

- cross-sectional study[J]. BMC Ophthalmol, 2012, 12: 34.
- 6 吴玲玲, 周 卉, 尹金福, 等. 慢性闭角型青光眼视野损害的特点 [J]. 中国实用眼科杂志, 2004, 22(12): 973-976.
- 7 马英慧, 刘 刚, 崔秀威, 等. 频域 OCT 检测原发性开角型青光眼与原发性慢性闭角型青光眼结构与功能的相关性 [J]. 中国实用眼科杂志, 2013, 31(2): 154-158.
- 8 杨新光, 刘 钊, 于敬妮, 等. 多焦视觉诱发电位在原发性青光眼诊断中的应用 [J]. 眼视光学杂志, 2009, 11(1): 46-49.
- [收稿日期 2014-10-20][本文编辑 潘洪平]

课题研究 · 论著

# p53 基因治疗对鼻咽癌患者局部免疫及预后的影响

覃扬达, 翁敬锦, 司勇锋, 韦海明, 张 政, 兰桂萍, 孙金杰

基金项目: 广西卫生厅科研课题(编号: Z2008062); 广西医疗卫生重点科研课题(编号: 重 200721)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院耳鼻咽喉头颈肿瘤科(覃扬达, 翁敬锦, 司勇锋, 张 政, 兰桂萍, 孙金杰), 病理科(韦海明)

作者简介: 覃扬达(1967-), 男, 大学本科, 医学学士, 副主任医师, 研究方向: 鼻咽癌诊治。E-mail: qinyangda@163.com

通讯作者: 司勇锋(1957-), 男, 大学本科, 医学学士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 鼻咽癌诊治。E-mail: syfklxf@126.com

**[摘要]** **目的** 探讨 p53 基因治疗后鼻咽癌患者的局部免疫变化及其对肿瘤复发和转移的影响。**方法** 63 例经病理确诊的初治中、晚期鼻咽癌患者分为 p53 治疗组[32 例, 采用 p53 腺病毒(rAd-p53)鼻咽部瘤体内注射和同步放、化疗]和常规治疗组(31 例, 采用同步放、化疗)。采用免疫组织化学方法检测治疗前、后鼻咽部肿瘤浸润淋巴细胞的 T 细胞受体 CD3 和 B 细胞受体 CD20 的表达情况, 了解肿瘤组织的局部免疫状态; 统计患者在治疗后定期回院的复查结果以及随访资料, 了解患者的生存率及肿瘤的复发和转移情况。**结果** p53 治疗组治疗后肿瘤组织中的 CD3 表达比治疗前明显增加( $P < 0.05$ ), 治疗前、后 CD20 的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。p53 治疗组和常规治疗组复发和转移率差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), p53 治疗组 5 年无瘤生存率优于常规治疗组( $P < 0.05$ )。**结论** p53 基因治疗后鼻咽部肿瘤中的肿瘤浸润淋巴细胞增殖以 T 细胞为主, 治疗后的局部细胞免疫状态较治疗前有明显提高, 肿瘤的复发和转移率降低, 基因治疗联合放化疗可能有助于改善鼻咽癌的预后。

**[关键词]** 鼻咽肿瘤; rAd-p53; 局部免疫; 预后

**[中图分类号]** R 739.63 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2015)02-0109-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2015.02.04

**Effect of p53 gene therapy on the local immunity and the prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma** QIN Yang-da, WENG Jing-jin, SI Yong-feng, et al. Department of Otolaryngology Head and Neck Oncology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the local immune function and prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC) treated with p53 gene therapy. **Methods** Sixty-three cases of advanced nasopharyngeal carcinoma were divided into p53 therapy group ( $n = 32$ ) and conventional therapy group ( $n = 31$ ). The p53 therapy group was treated by concurrent radiotherapy and chemotherapy plus nasopharynx intratumoral injection of rAd-p53; the conventional therapy group was treated by concurrent radiotherapy and chemotherapy. The expression of CD3 and CD20 were examined by immunochemistry and their relationship with prognosis was also analyzed. **Results** The expression of CD3 was significantly increased after p53 gene treatment. There was no significant change in expression of CD20 after p53 gene treatment. Five-year disease-free survival rate in the p53 therapy group was higher than that in the conventional therapy group ( $P < 0.05$ ). Recurrence and metastasis rate was significantly different between p53 therapy

group and the conventional therapy group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** T cells are the most important proliferative cell of tumor infiltrating lymphocyte in NPC patients after p53 gene therapy. The local cellular immune status in NPC patients is improved after p53 gene therapy with decrease of tumor recurrence rate and metastasis rate. Gene therapy combined with radiotherapy and chemotherapy may help to improve the prognosis of patients with NPC.

[Key words] NPC; rAd-p53; Local immune status; Prognosis

鼻咽癌是我国南方地区最常见的头颈部恶性肿瘤,因其早期发病隐匿,患者在临床确诊时70%以上是中、晚期。鼻咽癌对放射线敏感,放射治疗是鼻咽癌的主要治疗手段,虽然近年来随着影像学、放疗设备及放疗技术的发展使鼻咽癌的疗效有了明显提高,但令人遗憾的是中晚期鼻咽癌的生存率仍低,因此寻找一些新的治疗手段以提高中晚期鼻咽癌的生存率成为临床研究的重点之一。有研究资料显示,腺病毒载体人重组 p53 基因 (rAd-p53) 对头颈部鳞癌有良好的治疗反应<sup>[1]</sup>。前期我科将 rAd-p53 联合放化疗的方法应用于中晚期鼻咽癌的治疗,获得了满意的肿瘤消退率<sup>[2]</sup>。进一步研究发现,p53 基因治疗后鼻咽部肿瘤组织中的 TIL 增殖以 T 细胞为主,局部细胞免疫状态提高与肿瘤消退率呈正相关作用<sup>[3]</sup>。本研究是在前期研究的基础上,结合患者的随访资料来总结分析鼻咽癌基因治疗后的局部复

发和远处转移的情况,现报告如下。

### 1 资料与方法

**1.1 病例入组条件** (1)病理诊断为鼻咽部未分化非角化性癌,未行抗癌治疗;(2)按 UICC (1997) 鼻咽癌分期方案分期的 III、IV 期鼻咽癌患者;(3)年龄在 20 ~ 65 岁之间;(4)卡氏评分  $\geq 70$  分;(5)自愿参加并签署知情同意书。

**1.2 一般资料** 选择 2007-02 ~ 2010-08 63 例经病理确诊的初治中、晚期鼻咽癌患者进行前瞻性随机分组研究。男 52 例,女 11 例,年龄 22 ~ 63 岁,中位年龄 42 岁。p53 治疗组 (32 例) 采用 rAd-p53 鼻咽部瘤体内注射和同步放、化疗;常规治疗组 (31 例) 采用同步放、化疗。p53 治疗组和常规治疗组两组病例之间的性别、年龄、T 分期、N 分期、临床分期比较差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 两组患者一般资料比较

组别	例数	性别		年龄		T 分期			N 分期				临床分期	
		男	女	$\leq 42$ 岁	$> 42$ 岁	T2	T3	T4	N0	N1	N2	N3	III 期	IV 期
p53 治疗组	32	26	6	18	14	5	13	14	12	10	6	4	16	16
常规治疗组	31	26	5	15	16	5	19	7	7	11	10	3	21	10
$\chi^2$	-	0.075		0.390		3.443			2.491				2.045	
P	-	0.784		0.532		0.179			0.477				0.153	

**1.3 治疗方法** (1)放疗:所有患者采用直线加速器常规分割放疗,放疗剂量鼻咽部 70 ~ 76 Gy/35 ~ 38 f,颈部 66 ~ 70 Gy/33 ~ 35 f。(2)化疗:用卡铂联合氟尿嘧啶方案,卡铂 500 mg/m<sup>2</sup>,第 1 天,氟尿嘧啶用 2 000 mg/m<sup>2</sup>,持续 120 h 泵入。每 3 周重复,共 2 周期。(3)基因治疗:放疗前 72 h 在鼻内镜下行鼻咽部瘤体内注射重组人 p53 腺病毒注射液 1 × 10<sup>12</sup> VP (rAd-p53,中国深圳赛百诺公司生产),规格为 1 × 10<sup>12</sup> VP/支,1 次/周,治疗 6 ~ 8 周。

### 1.4 观测指标和试剂及检测方法

**1.4.1 观测指标** 观察两组患者治疗前、第 3 次 rAd-p53 治疗后鼻咽部肿瘤组织标本中 CD3 (CD3 + CD4 +、CD3 + CD8 +) 和 CD20 的表达情况;两组患者的局部复发率、远处转移率和 5 年生存率。

**1.4.2 试剂** ElivisionTM plus 二步法免疫组化试

剂盒,CD3 + CD4 + 和 CD3 + CD8 +、CD20 均购自福州迈新生物工程技术有限公司。DAB 显色试剂盒购自北京中杉公司。

**1.4.3 检测方法和结果判断** 取鼻咽部肿瘤组织标本切片,常规脱蜡至水、ElivisionTM Plus 两步法, DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片,光镜观察。用已知的 CD3 + CD4 + 和 CD3 + CD8 + 及 CD20 切片作阳性对照,用 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照。在显微镜下观察,抗体均以细胞膜呈棕黄色为阳性。CD3 + CD4 + 和 CD3 + CD8 + 及 CD20 蛋白依据阳性细胞占有所有肿瘤细胞的百分比分级。阴性为不着色;肿瘤细胞阳性数 10% 为 (+);肿瘤细胞阳性数占 10% ~ 50% 为 (++) ,肿瘤细胞阳性数  $> 50\%$  为 (+++)。

**1.5 随访情况** 患者治疗结束后开始定期随访复

查。患者在出院后 1 年内要求每 3 个月返回医院住院或门诊复查,3 年内要求每 6 个月要复查 1 次。随访日期截至 2014-09,中位随访时间为 52 个月,随访率为 100%。

**1.6 统计学方法** 应用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,治疗前后不同蛋白的表达程度之间差异采用秩和检验。计数资料采用  $\chi^2$  检验,应用 Kaplan-Meier 生存曲线进行单因素生存分析,用 log-rank 检验进行组间生存曲线的比较。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 CD3 和 CD20 治疗前后变化** p53 治疗组中 CD3 表达比治疗前明显增加( $Z = -2.185, P = 0.029$ );常规治疗组的 CD3 和 CD20 治疗前后表达差异不显著(均  $P > 0.05$ );两组间治疗前后 CD3 的差异有统计学意义( $Z = -2.709, P = 0.007$ ),而 CD20 差异无统计学意义( $Z = -0.224, P = 0.823$ )。见表 2,3。

表 2 基因治疗前后不同抗体蛋白表达程度的频数分布

蛋白	染色强度	治疗前	治疗后	Z	P
CD3	-	10	5	-2.185	0.029
	1+	11	11		
	2+	7	5		
	3+	4	11		
CD20	-	19	16	-0.721	0.471
	1+	7	9		
	2+	5	7		
	3+	1	0		

表 3 常规放化疗前后不同抗体蛋白表达程度的频数分布

蛋白	染色强度	治疗前	治疗后	Z	P
CD3	-	8	11	-0.871	0.384
	1+	13	10		
	2+	8	9		
	3+	2	1		
CD20	-	14	13	-0.258	0.796
	1+	11	12		
	2+	4	6		
	3+	2	0		

**2.2 p53 治疗组和常规治疗组之间复发和转移情况比较** 截止到随访日期,p53 治疗组局部复发率为 12.5% (4/32),远处转移率为 25% (8/32),局部复发和远处转移率为 37.5% (12/32);常规治疗组局部复发率为 29.03% (9/31),远处转移率为 35.48% (11/31),局部复发和远处转移率为 64.52% (20/31);两组间复发和转移率差异有统计学意义( $P = 0.032$ )。见表 4。

**2.3 CD3 和 CD20 的表达与肿瘤复发和转移的关系** (1)CD3 表达增加组复发率为 28% (7/25),远处转移率为 8% (2/25),CD3 表达无变化组复发率为 15.79% (6/38),远处转移率为 44.74% (17/38),复发率差异无统计意义( $P = 0.241$ ),远处转移率差异有统计学意义( $P = 0.002$ )。(2)CD20 表达增加组复发率为 26.67% (4/15),远处转移率为 26.67% (4/15),CD20 表达无变化组复发率为 18.75% (9/48),远处转移率为 31.25% (15/48),复发率和远处转移率差异均无统计学意义( $P = 0.508, P = 0.736$ )。见表 4。

表 4 不同组别之间复发和转移情况比较

组别	例数	局部复发	$\chi^2$	P	远处转移	$\chi^2$	P	复发和转移	$\chi^2$	P
p53 治疗组	32	4	2.628	0.105	8	0.822	0.365	12	4.598	0.032
常规放化疗组	31	9			11			20		
CD3 增加组	25	7	1.373	0.241	2	9.662	0.002	9	3.629	0.057
CD3 无变化组	38	6			17			23		
CD20 增加组	15	4	0.437	0.508	4	0.114	0.736	8	0.051	0.822
CD20 无变化组	48	9			15			24		

**2.4 p53 治疗组和常规治疗组的生存率比较** 截至随访日期 2014-09-30,两组患者死亡 14 例,仍存活 49 例。p53 治疗组和常规治疗组 5 年总生存率分别为 71.47%、53.49%,两组比较差异无统计学意义( $\chi^2 = 2.129, P = 0.145$ );无瘤生存率分别为 61.10% 和 35.48%,差异有统计学意义( $\chi^2 = 4.800, P =$

0.028);CD3 表达增加组和无变化组 5 年无瘤生存率分别为 64% 和 38.60%,两组比较差异均有统计学意义( $\chi^2 = 5.323, P = 0.021$ );CD20 表达增加组和减少组 5 年无瘤生存率差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.002, P = 0.963$ )。见图 1~4。

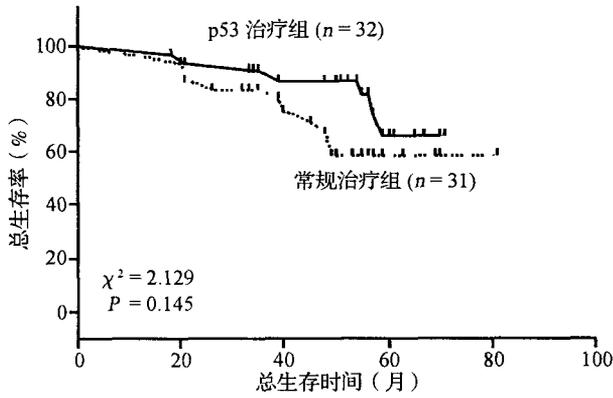


图1 p53 治疗组和常规治疗组的总生存曲线比较

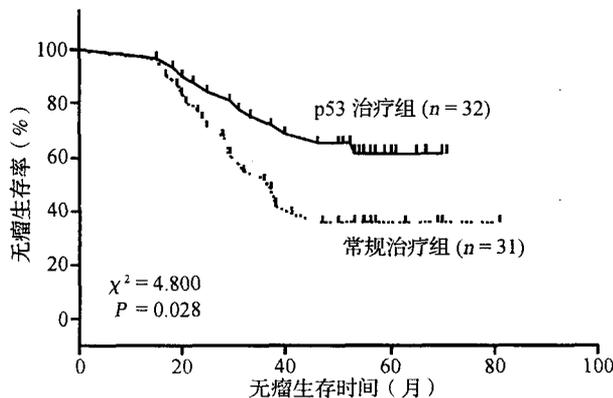


图2 p53 治疗组和常规治疗组的无瘤生存曲线比较

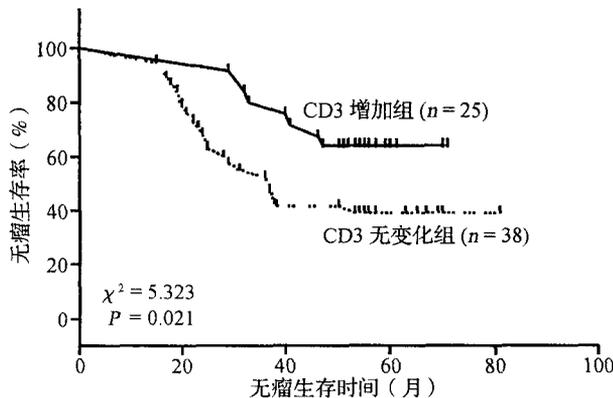


图3 CD3 表达对无瘤生存期的影响

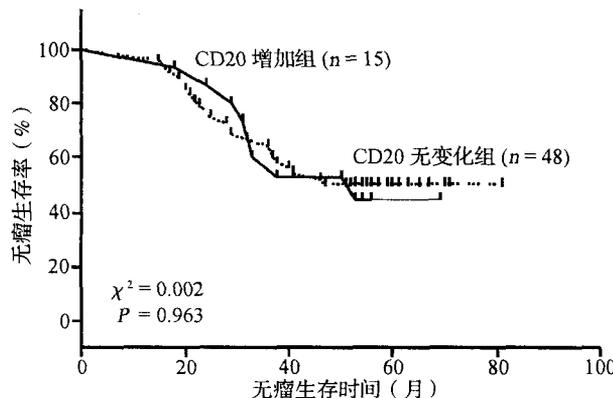


图4 CD20 表达对无瘤生存期的影响

### 3 讨论

**3.1 肿瘤形成和发展的主要原因之一是细胞凋亡功能异常导致细胞过度增生,肿瘤抑制因子 p53 是人体内一个关键的细胞凋亡调节因子,也是目前研究最透彻、结构了解最清晰和功能强大的一种抑癌基因,其在机体组织细胞的生长发育等过程中发挥重要作用。自 20 世纪 90 年代以来,肿瘤基因治疗的实验研究已取得重要进展,其中针对 p53 基因的治疗已从实验室研究逐步向临床应用过渡,而且有望成为肿瘤综合治疗的重要组成部分<sup>[4]</sup>。机体免疫功能异常是肿瘤发生的另一主要原因,而抗肿瘤免疫主要由细胞免疫介导,肿瘤与机体相互作用的局部微环境,特别是免疫微环境,对肿瘤的发生、发展和转移有着重要的影响<sup>[5]</sup>。肿瘤患者机体免疫功能全面受抑,抗肿瘤免疫细胞数量不足,亚群比例失调,机体免疫细胞的抗瘤活性明显减低,使肿瘤细胞在逃脱机体免疫监视后得以继续生长,最终导致肿瘤扩散和转移。现已有较多研究证实机体免疫与肿瘤的发生及消退有关<sup>[6,7]</sup>。p53 基因治疗是通过腺病毒感染将 p53 基因导入肿瘤细胞,表达 p53 蛋白,一方面有抑制肿瘤细胞分裂,诱导肿瘤细胞凋亡的作用;同时肿瘤细胞高表达的 p53 蛋白能有效刺激机体产生特异性抗肿瘤细胞免疫反应,吸引 T 淋巴细胞等肿瘤杀伤性细胞聚集杀灭肿瘤细胞<sup>[8]</sup>。已有临床研究表明 p53 基因治疗后能提高鼻咽癌患者的局部细胞免疫水平,p53 治疗组肿瘤消退率及完全缓解率明显高于常规化疗组<sup>[3]</sup>,局部细胞免疫状态与肿瘤的消退率成正相关<sup>[3]</sup>,前期我们的研究也证实了 p53 蛋白阳性表达与 1 年无瘤生存率相关<sup>[9]</sup>。肿瘤局部浸润的免疫细胞主要为 T 淋巴细胞,其中以 CD3 为最多,在其它肿瘤的相关研究中,CD3 与多种恶性肿瘤患者的预后有关<sup>[10,11]</sup>,阳性患者生存时间比阴性患者长;我们的随访资料与上述研究报道一致:CD3 表达水平与 NPC 治疗后复发和远处转移有关,推断可能是和基因治疗后随着肿瘤组织中 TIL 增加和机体局部细胞免疫力提高,机体杀灭肿瘤能力也得到提高,从而促进肿瘤消退<sup>[12]</sup>,降低肿瘤局部复发率和远处转移率。**

**3.2 多项研究结果表明,远处转移是鼻咽癌死亡的主要原因<sup>[13]</sup>,p53 基因治疗后能提高鼻咽癌患者的局部细胞免疫水平,局部细胞免疫水平与远处转移有关。本组病例 p53 治疗组与常规化疗组的无瘤生存率也有差异,进一步分层分析结果显示,p53 治疗组较常规化疗组 CD3 表达明显增加(62.96%**

vs 36.92%)，而 CD3 表达增加后患者的远处转移率下降，无瘤生存率提高，提示基因治疗后 CD3 细胞可能起主要作用。基于此，我们推断 p53 基因治疗可能是通过提高鼻咽癌患者的细胞免疫水平，改善肿瘤与机体之间的免疫微环境，进而促进肿瘤消退、减少肿瘤复发和远处转移。至于局部免疫与肿瘤复发和远处转移机制以及局部免疫细胞之间的相互关系，尚需进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Clayman GL, Frank DK, Brusio PA, et al. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer as a surgical adjuvant in advanced head and neck cancers[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(7):1715-1722.
- 2 司勇锋, 何承诚, 兰桂萍, 等. 重组人 p53 腺病毒注射液联合化疗对中晚期鼻咽癌消退率的影响[J]. 中国肿瘤临床, 2009, 36(18):1031-1033, 1039.
- 3 覃扬达, 翁敬锦, 兰桂萍, 等. p53 基因治疗对鼻咽癌患者局部免疫及疗效的影响[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2012, 26(21):980-983.
- 4 Hunt KK, Vorburger SA, Tech. Sight. Gene therapy hurdles and hopes for cancer treatment[J]. Science, 2002, 297(5580):415-416.
- 5 Movassagh M, Spatz A, Davoust J, et al. Selective accumulation of mature DC-Lamp+ dendritic cells in tumor sites is associated with efficient T-cell-mediated antitumor response and control of metastatic dissemination in melanoma[J]. Cancer Res, 2004, 64(6):2192-2198.
- 6 Robert J. Comparative study of tumorigenesis and tumor immunity in invertebrates and nonmammalian vertebrates[J]. Dev Comp Immunol, 2010, 34(9):915-925.
- 7 Lazorchak AS, Su B. Perspectives on the role of mTORC2 in B lymphocyte development, immunity and tumorigenesis[J]. Protein Cell, 2011, 2(7):523-530.
- 8 郭文. 鼻咽癌治疗药重组人 p53 腺病毒 (rhAd-p53)[J]. 世界临床药物, 2006, 27(7):443-445.
- 9 兰桂萍, 司勇锋, 翁敬锦, 等. p53 和 p21WAF1 在鼻咽癌 rAd-p53 瘤内注射前后的表达及其与近期预后的关系[J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(8):961-965.
- 10 Bamias A, Koutsoukou V, Terpos E, et al. Correlation of NK T-like CD3+ CD56+ cells and CD4+ CD25+ (hi) regulatory T cells with VEGF and TNFalpha in ascites from advanced ovarian cancer: Association with platinum resistance and prognosis in patients receiving first-line, platinum-based chemotherapy[J]. Gynecol Oncol, 2008, 108(2):421-427.
- 11 Shi F, Zhang JY, Zeng Z, et al. Skewed ratios between CD3(+) T cells and monocytes are associated with poor prognosis in patients with HBV-related acute-on-chronic liver failure[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 402(1):30-36.
- 12 Ghulam Muhammad AK, Candolfi M, King GD, et al. Antiglioma immunological memory in response to conditional cytotoxic/immunostimulatory gene therapy: humoral and cellular immunity lead to tumor regression[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(19):6113-6127.
- 13 Fang FM, Chien CY, Li CF, et al. Effect of S-phase kinase-associated protein 2 expression on distant metastasis and survival in nasopharyngeal carcinoma patients[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009, 73(1):202-207.

[收稿日期 2014-11-07][本文编辑 杨光 and]

## 课题研究·论著

# 针刀微创治疗慢性膝关节周围炎的临床研究

李 锋, 梁启荣, 李 芬, 朱蔚琳, 宁加娟, 张 行

基金项目: 广西卫生厅科研课题(编号:Z2013328)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院麻醉科疼痛门诊(李 锋, 朱蔚琳, 宁加娟, 张 行); 530021 南宁, 广西工人医院内科(梁启荣); 530021 南宁, 广西江滨医院康复科(李 芬)

作者简介: 李 锋(1970-), 男, 医学硕士, 副主任医师, 研究方向: 麻醉与疼痛医学。E-mail: nnlifeng@163.com

**[摘要]** 目的 观察针刀微创治疗慢性膝关节周围炎的临床疗效。方法 选择疼痛门诊确诊为慢性膝关节周围炎患者 200 例, 半随机分为观察组和对照组, 每组 100 例。观察组神经阻滞后进行针刀微创松解治疗, 对照组进行单纯神经阻滞治疗。比较两组治疗前及治疗后 1 w、2 w、4 w 后不同时点静息疼痛 VAS 评分(rest visual analogue scale, RVAS) 和被动活动时 VAS 评分(passive visual analogue scale, PVAS), 比较两组综合疗效。结果 两组治疗后 RVAS 评分和 PVAS 评分均呈下降趋势, 观察组总体评分均低于对照组, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 观察组治疗后 2 w、4 w 疼痛 RVAS 评分和 PVAS 评分均明显下降( $P <$