基础研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0361-03

肺癌患者肺泡巨噬细胞和外周血单个核细胞 IL-10、IL-12 测定的临床意义

李敏超,张 婷,周向东
(重庆医科大学附属第二医院呼吸内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:测定肺癌患者肺泡巨噬细胞(Alveolar marcrophage,AM)和外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell,PBMC)分泌 IL-10、IL-12 的水平,了解其细胞免疫功能状态;为 IL-12 应用于肺癌的治疗提供理论依据。方法:从 57 名肺癌(Lung cancer,LC)患者、33 名良性肺病(Benign pulmonary disease,BPD)患者、12 名健康者(Normal control,NC)的支气管肺泡灌洗液(Brochoalveolar larage,BALF)及外周血中分别获取 AM 和 PBMC,用 ELISA 法测定培养上清液中 IL-10、IL-12 的水平。结果:(1) LC 组 IL-10 的水平显著高于 NC、BPD 组,IL-12 则比 NC、BPD 组显著降低。(2) LC 组 IL-10 与 IL-12 的水平呈负相关。(3) Ⅲ、Ⅳ期患者 IL-10 水平比 Ⅰ ~ Ⅱ期显著升高,Ⅳ期患者 IL-12 水平比 Ⅰ ~ Ⅱ期显著降低。(4) 小细胞肺癌(Small cell lung cancer,SCLC)组 IL-10 水平显著高于腺癌组及鳞癌组,而 PBMC 分泌的 IL-12 水平低于腺癌组,AM 分泌的 IL-12 水平低于腺癌组及鳞癌组。结论:(1) LC 患者全身及局部的细胞免疫功能严重缺陷。(2) IL-10、IL-12 基础水平与 LC 的分期、恶性程度有关。

【关键词】肺癌;IL-10;IL-12;肺泡巨噬细胞
【中国图书分类法分类号】R734.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-16

Production of IL-10 and IL-12 by AM and PBMC from lung cancer patients

LI Min-chao, et al
(*Department of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the production of IL-10 and IL-12 by alveolar marcrophage and peripheral blood mononuclear cell from lung cancer patients, to evaluate the cellular immune state, and to provide justification for IL-12 therapy in the fields of Lung cancer. *Methods*: AM and PBMC were obtained from 57 patients with Lung cancer, 33 patients with benign pulmonary disease, and 12 normal control. IL-10 and IL-12 in the culture supernatants were measured quantitatively by ELISA. *Results*: (1) Higher levels of IL-10 were found in Lung cancer group than that in NC and BPD group. IL-12 showed significantly lower levels than that in NC and BPD group. (2) The levels of IL-10 had negative correlation with that of IL-12 in Lung cancer group. (3) The levels of IL-10 in Lung cancer group of stage Ⅲ, Ⅳ were significantly higher than that of stage Ⅰ ~ Ⅱ. The levels of IL-12 in Lung cancer group of stage Ⅳ were significantly lower than that of stage Ⅰ ~ Ⅱ. (4) Higher levels of IL-10 were found in SCLC group than that in NSCLC group. The levels of IL-12 from PBMC and AM in SCLC group were lower than that in adenocarcinoma, adenocarcinoma and squamous carcinoma groups separately. *Conclusion*: (1) results suggest the defect of cell-mediated immunity function presents both in local and general immune response in Lung cancer patients. (2) The basal levels of IL-10 and IL-12 are related to the stage and extent of malignancy.

【Key words】Lung cancer; IL-10; IL-12; Alveolar macrophage

随着肿瘤病因学研究的深入,认识到肿瘤的发生发展与宿主的免疫防御系统对肿瘤细胞失去调控有密切联系。IL-10 是近年来发现的一个重要的负调节因子,与肿瘤的生长、转移密切相关[1]。IL-12 为一种重要的抗肿瘤细胞因子,与之有关的治疗策略也在不断地探索中。本课题采用检测肺泡巨噬细胞(Alveolar marcrophage,AM)和外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell,PBMC)分泌 IL-10、IL-12 的水平,克服了传统的检测血清及血浆中细胞因子水平受诸多因素干扰的不足,可更为精确地反映局部及机体的免疫活性状态[2]。

作者介绍:李敏超(1971-),女,副主任医师,硕士,研究方向:肺癌早期诊断。
通讯作者:周向东,男,教授,E-mail: zxd999@263.net。
基金项目:重庆市卫生局基金资助课题(编号:07-2-126)。

1 材料和方法

1.1 研究对象

受试者均为 2007 年 2 月至 12 月我院肺科住院及门诊病人。LC 组:57 例(鳞癌 25 例,腺癌 22 例,小细胞肺癌(Small cell lung cancer,SCLC)10 例),TNM 分期:Ⅰ ~ Ⅱ期 13

例、Ⅲ期 14 例、Ⅳ期 30 例。良性肺病(Benign pulmonary disease, BPD)组:33 例(肺结核 22 例,肺炎 8 例,COPD 3 例。健康对照(Normal control, NC)组:12 例,包括因咳嗽、喉部异物感等原因作纤支镜,但镜检及临床诊断均无明显病变者。

1.2 标本采集

1.2.1 血液标本的采集 受试者在作纤支镜前采抗凝静脉血 3ml。

1.2.2 支气管肺泡灌洗液(Brochoalveolar larage, BALF)的采集 纤支镜前端楔入患侧肺中叶或舌叶的叶支气管开口处,注入 37℃、0.9%生理盐水 100 ~ 150 ml,负压回吸收量大于总量的 40%为回收成功。

1.3 细胞的分离、培养

1.3.1 PBMC 的分离、培养 外周血中加入生理盐水 3 ml 混匀,将混匀的血液贴壁加入 Ficoll 氏液中,离心,吸取单个核细胞,漂洗后悬浮细胞,调整细胞浓度至 1×10^6 个 /ml,吸入 24 孔培养板,每孔 1 ml,加入脂多糖(LPS, Sigma 公司产品) 1 μg/ml。置培养箱中培养 24 h,培养液离心,上清液置 -20℃保存备测。

1.3.2 AM 的分离、培养 BALF 用尼龙网过滤、离心、漂洗后用含 20%BS 的 RPMI 1640 培养液悬浮细胞,放入 37℃、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中,孵化 2 h。去除未贴壁细胞后加入胰酶使贴壁的 AM 脱落,离心、漂洗后悬浮细胞,调整细胞浓度至 1×10^6 个 /ml,吸入 24 孔培养板,每孔 1 ml,加入 LPS 1 μg/ml。培养 24 h,培养液离心,将上清液置 -20℃保存备测。

1.4 检测方法

采用 ELISA 方法测定培养上清液中 IL-10、IL-12 的水平。ELISA 试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司。

1.5 统计学处理

利用 SAS6.12 软件进行统计分析。由于组间方差不齐,多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,两两比较采用 Wilcoxon 秩和检验并校正检验水准。数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,$P \leq 0.05$ 定为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NC、BPD 及 LC 组 PBMC 及 AM 分泌 IL-10、IL-12 的水平比较

结果见表 1。

2.2 不同组织学类型肺癌的 PBMC 及 AM 分泌 IL-10、IL-12 水平比较

见表 2。

2.3 不同分期的受检者 PBMC 及 AM 分泌 IL-10、IL-12 的水平比较

见表 3。

2.4 LC 组 IL-10 与 IL-12 的相关性研究

2.4.1 LC 组 PBMC 分泌 IL-10 与 IL-12 的相关性研究 直线相关分析可见 IL-10 与 IL-12 之间呈负相关(决定系数 0.64, $P<0.001$),进行回归分析得出回归方程:IL-12=392.84-1.24IL-10 ($F=57.31$, $P<0.01$)

2.4.2 LC 组 AM 分泌 IL-10 与 IL-12 的相关性研究 直线相关分析可见 IL-10 与 IL-12 之间呈负相关(决定系数 0.86, $P<0.001$),进行回归分析得出回归方程:IL-12=371.23-1.31IL-10 ($F=216.06$, $P<0.01$)。

3 讨 论

肿瘤免疫逃逸的机理很复杂,其中部分原因是由于肿瘤细胞自发释放免疫抑制性细胞因子,如肿瘤生长因子(TGF)-β、IL-10 和前列腺素 E2(PGE2)等[3]。其中,IL-10 可通过多

表 1 NC、BPD 及 LC 组 PBMC、AM 分泌 IL-10、IL-12 的水平($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

分组	n	IL-10(PBMC)	IL-10(AM)	IL-12(PBMC)	IL-12(AM)
NC	12	93.83 ± 9.22	92.67 ± 11.22	266.43 ± 61.82	243.35 ± 40.01
BPD	33	108.91 ± 15.95	94.39 ± 10.04	315.50 ± 69.15*	283.17 ± 49.74*
LC	57	148.60 ± 35.56**	132.06 ± 30.42**	208.31 ± 52.32**	198.86 ± 42.63**

注:与 NC 组及 BPD 组相比,** $P<0.01$;与 NC 组相比,* $P<0.01$

表 2 不同组织学类型肺癌的 IL-10、IL-12 的水平比较($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

分组	n	IL-10(PBMC)	IL-10(AM)	IL-12(PBMC)	IL-12(AM)
鳞癌	25	140.37 ± 27.00	127.74 ± 26.19	209.42 ± 51.11	202.05 ± 41.05
腺癌	22	136.50 ± 27.39	120.30 ± 29.66	228.50 ± 60.43	215.10 ± 45.41
SCLC	10	194.83 ± 23.88**	165.33 ± 23.78**	171.17 ± 12.62*	161.67 ± 18.89△

注:与鳞癌、腺癌组比较,** $P<0.01$, △ $P<0.05$;与腺癌组比较,* $P<0.01$

表 3 不同分期肺癌 PBMC 及 AM 分泌 IL-10、IL-12 水平比较($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

分组	n	IL-10(PBMC)	IL-10(AM)	IL-12(PBMC)	IL-12(AM)
Ⅰ~Ⅱ期	13	131.57 ± 25.35	117.05 ± 28.12	228.38 ± 56.40	217.05 ± 43.80
Ⅲ期	14	171.00 ± 36.10*	150.13 ± 15.57*	186.50 ± 29.67	182.88 ± 19.10
Ⅳ期	30	178.33 ± 13.52*	160.50 ± 18.75*	167.17 ± 13.20**	156.50 ± 14.98*

注:与Ⅰ~Ⅱ期比较,* $P<0.01$,** $P<0.05$

种途径参与免疫抑制[4]:抑制 $CD4^+$T 细胞合成和产生 IL-2、IL-5、肿瘤坏死因子-α 和 γ-干扰素(IFN-γ);抑制细胞毒性 T 细胞、自然杀伤细胞释放 IFN-γ;抑制巨噬细胞向 Th1 细胞提呈抗原,减少巨噬细胞表面的主要组织相容性复合体(MHC)-II 类分子、细胞间粘附分子-1 和 B7 分子的表达等。文献报道肺癌患者胸水及肺癌组织中 IL-10 水平升高,并认为 IL-10 可能由局部的肺癌细胞分泌而后释放入血或胸液中[5],本研究发现,LC 组 PBMC 及 AM 分泌 IL-10 的水平显著高于 NC、BPD 组($P<0.01$),提示肺癌患者血或胸液升高的 IL-10 可能来源于 PBMC、AM。肺癌患者 PBMC、AM 分泌高水平 IL-10 的机制与肺癌细胞高表达 COX-2 从而使 PGE2 水平升高有关,PGE2 可诱导 PBMC 及 AM 分泌 IL-10[6]。

IL-12 作为一种重要的抗肿瘤细胞因子,具有多种生物学活性:激发抗肿瘤效应细胞分泌 IFN-γ;诱导 NK/淋巴因子激活的杀伤细胞和 T 细胞的增殖;在 Th0 细胞分化为 Th1 细胞的过程中,IL-12 发挥着中心作用;抑制肿瘤血管生成等。

本实验 LC 组 PBMC 及 AM 分泌的 IL-12 量与 NC、BPD 组比较均显著降低($P<0.01$),BPD 组显著高于 NC 组($P<0.01$)。这与肺癌细胞来源的 PGE2 不仅促进淋巴细胞和巨噬细胞产生 IL-10,而且还抑制巨噬细胞产生 IL-12 有关[7]。另外,一些观察显示:活动性结核病人 IL-12 水平升高,以满足机体对结核抗原刺激应答的需要[8]。在该实验中,活动性肺结核占 BPD 组的大多数(73.91%),BPD 组 IL-12 水平较 LC 组高,故这可能与活动性肺结核患者有关。

本实验结果表明:肺癌患者 PBMC 及 AM 分泌的免疫抑制性细胞因子 IL-10 呈高水平表达,而抗肿瘤细胞因子 IL-12 呈低水平表达,这说明了肺癌患者机体及局部均处于细胞免疫功能严重缺陷、抗肿瘤的免疫应答被抑制的状态。

IL-10 是拮抗 IL-12 生物学活性的重要细胞因子。有研究发现 IL-10 呈剂量依赖性地抑制 IL-12 诱导的血单核细胞的非 MHC 限制性杀伤活性及产生 IFN-γ 的能力。本实验证实 IL-10 与 IL-12 表达量呈负相关。Li 等[5]也证实了胸水及肿瘤组织中 IL-4、IL-10、TGF-α mRNA 表达显著高于 IL-12、IL-2、IL-18、IFN-γ mRNA 的表达。因肺癌患者 IL-12 水平降低,可使 Th1/Th2 细胞的比例下降,Th2 细胞相应增多,Th2 细胞分泌的 IL-10 水平随之升高。同时,IL-12 在体内和体外可迅速降低 IL-10 在肿瘤相关巨噬细胞的表达[9],可见 IL-10 与 IL-12 在细胞因子网络中相互影响。

分析 IL-10、IL-12 与 TNM 分期的关系发现,Ⅲ、Ⅳ期患者 PBMC、AM 分泌的 IL-10 水平比Ⅰ~Ⅱ期明显升高($P<0.01$);Ⅳ期患者 PBMC、AM 分泌的 IL-12 水平比Ⅰ~Ⅱ期明显降低($P<0.05$、$P<0.01$);IL-10 在Ⅲ期即呈现升高趋势,而 IL-12 则在Ⅳ期才显著降低,从该现象推测 IL-10 的升高较 IL-12 的降低出现得早。SCLC 组 PBMC、AM 分泌的 IL-10 水平显著高于鳞癌及腺癌组($P<0.01$、$P<0.01$);而 SCLC 组 PBMC 分泌的 IL-12 水平显著低于腺癌组($P<0.01$)、SCLC 组 AM 分泌的 IL-12 水平显著低于鳞癌及腺癌组($P<0.05$)。以上现象表明:IL-10 与 IL-12 表达水平与肺癌的分期、恶性程度有关。

综上所述:肺癌患者 PBMC 及 AM 分泌的免疫抑制细胞因子 IL-10 呈高水平表达,而有抗肿瘤作用的细胞因子 IL-12 呈低水平表达,且二者表达水平与肿瘤的分期及恶性程度有关,故 IL-10、IL-12 参与了肺癌患者抗肿瘤的免疫应答被抑制而致肿瘤的发生、发展这一过程。目前大量的研究已证实了 IL-12 的抗瘤、抑瘤效应,其与 IL-2、IL-8、粒-巨噬细胞集落刺激因子、协同刺激分子 B7-1 及抗血管生成因子等的多基因联合用药方案具有一定的临床应用前景[10~12]。本实验为 IL-12 应用于肺癌领域的治疗提供了一定理论基础。

参 考 文 献

[1] Montuenga L M, Pio R. Tumour-associated macrophages in nonsmall cell lung cancer: the role of interleukin-10[J]. Eur Respir J, 2007, 30:608-610.

[2] 田志刚,孙 沟.细胞因子的检测及其临床评价[J].国外医学肿瘤学分册,1997,24(3):163-165.

[3] Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses[J]. Cancer Biol Ther, 2005, 4(9):924-933.

[4] 孙卫民,王惠琴.细胞因子研究方法[M].北京:人民卫生出版社,2000,492-501.

[5] Li R, Rüttinger D, Li R, et al. Analysis of the immunological microenvironment at the tumor site in patients with non-small cell lung cancer[J]. Langenbecks Arch Surg, 2003, 388(6):406-412.

[6] Huang M, Sharma S, Mao J T, et al. Non-small cell lung cancer-derived soluble mediators and prostaglandin E2 enhance peripheral blood lymphocyte IL-10 transcription and protein production[J]. Immunol, 1996, 157(12):5512-5520.

[7] Stolina M, Sharma S, Lin Y. Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis[J]. J Immunol, 2000, 164(1):361-370.

[8] 钟 定,董临江,梁庆祥,等.肺结核患者肺泡灌洗液细胞分泌γ干扰素和白细胞介素12的变化[J].中华结核和呼吸杂志,2000,23(9):552-555.

[9] Watkins S K, Egilmez N K, Suttles J, et al. IL-12 rapidly alters the functional profile of tumor-associated and tumor-infiltrating macrophages in vitro and in vivo[J]. J Immunol, 2007, 178(3):1357-1362.

[10] Lee Y S, Kim J H, Choi K J, et al. Enhanced antitumor effect of oncolytic adenovirus expressing interleukin-12 and B7-1 in an immunocompetent murine model[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(19):5859-5868.

[11] Ino Y, Saeki Y, Fukuhara H, et al. Triple combination of oncolytic herpes simplex virus-1 vectors armed with interleukin-12, interleukin-18, or soluble B7-1 results in enhanced antitumor efficacy[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(2):643-652.

[12] Weiss J M, Subleski J J, Wigginton J M, et al. Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations[J]. Expert Opin Biol Ther, 2007, 7(11):1705-1721.

(责任编辑:冉明会)