

非小细胞肺癌的化疗联合免疫治疗中 树突状细胞与自然杀伤细胞间对话调控的机制研究

孙泽辉¹ 张彦²

【摘要】 目的 探究非小细胞肺癌的化疗联合免疫治疗中树突状细胞(Dendritic Cells, DC)与自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)间对话调控(Cross-talk)的调控机制。方法 采用重复测量设计:非小细胞肺癌患者(性别不拘)需进行细胞治疗的患者60例。将60例病人随机分为两组($n=30$):对照组,化疗前一周实施肿瘤DC疫苗联合CIK、NK细胞方案;试验组,化疗后一周实施肿瘤DC疫苗联合CIK、NK细胞方案。共设置4个测量时间点:治疗前24h、治疗后48h、治疗后1W、治疗后4W。使用ELISA法监测患者血清中可溶性细胞因子的表达,包括IL-12、IL-18、IL-15、分泌型TNF- α 以及IFN- γ 。结果 试验组和对照组血清中的IL-12、IL-18和IL-15在治疗前均无差异($P<0.05$)。实施治疗后,试验组患者血清中DC细胞相关可溶性细胞因子的表达较时间点的对照组数据明显增高,IL-12($P<0.05$),IL-18($P<0.05$),IL-15($P<0.05$);其表达在治疗后1W达到峰值,其峰值维持治疗后4W($P<0.05$)。结论 在化疗治疗之后进行免疫细胞治疗,免疫细胞间Cross-talk的调控诱发的DC细胞和NK细胞间的正反馈作用显著增强。

【关键词】 非小细胞肺癌;化疗;免疫治疗;树突状细胞;自然杀伤细胞;调控机制

Study on regulation mechanism of cross-talking of NK and DC in non-small cell lung cancer by chemotherapy combined with immunotherapy ZHANG Ze-hui, ZHANG Yan the Third Hospital of Tangshan, Tangshan, Hebei 063100, China

【Abstract】 Objective To study the regulation mechanism of cross-talking of NK and DC in non-small cell lung cancer by chemotherapy combined with immunotherapy. **Methods** The repeated measure design was adopted. 60 patients with non-small cell lung cancer were randomly divided into 2 groups ($n=30$). In the control group, the tumor DC vaccine combined with CIK and NK cells was implemented in the previous week. In the experimental group, the tumor DC vaccine combined with CIK and NK cells was carried out one week after chemotherapy. A total of 4 time points were set, including before and 24 h, 48 h and 4 w after treatment. ELISA method was used to monitor the expression of soluble cytokines in serum, including IL-12, IL-18, IL-15, TNF- α and IFN- γ . **Results** There was no difference in IL-15, IL-18 and IL-12 between the experimental group and the control group ($P<0.05$). After the treatment, the serum levels of DC cells, IL-12, IL-18, and IL-15 in the experimental group were significantly higher than that in the control group ($P<0.05$), and the expression reached the peak 1w after treatment, and lasted for 4 Ws ($P<0.05$). **Conclusion** After chemotherapy treatment, the positive feedback between DC cells and NK cells induced by Cross-talk is significantly enhanced by immune cell therapy.

【Key words】 non small cell lung cancer; chemotherapy; immunotherapy; dendritic cells; natural killer cells; regulation and control mechanism

目前,恶性肿瘤已成为一种世界范围的多发病、常见病^[1]。非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC) NSCLC 约占所有肺癌的80%,约75%的患者发现时已处于中晚期,5年生存率较低^[2]。化疗不能治愈NSCLC,只能适当延长患者的生存时间。生物免疫治疗(Biological immunothera-

py)是新型的治疗肿瘤的方法^[3],是利用树突状细胞(Dendritic cell, DC)细胞和自然杀伤细胞(Natural killer cell, NK)联合杀灭癌细胞。生物免疫治疗具有强大的抗原提呈能力,可以激活并且调动患者产生免疫反应,从而杀伤癌细胞,并且生物免疫治疗还能够提升化疗的治疗效果,同时减轻化疗的副作用。

目前,化疗和免疫细胞治疗的配合使用在临床愈来愈常见,但其配合使用的时间切入点却并不统一,业内一直存在争议。免疫细胞间对话调控

doi: 10.3969/j.issn.1009-6663.2016.06.036

作者单位:1. 630100 河北唐山,唐山市第三医院

2. 063100 河北唐山,唐山市妇幼保健院

(Cross-talk)的过程是免疫细胞相互激活的正反馈机制,对于免疫细胞在体内的活性具有非常重要的激活作用和调控作用,故而化疗和免疫细胞治疗的配合使用的时间切入点对于免疫细胞间 Cross-talk 的调控过程的影响是造成不同化疗和细胞治疗联合疗效差异的重要原因。

本研究即力图探究化疗和免疫细胞治疗的配合使用的时间切入点对化疗和细胞治疗联合疗效的差异及其影响对免疫细胞间 Cross-talk 的调控过程的分子机制。

资料与方法

一、主要试剂及仪器

人白介素-12(Interleukin-12,IL-12) ELISA 检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司);人白介素-18(Interleukin-18,IL-18) ELISA 检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司);人IL-15 ELISA 检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司);人分泌型肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α ,TNF- α) ELISA 检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司);人干扰素-C(Interferon-C,IFN-C) ELISA 检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)

二、研究方案

1. 医学伦理原则

试验方案上报医学伦理委员会审查,得到批准后方行试验;所有病人均于试验前了解试验全部过程并签署知情同意书。

2. 试验对象准入和排除标准以及伦理学考量

(1) 试验受试者的筛选标准: NSCLC,临床分期 III 期,病灶单发,没有远处转移并行根治性切除;年龄 > 16 岁;临床病理及术后随访资料完整者;能够进行外周血单采的肿瘤患者;卡氏体力状况评分标准 60 分以上;预计生存期至少大于 3 个月;白细胞不低于 $3.0 \times 10^9/L$ 、淋巴细胞绝对值不小于 0.8 至 $4 \times 10^9/L$ 、红细胞压积不低于 30%;血红蛋白不低于 80 g/L;血小板不低于 $70 \times 10^9/L$;凝血 PT20s 以内。

(2) 试验受试者的排除标准: 复发肿瘤或有与癌症相关疾病;接受其他针对肿瘤的新辅助治疗;初次手术为姑息性手术;采血失败、细胞培养失败、回输反应严重或者患者退出试验。

(3) 失联原因及其应对措施: 预计原因: ①患者中途退出试验;②患者在试验过程中转院治疗;应对

措施:按照 1:1 比例相应补充受试患者进试验组。

(4) 伦理学考量: ①患者及其直系家属在充分了解研究的过程的基础之上签署参与该临床研究的知情同意书;②入选患者相关诊治和监护措施均以临床指南相关原则为依据,对患者的医疗治疗和安全有充分保障。③对入选患者的信息及诊疗记录予以保密,保护患者的隐私权。④在中国临床试验注册中心注册试验方案,试验中遵循《渥太华工作组关于临床试验注册的声明》(Ottawa Group Statement for Clinical Trial Registration)。

3. 试验设计和分组

采用重复测量设计: NSCLC 患者(性别不拘)需进行细胞治疗的患者 60 例。

通过随机数字发生器将 60 例病人随机分为两组($n=30$): 对照组,化疗前一周实施肿瘤 DC 疫苗联合细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer,CIK)、NK 细胞方案;试验组,化疗后一周实施肿瘤 DC 疫苗联合 CIK、NK 细胞方案。

共设置 4 个测量时间点: ①治疗前 24 h;②治疗后 48 h;③治疗后 1W;④治疗后 4W。

4. 试验干预

(1) 化疗方案: ① TP 方案: 紫杉醇 $135 \text{ mg}/\text{m}^2$ 第一天,顺铂 $80 \sim 100 \text{ mg}/\text{m}^2$ 分 3 天应用,21 天 1 疗程,做 2 个疗程。② NP 方案: 盐酸阿霉素 $25 \text{ mg}/\text{m}^2$ 第 1、8 天,顺铂 $80 \sim 100 \text{ mg}/\text{m}^2$ 分 3 天应用,21 天 1 疗程,做 2 个疗程。③ GP 方案: 盐酸吉西他滨 $1250 \text{ mg}/\text{m}^2$ 第 1、8、15 天,顺铂 $80 \sim 100 \text{ mg}/\text{m}^2$ 分 3 天应用,28 天 1 疗程,做 2 个疗程。

(2) 细胞治疗方案

① 采血: 尽量在患者淋巴细胞 + 单核细胞绝对值大于 $2.0 \times 10^9/L$ 时采集外周血,如果低于该值,则一周后再行采集外周血。如果患者体质较差,可以选择直系亲属外周血或脐带血作为免疫细胞的来源。

$$\text{计算公式: 采血量 (mL)} = \frac{80}{\text{淋巴细胞绝对值}} \times 10^9$$

② 免疫细胞的分选和体外扩增: 该步骤的分选通过流式细胞仪完成,免疫细胞的体外扩增在细胞实验室内将免疫细胞置于无血清培养液中在 CO_2 内完成。

③ 免疫细胞悬液的回输: 免疫细胞的回输在采血后的第 14、16 和 18 天进行,通过外周静脉穿刺置管分三次回输,回输的免疫细胞总量是 1×10^{10} 。

三、患者血清检测指标(DC与NK间 Cross-talk 的调控机制)

患者血清中可溶性细胞因子的表达:患者血清中 IL-12 的表达水平(检测方法:ELISA);患者血清中 IL-18 的表达水平(检测方法:ELISA);患者血清中 IL-15 的表达水平(检测方法:ELISA);患者血清中分泌型 TNF- α 的表达水平(检测方法:ELISA);患者血清中 IFN- γ 的表达水平(检测方法:ELISA)。

四、统计学分析

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS20.0 统计学软件进行分析,计量资料采用重复测量设计方差分析 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 示差异有统计学意义。

结 果

一、患者血清中 DC 细胞相关的可溶性细胞因子的表达:

试验组和对照组血清中的 IL-12、IL-18 和 IL-15 在治疗前均无差异 ($P < 0.05$)。实施治疗后,试验组患者血清中 DC 细胞相关可溶性细胞因子的表达较时间点的对照组数据明显增高,IL-12 ($P < 0.05$), IL-18 ($P < 0.05$), IL-15 ($P < 0.05$);而且,其表达在治疗后 1W 达到峰值,其峰值维持治疗后 4W ($P < 0.05$) (表 1~3)。

表 1 患者血清中 IL-12 的表达水平(ELISA ng/L) ($\bar{x} \pm s$ $n=30$)

组别	对照组	试验组	P 值	F 值
治疗前 24 h	58.12 \pm 13.61	60.16 \pm 12.46	$P > 0.05$	16.01
治疗后 48 h	82.52 \pm 10.81	93.97 \pm 10.24	$P < 0.05$	29.95
治疗后 1 W	99.82 \pm 11.14	119.75 \pm 10.92	$P < 0.05$	19.86
治疗后 4 W	80.01 \pm 8.05	89.99 \pm 9.04	$P < 0.05$	55.86
P 值	$P < 0.05$	$P < 0.05$		
F 值	13.93	10.03		

表 2 患者血清中 IL-18 的表达水平(ELISA ng/L) ($\bar{x} \pm s$ $n=30$)

组别	对照组	试验组	P 值	F 值
治疗前 24 h	60.23 \pm 10.33	57.14 \pm 8.53	$P > 0.05$	18.85
治疗后 48 h	85.02 \pm 10.25	99.07 \pm 8.14	$P < 0.05$	10.07
治疗后 1 W	95.39 \pm 12.04	122.35 \pm 12.88	$P < 0.05$	42.32
治疗后 4 W	75.42 \pm 10.81	95.22 \pm 13.05	$P < 0.05$	25.56
P 值	$P < 0.05$	$P < 0.05$		
F 值	18.96	27.13		

二、患者血清中 NK 细胞相关的可溶性细胞因子的表达

试验组和对照组血清中的 TNF- α 和 IFN- γ 在治疗前均无差异 ($P < 0.05$)。试验组患者血清中

DC 细胞相关可溶性细胞因子的表达较时间点的对照组数据明显增高,分泌型 TNF- α ($P < 0.05$), IFN- γ ($P < 0.05$);而且,其表达在治疗后 1W 达到峰值,其峰值维持治疗后 4W ($P < 0.05$) (表 4、5)。

表 3 患者血清中 IL-15 的表达水平(ELISA ng/L) ($\bar{x} \pm s$ $n=30$)

组别	对照组	试验组	P 值	F 值
治疗前 24 h	19.66 \pm 3.55	21.18 \pm 4.57	$P > 0.05$	25.36
治疗后 48 h	62.51 \pm 9.95	77.97 \pm 10.814	$P < 0.05$	10.01
治疗后 1 W	100.02 \pm 11.74	112.89 \pm 12.34	$P < 0.05$	55.93
治疗后 4 W	71.22 \pm 10.52	85.03 \pm 15.25	$P < 0.05$	29.85
P 值	$P < 0.05$	$P < 0.05$		
F 值	9.99	18.21		

表 4 患者血清中分泌型 TNF- α 的表达水平(ELISA μ g/L) ($\bar{x} \pm s$ $n=30$)

组别	对照组	试验组	P 值
治疗前 24 h	0.95 \pm 0.12	0.92 \pm 0.15	$P > 0.05$
治疗后 48 h	1.29 \pm 0.16	1.77 \pm 0.19	$P < 0.05$
治疗后 1 W	1.46 \pm 0.18	1.98 \pm 0.21	$P < 0.05$
治疗后 4 W	1.10 \pm 0.15	1.65 \pm 0.11	$P < 0.05$
P 值	0.000	0.000	
F 值			

表 5 患者血清中 IFN- γ 的表达水平(ELISA ng/L) ($\bar{x} \pm s$ $n=30$)

组别	对照组	试验组	P 值
治疗前 24 h	13.02 \pm 0.52	12.59 \pm 0.56	$P > 0.05$
治疗后 48 h	17.32 \pm 0.95	24.07 \pm 1.31	$P < 0.05$
治疗后 1 W	19.58 \pm 1.42	29.01 \pm 2.92	$P < 0.05$
治疗后 4 W	15.45 \pm 1.38	20.74 \pm 1.85	$P < 0.05$
P 值	0.000	0.000	
F 值			

讨 论

NK 细胞与 DC 细胞有密切关系,后者可激活前者,从而促进 NK 细胞杀伤靶细胞;前者也可作用后者,促进 DC 细胞成熟^[4]。两者的协调沟通作用通过细胞间的可溶性细胞因子来实现,该生物效应称免疫细胞间的对话(Cross-talking)。DC 可以有助于激活 NK 细胞,DC 细胞上的多种分泌型细胞因子参与激活 NK 细胞并增强其细胞毒效应的功能。IL-12 是 DC 细胞成熟后的细胞因子,其促进 NK 细胞产生肿瘤坏死因子的凋亡配体和颗粒酶 B,最终产生细胞毒作用^[5,6]。IL-18 是 DC 未成熟时分泌的细胞因子,其可活化 NK 细胞,促进其活化和 IFN- γ ^[7,8]。IL-15 参与维持 NK 细胞的存活和增殖^[9,10]。NK 细胞亦可促进 DC 细胞的成熟和活化,

即NK细胞与DC的作用是相互的,NK细胞同样能促进DC的成熟。NK细胞与DC共育时产生大量TNF- α ,其是促进DC成熟的关键细胞因子^[11]。IFN- γ 在促进DC和NK细胞交流中与TNF- α 具有同样重要作用^[12]。GuanHB等^[13]明确地提出,来自NK细胞的IFN- γ 促进了两种细胞间的交流,促进DC产生IL-12和激活下游效应细胞。

在NSCLC的化疗联合免疫治疗中免疫细胞治疗与化疗配合使用的时间切入点对联合治疗效果及免疫细胞间Cross-talk调控的影响。免疫细胞间Cross-talk的调控过程是免疫细胞相互激活的正反馈机制,对于免疫细胞在体内的活性具有非常重要的激活作用和调控作用,故而化疗和免疫细胞治疗的配合使用的时间切入点对于免疫细胞间Cross-talk的调控过程的影响是造成不同化疗和细胞治疗联合疗效差异的重要原因^[14,15]。化疗和细胞治疗联合使用,其具有相互加强效果的益处。化疗后瘤组织崩解,肿瘤细胞的标记物在肿瘤周围的浓度会升高数倍,即化疗之后再行免疫细胞治疗,免疫细胞会更好地聚集到瘤体周围,其对肿瘤细胞的识别和杀灭效果会提高数倍。

本研究发现,在化疗治疗之后进行免疫细胞治疗,免疫细胞间Cross-talk的调控诱发的DC细胞和NK细胞间的正反馈作用显著增强,其疗效自然会显著提高。此外,免疫细胞的输注可以提高患者的免疫能力,使得患者可以更好地从化疗副作用的冲击中恢复。所以,本实验结果具有很大临床意义,即在化疗疗程开始之后实施免疫细胞治疗,对患者的益处显而易见,值得在临床广为推广。

总而言之,NK细胞与DC间相互激活的分子基础比较复杂,但总体可以看出膜结合分子和细胞因子在不同作用阶段和刺激条件下各自起着重要的作用。这一相互作用机制还有很多不清楚的地方,比如NK细胞与DC在不同环境中、不同刺激下相互作用时众多分子作用的具体过程、先后顺序等。而且可能还有更多的跨膜型和可溶性分子参与到这一过程,还需大量的工作来理清这一机制的作用方式。这对于理解在不同病理、生理条件下NK细胞与DC相互作用的免疫学意义和肿瘤治疗的免疫治疗均具有重要意义。

参考文献

[1] Avelino CU, Cardoso RM, de Aguiar SS, et al. Assessment of

quality of life in patients with advanced non-small cell lung carcinoma treated with a combination of carboplatin and paclitaxel [J]. *J Bras Pneumol*, 2015, 41(2): 133-142.

[2] Mavridis K, Gueugnon F, Petit-Courty A, et al. The oncomiR miR-497 is a novel prognostic indicator for non-small cell lung cancer patients [J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(9): 1527-1535.

[3] Center for Clinical Immunology HBRC-Human Biology Research Center in Nuclear Medicine and Biophysics Department and at the Sharett Institute of Oncology Research Center, University Hospital, Ein-Karem, Jerusalem, Israel.; Center for Clinical Immunology HBRC-Human Biology Research Center in Nuclear Medicine and Biophysics Department and at the Sharett Institute of Oncology Research Center University Hospital Ein-Karem Jerusalem Israel. Breast Cancer Treatment by Adipose-Derived Stem Cells: An Experimental Study [J]. *J Stem Cells*, 2015, 9(4): 211-217.

[4] Marcenaro E, Carlomagno S, Pesce S, et al. NK/DC crosstalk in anti-viral response [J] *Adv Exp Med Biol*, 2012, 946: 295-308.

[5] 田永菊, 崔保霞, 马道新, 等. 白细胞介素21及白细胞介素12单用或联合应用对子宫内膜癌患者外周血单核细胞抗肿瘤活性的影响[J]. *中国医学科学院学报* 2011, 33(3): 80-86.

[6] 翟欣辉, 魏绪仓, 韩秀蕊, 等. 脐血树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞协同抗急性白血病细胞效应及生物学活性研究[J]. *西安交通大学学报(医学版)* 2011, 32(1): 108-112.

[7] 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): 85-90.

[8] 钟连进, 叶巍, 文杰, 等. 重组人IL-18-EGF的双顺反子表达及其对NK细胞和肝癌细胞的影响[J]. *中国细胞生物学学报*, 2012, 34(8): 49-56.

[9] 王晓梦, 于津浦, 李慧, 等. IL-2+IL-15组合培养方案对乳腺癌患者外周血中NK细胞体外扩增的效果[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2013, 20(6): 29-35.

[10] 钟东佳, 黄永亨, 龙天柱, 等. 供肝NK细胞对肝移植免疫反应中NF- κ B活性和IL-15表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(12): 104-109.

[11] 王海, 刁宏燕, 崔光莹, 等. 甲型H1N1流感病人外周血免疫细胞和细胞因子水平变化[J]. *中国免疫学杂志* 2011, 27(2): 72-76.

[12] 林绮文, 吴长有. IFN- α 磷酸化STAT1和STAT4诱导人NK细胞产生IFN- γ 并增强其杀伤活性[J]. *免疫学杂志* 2011, 27(9): 22-25, 29.

[13] Guan HB, Moretto M, Bzik DJ, et al. NK Cells Enhance Dendritic Cell Response against Parasite Antigens via NKG2D Pathway [J] *IJ Immuno*, 2007, 179(5): 590-596.

[14] 田志刚, 魏海明, 孙沟, 等. NK细胞免疫识别及其调节机制与免疫相关性疾病[J]. *中国科学技术大学学报* 2008, 38(8): 32-40.

[15] 崔激, 王雅卓, 郝淑维, 等. 卵巢癌免疫生物学治疗策略研究进展[J]. *中国免疫学杂志* 2014, 30(9): 134-142.

[收稿日期: 2015-10-28]