

调强放疗前后外周血淋巴细胞及其亚群的变化分析

杨 婧^{1,2} 高 劲² 肖 亮^{1,3} 王 芬¹ 金问森¹ 熊 那^{1,4}

摘要 目的 分析肿瘤患者调强放疗(IMRT)前后外周血淋巴细胞和亚群的变化,探讨该变化对疗效的影响。方法 采用流式细胞仪(FCM)检测183例常见恶性肿瘤患者IMRT前后的外周血,其中66例行免疫功能检测,117例行调节性T(Treg)细胞检测。结果 IMRT可降低外周血中的淋巴细胞总数、CD3⁺T细胞、CD4⁺辅助性T(Th)细胞、CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg细胞以及B细胞的百分比,而CD8⁺抑制性/细胞毒性T(Ts/Tc)细胞和自然杀伤(NK)细胞的百分比升高,CD4⁺/CD8⁺比值降低。结论 IMRT可降低淋巴细胞总数,并引起细胞亚群的再分布,在IMRT的过程中和结束的早期给予免疫调节治疗,可能有利于免疫平衡的恢复。

关键词 调强放疗; 肿瘤; 淋巴细胞; 放射治疗; 免疫

中图分类号 R 730.55; R 392.12

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2019)01 - 0102 - 06

doi: 10. 19405/j. cnki. issn1000 - 1492. 2019. 01. 020

放射治疗(radiotherapy, RT)是治疗中晚期肿瘤的重要方法,也是早期肿瘤手术后的补充手段,能够明显提高患者的生存时间。但是,RT在杀伤肿瘤细胞的时候,也会对机体的正常组织及细胞产生影响。一般来说,人体淋巴细胞对放射线有着较高的敏感性,而RT可引起部分淋巴细胞的再分布甚至死亡,从而导致人体免疫系统的改变^[1]。随着RT技术的日新月异,调强放疗(intensity-modulated radiotherapy, IMRT)已被广泛地应用于头颈胸腹等全身各部位恶性肿瘤的治疗,它具有靶区剂量高,而对正常组织损伤却较小的特点^[2]。该研究对183例常见肿瘤(肺癌、食管癌、鼻咽癌和直肠癌)患者IMRT前后的外周血淋巴细胞亚群的变化进行综合分析,为今后

在IMRT中更为有效地保护免疫系统,以及免疫调节方面的治疗提供一定的研究依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取2015年10月~2017年11月安徽省立医院西区放疗科收治的食管癌、肺癌、鼻咽癌及直肠癌患者183例,其中男145例,女38例,年龄13~89岁,中位年龄58岁。入组标准:患者无免疫系统疾病,且入院前未接受其他免疫方面治疗。患者IMRT前后行外周血淋巴细胞及其亚群检测,其中66例行免疫功能测定,117例行调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)检测。患者一般资料见表1。

表1 患者的一般资料

患者	数值[n(%)]
性别	
女	38 (20.8)
男	145 (79.2)
年龄(岁)	
0~44	30 (16.4)
45~59	65 (35.5)
60~74	75 (41.0)
75~89	13 (7.1)
病种	
食管癌	72 (39.4)
肺癌	19 (10.4)
鼻咽癌	87 (47.5)
直肠癌	5 (2.7)
分期	
I	1(0.6)
II	22(12.0)
III	80(43.7)
IV	80(43.7)

1.2 研究方法和试剂

1.2.1 主要试剂 CD3、CD8、CD45、CD4、CD16、CD56、CD19、CD127 鼠抗人单克隆荧光抗体均购自美国BD公司,红细胞裂解液购自上海碧云天生物技术公司,其他均为国产市售常用试剂。

1.2.2 放疗方法 采用GE Discovery CT模拟定位机增强扫描后,扫描图像传输至Pinnacle放疗计划

2018 - 07 - 26 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81673099)

作者单位: ¹ 安徽医科大学核医学教研室,合肥 230032

² 安徽省立医院西区肿瘤放疗科,合肥 230031

³ 安徽医科大学第一附属医院肿瘤放疗科,合肥 230022

⁴ 美国宾夕法尼亚州立大学分子免疫与感染性疾病研究中心,大学园,费城 16802

作者简介: 杨 婧,女,硕士研究生;

熊 那,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: xionгна_2000@163.com

系统,勾画大体肿瘤体积(gross tumor volume, GTV)、大体肿瘤转移淋巴结体积(gross tumor volume lymph gland, GTVnd)和相应淋巴引流区,即临床靶体积(clinical target volume, CTV),通过3D外扩获得计划靶体积(planning target volume, PTV)。依据GTV、GTVnd和CTV外扩的PTV,给予不同的放疗剂量,周围正常组织给予合理剂量限值,制定放疗计划进行照射。食管癌、肺癌、直肠癌放疗剂量均在50~60 Gy,鼻咽癌为68~70 Gy。采用Varian Trilogy 5339 直线加速器 6 MV-X 线照射,常规分割为1.8~2.2 Gy/次,1次/d,5 d/周,每周行kV级锥形束CT图像引导,检测和校正患者的放疗体位。

1.2.3 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测 患者分别于IMRT开始时和结束后1个月时抽取空腹静脉血2 ml,乙二胺四乙酸盐(EDTA)抗凝。取100 μ l全血加入不同抗体的混合液20 μ l,4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min。加入1 ml红细胞裂解液,吹打混匀,裂解5 min,离心后弃上清液。PBS清洗细胞,重复2次,加入250 μ l染色缓冲液重悬细胞后,采用FCM进行检测,以FlowJo分析软件进行淋巴细胞及亚群分析。

1.3 统计学处理 采用SPSS 16.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,治疗前后结果以配对设计 t 检验进行统计分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IMRT前后淋巴细胞总数的变化 治疗前淋巴细胞总数均值为 $(1.592 \pm 0.491) \times 10^9$ 个/L,治疗后的淋巴细胞总数均值为 $(0.739 \pm 0.342) \times 10^9$ 个/L,以配对设计 t 检验进行统计学分析,结果显示IMRT前后患者血液中的淋巴细胞总数差异有统计学意义($t = 15.12, P < 0.01$),表明IMRT可以导致肿瘤患者外周血中的淋巴细胞总数显著降低。见图1。

2.2 IMRT前后总T(T)细胞、辅助性T(helper T cell, Th)细胞和抑制性/细胞毒性T(suppressor T cell/cytotoxic T cell, Ts/Tc)细胞的水平变化 治疗后的 $CD3^+$ T细胞和 $CD3^+CD4^+$ Th细胞占淋巴细胞百分比(均值分别为 $68.200\% \pm 13.902\%$ 、 $27.871\% \pm 9.167\%$)明显降低,与治疗前(均值分别为 $71.251\% \pm 9.475\%$ 、 $40.739\% \pm 9.68\%$)相比较,T细胞平均下降3.05%($t = 2.189, P < 0.05$),Th细胞平均下降12.87%($t = 9.962, P < 0.01$),然

而,治疗后患者血液中的 $CD3^+CD8^+$ Ts/Tc细胞占淋巴细胞的百分比(均值 $37.405\% \pm 13.026\%$)升高,较治疗前(均值 $28.439\% \pm 8.444\%$)平均增加8.96%($t = -6.403, P < 0.01$)。见图2。进一步计算患者治疗前的 $CD4^+$ 细胞/ $CD8^+$ 细胞比值为 1.645 ± 0.763 ,而治疗后的 $CD4^+$ 细胞/ $CD8^+$ 细胞比值为 0.862 ± 0.466 ,差异有统计学意义($t = 9.339, P < 0.01$)。上述结果提示,IMRT导致患者血液中T细胞和Th细胞的百分比降低,Ts/Tc细胞的百分比比较IMRT前升高,从而造成 $CD4^+/CD8^+$ 比值的明显下降。

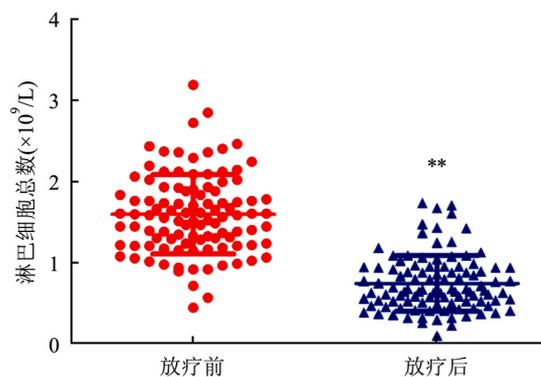


图1 IMRT前后患者血液中淋巴细胞总数的变化
与放疗前比较: ** $P < 0.01$

2.3 IMRT前后Treg的水平变化 $CD4^+$ 和 $CD25^+$ 是Treg细胞的标志,并且 $CD127$ 低表达($CD127^{low}$)为Treg细胞的重要标志,因此,进一步检测患者治疗前后血液中 $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ 的Treg细胞占 $CD4^+$ T细胞的百分比,治疗前均值为 $6.270\% \pm 1.900\%$,治疗后为 $5.802\% \pm 1.850\%$,如图3所示,患者治疗后血液中的Treg细胞水平下降,平均降低0.47%,与治疗前比较,差异有统计学意义($t = 2.17, P < 0.05$)。

2.4 IMRT前后自然杀伤细胞(nature killer cell, NK)和B细胞的水平变化 与T细胞和B细胞相比,NK细胞表面标志具有相对特异性, $CD3^-$ 和 $CD16^+CD56^+$ 为NK细胞检测的常用标记。 $CD3^-CD16^+CD56^+$ NK细胞的检测结果显示,患者IMRT前外周血NK细胞占淋巴细胞百分比均值为 $19.420\% \pm 9.688\%$,IMRT后为 $23.723\% \pm 11.909\%$,与治疗前外周血NK细胞水平相比增加4.3%,结果显示差异有统计学意义($t = -3.697, P < 0.01$)。由于 $CD19$ 存在于除浆细胞以外的几乎所有B细胞表面,因此, $CD3^-$ 和 $CD19^+$ 常作为B细

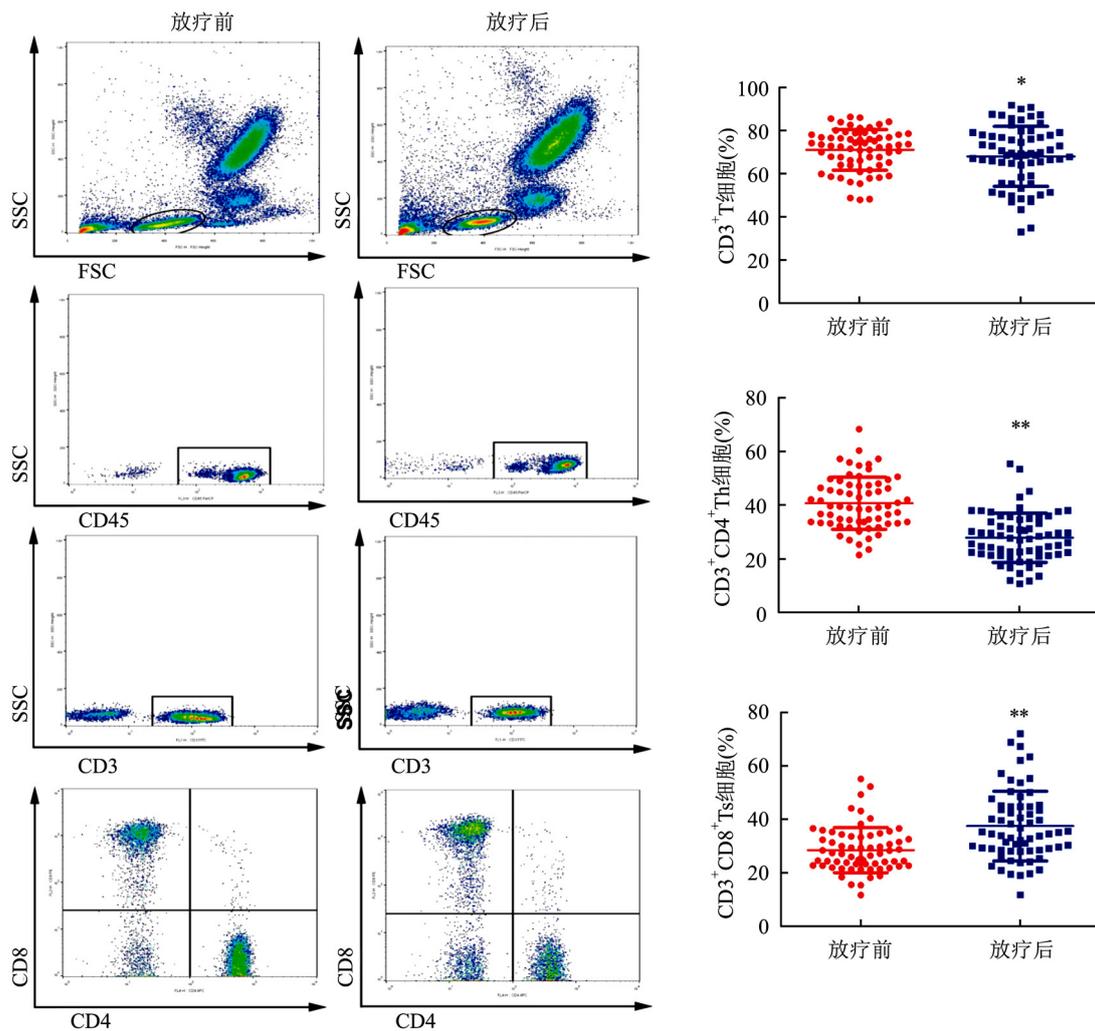


图2 IMRT前后血液中T、Th和Ts细胞的水平变化
与放疗前比较: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

胞的检测标记。检测结果显示,患者治疗后 $CD3^+ CD19^+ B$ 细胞水平(均值 $5.037\% \pm 4.106\%$) 平均下降 1.65% ,与治疗前(均值 $6.726\% \pm 3.240\%$) 比,差异有统计学意义 ($t = 2.973, P < 0.01$)。见图4。

3 讨论

传统放疗可引起肿瘤患者血液中淋巴细胞总数的下降,这种效应的机制为放射线直接杀伤循环淋巴细胞和射线对骨髓的抑制导致淋巴细胞增殖和分化减少。在现代放疗中,普遍采用IMRT治疗肿瘤,其靶区精确度高,摆位误差小,能最大限度的保护肿瘤附近的正常组织。其对骨髓的抑制作用也较小,因此,淋巴细胞数目的减少主要原因是IMRT的直接杀伤作用^[3]。在本研究中观察到IMRT引起患者

外周血淋巴细胞的数量明显下降,并且这种下降在治疗结束后4周尚未完全恢复,提示尽管IMRT对机体正常组织损伤较小,但是对高度敏感性的淋巴细胞仍然具有很强的杀伤作用。

T淋巴细胞是形成并促进机体免疫应答的重要组成部分,其中 $CD3^+ CD4^+$ Th细胞可通过扩增辅助B淋巴细胞产生抗体,并可活化其他的T细胞亚群,进而调节机体的免疫应答,在抗肿瘤和炎症反应的调节中具有重要作用,而 $CD3^+ CD8^+$ Ts/Tc细胞则具有杀伤和抑制靶细胞的作用,在抗肿瘤方面能够直接杀伤肿瘤细胞^[4]。通常情况下, $CD4^+ / CD8^+$ 细胞比例保持相对稳定,以达到机体免疫稳态。本研究中IMRT后患者外周血中的Th细胞百分比下降,而Ts/Tc细胞比例升高,导致 $CD4^+$ 细胞/ $CD8^+$ 细胞比值进一步降低,提示IMRT诱导了患者外周血中T

细胞亚群的再分布。Tao et al^[5] 在鼻咽癌患者 IM-RT 的研究中,发现治疗后外周血 Th 细胞占淋巴细胞百分比与分期呈负相关,而 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比值降低可明显增加肿瘤远处转移的风险。Yang et al^[6] 也发现前列腺癌放疗有效的患者外周血中 CD4⁺ 细胞/CD8⁺ 细胞比值明显高于无显著疗效的患者。

CD4⁺CD25⁺Treg 细胞是 CD4⁺T 淋巴细胞的一个亚群,能够通过抑制 T 细胞的活化和增殖、下调白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2) 的分泌,以抑制抗肿瘤的免疫反应,同时在肿瘤治疗中也起到维持免疫平衡、防止过度炎症反应和损伤的作用^[7]。Foxp3⁺ 是 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的标志分子,而

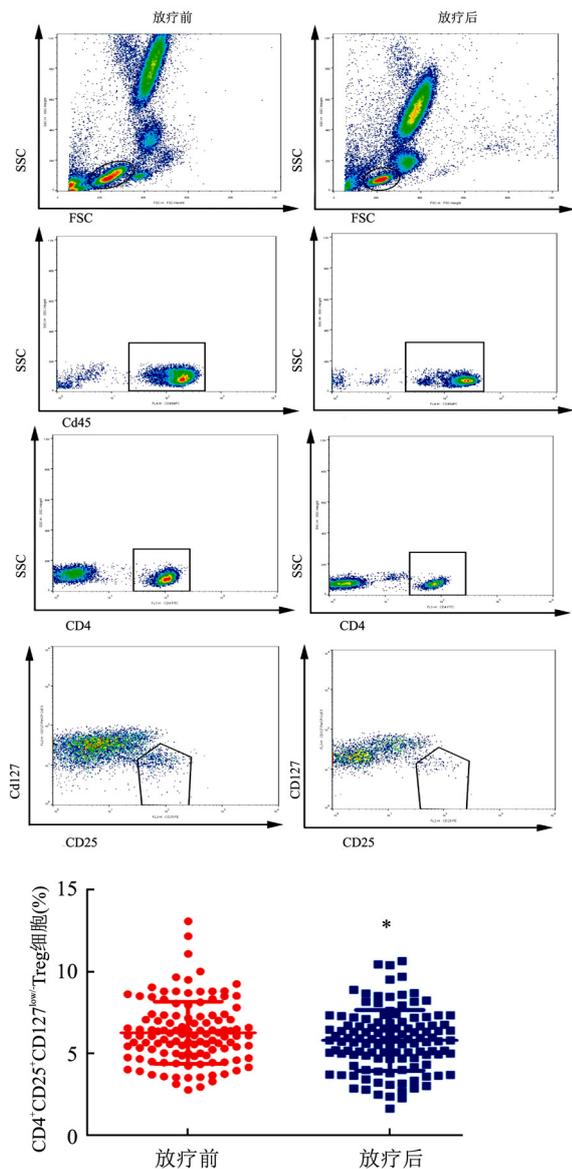


图3 IMRT 前后血液中 Treg 细胞的水平变化
与放疗前比较: * P < 0.05

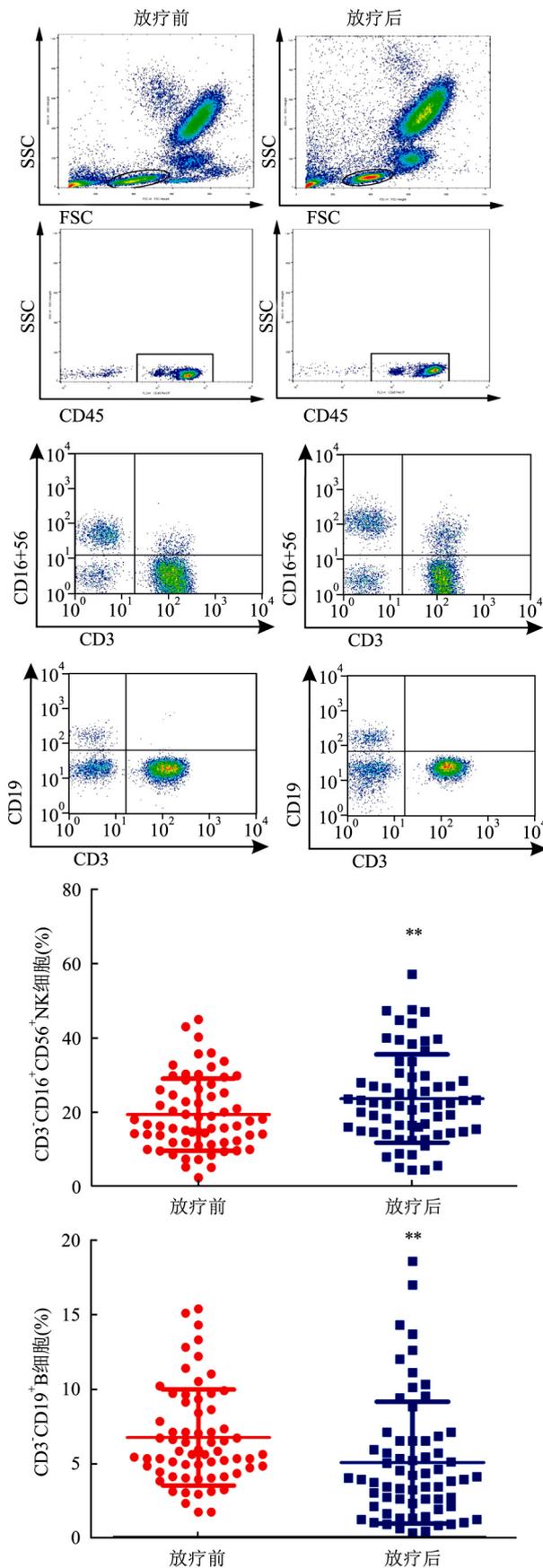


图4 IMRT 前后血液中 NK 和 B 细胞的水平变化
与放疗前比较: ** P < 0.01

Foxp3⁺具有良好的相关性,CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}细胞包含了绝大多数的Foxp3⁺细胞,通常情况下,以CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}进行Treg细胞分选^[8]。部分临床研究^[9-10]表明,放疗可导致患者血液中Treg细胞的增加,与其他T淋巴细胞亚群CD127^{low/-}与相比,Treg细胞的放射敏感性相对较低。而本研究结果提示,肿瘤患者在IMRT结束后4周,外周血中Treg细胞的比例并未升高,反而出现降低,可能与检测时间的差异和样本数量有关。Cao et al^[11]研究显示,CD4⁺CD25⁺Treg细胞受到电离辐射后,其凋亡相关蛋白(caspase-3、Bax和CD95)都高于CD4⁺CD25⁻T淋巴细胞,从而导致CD4⁺CD25⁺Treg细胞具有高放射敏感性,与本项研究结果相似。

NK细胞属于固有免疫细胞,在机体受到抗原和外界刺激时,首先快速启动固有免疫应答,其中NK细胞表面高表达Fcγ受体(CD16),与配体结合后,分泌肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)和干扰素-γ(interferon-γ,IFN-γ),发挥炎症反应和抗肿瘤作用,B细胞可分化为浆细胞,合成和分泌免疫球蛋白^[12]。本研究结果显示,IMRT患者外周血中的NK细胞百分比升高,而B细胞的百分比降低。此现象是由于NK细胞中含有大量还原型谷胱甘肽(reduced glutathione,GSH)能够有效清除由电离辐射激发水分子所形成的活性氧和自由基,具有很强的抗氧化能力,所以对电离辐射的耐受性高^[3],而Sage et al^[3]和Jiang et al^[13]则在肿瘤放疗的研究中发现,B细胞与其他淋巴细胞亚群相比较,具有更高的放射敏感性。

综上所述,IMRT可以导致肿瘤患者外周血淋巴细胞及其亚群的变化,从而对免疫功能产生影响,并且在治疗后的短时间内不能恢复正常。因此,需要及早给予免疫调节治疗,如IMRT过程中和结束的早期,以促进免疫平衡的恢复,预防辐射导致的过度炎症反应及诱发的二次致癌效应。

参考文献

[1] Talebian Yazdi M, Schinkelshoek M S, Loof N M, et al. Standard radiotherapy but not chemotherapy impairs systemic immunity in non-small cell lung cancer[J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(12): e1255393.

[2] Pietrowska M, Jelonek K, Polanska J, et al. Partial - Body irradiation in patients with prostate cancer treated with IMRT has little effect on the composition of serum proteome [J]. *Proteomes*, 2015, 3(3): 117 - 131.

[3] Sage E K, Schmid T E, Geinitz H, et al. Effects of definitive and salvage radiotherapy on the distribution of lymphocyte subpopulations in prostate cancer patients [J]. *Strahlenther Onkol*, 2017, 193(8): 648 - 55.

[4] Yu T, Guo P, Wu Y, et al. The role of chemotherapy and operation on lymphocytes accumulation in peripheral blood obtained from patients with oral squamous cell carcinoma [J]. *Springerplus*, 2015, 4: 698.

[5] Tao C J, Chen Y Y, Jiang F, et al. A prognostic model combining CD4/CD8 ratio and N stage predicts the risk of distant metastasis for patients with nasopharyngeal carcinoma treated by intensity modulated radiotherapy [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29): 46653 - 61.

[6] Yang Z R, Zhao N, Meng J, et al. Peripheral lymphocyte subset variation predicts prostate cancer carbon ion radiotherapy outcomes [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(18): 26422 - 35.

[7] Persa E, Balogh A, Sáfrány G, et al. The effect of ionizing radiation on regulatory T cells in health and disease [J]. *Cancer Lett*, 2015, 368(2): 252 - 61.

[8] Piloni D, Morosini M, Magni S, et al. Analysis of long term CD4⁺CD25^{high}CD127⁻T-reg cells kinetics in peripheral blood of lung transplant recipients [J]. *BMC Pulm Med*, 2017, 17(1): 102.

[9] Muroyama Y, Nirschl T R, Kochel C M, et al. Stereotactic radiotherapy increases functionally suppressive regulatory T cells in the tumor microenvironment [J]. *Cancer Immunol Res*, 2017, 5(11): 992 - 1004.

[10] Sage E K, Schmid T E, Sedelmayr M, et al. Comparative analysis of the effects of radiotherapy versus radiotherapy after adjuvant chemotherapy on the composition of lymphocyte subpopulations in breast cancer patients [J]. *Radiother Oncol*, 2016, 118(1): 176 - 80.

[11] Cao M, Cabrera R, Xu Y, et al. Different radiosensitivity of CD4 (+) CD25 (+) regulatory T cells and effector T cells to low dose gamma irradiation *in vitro* [J]. *Int J Radiat Biol*, 2011, 87(1): 71 - 80.

[12] Nieto-Velázquez N G, Torres-Ramos Y D, Muñoz-Sánchez J L, et al. Altered expression of natural cytotoxicity receptors and NKG2D on peripheral blood NK cell subsets in breast cancer patients [J]. *Transl Oncol*, 2016, 9(5): 384 - 91.

[13] Jiang L, Zhan Y, Gu Y, et al. Changes of regulatory T and B cells in patients with papillary thyroid carcinoma after 131I radioablation: a preliminary study [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 683768.

网络出版时间: 2019-1-3 17:26 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20181230.1809.021.html>

胃癌组织中 NEDD4L 的表达及其临床意义

蒋兴旺 闫强 张尚鑫 孙若川 李德关 鲁明典 张震 李永翔

摘要 目的 研究胃癌中神经前体细胞表达发育下调样基因 4 (NEDD4L) 的表达及其临床意义。方法 分别采用实时荧光定量 PCR 和蛋白质免疫印迹法检测 25 对胃癌组织及其对应癌旁正常胃组织中 NEDD4L 的 mRNA 和蛋白表达水平, 采用免疫组化方法 (IHC) 检测 NEDD4L 在 124 例胃癌组织和 25 例癌旁正常胃组织中的表达情况, 并统计分析其表达与胃癌患者临床病理参数及预后之间的关系。结果 NEDD4L 在胃癌组织中的 mRNA 和蛋白表达水平均显著低于对应癌旁正常组织 ($P < 0.05$)。免疫组化结果显示 NEDD4L 在胃癌组织中的阳性表达率明显低于癌旁正常组织 ($P < 0.05$)。NEDD4L 的表达与肿瘤组织分化程度

($P < 0.05$)、浸润深度 ($P < 0.05$) 和临床 TNM 分期 ($P < 0.05$) 显著相关, 且 NEDD4L 高表达的胃癌患者其预后较好 ($P < 0.001$)。结论 NEDD4L 在胃癌组织中低表达, 可能与胃癌的发生发展密切相关, 且可能作为判断胃癌预后的潜在指标。

关键词 胃癌; 神经前体细胞表达发育下调样基因 4; 预后
中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)01-0107-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.01.021

胃癌发病率在我国连年居高不下, 是我国第二大常见肿瘤^[1], 要降低胃癌的总体死亡率, 早期发现并及时治疗是非常重要的, 而早期胃癌并无明显症状, 多数患者就诊时已是中晚期。手术治疗是胃癌的首选治疗方式, 但对于中晚期患者, 手术预后不佳。泛素化是人体内的蛋白质修饰系统, 能够介导膜蛋白、细胞周期调控因子、转录因子、癌蛋白和抑癌蛋白等底物蛋白的降解、稳定和重定位, 该过程受

2018-08-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 81672389); 安徽省科技攻关重大项目(编号: 1704a0802167); 安徽高校自然科学基金研究项目(编号: KJ2016A329)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院普外科, 合肥 230022

作者简介: 蒋兴旺, 男, 硕士研究生;

李永翔, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yongxiangli_1@hotmail.com

Analysis on the changes of lymphocytes and their subpopulations in the peripheral blood of patients with carcinoma after intensity modulated radiotherapy

Yang Jing^{1,2}, Gao Jin², Xiao Liang^{1,3}, et al

¹Teaching and Research Section of Nuclear Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Radiation Oncology Division, West Branch of Anhui Provincial Hospital, Hefei 230031;

³Dept of Radiation Oncology Division, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To analyze the changes of lymphocytes and their subsets in the peripheral blood of patients with carcinoma before and after intensity modulated radiotherapy (IMRT), and discuss the influence of these changes on therapeutic effects. **Methods** Flow cytometer (FCM) was used to analyze the blood samples from 183 patients, of which 66 and 117 blood samples were utilized for analyses of immunologic function and regulatory T (Treg) cells respectively. **Results** Total counts of lymphocytes, the percentages of CD3⁺T cells, CD4⁺ helper T (Th) cells, CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg cells and B cells in peripheral blood were reduced by IMRT. Conversely, the percentages of CD8⁺ suppressor T (Ts) / cytotoxic T (Tc) cells and nature killer (NK) cells were increased. The ratio of CD4⁺ cells and CD8⁺ cells was also reduced by IMRT. **Conclusion** IMRT can decrease the number of lymphocytes in peripheral blood, and lead to the redistribution of lymphocytes subpopulations. It is therefore important that the recovery of immunological homeostasis may be helped by immunological modulating therapies during and in an early stage after IMRT.

Key words intensity modulated radiotherapy; tumor; lymphocyte; radiotherapy; immunity