观察[J]. 临床泌尿外科杂志, 2001, 16(5): 228-229.
- [17] 何恒,严军. 膀胱黏膜下注射塞替派预防膀胱肿瘤复发[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2005, 19(1): 65.
- [18] 周文定,叶哲伟,李万峰. 膀胱黏膜下浸润注射盐酸氮芥预防膀胱癌复发(附 106 例报告)[J]. 中国肿瘤临床, 2004, 31(21): 1229-1231.

【收稿日期】 2007-06-25

【修回日期】 2007-08-16

【本文编辑】 王莹