

肺癌患者血清中细胞因子的检测及临床意义

Clinical Significance of Serum Levels of Cytokines in Patients with Lung Cancer

HUANG Qiu-han, SUN Jun-ning, WANG Yan-feng, et al.

黄秋晗¹, 孙俊宁², 王艳峰², 李振华², 石理², 苏文²

(1. 山西医科大学第二临床医学院, 山西太原 030001; 2. 山西省肿瘤医院/研究所, 山西太原 030013)

摘要: [目的] 检测细胞因子在肺癌患者血清中的表达水平, 并分析各细胞因子与肺癌临床病理特征间的关系, 以及各细胞因子间的相关性。 [方法] 采用流式细胞微球阵列术(CBA)检测 32 例肺癌患者及 39 例正常人血清中的 Th1 (IFN- γ 、TNF- α 、IL-2)、Th2 (IL-4、IL-6、IL-10)、Th17 (IL-17) 细胞因子水平。 [结果] 与正常人相比, 肺癌患者血清中 IFN- γ 、IL-6、IL-17 的表达水平显著升高 ($P < 0.05$), TNF- α 、IL-2、IL-10 的表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 而 IL-4 表达水平无差异 ($P > 0.05$)。不同性别、临床分期、病理类型及有无淋巴结转移的肺癌患者血清中细胞因子表达水平无统计学差异 ($P > 0.05$)。IL-17 与 IFN- γ 、IL-2、IL-6、IL-10 均有相关性 ($P < 0.05$)。 [结论] 肺癌患者血清中 Th1 型细胞因子的表达水平降低, 提示机体抗肿瘤免疫力低下与肺癌发病密切相关。细胞因子之间相互作用、相互影响是肺癌发生发展过程中的重要因素。

关键词: 肺癌; 细胞因子; 流式细胞术

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)10-0779-05

肺癌是世界上发病率和病死率最高的恶性肿瘤, 且呈急剧上升趋势。目前, 我国肺癌发病率每年增长 26.9%^[1]。机体的免疫功能下降或低下与肿瘤的发生、发展、复发、转移及预后有着密切的关系, 而免疫功能的变化可引起细胞因子相应的改变。各种细胞因子在肿瘤组织、机体内的表达水平及其与肿瘤的关系等一直是肿瘤免疫学研究的热点之一^[2]。

在抗肿瘤中起主要作用的 CD4+T 辅助细胞(Th 细胞), 根据其分泌的细胞因子类型, 主要分为 Th1、Th2 及 Th3 三种细胞亚群, 其中 Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 等细胞因子, 介导细胞免疫应答; Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-6、IL-10 等细胞因子, 介导体液免疫应答。机体抗肿瘤作用主要是细胞免疫, 在某些情况下体液免疫起到协同作用^[3]。Th17 细胞是新近被确认的一种 T 细胞亚群, 主要分泌细胞因子 IL-17, 具有招募粒细胞, 促进多种细胞释放炎症因子, 促进细胞增殖, 参与了机体多种炎症疾病, 自身免疫性疾病和肿瘤的发生^[4]。

本实验采用高通量、灵敏、快速且可同步进行多

参数分析的流式细胞术的微球阵列术(CBA)方法检测肺癌患者和正常人血清中的 Th1 型(TNF- α 、IFN- γ 、IL-2)、Th2 型(IL-4、IL-6、IL-10)及 Th17 型(IL-17)细胞因子的表达水平, 探讨联合检测细胞因子在肺癌患者血清中的表达水平, 并与临床分期、病理分型比较分析, 以期探讨细胞因子与肺癌发生发展过程的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

资料来自 2011 年 2~12 月就诊于山西省肿瘤医院, 经病理组织学明确诊断为肺癌, 之前未经过放疗或免疫生物治疗的 32 例患者, 其中男性 28 例, 女性 4 例; 年龄 35~78 岁, 中位年龄 58.5 岁; 鳞癌 11 例, 腺癌 12 例, 小细胞癌 6 例, 未分化癌 3 例; 按 2002 年 UICC 第 6 版肺癌 TNM 分期标准, I~II 期 8 例, III 期 13 例, IV 期 11 例。

对照组均为山西省肿瘤医院健康体检中心经体检合格的健康人, 39 人, 男性 27 人, 女性 12 人; 年龄 28~80 岁, 中位年龄 53 岁。

收稿日期: 2012-04-30 修回日期: 2012-08-01

通讯作者: 苏文, E-mail: SuWen30@yahoo.com

血清标本收集：抽取患者清晨空腹外周静脉血 2ml,离心 2 500r/min,7min,留取上层血清,然后分装冻存于-80℃ 低温冰箱中,待样本收集全后一并标记并上机检测。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂

流式细胞微球阵列术 (Cytometric Bead Array, CBA)试剂盒,购于美国 BD 公司,试剂盒包括 7 种细胞因子: IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17。实验时设标准管和阴性对照管。

1.2.2 主要仪器

流式细胞仪 (美国 BD 公司,型号:BD FACS Canto II),低速离心机(中国科大创新股份有限公司中佳分公司,型号:KDC-1044),超低温冰箱(中国大连三洋冷链股份有限公司,型号:MDF-382E (CN))。

1.2.3 细胞因子检测

按 CBA 试剂盒说明书进行操作。每种批号的试剂盒在使用前均做标准曲线。用反应稀释液将 7 种细胞因子标准品按梯度法稀释为 5 000、2 500、1 250、625、312、156、80、40、20、10 和 0pg/ml 共 11 个浓度梯度。吸取标准品稀释液或待测血清 50 μ l,加入 7 种细胞因子检测微球混合液 50 μ l、藻红蛋白(PE)荧光染液 50 μ l;充分涡旋混匀后在室温避光反应 3h;然后向各管加入 800 μ l 洗液,离心 1 500r/min,7min,倾弃上清;再加入 100 μ l 洗液,震荡混匀,5min 后上机采集数据,并用 BD 公司 CBA 数据处理软件(BD CBA FCAP Array Software)进行分析,自动绘制标准曲线并计算出各样本中各种细胞因子浓度(pg/ml)。

1.3 统计学处理

使用 SPSS16.0 for Windows 统计软件对实验原始数据进行分析处理,经 Kolmogorov-Smirnov 正态性检验各个细胞因子数据符合正态性,以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)来表示,组间比较采用方差分析,相关性分析采用 Pearson 相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 肺癌患者和正常人血清中 Th1、Th2 及 Th17 型细胞因子的表达水平

在肺癌患者中血清 IFN- γ 、IL-6、IL-17 水平较对照组高;IL-2、TNF- α 、IL-10 水平较对照组低 ($P<0.05$);IL-4 水平与对照组无统计学差异 ($P>0.05$)。见表 1。

2.2 不同临床特征肺癌患者血清细胞因子表达水平比较

由表 2 可见,各细胞因子的表达水平在不同性别、临床分期、病理类型及有无淋巴结转移之间差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 肺癌患者和正常人血清中各个细胞因子之间的相关性分析

肺癌患者中 IFN- γ 与 IL-2、IL-4、IL-17 均显著性相关,相关系数分别为 0.406、0.784、0.389(均 $P<0.05$);IL-2 与 TNF- α 、IL-4、IL-6、IL-17 显著性相关,相关系数分别为 0.390、0.382、0.433、0.646 (均 $P<0.05$);IL-6 与 IL-10、IL-17 显著性相关,相关系数分别为 0.460、0.514 ($P<0.05$);IL-10 与 IL-17 显著性相关,相关系数为 0.377($P<0.05$)。

正常人中 IFN- γ 与 IL-2、TNF- α 、IL-4、IL-10 显著性相关,相关系数分别为 0.486、0.509、0.357、0.402 (均 $P<0.05$);IL-2 与 TNF- α 、IL-4、IL-10 显著相关,相关系数分别为 0.559、0.355 和 0.365($P<0.05$),TNF- α 与 IL-10 显著性相关,相关系数为 0.330 ($P<0.05$)。见表 3。

3 讨论

细胞因子(cytokine,CK)是由活化的免疫细胞(T 细胞、B 细胞、NK 细胞、单核巨噬细胞、中性粒细胞),成纤维细胞等产生的一类分泌型糖蛋白。它们能在免疫细胞及细胞与细胞之间传递信息,介导细

表 1 肺癌组与对照组血清中细胞因子的表达水平比较(pg/ml)

组别	例数	IFN- γ	IL-2	TNF- α	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17
肺癌组	32	6.89 \pm 2.83	2.08 \pm 0.44	2.80 \pm 0.75	3.02 \pm 1.17	10.65 \pm 9.14	3.99 \pm 1.20	22.16 \pm 13.18
对照组	39	4.12 \pm 0.82	3.03 \pm 0.44	3.88 \pm 0.86	3.02 \pm 0.47	5.20 \pm 1.58	4.61 \pm 0.85	12.35 \pm 4.60
<i>t</i>		5.341	-2.913	-5.548	-0.110	3.335	-2.463	4.017
<i>P</i> 值		<0.001	0.005	<0.001	0.992	0.002	0.017	<0.001

表 2 不同临床特征的肺癌患者血清中各个细胞因子的表达水平

临床病理特征	例数	Th1 细胞因子			Th2 细胞因子			Th17 细胞因子
		IFN- γ	IL-2	TNF- α	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17
性别								
女性	4	8.33 \pm 1.97	3.10 \pm 0.64	3.15 \pm 0.59	3.60 \pm 1.19	6.28 \pm 4.93	4.00 \pm 1.13	26.60 \pm 10.72
男性	28	6.91 \pm 2.76	2.59 \pm 0.74	2.74 \pm 0.76	2.92 \pm 1.17	10.08 \pm 9.65	3.98 \pm 1.25	21.93 \pm 13.04
<i>t</i>		0.987	1.308	1.040	1.085	-0.947	0.038	0.681
<i>P</i>		0.332	0.201	0.307	0.287	0.351	0.970	0.501
临床分期								
I~II	8	7.95 \pm 2.37	2.49 \pm 0.70	2.46 \pm 0.53	3.04 \pm 1.56	7.36 \pm 7.49	3.83 \pm 1.55	23.74 \pm 12.86
III	13	6.56 \pm 3.49	2.62 \pm 0.71	2.83 \pm 0.83	2.98 \pm 1.23	13.21 \pm 11.68	3.93 \pm 1.13	20.88 \pm 15.65
IV	11	7.07 \pm 1.69	2.81 \pm 0.83	2.97 \pm 0.76	3.00 \pm 0.89	13.26 \pm 6.68	4.15 \pm 1.14	23.55 \pm 9.27
<i>F</i>		0.646	0.440	1.126	0.005	1.116	0.168	0.170
<i>P</i>		0.532	0.648	0.338	0.995	0.341	0.846	0.844
病理类型								
鳞癌	11	8.21 \pm 2.96	2.65 \pm 0.86	2.76 \pm 0.59	3.39 \pm 1.45	8.90 \pm 5.44	3.72 \pm 0.85	26.95 \pm 10.76
腺癌	12	6.08 \pm 2.41	2.77 \pm 0.74	3.03 \pm 0.79	2.53 \pm 0.84	11.98 \pm 13.64	3.96 \pm 1.55	22.53 \pm 15.04
小细胞癌	6	6.40 \pm 1.72	2.43 \pm 0.72	2.57 \pm 0.94	2.65 \pm 0.63	5.10 \pm 3.17	3.98 \pm 0.66	16.80 \pm 9.50
未分化癌	3	8.37 \pm 3.44	2.63 \pm 0.51	2.37 \pm 0.70	4.20 \pm 1.23	20.10 \pm 5.30	5.00 \pm 1.76	17.53 \pm 14.67
<i>F</i>		1.664	0.253	0.891	2.613	2.183	0.865	1.002
<i>P</i>		0.197	0.859	0.458	0.071	0.112	0.471	0.406
淋巴结转移								
无	15	6.89 \pm 2.13	2.63 \pm 0.68	2.55 \pm 0.56	2.89 \pm 1.26	11.11 \pm 11.84	4.11 \pm 1.43	26.14 \pm 13.10
有	17	7.26 \pm 3.16	2.67 \pm 0.81	2.99 \pm 0.84	3.10 \pm 1.13	9.75 \pm 6.56	3.86 \pm 1.02	19.31 \pm 11.82
<i>t</i>		-0.385	-0.140	-1.717	-0.488	-0.409	0.585	1.550
<i>P</i>		0.703	0.890	0.096	0.629	0.686	0.563	0.519

表 3 肺癌组和正常组血清中细胞因子间 Pearson 相关性分析

肺癌	对照组						
	Th1 细胞因子			Th2 细胞因子			Th17 细胞因子
	IFN- γ ;r(P)	IL-2;r(P)	IL- α ;r(P)	IL-4;r(P)	IL-6;r(P)	IL-10;r(P)	IL-17;r(P)
Th1							
IFN- γ	1.00	0.486(0.002)	0.509(0.001)	0.357(0.026)	0.264(0.105)	0.402(0.011)	0.155(0.347)
IL-2	0.406(0.021)	1.00	0.559(0.000)	0.355(0.027)	0.128(0.438)	0.365(0.022)	0.115(0.485)
TNF- α	0.053(0.773)	0.390(0.027)	1.00	0.304(0.060)	0.262(0.107)	0.330(0.040)	0.091(0.583)
Th2							
IL-4	0.784(0.000)	0.382(0.031)	0.079(0.328)	1.00	0.258(0.113)	0.214(0.192)	0.052(0.753)
IL-6	0.041(0.823)	0.433(0.013)	0.062(0.734)	0.156(0.395)	1.00	0.280(0.084)	0.036(0.828)
IL-10	0.212(0.244)	0.218(0.230)	0.158(0.389)	0.290(0.107)	0.460(0.008)	1.00	0.133(0.421)
Th17							
IL-17	0.389(0.028)	0.646(0.000)	0.214(0.239)	0.243(0.181)	0.514(0.003)	0.377(0.033)	1.00

胞生长、炎症作用、免疫应答、细胞分化、迁移和组织修复。细胞因子既可诱导免疫系统活化又可诱导免疫功能抑制，还可以调节肿瘤细胞的免疫耐受使其进入活化状态^[3]。

本实验采用的流式细胞术的微球阵列术(CBA)是一种新的流式细胞术液相蛋白定量技术，利用一系列荧光强度不同的微球包被有特异性捕获抗体，

与待测样本孵育后，形成“三明治”复合物，然后上流式细胞仪检测，其与传统的 ELISA 检测相比，其原理相似，但具有所需样本量小、灵敏度高、重复性好，一次可同时检测多个细胞因子的优点^[5]。

IL-2 主要由 Th1 细胞产生，可有效促进 T 细胞增殖和活化，诱导或促进多种细胞毒性活性，协同刺激 B 细胞增殖及分泌免疫球蛋白。IL-2 通过与 NK

细胞、杀伤细胞等淋巴细胞膜上 IL-2 受体结合,调节免疫细胞增殖,发挥抗肿瘤作用^[6]。IL-2 单抗(鼠源性 IL-2 单抗 S4B6) 联合 IL-2 可提高抗肿瘤效果^[7],已被广泛用于抗肿瘤及 HIV 感染治疗。本实验结果显示肺癌患者血清中 IL-2 水平较正常人低,符合上述的报道,因为肿瘤细胞可以分泌多种不同的免疫抑制分子(如 GTB- β 、IL-10、VEGF 等),可抑制 Th1 型细胞因子 IFN- γ 、IL-2 等生成。

IL-6 主要由单核-巨噬细胞和活化的 T 细胞产生,可作用于多种免疫细胞和造血细胞,并参与机体炎症反应和肿瘤细胞增殖。目前已有多种文献报道肿瘤细胞如骨髓瘤、膀胱癌、胃癌、宫颈癌等可以自分泌 IL-6,早在 1996 年 Wojciechowska 等^[8]发现治疗无效的肺癌患者血清中的 IL-6 水平不断升高,均提示肺癌细胞可自分泌 IL-6。美国国家癌症研究所的癌症筛查实验结果显示:IL-6 高表达与肺癌的发生有关系。在诊断为肺癌或将很快发展为肺癌的人群中 IL-6 的表达水平较高,与吸烟、年龄、性别、肿瘤组织学、分期以及系统性炎症无关,提示 IL-6 参与了肿瘤的进展^[9]。Kim 等^[10]实验结果显示,在疾病后期体重减少的患者中最初常维持高表达的 IL-6 或 IL-6 的表达升高,提示 IL-6 可能会诱导和维持肿瘤患者的恶病质。本实验结果显示,与正常对照组相比,肺癌患者血清中 IL-6 升高;随着临床分期增加,IL-6 的表达水平升高,但无统计学差异,与上述研究结果基本相符。

IL-17 是一种主要由 Th17 细胞分泌的前炎症细胞因子,其在肿瘤的发生发展中的作用尚存在争议,作用可能是双向的。IL-17 可通过刺激肿瘤细胞表达 IL-6,诱导巨噬细胞募集,进而促进肿瘤的生长^[9];IL-17 还可通过诱导活化 CD8+T 细胞的细胞毒性活细胞作用而杀伤肿瘤细胞起到抗肿瘤作用,但 IL-17 介导的抗肿瘤反应很大程度上依赖于 IFN- γ 的作用^[11-13]。肺癌模型显示:肺癌组织中高表达的 IL-17 还可通过增加 IFN- γ ,消除 T 细胞来增强抗肿瘤的免疫反应,抑制肿瘤的生长^[14]。本文实验结果显示 IL-17 在肺癌患者血清中的表达水平显著高于正常人,而 IL-17 与 IFN- γ 、IL-6 呈显著性相关,与以往报道^[11-14]的结果均相符。

我们的实验结果显示,肺癌患者血清中 Th1、Th2 及 Th17 型细胞因子在不同年龄、性别、不同临

床分期、病理类型及有无淋巴结转移的肺癌患者血清中的表达水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$),与先前的相关文献报道结果相一致^[15,16],但肺癌患者血清中 Th1 型细胞因子表达降低,患者的细胞免疫低下,机体的抗肿瘤免疫力下降,与 Yamazaki 等^[17]、高平等^[18]的研究结果相符合,提示细胞因子可能与肿瘤细胞本身的特征无相关性,而与肿瘤的炎症性微环境有关。

多数肿瘤患者体内呈现 Th2 优势的漂移状态,并且肿瘤细胞本身也可分泌多种细胞因子,影响肿瘤的微环境^[19,20]。这样一个微环境除了有肿瘤细胞和迁徙来的造血细胞,还包含许多不同类型细胞的亚群^[21],各种免疫细胞、分子及细胞因子则是肿瘤微环境的构成者,通过与肿瘤细胞及间质细胞相互作用发挥生物学效应^[22]。在本实验中,肺癌患者血清中 IFN- γ 与 IL-2、IL-4、IL-17;IL-2 与 TNF- α 、IL-4、IL-6、IL-17;IL-6 与 IL-10、IL-17;IL-10 与 IL-17 均显著性相关,说明细胞因子具有多样性、重叠性、协同性等特点,孤立的分析一个细胞因子很难对肿瘤局部免疫环境作出客观实际的评价^[23]。

因此,联合检测肿瘤患者血清中的细胞因子表达水平并分析其相互间的相关性,有助于动态监测肿瘤组织发生,发展过程中的变化情况,具有一定的临床意义。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [2] 单保恩. 肿瘤的细胞因子和细胞因子基因治疗[J]. 临床荟萃, 2003, 18(22): 1319-1320.
- [3] 丁桂凤. Roitt 免疫学基础 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2005. 167-188.
- [4] 陈曦, 朱波, 陈正堂. IL-7/IL-17R 与恶性肿瘤[J]. 免疫学杂志, 2010, 26 (4): 366-369.
- [5] Morgan E, Varro R, Sepulveda H, et al. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology[J]. Clin Immunol, 2004, 110(3): 252-266.
- [6] Neuner A, Schindel M, Wildenberg U, et al. Prognostic significance of cytokine modulation in non-small cell lung cancer [J]. Int J Cancer, 2002, 101(3): 287-292.
- [7] Kamimura D, Sawa Y, Sato M, et al. IL-2 in vivo activities and antitumor efficacy enhanced by an anti-IL-2 mab [J].

- J Immunol,2006,177(1):306-314.
- [8] Wojciechowska A,Matecka-Nowak M,Adamiak E,et al. Serum levels of interleukin-10 and interleukin-6 in patients with lung cancer [J]. Neoplasma,1996,43(3): 155-158.
- [9] Pine SR,Mechanic LE,Enewold L,et al. Increased levels of circulating interleukin 6,interleukin 8,C-reactive protein, and risk of lung cancer[J]. J Natl Cancer Inst 2011,103(14): 1112-1122.
- [10] Kim HJ,Kim HJ,Yun J,et al. Pathophysiological role of hormones and cytokines in cancer cachexia [J]. J Korean Med Sci,2012,27(2): 128-134.
- [11] Tartour E,Fossiez F,Joyeux I,et al. Interleukin17, a T-cell-derived cytokine,promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice[J]. Cancer Res,1999,59(15): 3698-3704.
- [12] Murugaiyan G,Saha B. Protumoe vs antitumor functions of IL-17 [J] . J Immunol,2009,183(7):4169-4175.
- [13] 黄锦,何凡. IL-17 在肿瘤发生发展中的作用[J]. 医学分子生物学杂志,2010,7(4):373-376.
- [14] Sarah Reppert,Sonja Koch,Susetta Finotto. IL-17 is a central regulatory of Lung tumor growth[J]. Oncolmmunology,2012,1(5):1-3.
- [15] 陈宏新,贾哲浦,姜健,等. 肺癌患者外周血 Th1/Th2 的检测及意义 [J]. 现代检验医学杂志,2003,18(2):50-51.
- [16] 杨凌,陈清勇,方睿,等. 肺癌患者外周血 Th1/Th2 水平测定及其临床意义[J]. 浙江医学,2008,30(2):129-131.
- [17] Yamazaki K,Yano T,Kameyama T,et al. Clinical significance of serum Th1/Th2 cytokines in patients with pulmonary adenocarcinoma[J]. Surgery,2002,131 (Suppl): s236-s241.
- [18] 高平,吴鄂生,尹本义,等. 非小细胞肺癌患者外周血单个核细胞 Th 细胞因子分泌 [J]. 中华结核和呼吸杂志,2002,25(9):560-561.
- [19] Wolf AW,Wolf D,Steurer M,et al. Increase in regulatory Tcells in the peripheral blood of cancer patients [J]. Clin Cancer Res,2003,9(3):606-612.
- [20] Schaefer C,Gkim G,Albers A,et al. Characteristics of patients with head and neck cancer [J]. BJC,2005,8(1):1-8.
- [21] Seike T,Fujita K,Yamakawa Y,et al. Interaction between lung cancer cells and astrocytes via specific inflammatory cytokines in the microenvironment of brain metastasis [J]. Clin Exp Metastasis,2011,28(1):13-25.
- [22] Van Kempen LC,Ruiter DJ, Van Muijen,et al. The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution [J]. Eur J Cell Biol,2003,82(11):539-548.
- [23] 聂刚,范志民. T 细胞型细胞因子与非小细胞肺癌的相关性研究[J]. 中国医药,2008,3(7):445-446.