香菇多糖对新辅助化疗后乳腺癌患者免疫功能及淋巴细胞的影响

鲁海燕,张喜平
(内蒙古医科大学附属医院普外科,内蒙古 呼和浩特 010050)

摘要:目的 探讨香菇多糖对新辅助化疗后乳腺癌患者免疫功能及淋巴细胞的影响。**方法** 自2015年1月至2016年10月,前瞻性收集内蒙古医科大学附属医院收治的接受新辅助化疗的乳腺癌患者88例,采用随机对照的方式将其分为观察组(44例)和对照组(44例)。两组患者治疗方法相同,观察组联合应用香菇多糖,所有患者均新辅助化疗后手术切除肿瘤组织并留取肿瘤组织标本,观察肿瘤组织及外周血 $CD4^+$ T细胞、$CD8^+$ T细胞、$CD4^+/CD8^+$ 比例以及血清白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、转化生长因子-β1(TGF-β1)浓度。**结果** 治疗后,观察组肿瘤组织微环境 $CD4^+$ T细胞明显低于对照组(21.56% ±5.08% 比 23.95% ±5.17%,$t=2.187$,$P=0.031$);$CD8^+$ T细胞高于对照组(29.52% ±3.51% 比 27.47% ±3.68%,$t=2.673$,$P=0.009$);$CD4^+/CD8^+$ T细胞比例低于对照组(0.72±0.12 比 0.86±0.14,$t=5.036$,$P=0.000$)。外周血 $CD4^+$ T细胞水平明显增加(28.57% ±4.32% 比 26.23% ±4.12%,$t=2.600$,$P=0.011$);$CD4^+/CD8^+$ T细胞比例明显增加(0.84±0.15 比 0.76±0.13,$t=2.673$,$P=0.009$)。外周血 IL-6 浓度明显增高[(14.56±4.79) 比 (11.45±4.48) $ng \cdot L^{-1}$,$t=3.145$,$P=0.002$)];IL-10 浓度明显降低[(11.34±3.37) 比 (13.46±3.41) $ng \cdot L^{-1}$,$t=2.933$,$P=0.004$)];TGF-β1 浓度明显降低[(15.14±4.69) 比 (17.67±4.53) $\mu g \cdot L^{-1}$,$t=2.290$,$P=0.024$)]。**结论** 香菇多糖有助于提高新辅助化疗后乳腺癌患者免疫功能,改善肿瘤组织微环境中免疫状态。

关键词:乳腺癌;香菇多糖;淋巴细胞浸润;新辅助化疗
doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.12.040

Effect of lentinan on infiltrating lymphocytes of tumor tissue and peripheral blood in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy

LU Haiyan, ZHANG Xiping
(*Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia* 010050, *China*)

Abstract: Objective To investigate the effect of lentinan on infiltrating lymphocytes in the microenvironment of breast cancer patients with neoadjuvant chemotherapy. **Methods** From January 2015 to October 2016, 88 breast cancer patients admitted to our hospital received neoadjuvant chemotherapy and were randomly assigned into a study group (44 cases) and a control group (44 cases). Basic treatment were the same in two groups and patients in the study group received lentinan injection. After neoadjuvant chemotherapy, surgical resection were performed in all patients and tumor tissue were collected. The $CD4^+$ T cells, $CD8^+$ T cells and the proportion of $CD4^+/CD8^+$ T cells in tumor tissue and peripheral blood and serum level of IL-6, IL-10 and TGF-β1 were observed. **Results** When compared with control group after the treatment, patients in the study group showed significantly decrease of $CD4^+$ T cells (21.56 % ± 5.08 % *vs*. 23.95% ±5.17%, $t=2.187$, $P=0.031$); increase of $CD8^+$ T cell (29.52% ±3.51% *vs*. 27.47% ±3.68%, $t=2.673$, $P=0.009$) and decrease of the proportion of $CD4^+/CD8^+$ T cells, respectively (0.72±0.12 *vs*. 0.86±0.14, $t=5.036$, $P=0.000$). Moreover, in peripheral blood, patients in the study group got an elevated post-operative level of $CD4^+$ T cells (28.57% ± 4.32% *vs*. 26.23% ±4.12%, $t=2.600$, $P=0.011$), a higher level of $CD4^+/CD8^+$ T (0.84±0.15 *vs*. 0.76±0.13, $t=2.673$, $P=0.009$), an increase in IL-6 level (14.56±4.79 *vs*. 11.45±4.48 $ng \cdot L^{-1}$, $t=3.145$, $P=0.002$), a decrease in IL-10[(11.34 ± 3.37) *vs*. (13.46±3.41) $ng \cdot L^{-1}$, $t=2.933$, $P=0.004$)], and a decrease in TGF-β1 [(15.14±4.69) *vs*. (17.67±4.53) $\mu g \cdot L^{-1}$, $t=2.290$, $P=0.024$)]. **Conclusions** Lentinan is helpful to improve the immune status in the microenvironment and the total immune function in patients with breast cancer who underwent neoadjuvant chemotherapy.

Key words: Breast cancer; Lentinan; Lymphocyte infiltration; Neoadjuvant chemotherapy

随着人口老龄化、饮食结构、生活环境的变化以及其他因素的影响,乳腺癌近年来发病率呈明显上升趋势,已俨然成为女性患者尤其是老年女性群体最为常见的恶性肿瘤,且有发病年龄年轻化的趋

势[1-2]。肿瘤微环境是指包含内皮细胞、免疫细胞、成纤维细胞、肿瘤细胞和细胞间基质等在内的相互协同作用,从而利于肿瘤细胞生长、转移的特殊环境。研究证实,肿瘤微环境在肿瘤的病理生理过程中发挥着决定性的作用[3-5]。肿瘤微环境中的淋巴细胞反映出患者的免疫功能状态以及对抗肿瘤的能力,研究证实 $Foxp3^+$ Tregs 是乳腺癌患者中无病生存时间和总生存率的独立预测指标,且与肿瘤分型有关,并能在肿瘤组织内差异性分布,证实肿瘤微环境中免疫细胞与患者预后息息相关,因此可以作为肿瘤治疗的重要手段[6-8]。香菇多糖具有免疫调节作用,对固有免疫和获得性免疫均有调节作用,可以提高机体免疫力[9]。但目前其免疫调节机制尚不明确,在乳腺癌患者中研究也较少,因此本研究通过前瞻性纳入接受新辅助化疗的乳腺癌患者,探讨香菇多糖对此类患者免疫功能以及肿瘤微环境中浸润淋巴细胞的影响,以求为临床提供相应的理论支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料 前瞻性纳入自 2015 年 1 月至 2016 年 10 月内蒙古医科大学附属医院收治的乳腺癌患者。入组标准:①明确诊断为乳腺癌;②入组前 4 周未接受化疗或放疗;③年龄范围为 18 ~ 70 岁;④预期寿命≥3 月,ECOG 评分≤2 分;⑤知情并同意此研究。排除标准:①合并其他恶性肿瘤;②合并严重的心、肺、肾、肝脏功能障碍;③合并自身免疫性疾病或长期应用激素;④使用其它免疫调节剂;⑤研究期间放弃治疗、失访、转院等。根据以上标准,研究期间共入组乳腺癌患者 88 例,采用随机、对照、单盲的方法将患者分为观察组和治疗组,每组各 44 例患者。观察组年龄(57.53 ±8.57)岁,年龄范围为40 ~68 岁;病理分型其中浸润性导管癌 30 例,乳头状癌 6 例,单纯癌 5 例,髓样癌 3 例;雌激素受体阳性 29 例,孕激素受体阳性 25 例,人表皮生长因子-2 受体阳性 20 例;组织分化程度其中高分化的 8 例,中分化的 20 例,低分化的 11 例,不能判别分化程度 5 例。对照组年龄(58.69 ±9.35)岁,年龄范围为 43 ~70 岁;病理分型其中浸润性导管癌 28 例,乳头状癌 8 例,单纯癌 6 例,髓样癌 2 例;雌激素受体阳性 27 例,孕激素受体阳性 23 例,人表皮生长因子-2 受体阳性 21 例;组织分化程度其中高分化的 7 例,中分化的 19 例,低分化的 14 例,不能判别分化程度 4 例。两组患者治疗前一般临床资料比较均差异无统计学意义(均 $P>0.05$),见表 1。本研究通过内蒙古医科大学附属医院伦理委员会批准,所有患者或其家属均知情同意并签署知情同意书。

1.2 治疗方法 所有患者入院均常规完善乳腺、淋巴结超声,胸腹部 CT 等检查,必要时行核磁共振,骨组织核素扫描等检查。两组患者均给予相同新辅助化疗方案,每次化疗前均常规检查血常规、肝肾功能、心电图等检查以排除化疗禁忌。新辅助化疗方案为 CAF 方案化疗:疗程第 1 天和第 8 天静脉注射环磷酰胺 500 $mg \cdot m^{-2}$, 5-氟尿嘧啶 500 $mg \cdot m^{-2}$,多柔比星 50 $mg \cdot m^{-2}$ 为疗程第 1 天使用。每 21 d 为 1 疗程,术前共给予 3 ~4 个疗程,每 2 ~3 疗程结束时行影像学检查评估疗效。新辅助化疗结束后行改良根治术,围手术期给予营养、血糖、血压、内环境、心肺功能支持等对症治疗。观察组在此基础上给予香菇多糖(天地欣,南京绿叶制药有限公司,生产批号 Z20080579)治疗。用法用量:香菇多糖 1 mg +5% 葡萄糖注射液 250 mL 静脉滴注,1 周 2 次,患者非住院期间在社区卫生院输注。所有患者外周血免疫细胞检测期间均未行分子靶向治疗。

1.3 观察指标及检测方法 一般临床资料包括年龄、性别、病理分型、组织分化程度等。肿瘤组织切片后常规 HE 染色和免疫组化(IHC)染色,雌激素或孕激素≥1% 定义为激素受体阳性;人表皮生长因子-2 受体检测首先采用 IHC 初筛,IHC 0/1 + 诊断受体阴性,IHC3 + 诊断为受体阳性;IHC2 + 患者

表 1 两组一般资料比较

分组	例数	年龄/(岁,$\bar{x}\pm s$)	病理分型/例(%)				分化程度/例(%)				雌激素受体阳性/例(%)	孕激素受体阳性/例(%)	人表皮生长因子-2 受体阳性/例(%)
			浸润性导管癌	乳头状癌	单纯癌	髓样癌	高分化	中分化	低分化	无法判别			
对照组	44	58.69 ±9.35	28 (63.64)	8 (18.18)	6 (13.64)	2 (4.55)	7 (15.91)	19 (43.18)	14 (31.82)	4 (9.09)	27(61.36)	23(52.27)	21(47.73)
观察组	44	57.53 ±8.57	30 (68.18)	6 (13.64)	5 (11.36)	3 (6.81)	8 (18.18)	20 (45.45)	11 (25.00)	5 (11.36)	29(65.91)	25 (56.82)	20(45.45)
$t(\chi^2)$值		0.607	0.202	0.339	0.103	0.212	0.08	0.046	0.502	0.123	0.196	0.183	0.046
P 值		0.545	0.653	0.559	0.747	0.645	0.776	0.83	0.478	0.725	0.658	0.669	0.831

进一步行荧光原位杂交法(FISH)检测明确受体基因扩增状态以明确诊断。主要观察指标包括:肿瘤组织中淋巴细胞浸润程度如 $CD4^+$ T 细胞、$CD8^+$ T 细胞、$CD4^+/CD8^+$ T 细胞比例等;外周血中 $CD4^+$ T 细胞、$CD8^+$ T 细胞水平;血清白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、转化生长因子-β1(TGF-β1)浓度。肿瘤组织淋巴细胞浸润情况:手术中留取肿瘤组织标本,洗净、剪碎、PBS 制成细胞悬液,去碎片和细胞团后取得细胞沉淀,分离淋巴细胞后加入单克隆抗体反应 30 min,使用 Epics XL 型流式细胞仪(Beckman,美国)检测 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞。外周血 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞:治疗前及手术前留取外周血标本,使用 Epics XL 型流式细胞仪(Beckman,美国)检测患者外周血中 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞。血清白细胞介素-2(IL-2)、IL-6、IL-10、TGF-β1 浓度:治疗前及手术前留取外周血标本,离心后将血清冻存于 -80 ℃冰箱,后集中采用 Elisa 法(云克隆,武汉)检测。

1.4 统计学方法 所有数据均采用 SPSS 22.0 统计软件完成分析,两组患者计量资料采用两独立样本 t 检验,组间计量资料采用配对样本 t 检验。分类资料采用 χ^2 检验。$P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组肿瘤组织淋巴细胞浸润水平比较 观察组肿瘤组织微环境 $CD4^+$ T 细胞(21.56% ±5.08% 比 23.95% ±5.17%,$t=2.187$,$P=0.031$)低于对照组;$CD8^+$ T 细胞(29.52% ±3.51% 比 27.47% ±3.68%,$t=2.673$,$P=0.009$)高于对照组;$CD4^+/CD8^+$ T 细胞比例(0.72 ±0.12 比 0.86 ±0.14,$t=5.036$,$P=0.000$)亦低于对照组,均差异有统计学意义,见图 1。

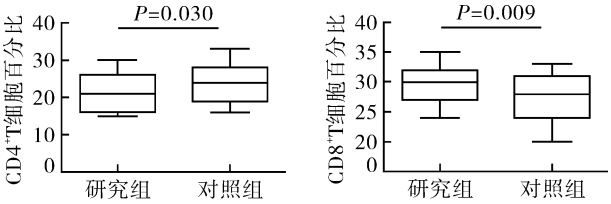

图 1 两组患者肿瘤组织淋巴细胞浸润水平比较

2.2 两组外周血淋巴细胞水平比较 相比于对照组,观察组治疗后外周血 $CD4^+$ T 细胞水平明显增加;$CD4^+/CD8^+$ T 细胞比例明显增加。治疗后观察组和对照组外周血 $CD4^+$ T 细胞水平均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.3 两组血清 IL-6、IL-10、TGF-β1 浓度比较 治疗前两组血清 IL-6、IL-10、TCG-β1 浓度差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。相比于对照组,观察组治疗后血清 IL-6 浓度明显增高($P=0.002$);IL-10 浓度明显降低($P=0.004$);TGF-β1 浓度明显降低($P=0.024$)。治疗后观察组和对照组外周血 IL-6 浓度均显著降低,IL-10 和 TGF-β1 浓度均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

3 讨论

近年来越来越多的研究证实,免疫在肿瘤患者的病理生理过程中起到了极为重要的作用,活化肿瘤患者机体免疫功能有可能成为抗肿瘤的有效治

表 2 两组患者外周血淋巴细胞水平比较/$\bar{x}\pm s$

组别	例数	$CD4^+$ T 细胞/%		$CD8^+$ T 细胞/%		$CD4^+/CD8^+$ T 细胞	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	44	24.18 ±3.51	26.23 ±4.12[a]	32.91 ±4.13	33.87 ±4.56	0.74 ±0.14	0.76 ±0.13
观察组	44	23.72 ±3.43	28.57 ±4.32[a]	33.74 ±4.34	34.59 ±4.63	0.71 ±0.13	0.84 ±0.15[a]
t 值		0.622	2.600	0.919	0.734	1.042	2.673
P 值		0.535	0.011	0.361	0.464	0.301	0.009

注:与治疗前对比,[a]$P<0.05$

表 3 两组患者外周血 IL-6、IL-10、TGF-β1 水平比较/$\bar{x}\pm s$

组别	例数	IL-6/ng·L^{-1}		IL-10/ng·L^{-1}		TGF-β1/μg·L^{-1}	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	44	9.78 ±4.32	11.45 ±4.48[a]	15.61 ±3.97	13.46 ±3.41[a]	19.78 ±5.63	17.67 ±4.53[a]
观察组	44	10.33 ±4.15	14.56 ±4.79[a]	15.78 ±3.68	11.34 ±3.37[a]	20.59 ±5.48	15.14 ±4.69[a]
t 值		0.609	3.145	0.208	2.933	0.683	2.290
P 值		0.544	0.002	0.835	0.004	0.495	0.024

注:与治疗前对比,[a]$P<0.05$

疗手段[7,10-11]。现有研究结果已经证实,乳腺癌患者机体存在一定的免疫抑制,且研究表明其抑制程度越严重,整体临床预后越差[12]。乳腺癌肿瘤细胞免疫耐受与肿瘤快速生长和转移息息相关,也是患者临床预后恶化的重要因素[13]。细胞免疫在抗肿瘤作用中是最主要的执行者,T 淋巴细胞,自然杀伤细胞和巨噬细胞在肿瘤微环境中发挥着主要的抗肿瘤免疫应答功能,而体液免疫通常起到协助作用[14]。在抗肿瘤细胞免疫中,活化的细胞毒性 T 细胞被认为是最重要的效应细胞,可通过诱导肿瘤细胞凋亡发挥作用,因此也被认为是人体对抗肿瘤的防御最前线。细胞毒性 T 淋巴细胞主要包括 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 淋巴细胞,$CD8^+$ T 细胞为主要效应执行细胞但其激活又依赖于 $CD4^+$ T 细胞所分泌的 Th 细胞因子[15]。白海亚和马秀芬[16]研究发现 CAF 新辅助化疗方案可以有效提高外周血 $CD3^+$、$CD4^+$ T 细胞以及自然杀伤细胞数量,降低 $CD8^+$ T 细胞数量,增加 $CD4^+/CD8^+$ 比例,与本研究结果基本一致,提示有效的新辅助化疗方案在抑制肿瘤增殖同时可以改善患者免疫功能。

此外,生物调节剂也是活化机体免疫功能从而发挥抗肿瘤作用的重要治疗手段之一。香菇多糖是指从优质香菇子实体中提取出来的一种多聚葡糖,具有很强免疫调节能力和抗肿瘤活性,还具有抗氧化、降血脂、抗病毒等多种药理功能,近年来在临床中得到广泛应用[17]。向冬晴和洛若愚发现香菇多糖可以有效改善Ⅳ期宫颈癌化疗患者 T 淋巴细胞免疫功能,提高化疗效果并减轻化疗不良反应[18]。龙爱娥[19]也发现,香菇多糖可以增强老年卵巢癌患者中化疗效果,并可以抑制实体瘤的生长和有助于控制恶性腹水。本研究结果发现香菇多糖可以有效降低肿瘤组织微环境中 $CD4^+$ T 细胞,同时上调 $CD8^+$ T 细胞比例,$CD4^+$ T 细胞在肿瘤微环境中主要分化为调节性 T 细胞,而抑制免疫系统对机体的杀伤作用,$CD8^+$ T 细胞主要分化为细胞毒性 T 细胞,而杀伤肿瘤细胞,香菇多糖通过降低 $CD4^+$ T 细胞、提高 CD^+ T 细胞,进而增强对肿瘤细胞的杀伤作用。

外周血中 $CD4^+$ T 细胞可根据其分泌细胞因子的不同分为 Th1 和 Th2 细胞,研究证实 IL-6 因子可刺激其向 Th1 细胞方向分化,而 IL-10 因子则刺激其向 Th2 方向分化[20-23]。当 Th1 细胞下调而 Th2 上调,即所谓的 Th1/Th2 漂移往往会导致机体整体免疫功能下降,而 Th1 细胞具有抗肿瘤作用,因此也会降低机体抗肿瘤作用[24]。本研究结果发现香菇多糖可以有效降低血清 IL-10 和 TGF-β1 浓度,提高 IL-6 浓度,同时可以提高外周血 $CD4^+$ T 细胞水平和 $CD4^+/CD8^+$ 细胞比例。TGF-β1 可以调节细胞表型,抑制免疫细胞增殖、淋巴细胞分化和细胞因子差生,在细胞的生长、分化和免疫功能中具有重要的调节作用[25],表明香菇多糖可以有效促进乳腺癌患者细胞免疫向 Th1 漂移,增强机体对肿瘤细胞的杀伤作用。

综上所述,香菇多糖可以有效改善乳腺癌患者机体免疫功能,调节肿瘤组织中浸润淋巴细胞免疫状态,但目前关于香菇多糖的抗肿瘤机制尚不明确,且目前研究多为单中心,小样本观察性研究,其在肿瘤中所发挥的确切作用仍需进一步深入研究。

参考文献

[1] ROJAS K, STUCKEY A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors[J]. Clin Obstet Gynecol, 2016, 59(4): 651-672.

[2] RAHMAN M, AHSAN A, BEGUM F, et al. Epidemiology, Risk Factors and Tumor Profiles of Breast Cancer in Bangladeshi underprivileged women[J]. Gulf J Oncolog, 2015, 1(17): 34-42.

[3] KHAN AM, YUAN Y. Biopsy variability of lymphocytic infiltration in breast cancer subtypes and the ImmunoSkew score[J]. Sci Rep, 2016, 6: 36231.

[4] KALBASI A, BEATTY GL, BERMAN AT. Expanding Tumor Lymphocytic Infiltration as a Prognostic Tool to Patients with NSCLC Who Are Treated with Radiotherapy? [J]. J Thorac Oncol, 2016, 11(11): e141-e142. DOI: 10.1016/j.jtho.2016.07.029.

[5] BRAHA M, CHIKMAN B, HABLER L, et al. Lymphocytic Infiltration as a Prognostic Factor in Patients With Colon Cancer[J]. Int J Surg Pathol, 2016, 24(1): 16-23.

[6] PLITAS G, KONOPACKI C, WU K, et al. Regulatory T Cells Exhibit Distinct Features in Human Breast Cancer[J]. Immunity, 2016, 45(5): 1122-1134.

[7] FREIER CP, KUHN C, ENDRES S, et al. FOXP3 + Cells Recruited by CCL22 into Breast Cancer Correlates with Less Tumor Nodal Infiltration[J]. Anticancer Res, 2016, 36(6): 3139-3145.

[8] ASANO Y, KASHIWAGI S, GOTO W, et al. Tumour-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer[J]. Br J Surg, 2016, 103(7): 845-854.

[9] YIN X, YING J, LI L, et al. A meta-analysis of lentinan injection combined with chemotherapy in the treatment of nonsmall cell lung cancer[J]. Indian J Cancer, 2015, 52 (Suppl 1): e29-e31. DOI: 10.4103/0019-509X.168953.

[10] FANG J, XIAO L, JOO KI, et al. A potent immunotoxin targeting fibroblast activation protein for treatment of breast cancer in mice [J]. Int J Cancer, 2016, 138(4): 1013-1023.

[11] GARCIA-TEIJIDO P, CABAL ML, FERNANDEZ IP, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple Negative Breast Cancer: The Future of Immune Targeting[J]. Clin Med Insights Oncol, 2016, 10 (Suppl 1): 31-39.