DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.06.003
文章编号：1005-8982（2019）06-0011-05

SBHFRT 和 CFRT 技术对 NSCLC 组织中淋巴细胞和细胞因子的影响 *

岳宏程[1]，熊良庚[2]，张建文[3]，林盛[1]，傅少志[1]，刘伟[2]，彭红菊[1]
（1. 西南医科大学附属医院 肿瘤科，四川 泸州 646000；2. 重庆市巴南区人民医院 肿瘤科，重庆 401320；3. 西南医科大学附属医院 核医学与分子影像四川省重点实验室，四川 泸州 646000）

摘要：目的 探讨单次近距离大分割放疗（SBHFRT）和常规分割放疗（CFRT）对非小细胞肺癌（NSCLC）组织中淋巴细胞和细胞因子的影响。**方法** 将NSCLC移植瘤模型小鼠随机分为对照组、CFRT组及SBHFRT组，每组6只小鼠。计算放疗结束后第14天肿瘤体积和肿瘤生长抑制率（TGIR），以^{18}F-FDG micro PET-CT检测肿瘤标准摄取值（SUV），评估肿瘤代谢活性；免疫组织化学SP法和酶联免疫吸附测定法检测肿瘤组织中$CD4^+$、$CD8^+$及$Foxp3^+$ T淋巴细胞的表达和白细胞介素10（IL-10）、白细胞介素12（IL-12）及γ干扰素（INF-γ）的含量。**结果** SBHFRT组$CD4^+$、$CD8^+$ T淋巴细胞表达高于CFRT组和对照组，而$Foxp3^+$ T淋巴细胞表达低于CFRT组和对照组（$P<0.05$）；SBHFRT组IL-12和INF-γ含量高于CFRT组和对照组，而IL-10含量低于CFRT组和对照组（$P<0.05$）；SBHFRT组肿瘤体积、肿瘤SUV值低于CFRT组和对照组（$P<0.05$）；SBHFRT组TGIR高于CFRT组（$P<0.05$）。**结论** SBHFRT相对于CFRT能增加NSCLC肿瘤组织中抗肿瘤淋巴细胞表达和具有肿瘤杀伤作用的细胞因子含量，更能抑制肿瘤生长，降低肿瘤代谢活性。

关键词： 癌，非小细胞肺；近距离放射疗法；淋巴细胞；细胞因子类
中图分类号： R445.4 **文献标识码：** A

Effects of SBHFRT and CFRT on lymphocytes and cytokines in NSCLC tissues*

Hong-cheng Yue[1], Liang-geng Xiong[2], Jian-wen Zhang[3], Sheng Lin[1], Shao-zhi Fu[1], Wei Liu[2], Hong-ju Peng[1]
(1. Department of Oncology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Oncology, Banan People's Hospital of Chongqing, Chongqing 401320, China; 3. Nuclear Medicine and Molecular Imaging Key Laboratory of Sichuan Province, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of single brachytherapy hypofractionated radiotherapy (SBHFRT) and conventional fractionation radiotherapy (CFRT) on lymphocytes and cytokines in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** The NSCLC model mice were randomly divided into control group, conventional fractionation radiotherapy (CFRT) group and single brachytherapy hypofractionated radiotherapy (SBHFRT) group. The tumor volume of mice in each group and tumor growth inhibition rate (TGIR) of treatment groups were calculated

收稿日期：2018-09-22
* 基金项目：重庆市自然科学基金合作项目（No：cstc2018jcyjA0794）
[通信作者] 张建文，E-mail：zhangjianwen66@126.com

on the 14th day after the end of treatment. The tumor metabolism was assessed by micro 18F-FDG PET-CT imaging. The Immunohistochemistry SP method was used to detect the expression of $CD4^+$, $CD8^+$ and $Foxp3^+$ T lymphocytes in tumor tissues of the mice in each group and the content of interleukin-10 (IL-10), interleukin-12 (IL-12) and interferon-γ (INF-γ) in tumor tissues were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The expressions of $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes in the SBHFRT group were higher than those in the CFRT group and the control group ($P < 0.05$), while the expression of $Foxp3^+$ T lymphocytes in the SBHFRT group was lower than that in the CFRT group and the control group ($P < 0.05$). The contents of IL-12 and INF-γ in the SBHFRT group were higher than those in the CFRT group and the control group ($P < 0.05$), while the content of IL-10 in the SBHFRT group was lower than that in the CFRT group and the control group ($P < 0.05$). The tumor volume and standard uptake value (SUV) in the SBHFRT group were lower than those of the CFRT group and the control group ($P < 0.05$). Compared with the CFRT group, the TGIR of SBHFRT group was higher ($P < 0.05$). **Conclusions** Compared with CFRT, SBHFRT can increase the content of antitumor lymphocytes and cytokines to inhibit tumor growth and reduce tumor activity more significantly.

Keywords: carcinoma, non-small-cell lung; brachytherapy; lymphocytes; cytokines

肺癌是我国发病率和死亡率最高的肿瘤，其中非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）≥ 80%[1]。放疗是 NSCLC 主要治疗措施之一，合适的放疗模式可增加肿瘤组织中抗肿瘤淋巴细胞表达和细胞因子含量，增强抗肿瘤作用[2-3]。而单次近距离大分割放疗（single brachytherapy hypofractionated radiotherapy, SBHFRT）是否增强肿瘤组织中抗肿瘤淋巴细胞表达和细胞因子含量，目前少有报道。本研究探讨 SBHFRT 和常规放疗（conventional fractionation radiotherapy, CFRT）对 NSCLC 肿瘤组织中淋巴细胞表达和细胞因子含量的影响，为 NSCLC 放疗方案的制定和联合免疫治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 荷瘤小鼠模型复制 取对数生长的 Lewis 细胞株（西南医科大学附属医院肿瘤科）接种于 4 、5 周龄，体重 16 ~ 22 g 健康 C57BL/16 雌性小鼠（重庆腾鑫华阜生物科技公司，合格证编号：11401300024918，SPF 级饲养）右后肢根部皮下。观察记录小鼠一般状态、体重、成瘤情况及瘤体积变化。待移植瘤直径达 8 ~ 10 mm 时，分成对照组、CFRT 组、SBHFRT 组进行实验，每组 12 只小鼠。其中 6 只用于观察肿瘤体积和代谢情况，其余 6 只用于淋巴细胞和细胞因子的检测。

1.1.2 主要实验仪器与设备 直线加速器（瑞典 Elekta 有限公司），石蜡切片机（德国莱卡仪器有限公司），新型 BGZ 系列Ⅱ型高精度烤箱（上海博讯实业有限公司），移液器（德国艾本德公司），倒置相差显微镜（日本奥林巴斯公司），Oncentra brachy TPS 近距离治疗计划系统、Ir192 三维后装近距离治疗机购自荷兰 Nucletron Netherlands 公司。

1.2 方法

1.2.1 主要实验试剂 DMEM 高糖培养液（美国 HyClone 公司），胎牛血清（美国 Gibco 公司），抗小鼠 CD4、CD8、Foxp3 单克隆抗体（美国 Bio-world 公司），白细胞介素 10（Interleukin-10, IL-10）、白细胞介素 12（Interleukin-12, IL-12）及 γ 干扰素（Interferon-γ，INF-γ）检测试剂盒购自北京安迪华泰生物科技有限公司。

1.2.2 实验分组 ① CFRT 组：Dt=20 Gy/10 d，放射源为 6 MV X 射线，源皮距 100 cm，从接种后第 19 天开始放疗，连续放疗 5 d 后间隔 2 d 再连续放疗 5 d，接种后第 30 天放疗结束；② SBHFRT 组：于接种后第 30 天开始放疗，沿肿瘤长轴方向植入施源器（依肿瘤大小植入 1 或 2 根），行模拟定位 CT 扫描，在 Oncentra brachy TPS 勾画大体肿瘤靶区，设计和实施放疗计划（Dt=11.3 Gy/1F，$D_{95\%}$ ≥ 10 Gy），只放疗 1 d。按 L-Q 模型计算生物等效剂量（biological equralent dose, BED）（肿瘤 $\alpha/\beta=10$），CFRT 组 BED=24 Gy，SBHFRT 组 BED=24.07 Gy，两者 BED 基本相同。

1.2.3 $CD4^+$、$CD8^+$ 及 $Foxp3^+$ T 淋巴细胞表达检测 放疗结束后第 14 天，每组处死 6 只小鼠，完整剥离肿瘤，切取部分肿瘤用于酶联免疫吸附（ELISA）检测，其余肿瘤组织采用免疫组织化学 SP 法检测肿瘤组织中 $CD4^+$、$CD8^+$ 及 $Foxp3^+$ T 淋巴细胞表达，由 2 位经验丰富的病理科医生分别独立对实验结果进行双盲法评估。$CD4^+$、$CD8^+$ 及 $Foxp3^+$ T 淋巴细胞表达

判断标准：$CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞染色为细胞质或细胞膜呈棕黄色或褐色，$Foxp3^+$ T 淋巴细胞染色为细胞核呈棕黄色或褐色。$CD4^+$、$CD8^+$ 及 $Foxp3^+$ T 淋巴细胞数计算方法：每张切片选 5 个视野，显微镜（400 倍）下计数每个视野阳性淋巴细胞数，计算 5 个视野阳性淋巴细胞数平均值即为该切片阳性淋巴细胞数。

1.2.4　IL-10、IL-12 及 INF-γ 含量检测　采用 ELISA 法检测肿瘤组织中 IL-10、IL-12 及 INF-γ 含量。具体操作：将肿瘤组织磨碎取上清液，用洗液清洗酶孔板，每孔加样本稀释液和检测缓冲液，加等量样本，加检测抗体（1 ∶ 100），封板震荡，室温孵育 2 h，洗板，加 HRP 标记的链霉亲和素（1 ∶ 100），封板震荡，室温孵育 45 min，洗板，TMB 显色，避光室温孵育 30 min，加终止液。调节酶标仪波长为 450 nm 测定吸光度值。依据标准曲线计算各样本 IL-10、IL-12 及 INF-γ 的含量。

1.2.5　肿瘤体积的测量和生长抑制率（tumor growth inhibition rate, TGIR）的计算　各组从肿瘤接种后第 12 天开始，每隔 2 d 测量各组移植瘤最大直径（a）与最小直径（b），肿瘤体积（V）：$V=a\times b^2/2$。放疗后第 14 天计算各治疗组 TGIR。$TGIR=(V_{对照组}-V_{实验组})/V_{对照组}\times 100\%$。

1.2.6　肿瘤代谢活性检测　放疗结束后第 14 天，每组选 6 只小鼠分别行 ^{18}F-FDG micro PET/CT 扫描。^{18}F-FDG micro PET-CT 扫描参数：80 kV；500 μA；层距 1.5 mm。扫描图像由 2 位经验丰富的核医学科医师对 ^{18}F-FDG PET/CT 图像进行分析，计算肿瘤组织 SUV。SUV 值高低反映肿瘤代谢活性，即肿瘤 SUV 值越小表示肿瘤代谢活性越低。

1.3　统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组比较用单因素方差分析，两两比较用 LSD-t 检验；计数资料以率（%）表示，比较用 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　3 组 $CD4^+$、$CD8^+$ 及 $Foxp3^+$ T 淋巴细胞表达水平比较

3 组 $CD4^+$、$CD8^+$ 及 $Foxp3^+$ T 淋巴细胞表达水平比较，经单因素方差分析，差异有统计学意义（$P<0.05$）。进一步两两比较，SBHFRT 组 $CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞表达高于 CFRT 组和对照组，而 $Foxp3^+$ T 淋巴细胞表达低于 CFRT 组和对照组（$P<0.05$）。见表 1 和图 1。

表 1　3 组 $CD4^+$、$CD8^+$ 及 $Foxp3^+$ T 淋巴细胞表达水平比较　（$n=6$，个，$\bar{x}\pm s$）

组别	$CD4^+$	$CD8^+$	$Foxp3^+$
对照组	34.3 ± 3.3	24.2 ± 4.0	17.5 ± 3.6
CFRT 组	37.3 ± 6.8	39.8 ± 6.6	15.2 ± 3.3
SBHFRT 组	49.2 ± 6.0	71.3 ± 8.2	9.2 ± 1.9
F 值	11.892	82.047	12.126
P 值	0.001	0.000	0.001

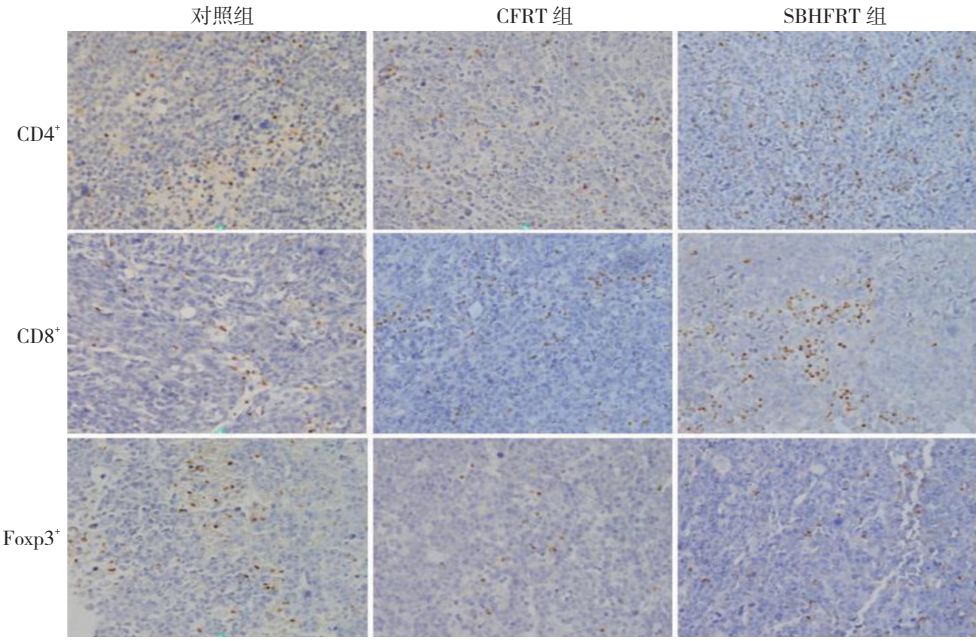


图 1　3 组 $CD4^+$、$CD8^+$ 及 $Foxp3^+$ T 淋巴细胞的表达　（SP × 400）

2.2　3 组 IL-10、IL-12 及 INF-γ 含量比较

3 组 IL-10、IL-12 及 INF-γ 含量比较，经单因素方差分析，差异有统计学意义（P <0.05）。进一步两两比较，SBHFRT 组 IL-12 和 INF-γ 含量高于 CFRT 组和对照组（P <0.05）；而 IL-10 含量低于 CFRT 组和对照组（P <0.05）。见表 2。

2.3　3 组肿瘤体积、肿瘤 SUV 值比较

3 组肿瘤体积、肿瘤 SUV 值比较，经单因素方差分析，差异有统计学意义（P <0.05）。进一步两两比较，SBHFRT 组肿瘤体积、肿瘤 SUV 值低于 CFRT 组和对照组（P <0.05）。见表 3 和图 2。

2.4　SBHFRT 组和 CFRT 组 TGIR 比较

SBHFRT 组、CFRT 组 TGIR 分别为（37.0 ± 2.5）%和（19.2 ± 3.2）%。两组 TGIR 比较，经 t 检验，差异有统计学意义（t =10.701，P =0.000）；SBHFRT 组 TGIR 高于 CFRT 组。

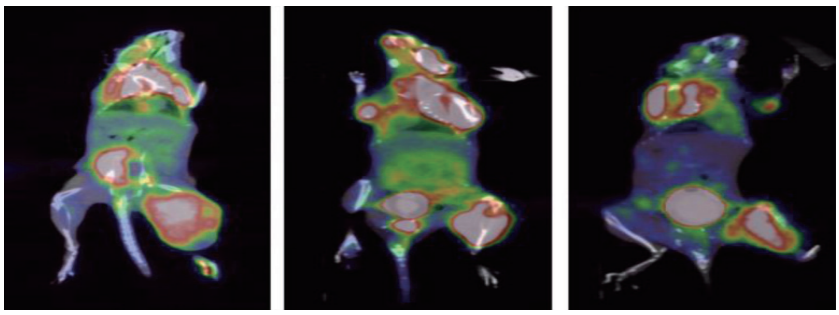
表 2　3 组 IL-10、IL-12 及 INF-γ 含量比较

（n =6，pg/ml，$\bar{x} \pm s$）

组别	IL-10	IL-12	INF-γ
对照组	257.4 ± 65.4	17.4 ± 2.0	184.9 ± 31.6
CFRT 组	219.9 ± 54.1	19.1 ± 1.9	210.8 ± 36.1
SBHFRT 组	135.8 ± 47.6	22.5 ± 2.5	270.7 ± 44.6
F 值	7.383	8.702	8.110
P 值	0.006	0.003	0.004

表 3　3 组肿瘤体积、肿瘤 SUV 值比较　（n =6，$\bar{x} \pm s$）

组别	肿瘤体积 /mm^3	肿瘤 SUV 值
对照组	4 169.8 ± 123.3	2.9 ± 0.3
CFRT 组	3 368.7 ± 134.9	2.6 ± 0.2
SBHFRT 组	2 627.3 ± 103.4	1.8 ± 0.2
F 值	242.935	43.025
P 值	0.000	0.000



对照组　　CFRT 组　　SBHFRT 组

图 2　3 组 ^{18}F-FDG micro PET-CT 扫描图

3　讨论

以立体定向放疗（stereotactic body radiotherapy，SBRT）为代表的大分割放疗能提高 cT_3 和 $cT_4N_0M_0$ 期 NSCLC 患者的 2 年总生存率（overall survival，OS）和局部控制率[4]。NSCLC 行 SBHFRT 放疗研究较少，缺乏基础性研究。对临床 NSCLC 原发灶行 SBHFRT 联合纵隔转移淋巴结调强放疗研究发现，其有效率、2 年 OS 分别为 92.3% 和 67%，中位生存期 22.5 个月[5]。上述结果表明，SBHFRT 与 SBRT 能有效提高 NSCLC 治疗的有效率和患者生存期。

肿瘤微环境的组成和作用十分复杂[6-7]，对抗肿瘤免疫有抑制作用[8-10]。研究表明，放疗可改变肿瘤微环境中淋巴细胞和细胞因子的组成，增强抗肿瘤免疫反应[11-13]。NSCLC 肿瘤组织中 $CD4^+$、$CD8^+$ 及 $Foxp3^+$ T 淋巴细胞表达与放疗生存期密切相关，肿瘤组织中 $CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞高表达，中位生存期和 3 年生存率均高于低表达和无表达；而 $Foxp3^+$ T 淋巴细胞低表达中位生存期和 3 年生存率均高于高表达[14-15]。上述研究表明，增加肿瘤组织中 $CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞表达，降低 $Foxp3^+$ T 淋巴细胞表达，可提高肿瘤患者生存期和生存率。本研究结果提示，NSCLC 行 SBHFRT 治疗相对于 CFRT 治疗，能有效聚集抗肿瘤淋巴细胞的能力，和其他学者报道类似[15-17]。

细胞因子在抗肿瘤免疫反应中发挥重要的作用，IL-12 能诱导 IFN-γ 的产生，后者可刺激 $CD8^+$ T 淋巴细胞增值和活化，在抗肿瘤免疫反应中发挥正向调节作用[18]。IL-10 由肿瘤细胞分泌的一种免疫抑制因子，其不仅可抑制肿瘤细胞凋亡，还有对抗 FIN-γ 作用，抑制抗肿瘤免疫反应[19]。本研究表明，SBHFRT 较 CFRT 可增加肿瘤组织中 IL-12 和 INF-γ 含量，降

低 IL-10 含量，更利于促进淋巴细胞增殖和肿瘤细胞凋亡，增强放射线作用。

肿瘤 SUV 值对肿瘤代谢情况及预后评估具有重要指导意义[20]。本研究通过 PET-CT 检测各组肿瘤 SUV 值显示，放疗后 SBHFRT 组肿瘤代谢低于 CFRT 组和对照组；同时本研究显示，SBHFRT 在控制肿瘤体积和 TGIR 方面优于 CFRT 组，其机制可能与 SBHFRT 增加肿瘤组织中 $CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞浸润和 IL-12、INF-γ 含量，从而增强抗肿瘤作用有关。

综上所述，SBHFRT 比 CFRT 更能促进肺癌肿瘤组织中抗肿瘤淋巴细胞浸润，以及增加具有肿瘤杀伤作用的细胞因子 IL-12 和 INF-γ 含量，更有利于增强放疗效应。但 SBHFRT 促进肿瘤组织中上述物质增加的最佳放疗分割剂量，有待进一步研究。

参 考 文 献：

[1] 陈万青，李贺，孙可欣，等 . 2014 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中华肿瘤杂志，2018, 40(1): 5-13.

[2] DELOCH L, DERER A, HARTMANN J, et al. Modern radiotherapy concepts and the impact of radiation on immune activation[J]. Frontiers in Oncology, 2016, 6(1): 141.

[3] HAIKERWAL S J, HAGEKYRIAKOU J, MACMANUS M, et al. Building immunity to cancer with radiation therapy[J]. Cancer Letters, 2015, 368(2): 198-208.

[4] TAKAHISA E, ATSUYA T, NAOKO S, et al. Stereotactic body radiotherapy for T_3 and $T_4N_0M_0$ non-small cell lung cancer[J]. Journal of Radiation Research, 2016, 57(3): 265-272.

[5] XIANG L, ZHANG J W, LIN S, et al. Computed tomography-guided interstitial high-dose-rate brachytherapy in combination with regional positive lymph node intensity-modulated radiation therapy in locally advanced peripheral non-small cell lung cancer: a phase 1 clinical trial[J]. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2015, 92(5): 1027-1034.

[6] GRAVES E E, MAITY A, LE Q T, et al. The tumor microenvironment in non-small cell lung cancer[J]. Seminars in Radiation Oncology, 2010, 20(3): 156-163.

[7] KLEMM F, JOYCE J A. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer[J]. Trends in Cell Biology, 2015, 25(4): 198-213.

[8] KOFF J L, RAMACHANDIRAN S, BERNAL-MIZRACHI L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(2): 2942-2955.

[9] BOS R, SHERMAN L A. $CD4^+$ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of $CD8^+$ T lymphocytes[J]. Cancer Research, 2010, 70(21): 8368-8377.

[10] SAKAI C, NISHIKAWA H. Immunosuppressive environment in tumors[J]. Gan to Kagaku Ryoho Cancer Chemotherapy, 2018, 45(2): 222-226.

[11] FILATENKOV A, BAKER J, MUELLER A M, et al. Ablative tumor radiation can change the tumor immune cell microenvironment to induce durable complete remissions[J]. Clinical Cancer Research, 2015, 21(16): 3727-3739.

[12] ARNOLD K M, FLYNN N J, RABEN A, et al. The impact of radiation on the tumor microenvironment: effect of dose and fractionation schedules[J]. Cancer Growth Metastasis, 2018, 11(3): 117-121.

[13] FREY B, RÜCKERT M, WEBER J, et al. Hypofractionated irradiation has immune stimulatory potential and induces a timely restricted infiltration of immune cells in colon cancer tumors[J]. Frontiers in Immunology, 2017, 18(3): 231.

[14] 胡静，郑璐，张欢乐，等 . $CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞表达对术后辅助放疗的非小细胞肺癌患者预后意义 [J]. 浙江医学，2018, 40(7): 712-716.

[15] GENG Y, SHAO Y, HE W, et al. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in lung cancer: a meta-analysis[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2015, 37(4): 1560-1571.

[16] FLUXÁ P, ROJAS-SEPÚLVEDA D, GLEISNER M A, et al. High $CD8^+$ and absence of $Foxp3^+$ T lymphocytes infiltration in gallbladder tumors correlate with prolonged patients survival[J]. Bmc Cancer, 2018, 18(1): 243.

[17] RASHED H E, ABDELRAHMAN A E, ABDELGAWAD M, et al. Prognostic significance of programmed cell death ligand 1 (PD-L1), $CD8^+$ tumor-infiltrating lymphocytes and p53 in non-small cell lung cancer: an immunohistochemical study[J]. Respiratory Medicine, 2017, 132(15): 211-222.

[18] GALDIERO M R, MARONE G, MANTOVANI A. Cancer inflammation and cytokines[J]. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2017, 47(6): 335-338

[19] VAHL J M, FRIEDRICH J, MITTLER S, et al. Interleukin-10-regulated tumour tolerance in non-small cell lung cancer[J]. British Journal of Cancer, 2017, 117(11): 1644-1655.

[20] GEETS X, STERPIN E, WANET M, et al. Metabolic imaging in non-small-cell lung cancer radiotherapy[J]. Cancer Radiotherapie, 2014, 18(6): 402-405.

（唐勇　编辑）