

放射治疗对肺癌患者 IL-18、sMICA 及 NK 细胞的影响

白璐, 张晶晶, 高东奇, 刘承一, 于晓磊, 李文鑫, 李青山

(承德医学院附属医院 肿瘤科, 承德 067000)

摘要: 为探讨肺癌患者放射治疗(简称放疗)前及放疗不同阶段 NK 细胞存活率及 IL-18、可溶性 MHC-I 类链相关蛋白 A(soluble MHC class I-related chain A, sMICA)浓度变化, 对肿瘤科收治的 30 例肺癌放疗患者, 通过 ELISA 检测 IL-18、sMICA 浓度, 应用磁珠分选检测 NK 细胞存活率。结果显示, sMICA 浓度在放疗前最低, 而在放疗后, 随着放疗剂量的增加逐渐降低($P < 0.05$); IL-18 浓度随着放疗剂量的增加并无明显变化, 且与放疗前无显著差异($P > 0.05$); NK 细胞活性在放疗后与放疗前无显著差异, 且不随剂量增加而明显变化($P > 0.05$)。由此, 放疗对肺癌患者外周血中 NK 细胞的存活率和 IL-18 浓度无明显影响; 放疗可降低患者外周血中肿瘤抗原 sMICA 浓度, 表明肿瘤免疫逃逸功能被抑制, 放疗可间接增强机体的免疫功能。

关键词: 肺癌; 放疗; 白细胞介素 18; 可溶性 MHC-I 类链相关蛋白 A; 自然杀伤细胞

中图分类号: R735.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)04-0307-05

放射治疗(简称放疗)是肺癌的主要治疗方法之一, 约有 70% 的肿瘤患者需要接受放疗。它实现了良好的肿瘤局部控制, 通过直接或间接 DNA 损伤并影响肿瘤血供系统和免疫系统从而抑制肿瘤生长, 但放疗对机体免疫功能的影响目前尚不明确。鉴于此, 并对以往的研究进行分析, 考虑 IL-18 是机体主要的细胞因子, 可溶性 MHC-I 类链相关蛋白 A(soluble MHC class I-related chain A, sMICA)是机体内肿瘤相关抗原, 故本研究选择 NK 细胞、IL-18、sMICA 等与免疫相关的指标, 通过检测分析其在晚期肺癌患者局部放疗前后的变化, 以了解放疗对机体免疫状态的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择 2017 年 4 月至 2018 年 1 月期间于承德医学院附属医院肿瘤科就诊的肺癌患者进行筛查, 纳入对象为经组织病理学及影像学检查明确为不可手术的肺癌患者。该计划已得到我院伦理委员会的批准, 患者及家属均已签署知情同意书。

1.2 入组标准 患者的入组标准: (1)年龄介于

18~75 岁间; (2)组织病理学检查诊断为肺癌; (3)初次接受胸部放疗; (4)心、肝、肾功能正常; (5)预计生存时间大于 3 个月; (6)白细胞(white blood cell, WBC): $3.5 \times 10^9 \sim 9.5 \times 10^9$ 个/L; 血小板(blood platelet, PLT): $1.25 \times 10^{11} \sim 3.5 \times 10^{11}$ 个/L; 血红蛋白(hemoglobin, HGB): 115~150 g/L; (7)治疗期间未使用激素或增加免疫力的药物。

1.3 放疗方法 放疗前患者在模拟定位机下进行定位。定位边界: 上界为环状软骨; 下界为肝脏组织下缘。全程常规分割照射, 6MV-X 线, 应用调强放射治疗技术, 6 000 cGy/30 次, 6 周为 1 个周期。放疗结束后 1 个月完善胸部 CT, 进行疗效评估。

1.4 研究方法

1.4.1 ELISA 检测患者血清 sMICA、IL-18 水平

ELISA 检测受试对象 IL-18、sMICA 水平(主要试剂及试剂盒由北京康泰合元生物技术有限公司提供)。

操作步骤: 将成倍数稀释的包被有特异性抗体的球蛋白加入凹孔中, 并以蒸馏水为空白对照组, 37℃温育 1 h, 移去包被液并洗涤 3 次; 洗涤结束后加入含有抗原的被检标本, 37℃温育 1 h, 弃去孔内液体, 洗涤 3 次, 并于吸水纸上轻拍酶标板以甩除孔内剩余液体; 加入辣根过氧化物酶进行标记, 37℃温育 30 min, 弃液, 洗涤 3 次; 加入底

收稿日期: 2018-12-06

基金项目: 承德市科技计划支撑项目(201701A036)

作者简介: 白璐(1984—), 女, 硕士生, 主治医师, 主要从事肿瘤治疗研究

通信作者: 李青山(E-mail: libing200865@126.com)

物溶液, 酶标板覆膜, 37 ℃ 避光显色 10 ~ 20 min; 最后加入终止液停止反应, 此时液体由蓝色立转黄色, 再用酶标仪检测光密度 $D(450\text{ nm})$ 。

1.4.2 免疫磁珠法检测患者 NK 细胞存活率 用免疫磁珠法检测患者外周血 NK 细胞存活率。从患者血液中纯化出外周血单核细胞, 磁珠标记 NK 细胞, 收集 10^8 个, $300 \times g$ 离心 10 min; 弃上清, 加入 300 μL 缓冲液重悬细胞, 再加入 100 μL HBS, 充分混合, 2~8 ℃ 孵育 15 min; 加入 5~10 mL 缓冲液洗涤细胞, $300 \times g$ 离心 10 min, 弃上清, 加入 500 μL 缓冲液重悬细胞。磁珠分选: 将 LD 柱放置在磁力架上, 用 2 mL 缓冲液润洗柱子, 将细胞悬液加入柱子, 收集流出液, 用 1 mL 缓冲液滤洗柱子 2 次。NK 细胞收集: 将分选柱从磁场中取出, 加入 0.5 mL NK 细胞分离缓冲液, 将细胞冲洗下来, 并用 2.5 mL NK 细胞分离缓冲液冲洗, 此时收集的细胞为 $\text{CD}56^+$ NK 细胞。收集分选后的 NK 细胞, 用锥虫蓝染色, 200 倍显微镜下观察并记录细胞个数, 活细胞数与总细胞数之比为 NK 细胞存活率。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。放疗前后数据应用单因素重复测量方差分析。放疗不同时期细胞因子浓度变化应用两因素重复测量方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般信息 本试验入组的 30 例患者均为不可切除的局部晚期肺癌, 其一般情况统计见表 1。

表 1 30 例患者基本情况表

类目	<i>n</i>	百分比(%)
性别		
男性	16	53.3
女性	14	46.7
年龄		
< 60 岁	14	46.7
≥ 60 岁	16	53.3
病理类型		
非小细胞肺癌	13	43.3
小细胞肺癌	17	56.7

2.2 患者放疗前后 IL-18、sMICA 浓度和 NK 细胞存活率变化 血清 IL-18 浓度在放疗前及放疗剂量 2 000、4 000、6 000 cGy 时并无明显变化 ($P > 0.05$), 即放疗与否和放疗剂量对患者 IL-18 的分泌量无影响。血清 sMICA 浓度在放疗前及放疗剂量 2 000、4 000、6 000 cGy 时随着放疗剂量的增加逐渐降低 ($P < 0.05$)。NK 细胞存活率在放疗前及放疗剂量 2 000、4 000、6 000 cGy 时随着放疗剂量的增加未见明显变化 ($P > 0.05$)。(表 2、图 1~4)

表 2 放疗前后及不同剂量下 IL-18、sMICA 浓度和 NK 细胞存活率比较

类目	IL-18	sMICA	NK 细胞存活率(%)
放疗前	115.57±61.48	291.91±13.65	93.54±2.16
2 000 cGy	135.03±73.23	234.24±16.45	94.70±2.32
4 000 cGy	151.57±85.79	211.61±6.36*	94.95±2.19
6 000 cGy	116.00±57.55	191.53±14.31*	93.77±2.89
<i>F</i> 值	2.624	331.955	2.264
<i>P</i> 值	0.56	0.00	0.87

注: 与放疗前比较, * $P < 0.05$

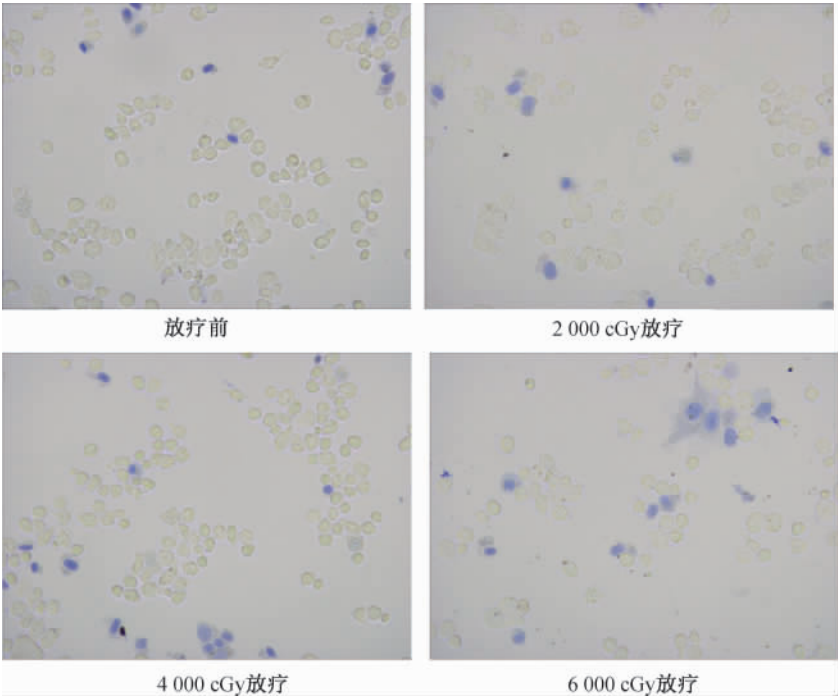


图 1 不同治疗时期 NK 细胞数量比较 (×200)

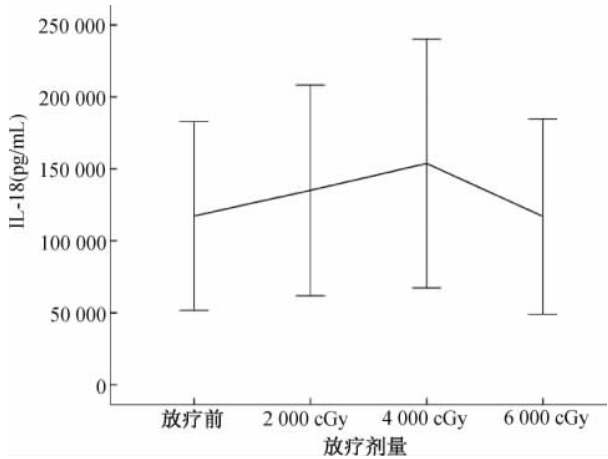


图 2 不同治疗时期血清 IL-18 浓度变化

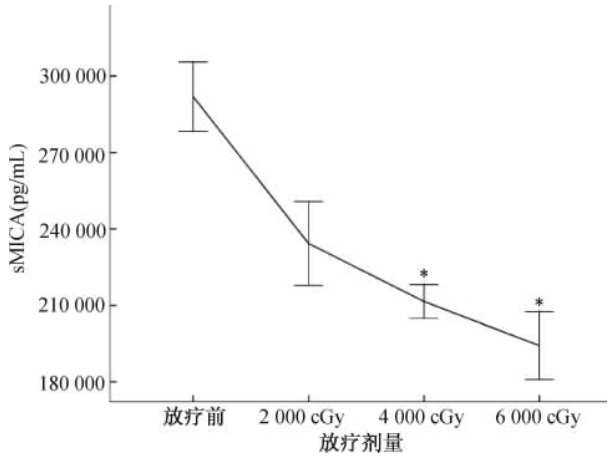


图 3 不同治疗时期血清 sMICA 浓度变化

注：与放疗前相比，* $P < 0.05$

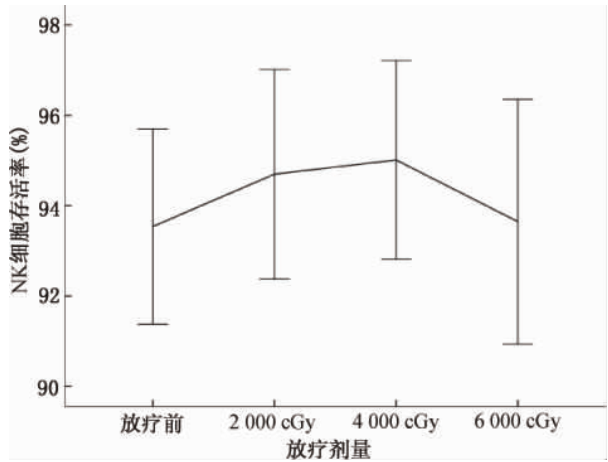


图 4 不同治疗时期 NK 细胞存活率变化

3 讨论

机体内的 MICA 以膜型和分泌型 2 种形式存在，膜型(mMICA)与 NKG2D 相结合，可直接活化 NK 细胞，起到杀伤肿瘤的作用；肿瘤细胞死亡后，MICA 脱落到外周血中，形成 sMICA。sMICA 属于肿瘤相关抗原，它能与 NKG2DR 相结合，抑制 NK 细胞的免疫活性，参与肿瘤的免疫逃逸^[1]。肿瘤的进展提高了 sMICA 水平，进一步抑制了 NK 细胞的免疫功能。有研究表明，肿瘤患者血清中的 sMICA 水平较良性疾病及健康人群显著升高，且肿瘤分期愈晚，sMICA 水平愈高，手术

治疗前高于治疗后,进一步证明 sMICA 参与了肿瘤的免疫逃逸^[2-3]。已有研究证明大分割放疗可导致机体免疫状态的改变^[4-5],但目前临床并没有讨论常规分割是否引起远隔效应。本研究采用常规分割方式,放疗前与放疗 2 000、4 000、6 000 cGy 时 sMICA 浓度逐渐下降,表明放疗能够抑制肿瘤的免疫抑制功能,对机体免疫功能有促进作用;但 sMICA 浓度降低后 NK 细胞并未被抑制,存活率并未下降,考虑可能是放疗过程中肿瘤微环境中的各种因素可抑制 NK 细胞反应,其中包括 TGF- β 、髓源性抑制细胞、Treg、低 pH 值和氧含量等,这些因素的综合作用导致 NK 细胞存活率保持稳定,且 IL-18 也在调控 NK 细胞活性方面起到一定作用。

IL-18 是在动物模型中发现的一种细胞因子^[6],主要由巨噬细胞产生,试验证明,IL-18 能够促进 T 淋巴细胞增殖,诱导其产生 IFN- γ ^[7-8]。IL-18 还能作用于机体的 NK 细胞,调控 NK 细胞活性,使其发挥抗肿瘤作用。在小鼠模型中,IL-18 能够用于治疗肺癌、乳腺癌、白血病、淋巴瘤及骨髓瘤等恶性肿瘤^[9-11]。体外试验表明 IL-18 能够促进胰腺癌的转移,缩短小鼠生存时间^[12]。NK 细胞通过直接接触和 ADCC 效应对多种肿瘤细胞和病毒感染细胞有较强的杀伤作用,IL-18 同样可以在体外诱导 NK 细胞活化^[13-14],而静止的 NK 细胞必须经活化后才能发挥杀伤作用。在此次研究中,IL-18 在放疗前与放疗 2 周浓度相比差异无统计学意义($P=0.465$)。放疗前与放疗 4、6 周浓度相比较差异有统计学意义($P<0.05$),总体结论为放疗前后 IL-18 浓度并无异常。目前关于常规分割放疗对肺癌患者免疫功能的影响仍然未知,故需继续进行大量检测及研究,探究常规分割放疗与免疫功能的关系。

参考文献

- [1] 丁军颖,王润田.人 MICA 基因多态性和表达特性与肿瘤的关系[J].现代免疫学,2007,27(2):165-168.
- [2] Liu Y, Guo X, Xing M, *et al.* Prognostic value of serum levels of soluble MICA (sMICA) in patients with prostate cancer[J]. Br J Biomed Sci, 2018, 75(2): 98-100.
- [3] 王云炎,徐宗源,孟峻嵩,等. MICA 基因与肿瘤[J]. 国际肿瘤学杂志,2013,40(4): 243-246.
- [4] Herrera FG, Bourhis J, Coukos G. Radiotherapy combination opportunities leveraging immunity for the next oncology practice[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 65-85.
- [5] Muroyama Y, Nirschl TR, Kochel CM, *et al.* Stereotactic radiotherapy increases functionally suppressive regulatory T cells in the tumor microenvironment[J]. Cancer Immunol Res, 2017, 5(11): 992-1004.
- [6] Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, *et al.* Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cell[J]. Nature, 1995, 387(6552): 88-91.
- [7] Avanzi MP, Yeku O, Li XH, *et al.* Engineered tumor-targeted T cells mediate enhanced anti-tumor efficacy both directly and through activation of the endogenous immune system[J]. Cell Rep, 2018, 23(7): 2130-2141.
- [8] Esmailbeig M, Ghaderi A. Interleukin-18: A regulator of cancer and autoimmune diseases[J]. Eur Cytokine Netw, 2017, 28(4): 127-140.
- [9] Tse BW, Russell PJ, Lochner M, *et al.* IL-18 inhibits growth of murine orthotopic prostate carcinomas via both adaptive and innate immune mechanisms[L]. PLoS One, 2011, 6(9): e24241.
- [10] Yamanishi K, Mukai K, Hashimoto T, *et al.* Physiological and molecular effects of interleukin-18 administration on the mouse kidney[J]. J Transl Med, 2018, 16(1): 51.
- [11] 徐玢,马小彤,董成亚,等. 小鼠 IL-18 基因修饰瘤苗的抗白血病作用研究[J]. 现代免疫学,2007,27(4): 274-278.
- [12] 郭兴军. 白介素 18 对胰腺癌免疫治疗作用及其机制的研究[D]. 武汉:华中科技大学,2015.
- [13] 王晓梦,李玲,于津浦,等. 四种 NK 细胞体外扩增方案的比较[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2013,20(3): 336-341.
- [14] Senju H, Kumagai A, Nakamura Y, *et al.* Effect of IL-18 on the expansion and phenotype of human natural killer cells: Application to cancer immunotherapy[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(3): 331-340.

[1] 丁军颖,王润田.人 MICA 基因多态性和表达特性与肿瘤的

The effect of radiation therapy on IL-18, sMICA and NK cell of patients with lung cancer

BAI Lu, ZHANG Jing-jing, GAO Dong-qi, LIU Cheng-yi, YU Xiao-lei, LI Wen-xin, LI Qing-shan
(Oncology Department, The Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

Abstract: In order to investigate the survival rate of NK cells and the changes of IL-18 and soluble MHC class I-related chain A (sMICA) concentrations in different stages of radiation therapy (referred to as radiotherapy) for lung cancer patients, we detected IL-18 and sMICA by ELISA and NK cell survival rate by magnetic bead sorting in 30 patients with lung cancer treated by radiotherapy in the Oncology Department. The results showed that the concentration of sMICA before radiotherapy was generally lower than post-radiotherapy, while among the different dosage groups, the concentration of sMICA decreased gradually with the increase of radiation dose ($P < 0.05$) (2 000, 4 000, 6 000 cGy), while the concentration of IL-18 did not change significantly with the increase of radiotherapy dosage ($P > 0.05$). NK cell activity did not change significantly with the increase of radiotherapy dosage ($P > 0.05$). In conclusion, radiation has no significant effect on the survival rate of NK cells in the peripheral blood of lung cancer patients and does not affect the killing effect of NK cells on tumor cells. Radiotherapy can reduce the sMICA concentration in patients' peripheral blood, indicating that the tumor escape is inhibited and thus indirectly enhances the body's immune function.

Key words: lung cancer; radiation therapy; interleukin 18; soluble MHC class I-related chain A; natural killer cell