

人参多糖注射液联合 DC 干预肺、
肠癌 Th1/Th2 研究

马俊杰^{1,2*},徐彬²,刘会平^{1,3}

(1. 南京中医药大学基础医学院,南京 210046; 2. 江苏省沭阳县中医院肿瘤科,江苏 宿迁 223600;
3. 南京医科大学附属明基医院胸腔外科,南京 210021)

〔摘要〕 目的:探索人参多糖注射液(GPS)联合树突状细胞(DC)对非小细胞肺癌(NSCLC)、大肠癌(CRC)异病同治的Th1/Th2 相关肿瘤免疫调节机制。方法:80 例 NSCLC,CRC 患者(各 40 例)按照不同疾病及治疗方法随机分 4 组:NSCLC 对照组(DC 治疗)、NSCLC 研究组(GPS 联合 DC 治疗)、CRC 对照组(DC 治疗)、CRC 研究组(GPS 联合 DC 治疗),每组各 20 例。4 组肿瘤患者干预前后分别检测血清 γ 干扰素(INF- γ)、白细胞介素 4(IL-4)、白细胞介素 2(IL-2)、白细胞介素 5(IL-5)。结果:4 组肿瘤患者治疗前后比较,Th1(INF- γ ,IL-2)及 Th1/Th2(INF- γ /IL-4,IL-2/IL-5)升高,Th2(IL-4,IL-5)降低($P<0.01$);4 组肿瘤患者治疗后比较,Th1(INF- γ ,IL-2)及 Th1/Th2(INF- γ /IL-4,IL-2/IL-5):NSCLC 研究组>NSCLC 对照组,CRC 研究组>CRC 对照组($P<0.05$);Th2(IL-4,IL-5):NSCLC 对照组>NSCLC 研究组,CRC 对照组>CRC 研究组($P<0.05$)。结论:GPS 联合 DC 对此两类肿瘤患者 Th1/Th2 皆具有不同程度调节作用,此为其异病同治作用机制之一;GPS 对 DC 免疫调节具有协同作用。

〔关键词〕 异病同治;非小细胞肺癌;大肠癌;1 型 T 细胞辅助细胞/2 型 T 细胞辅助细胞;人参多糖注射液;树突状细胞

〔中图分类号〕 R287.6 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2014)08-0203-04

〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfx.2014080203

Research on Ginseng Polysacchride Injection Add DC Treatment in
Th1/Th2 of NSCLC and CRC Patients Under Theory of
Treating Different Diseases with Same Method

MA Jun-jie^{1,2*}, XU Bin², LIU Hui-ping^{1,3}

(1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanjing 210046, China;
2. Jiangsu Shuyang Hospital of TCM, Suqian 223600, China;
3. Affiliated Benq Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210021, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To explore the mechanism of Ginseng Polysacchride injection (GPS) add dendritic cells (DC) effect on Th1/Th2 of non-small cell lung cancer (NSCLC) and colorectal cancer (CRC) patients. **Method:** Eight cases of NSCLC and CRC patients were divided into four groups randomly (NSCLC control group, NSCLC research group, CRC control group, CRC research group), 20 cases in each group. Using DC or GPS add DC treatment. Detect interferon- γ (INF- γ), interleukin-4 (IL-4), IL-2 and IL-5 in the four groups before and after treatment. **Result:** Before and after treatment, Th1 (INF- γ , IL-2) and Th1/Th2 (INF- γ /IL-4, IL-2/IL-5) were increased and Th2 (IL-4, IL-5) was decreased in four cancer groups ($P<0.01$). After treatment, Th1 (INF- γ , IL-2) and Th1/Th2 (INF- γ /IL-4, IL-2/IL-5) were showed: NSCLC research

〔收稿日期〕 20130606(007)
〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81273639);江苏省中医药局科技项目(LB13042)
〔通讯作者〕 * 马俊杰,博士,主治中医师,从事《伤寒论》理法方药及炎症免疫研究,Tel:15850531120,E-mail:majunjie_2@sina.com

group > NSCLC control group and CRC research group > CRC control group ($P < 0.05$); Th2 (IL-4, IL-5) was showed: NSCLC control group > NSCLC research group and CRC control group > CRC research group ($P < 0.05$). **Conclusion:** GPS add DC treatment has different degree of Th1/Th2 regulation in NSCLC and CRC patients, this is one of the mechanisms of treating different diseases with the same method; GPS have the assistant to DC in adjusting the immunity of cancer patients.

[**Key words**] different diseases with the same treatment; NSCLC; CRC; Th1/Th2; DC; Ginseng polysacchride injection

异病同治为中医经典治则学理论,其核心思想是不同疾病由于其病理机制相似故而治法亦相似,该理论不仅适用于中医中药的临床运用,对现代医学亦有重要指导意义,这就对异病同治所治疾病共同病理机制研究提出了必要性。鉴于此,本研究收集非小细胞肺癌(NSCLC),大肠癌(CRC)患者各 40 例,围绕 Th1/Th2 相关肿瘤免疫这一目前临床研究热点^[1],运用树突状细胞(DC)或人参多糖注射液(GPS)联合 DC 干预治疗,体现其异病同治的临床运用思路。

1 资料与方法

1.1 诊断标准 NSCLC 诊断参考 2004 年 WHO 肺及胸膜肿瘤组织学分类修订方案^[2],并根据国际抗癌联盟(UICC)及美国癌症联合会(AJCC)专家组提出的诊断标准^[3]对其进行分期和病理学分型;CRC 诊断参考 AJCC 发布的《AJCC 癌症分期手册》^[4],经肠镜病理学检查和术后病理确诊为结、直肠癌。中医诊断参照《中药新药临床研究指导原则》^[5]诊断为虚证。

1.2 纳入及排除标准 纳入标准:①符合 NSCLC 或 CRC 诊断标准,按肿瘤国际分期标准(TNM)分期

为ⅢA、ⅢB 期,病理分型为腺癌,形态分型为浸润型;②初次手术,曾先后行 3~6 个周期化疗,其中 NSCLC 为 NP,GP,EP 方案,CRC 为 FOLFOX 方案;③现化疗已停止;④年龄 30~70 岁;⑤体力状况(KPS)评分在 60 分以上,估计能存活 6 个月以上;⑥签署知情同意书。排除标准:①术后发生远处转移,并得到病理或影像学(CT, MRI, ECT, PET-CT 等)证实;②合并有心脑血管、肝、肾和造血系统等严重原发性疾病;③有先天性疾病或精神疾病患者;④妊娠、哺乳期妇女及过敏体质患者。

1.3 一般资料 收集 80 例 2010 年 1 月—2013 年 4 月就诊于南京医科大学附属明基医院及南京中医药大学教学沭阳县中医院肿瘤科的 NSCLC, CRC 患者各 40 例,根据不同疾病及治疗方法随机分为 4 组: NSCLC 对照组、NSCLC 研究组、CRC 对照组、CRC 研究组,每组各 20 例。所有病例均通过 3 名主任医师复查取得一致病理诊断;病理分型为腺癌,形态分型为浸润型。4 组间基线比较差异均无统计学意义,见表 1。研究过程已和患者、家属沟通并取得知情同意,同时由江苏省沭县中医院伦理委员会批准,符合伦理规范。

表 1 4 组患者临床基线比较(n=20)

组别	年龄 /岁($\bar{x} \pm s$)	性别/例		来源/例		TNM 分期/例		曾行化疗 周期数 ($\bar{x} \pm s$)/次	曾行化疗方案/例			
		男	女	明基 医院	沭县 中医院	Ⅲ A	Ⅲ B		NP	GP	EP	FOLFOX
NSCLC 对照	32~65(51.36±12.26)	12	8	9	11	16	4	4.1±1.41	12	6	2	—
NSCLC 研究	33~66(54.49±13.25)	11	9	8	12	14	6	3.95±1.36	11	6	3	—
CRC 对照	36~63(52.29±15.18)	9	11	7	13	15	5	3.9±1.25	—	—	—	20
CRC 研究	36~67(56.25±15.23)	13	7	9	11	16	4	3.97±1.28	—	—	—	20

注:4 组间基线比较 $P > 0.05$ 。

1.4 治疗方法 所有 NSCLC 或 CRC 病例均采用对症支持治疗,两类肿瘤病例各自对照组与研究组采用相应疗法方案组间无差异。在此治疗基础上, NSCLC 对照组、CRC 对照组为皮内注射 DC, NSCLC 研究组、CRC 研究组为皮内注射 DC 联合静脉滴

注 GPS。

1.4.1 DC 治疗

1.4.1.1 外周血 DC 的诱导与自体抗原负载 参照文献[6]的方法,采集患者抗凝全血 100 mL,收集贴壁 2 h 后 PBMNC 中的贴壁成分作为前体细胞,以

2 × 10⁶ 个/mL 密度加入含 GM-CSF 1 000 U · mL⁻¹, IL-4 1 000 U · mL⁻¹ 的 AIM-V, 5% CO₂, 37 ℃ 培养, 每 3 d 半量换液 1 次, 培养细胞至第 5 天, 加入肿瘤抗原液 0.5 mL 刺激, 同期采集患者自身肿瘤组织在第 5 天加入, 至第 7 天加入肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 20 μg · L⁻¹, 第 8 天收获的细胞为负载肿瘤抗原的 DCs 在此基础上对 DC 进行数量、存活率、无菌、革兰氏染色、内毒素、支原体、细胞纯度和均一性等质量检测以期为下一阶段治疗做准备。

1.4.1.2 DC 皮内注射 采用 DC 皮内注射的方式, 细胞数量为每次 0.06 × 10⁶ 个/kg, 以淋巴结富集区 (腋窝/腹股沟) 为主要注射部位, 7 d 1 次, 连续注射 4 次, 持续 28 d。

1.4.2 GPS 治疗 GPS 30 mg · d⁻¹ 静脉滴注 (人參多糖注射液 6 mg/支, 山西普德药业股份有限公司), 持续 28 d。

1.5 观察指标 患者治疗第 1 天及治疗后第 29 天的血清干扰素-γ (INF-γ), 白细胞介素-4 (IL-4), IL-2, IL-5 水平。所有病例均于清晨空腹采静脉血 3 mL, 采血过程中避免溶血, 待血块收缩后, 以 4 000

r · min⁻¹ 离心 10 min, 取血清置 -75 ℃ 冰箱保存, 采用双抗夹心 ELISA 法测定血清中 INF-γ, IL-4, IL-2, IL-5 含量。试剂盒购于北京四正柏生物科技有限公司 (批号 20120647), 按说明书操作并进行质量控制。Rainbow 型酶标仪 (瑞士帝肯公司) 由专人操作, 自动打印结果。

1.6 统计学方法 采用 SPSS for windows 16.0 软件分析, 计量资料采用 *t* 检验, 计数资料采用 χ² 检验; 两组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为有统计学意义, 多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

4 组肿瘤患者治疗前后比较, Th1 (INF-γ, IL-2) 及 Th1/Th2 (INF-γ/IL-4, IL-2/IL-5) 升高, Th2 (IL-4, IL-5) 降低 (*P* < 0.01); 4 组肿瘤患者治疗后比较, Th1 (INF-γ, IL-2) 及 Th1/Th2 (INF-γ/IL-4, IL-2/IL-5): NSCLC 研究组 > NSCLC 对照组, CRC 研究组 > CRC 对照组 (*P* < 0.05), Th2 (IL-4, IL-5): NSCLC 对照组 > NSCLC 研究组, CRC 对照组 > CRC 研究组 (*P* < 0.05), 见表 2。

表 2 4 组患者血清中 INF-γ, IL-4, INF-γ/IL-4, IL-2, IL-5, IL-2/IL-5 比较 (n = 20, $\bar{x} \pm s$)								ng · L ⁻¹
组别	时间	INF-γ	IL-4	INF-γ/IL-4	IL-2	IL-5	IL-2/IL-5	
NSCLC 对照	治疗前	34.13 ± 9.24	49.54 ± 9.26	0.69 ± 0.22	25.15 ± 6.14	62.58 ± 12.14	0.4 ± 0.15	
	治疗后	65.36 ± 10.21 ¹⁾	39.34 ± 9.12 ¹⁾	1.66 ± 0.72 ¹⁾	51.56 ± 9.48 ¹⁾	53.25 ± 12.37 ¹⁾	0.98 ± 0.38 ¹⁾	
NSCLC 研究	治疗前	32.46 ± 9.65	47.88 ± 9.67	0.68 ± 0.17	24.12 ± 6.98	61.34 ± 14.29	0.39 ± 0.17	
	治疗后	75.35 ± 12.86 ^{1,2)}	32.54 ± 8.32 ^{1,2)}	2.32 ± 0.99 ^{1,2)}	62.42 ± 17.97 ^{1,2)}	43.37 ± 11.32 ^{1,2)}	1.44 ± 0.62 ^{1,2)}	
CRC 对照	治疗前	32.36 ± 9.16	45.23 ± 9.08	0.73 ± 0.23	24.52 ± 6.13	58.46 ± 11.36	0.42 ± 0.18	
	治疗后	58.78 ± 9.47 ¹⁾	39.25 ± 9.12 ¹⁾	1.51 ± 0.55 ¹⁾	63.56 ± 9.27 ¹⁾	53.25 ± 12.37 ¹⁾	1.19 ± 0.52 ¹⁾	
CRC 研究	治疗前	34.14 ± 9.35	44.34 ± 8.12	0.77 ± 0.19	25.69 ± 6.26	57.57 ± 12.54	0.45 ± 0.18	
	治疗后	65.35 ± 14.21 ^{1,2)}	32.46 ± 9.24 ^{1,2)}	2.02 ± 0.77 ^{1,2)}	73.75 ± 14.36 ^{1,2)}	42.75 ± 12.81 ^{1,2)}	1.72 ± 0.74 ^{1,2)}	

注: 各组治疗前后比较¹⁾ *P* < 0.01; 与本肿瘤对照组治疗后比较²⁾ *P* < 0.05。

3 讨论

免疫失调是多种恶性肿瘤患者术后共同的病理特征之一, 现代研究表明肿瘤免疫与 Th1/Th2 关系密切^[1], Th1, Th2 为 CD4⁺ T 淋巴细胞的两亚型, 其分泌的相关细胞因子参与 NSCLC, CRC 等恶性肿瘤免疫反应的调节, 影响疾病病理过程, 其中 Th1 介导细胞免疫, 主要分泌 INF-γ, IL-2 等, 起抑制肿瘤细胞增殖的作用; 而 Th2 介导体液免疫, 主要分泌 IL-4, IL-5 等, 与 Th1 作用相反, 具有促进肿瘤细胞增殖作用^[7]。正常情况下, Th1/Th2 细胞处于相对平衡状态, 而肿瘤患者机体免疫功能发生异常, Th1/Th2 表达细胞因子的动态平衡随之改变, 主要表现为

Th1 功能低下, 而 Th2 功能亢进^[8]。Th1/Th2 漂移为多种恶性肿瘤共同的免疫病理环节, 此为对其异病同治提供了病理学依据。

DC 是迄今为止发现功能最有效的抗原提呈细胞 (antigen presenting cells, APC), 近年来已成为当今肿瘤生物治疗领域备受关注的热点之一^[9]。由于主要从患者自体外周血或经自体骨髓干细胞体外诱导获得, 故该疗法避免了放、化疗等肿瘤非特异性治疗手段所带来的机体损伤及耐药等严重毒副作用, 为术后残余或转移肿瘤细胞的清除, 防止肿瘤复发提供了一种全新、特异、有效的辅助治疗手段^[10-11]。除此之外, 该疗法亦能激发、增强各种肿

瘤患者特异性抗肿瘤免疫应答,对其机体免疫功能具有调节作用^[12]。前期研究表明,DC 对 NSCLC, CRC 患者 Th1/Th2 相关肿瘤免疫皆具有一定调节作用^[13-14],此为其异病同治抗肿瘤研究提供了线索。人参多糖为扶正中药人参中分离得到的多糖类抗肿瘤药物,对多种肿瘤患者皆具有免疫调节作用^[15-16],其能显著提高肿瘤患者 DC 等免疫细胞活性,调控多种抗肿瘤细胞因子的释放,如干扰素、白介素等,从而增强机体免疫监视的抗肿瘤效应^[17],此符合中医异病同治扶正祛邪治则学思想。

基于上述认识,本研究在前期 DC 研究基础上,选择 GPS 联合 DC 为全新免疫调节药物,并再次围绕 Th1/Th2 相关免疫机制展开研究,结果发现 4 组肿瘤患者治疗后 Th1, Th2, Th1/Th2 皆有不同程度变化,主要表现为 Th1 升高, Th2 下降, Th1/Th2 升高,其中两 GPS 联合 DC 研究组对机体免疫的调节作用优于两 DC 对照组,说明 GPS 与 DC 在调节肿瘤患者机体免疫方面具有协同作用,为此我们找到了 NSCLC, CRC-Th1/Th2-GPS 联合 DC-异病同治之间的全新逻辑关系,为该中西医结合疗法异病同治提供了最为直接的免疫学证据。

[参考文献]

[1] 孔琦,朱家胜,芮景. Th1/Th2 偏移与肿瘤免疫研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2010,18(8):1653.

[2] Travis W D, Brambilla E, Muller-Hermelink H K, et al. WHO classification of tumours. pathology and genetics of tumours of the lung,pleura,thymus and heart [M]. Lyon:IARC Press,2004:26.

[3] Stephen B,Carolyn C. The American Joint Committee on cancer; the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM[J]. Ann Surg Oncol, 2010,17(1):1471.

[4] FL 格林尼,DL 佩基,ID 弗莱明,等. AJCC 癌症分期手册[M]. 毛伟征,苏东明,李雪萍,等主译. 6 版. 沈阳:辽宁科学技术出版社,2005:115.

[5] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[S]. 北京:中国医药科技出版社,2002:216.

[6] 钟润波,韩宝惠,钟华. 树突状细胞抑制 I_B 期非小细胞肺癌术后复发和转移初探[J]. 中国癌症杂志, 2008,18(10):760.

[7] 陈海,毛建平. 肿瘤免疫逃逸与 T 淋巴细胞关系的研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2012,32(10):86.

[8] Chechlińska M, Duma A, Swierkowska K, et al. Sera of lung cancer patients affect the release of Th1, Th2 and monocyte-derived cytokines, and the expression of IL-2R alpha by normal, stimulated mononuclear cells[J]. Cell Mol Biol Lett,2004,9(1):69.

[9] Panoskaltsis N, Reid C C L, Knight S C. Immune modulation with dendritic cells [J]. Transfusion Medicine, 2004,14(1):81.

[10] Dillman R, Selvan S, Schiltz P, et al. Phase I/II trial of melanoma patient-specific vaccine of proliferating autologous tumor cells, dendritic cells, and GM-CSF: planned interim analysis [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2004, 19(5):658.

[11] Palucka A K, Dhodapkar M V, Paczesny S, et al. Boosting vaccinations with peptide-pulsed CD34⁺ progenitor-derived dendritic cells can expand long-lived melanoma peptide-specific CD8⁺ T Cells in patients with metastatic melanoma[J]. J Immunother, 2005, 28(2):158.

[12] Wan H, Dupasquier M. Dendritic cells *in vivo* and *in vitro*[J]. Cell Mol Immunol, 2005,2(1):28.

[13] 张春雨,李立. 树突状细胞与肺癌免疫的相关研究进展[J]. 中国实验诊断学,2012,16(4):746.

[14] 李莎,李岩,梁婧,等. DC-CIK 联合化疗治疗结肠癌的临床研究[J]. 中国免疫学杂志,2012,28(9):835.

[15] 王忠全. 人参多糖在抗肿瘤领域的临床应用[J]. 中国药业,2009,18(7):61.

[16] 宋利华,王红梅,萧伟. 人参多糖的分级及其免疫活性初探[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(14):162.

[17] Kim M H, Byon Y Y, Ko E J, et al. Immunomodulatory activity of ginsan, a polysaccharide of panax ginseng, on dendritic cells[J]. Koraen J Physiol Pharmacol,2009,13(3):169.

[责任编辑 邹晓翠]