

重组人白细胞介素-12 对胰腺癌放射治疗防护作用的研究

于伟娜¹, 郭娜¹, 杨莉荣¹, 王东¹, 张文华¹, 万玲琴², 官晓静², 王义善¹

(1.解放军第107医院国家中西医结合肿瘤治疗重点专科/全军肿瘤中心, 山东烟台 264002; 2.滨州医学院, 山东烟台 264003)

摘要: [目的] 探讨重组人白细胞介素-12 (recombinant human interleukin-12, rhIL-12) 在胰腺癌放射治疗放射防护中发挥的作用。 [方法] 回顾性分析 52 例胰腺癌患者, 根据治疗方式分为单纯放疗组和 rhIL-12+放疗组。两组患者均采用射波刀治疗, 放射剂量 30~35Gy, rhIL-12+放疗组放疗后予以 150ng/kg rhIL-12 干预治疗。两组分别于 0h、12h、3d、7d、14d、21d、28d 采用流式细胞术检测两组患者细胞免疫功能相关指标 CD4/CD8 比值、CD45、CD56 数值变化; ELISA 法检测血清细胞因子 IFN- γ 表达水平; 分析评价两组患者外周血细胞计数变化、近期治疗疗效和胃肠道相关不良反应。 [结果] rhIL-12+放疗组患者免疫相关分子 CD4/CD8 比值、CD45 和 CD56 表达 12h 内均存在一过性降低现象, 随治疗时间的推移逐渐回升, 于治疗第 14d 达到峰值且恢复, 改善趋势明显优于单纯放疗组 ($P<0.05$); 细胞因子 IFN- γ 表达随时间变化逐渐递增, 于 14d 达峰值, 较单纯放疗组具有显著性差异 ($P<0.05$)。血液标本检测显示两组患者治疗前红细胞 (RBC)、白细胞 (WBC)、血小板 (PLT)、中性粒细胞 (NEUT) 计数以及血红蛋白 (Hb) 含量均无显著性差异 ($P>0.05$); 在治疗 14d 时 rhIL-12+放疗组患者 WBC、PLT 和 NEUT 计数较单纯放疗组均具显著性差异 ($P<0.05$), 而 RBC 计数和 Hb 含量则差异无统计学意义 ($P>0.05$); rhIL-12+放疗组患者近期治疗疗效显著 ($P=0.046$); 两组患者胃肠道不良反应主要表现为恶心呕吐和腹泻, rhIL-12+放疗组发生率均低于单纯放疗组 ($P=0.001$; $P=0.012$)。 [结论] rhIL-12 可有效地促进胰腺癌放射治疗患者造血功能和免疫机能的恢复和重建, 并能降低放射治疗不良反应的发生率, 提高治疗疗效。

关键词: 重组人白细胞介素-12; 胰腺肿瘤; 放射疗法; 放射防护; 免疫功能

中图分类号: R735.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)07-0574-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.07.B010

Study on Radiation Protection Effect of Recombinant Human Interleukin-12 in Radiotherapy for Pancreatic Cancer

YU Wei-na, GUO Na, YANG Li-rong, et al.

(National Key Specialty of Combination of Traditional Chinese and Western Medicine for Tumor Center for Tumor Treatment, the People's Liberation Army 107th Hospital, Yantai 264002, China)

Abstract: [Objective] To investigate the role of recombinant human interleukin-12 (rhIL-12) on radiation protection in radiotherapy for pancreatic cancer. [Methods] The clinical data of 52 cases with pancreatic cancer was analyzed retrospectively. Patients were divided into two groups according to treatment method: radiotherapy alone group and rhIL-12 plus radiotherapy group. The patients in two groups both received CyberKnife radiosurgery with 30 to 35Gy. The patients in rhIL-12 plus radiotherapy group were treated with rhIL-12 with the dose of 150ng/kg additionally. CD4/CD8 ratio, the number of CD45 and CD56 were detected by flow cytometry (FCM) at 0h, 12h, 3d, 7d, 14d, 21d and 28d, respectively. The level of IFN- γ was analyzed by ELISA. The changes of peripheral blood cell counts, short-term response and gastrointestinal tract toxicities were compared between the two groups. [Results] CD4/CD8 ratio, CD45 and CD56 showed a transient decreasing within 12h in rhIL-12 plus radiotherapy group, and then significantly increased with the lapse of time. Subsequently, the expressions of them reached peak level at the 14th day and the trend of improvement was significantly better than that in radiotherapy alone group ($P<0.05$). The expression of IFN- γ gradually increased with the lapse of time and reached peak level at the 14th day which had significant difference compared to radiotherapy alone group

基金项目: 吴阶平医学基金会重大专项 (320.6750.14204)

通讯作者: 王义善, 主任医师; 解放军第 107 医院国家中西医结合肿瘤治疗重点专科/全军肿瘤中心, 山东省烟台市芝罘区只楚南路 7 号 (264002); E-mail: wangyishan288@163.com

收稿日期: 2015-11-30; **修回日期:** 2015-12-30

($P < 0.05$). There was no significant difference in red blood cells (RBC), white blood cells (WBC), platelet (PLT), neutrophil (NEUT) and hemoglobin (Hb) between the two groups before treatment ($P > 0.05$). The levels of WBC, PLT and NEUT had significant difference at the 14th day in rhIL-12 plus radiotherapy group compared to radiotherapy alone group ($P < 0.05$). While there was no statistical significance in the levels RBC and Hb ($P > 0.05$). The short-term response in rhIL-12 plus radiotherapy group was significant ($P = 0.046$). Gastrointestinal tract toxicities in two groups were mainly for nausea and vomiting and diarrhea. Patients in the rhIL-12 plus radiotherapy group showed a lower incidence than that in radiotherapy alone group ($P = 0.001$; $P = 0.012$). [Conclusion] RhIL-12 might effectively improve recovery of hematopoiesis and immune reconstitution, reduce the toxicities and enhance the clinical efficacies in patients with pancreatic cancer.

Subject words: recombinant human interleukin-12; pancreatic neoplasms; radiotherapy; radiation protection

胰腺癌因其起病较隐匿,病情发展迅速而成为预后极差的消化道恶性肿瘤之一。虽然手术切除是唯一根治的手段,但大部分患者就诊时多已发生远处转移,故此,胰腺癌的预后极差。放疗是胰腺癌重要的辅助治疗手段,对于改善患者生存质量,延长生存期具有一定作用,但放射治疗极易导致骨髓抑制等诸多不良反应,甚至还可造成一定程度的免疫功能抑制。白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12)是一类具有广泛生物学活性的细胞因子,主要作用于淋巴细胞,同时也是抗肿瘤细胞免疫应答的决定性因素^[1]。由基因工程技术制备的重组人白细胞介素-12(rhIL-12)是由CHO细胞表达分泌的新型生物制剂,可在一定程度上实现骨髓抑制外周血象的恢复,促进骨髓各系祖细胞的增殖与分化,改善机体的免疫功能。目前有关rhIL-12在人抗放射损伤作用的研究尚未见报道,本研究拟回顾性分析解放军第107医院全军肿瘤中心自2014年10月至2015年9月接受放射治疗的胰腺癌患者的临床资料,探讨rhIL-12在胰腺癌放射治疗中的防护作用,以期为其在临床的广泛应用提供一定的依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择2014年10月至2015年9月于解放军第107医院全军肿瘤中心行放射治疗的52例胰腺癌患者,依据患者的治疗方式分为单纯放疗组(23例)和rhIL-12+放疗组(29例),其中男性35例,女性17例,年龄42~76岁,平均(58±8.6)岁,全部患者

Karnofsky评分 ≥ 60 分。病例TNM分期为Ⅲ~Ⅳ期,其中Ⅲ期30例,Ⅳ期22例。两组患者性别、年龄、临床分期差异均无统计学意义($P > 0.05$),具可比性。病例纳入标准:①肿瘤经组织病理学、CT或MRI等影像学确诊,且无服用免疫抑制剂药物史。根据国际卫生组织(WHO)临床分期标准均为Ⅲ~Ⅳ期。②ECOG评分1~4分。③术后复发或淋巴神经细胞浸润转移,需接受放射外科治疗患者。④纳入患者均对研究检测和治疗知情同意。排除标准:①合并结核、心、肝、肾、肺等重要脏器功能严重衰竭者。②肿瘤确诊为良性者。③有脏器移植或有过敏史者。④妊娠、哺乳期或育龄患者。实验研究经解放军第107医院伦理委员会批准。

1.2 主要设备与试剂

BrightSpeed Elite Select X射线计算机断层扫描(CT)装置购自美国GE公司;流式细胞仪购自美国BD公司;血细胞分析仪购自日本希森美康株式会社;射波刀(CyberKnife)购自美国Accuray公司;注射用rhIL-12购自青岛康立泰药业有限公司;IFN- γ 检测试剂盒、Anti-Human CD4、CD8、CD45、CD56抗体购自美国BD公司。

1.3 治疗方法

采用16排CT行1.25 mm薄层扫描定位勾画肿瘤靶区,进行放射治疗。大体肿瘤体积(GTV)为影像学可见的胰腺原发肿瘤,临床靶体积(CTV)为GTV外放2~3 mm以覆盖可能的微转移灶,计划靶体积(PTV)为CTV外放2~3 mm以防止同步呼吸产生的误差。据患者一般情况、肿瘤大小及位置确定合适的剂量,通常采用70%~80%的等剂量曲线覆盖

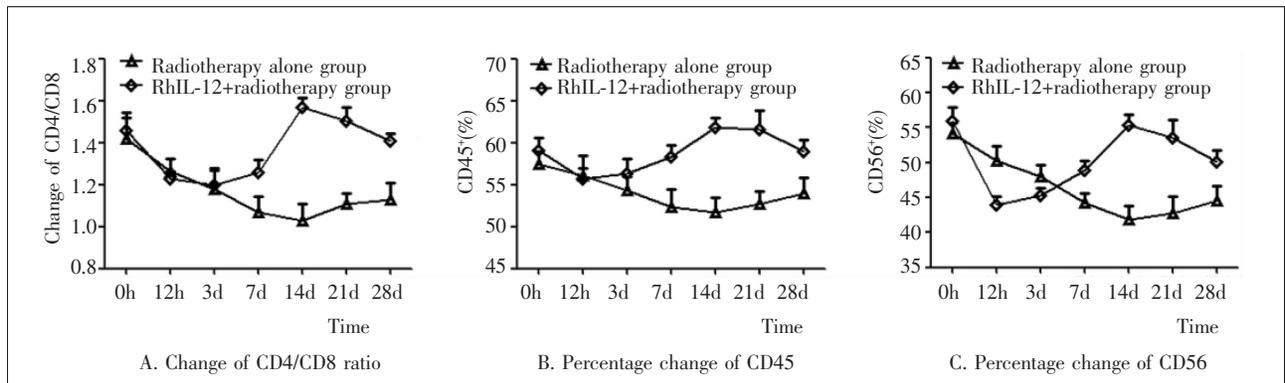


Figure 1 The effects of rhIL-12 intervention treatment on the expression of CD4/CD8 ratio, CD45 and CD56

PTV,并给予其周边单次剂量 6~7Gy,分 5 次进行治疗,隔日一次,总剂量 30~35Gy。rhIL-12+放疗组在放疗治疗 24h 后皮下注射 rhIL-12(150ng/kg),并于放疗后第 7d 重复给药;分别于用药前(0h)及给药后 12h、3d、7d、14d、21d、28d 采集外周静脉血,流式细胞术检测免疫功能相关指标 CD4/CD8 比值、CD45 和 CD56 表达水平;ELISA 检测两组患者血清细胞因子 IFN- γ 表达变化;检测两组患者全血细胞计数变化;观察两组患者的近期治疗疗效和胃肠道相关不良反应。

1.4 疗效评价标准(WHO)

治疗结束后 3 个月通过腹部 CT 检查进行近期疗效评价:完全缓解(CR):所有症状体征完全消失并维持 4 周以上;部分缓解(PR):肿瘤体积减少 $\geq 50\%$ 并维持 4 周以上;无变化(NC):病变无明显变化并至少维持 4 周,肿瘤大小估计增大 $<25\%$,减少 $<50\%$ 并至少维持 4 周;进展(PD):出现新病灶,或原有病灶增大 $\geq 25\%$ 。CR+PR 为治疗有效。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计数资料比较采用 χ^2 检验,计量资料比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫相关指标 CD4/CD8 比值、CD45 和 CD56 表达变化

流式检测发现单纯放疗组患者在放疗治疗后 CD4/CD8 比值、CD45 和 CD56 表达水平持续下降且在 14d 时降至谷底,随后逐渐缓慢回升;而 rhIL-12+

放疗组患者在注射 rhIL-12 后,CD4/CD8 比值、CD45 和 CD56 表达 12h 内均存在一过性降低现象,后随治疗时间的推移逐渐呈递增趋势,于治疗第 14d 达到峰值,较单纯放疗组差异显著 (*t* 值分别为 30.79, 25.58 和 28.99; P 均 <0.05)(Figure 1)。

2.2 细胞因子 IFN- γ 水平变化

单纯放疗组患者在放疗治疗后 IFN- γ 水平持续下降,21d 后有所改善提高;rhIL-12+放疗组患者血清 IFN- γ 水平在注射 rhIL-12 后持续升高,于第 14d 到达峰值;虽然 14d 后 IFN- γ 水平呈减低趋势,但仍明显高于单纯放疗组 (*t* 值分别为 14.49, 12.7 和 15.29; P 均 <0.05)(Figure 2)。

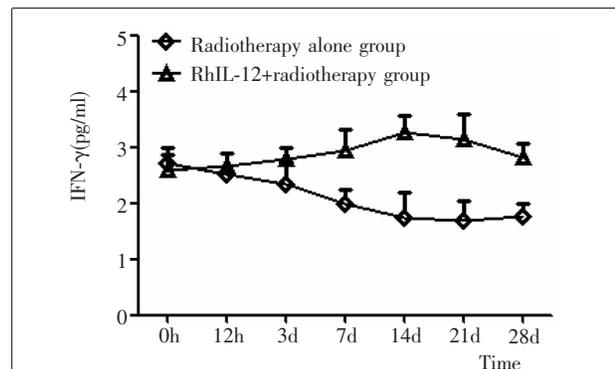


Figure 2 The effect of rhIL-12 intervention treatment on the expression of IFN- γ

2.3 血液学指标变化

放疗治疗前,两组患者的白细胞、红细胞、血小板、中性粒细胞计数以及血红蛋白含量差异均无统计学意义。rhIL-12 干预治疗 14d 后,检测发现 rhIL-12+放疗组患者白细胞、血小板、中性粒细胞计数较同期单纯放疗组患者均具显著性差异 (*t* 值分别为 13.490, 2.114 和 3.382; P 均 <0.05), 红细胞计数、血

Table 1 The change of hematologic indexes in two groups before and after treatment($\bar{x}\pm s$)

Groups	RBC($\times 10^{12}/L$)	WBC($\times 10^9/L$)	Hb(g/L)	NEUT($\times 10^9/L$)	PLT($\times 10^9/L$)
Radiotherapy alone group					
Before radiotherapy	4.34 \pm 0.62	7.24 \pm 0.49	129.37 \pm 13.56	4.23 \pm 2.15	266 \pm 23
After radiotherapy	4.26 \pm 1.03	3.82 \pm 0.52	116.52 \pm 10.83	2.97 \pm 1.42	221 \pm 47
RhIL-12+radiotherapy group					
Before radiotherapy	4.42 \pm 1.31	7.75 \pm 1.85	126.75 \pm 12.18	4.64 \pm 3.01	262 \pm 19
After radiotherapy	4.38 \pm 0.78	6.23 \pm 0.72*	110.83 \pm 11.26	4.86 \pm 2.36*	254 \pm 62*

Note: *: Compared with radiotherapy alone group in the same period, $P < 0.05$.

红蛋白含量则差异无统计学意义(t 值分别为 0.463 和 1.840; P 均 >0.05)(Table 1)。

2.4 近期疗效比较

统计结果显示 rhIL-12+放疗组治疗近期有效率为 89.7%, 单纯放疗治疗组为 65.2%, 两组近期疗效统计学差异显著($P=0.046$)(Table 2)。

Table 2 Comparison of short-term response in two groups(%)

Groups	N	CR	PR	NC	PD	χ^2	P
Radiotherapy alone group	23	6(26.1)	9(39.1)	5(21.7)	3(13.0)	7.608	0.046
RhIL-12+radiotherapy group	29	18(62.1)	8(27.6)	2(6.9)	1(3.4)		

2.5 胃肠道相关不良反应

单纯治疗组患者胃肠道相关不良反应中恶心呕吐发生率 56.5%(13/23), 腹泻 43.5%(10/23), 肝肾功能损伤 30.4%(7/23), rhIL-12+放疗组则分别为 13.8%(4/29)、10.3%(3/29)、10.3%(3/29); 两组恶心呕吐、腹泻统计结果比较有显著统计学意义($\chi^2=10.643, P=0.001; \chi^2=7.498, P=0.012$), 而肝肾功能损伤方面两组差异则无统计学意义($\chi^2=3.333, P=0.068$)(Table 3)。

Table 3 Comparison of gastrointestinal tract-related toxicities effect in two groups

Groups	Nausea and vomiting		Diarrhea		Hepatic and renal function damage	
	I/II	III/IV	I/II	III/IV	I/II	III/IV
Radiotherapy alone group	13	0	9	1	7	0
RhIL-12+radiotherapy group	4	0	3	0	3	0
χ^2	10.643		7.498		3.333	
P	0.001		0.012		0.068	

3 讨论

胰腺癌的发病多趋于老龄化且恶性程度极高, 其唯一有效的治疗方法为外科手术切除, 但这也只能使 5 年生存率提高到 10%, 尽管如此, 约 80% 的胰腺癌患者由于其临床特征原因不宜手术^[2]。目前临床上一些化疗药物如吉西他滨对胰腺癌的治疗有一

定的疗效, 但也仅可延长 1.24 个月的中位生存期^[3]。目前越来越多的研究显示放射治疗对缓解无法进行手术根治的胰腺癌患者疗效显著, 且已为众多学者认可, 但放射治疗极易引起发烧、乏力、白细胞下降等不良反应, 甚至引起机体的免疫抑制, 而免疫功能的紊乱也是肿瘤发生发展的一个重要原因^[4,5]。因此, 探寻免疫调节因子在

增强机体免疫功能的同时, 既可提高胰腺癌的放疗疗效又可减缓放射损伤

亦显得尤为迫切和重要。

放射治疗在短时间内杀伤肿瘤组织细胞的同时, 也可造成周围正常组织的放射性损伤。全血细胞减少, 特别是血小板及白细胞迅速下降而引起的出血和感染, 往往是影响患者治疗效果的重要原因。早期研究揭示 rhIL-12 可作用于定向分化的造血祖细胞及多系分化潜能的造血干细胞, 从而促进造血功能的恢复, 且认为 rhIL-12 可能通过促使骨髓造血祖细胞进入对辐射耐受的 S 期以发挥辐射防护作用^[6]。

Basile 等^[7]近期研究发现 rhIL-12 可促进骨髓各系祖细胞的增殖和分化, 有利于骨髓抑制小鼠外周血象的恢复。本研究对部分放疗患者行 rhIL-12 干预治疗 14d 后, 患者全

血细胞计数分析结果表明, 放射治疗后两组患者血白细胞、血小板和中性粒细胞计数均有不同程度的下降, 但 rhIL-12+放疗组患者的下降程度均明显低于单纯放疗组患者, 初步提示 rhIL-12 有助于放疗患者造血功能的恢复。

IL-12 是一类重要的免疫细胞因子, 其一方面可激活一些细胞毒性细胞诸如 NK 细胞、CTL 细胞等

来增加肿瘤细胞的死亡;另一方面,IL-12又可抑制肿瘤新生血管的生成从而导致肿瘤细胞的坏死^[8]。Zilocchi等^[9]在结直肠癌研究模型中发现过表达的IL-12不仅可通过促进IFN- γ 的分泌降低新生肿瘤的形成比例,还可有效地抑制肿瘤的进展,在此过程中CD4⁺和CD8⁺T细胞介导的细胞免疫应答是必不可少的,进一步验证了在肿瘤免疫应答过程中肿瘤细胞与细胞因子之间的相互关系。此外,NK细胞表面标记CD56表达含量的增加将不断促使NK细胞分泌大量的IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子,从而调控肿瘤的生长和转移,在肿瘤的免疫监视过程中也发挥了重要的作用^[10-13]。本研究发现rhIL-12+放疗组患者血细胞CD4/CD8比值、CD56以及白细胞共同抗原CD45在一过性降低之后,随治疗时间推移逐渐回升,于治疗14d达到峰值且高峰出现前均呈递增趋势,恢复改善趋势均明显优于单纯放疗组;同时血浆细胞因子IFN- γ 表达水平逐渐增加,14d达到峰值之后又趋于降低,考虑可能与机体IL-12浓度降低有关;两组患者在治疗3个月后,近期疗效分析显示rhIL-12+放疗组患者疗效显著。这些研究结果表明rhIL-12可有效地恢复放射治疗患者外周血细胞计数并改善造血功能,同时还可提升血细胞中免疫相关分子的表达,增加细胞因子IFN- γ 的分泌,从而增强机体的细胞免疫应答能力,提高治疗疗效,进一步证实了rhIL-12在放射防护中的作用。至于外周血中CD4/CD8比值、CD45和CD56表达在达到峰值之后又趋于下降,考虑可能与机体的免疫调节能力有关,如若继续用药是否有改善,后续还有待观察;另外,患者在应用rhIL-12之后各项表达出现短暂的一过性降低现象,其具体原因还需要进一步的探讨研究。

本研究还发现rhIL-12在干预治疗过程中患者恶心呕吐及腹泻的发生率均明显低于单纯放疗组,表明rhIL-12干预治疗对胃肠道黏膜具有较好的放射防护作用,能有效地降低患者的放疗不良反应。Leonard等^[14]曾报道参加rhIL-12临床试验的17例患者中有15例出现消化道出血、肝功能异常和哮喘等不良反应,2例死亡,考虑可能为既定给药方案致使机体IFN- γ 含量过高,直接导致不良反应的发生。因此,有关rhIL-12在临床应用中存在的潜在不良反应还需要做深入探索研究。

综上所述,放射治疗后联合应用rhIL-12可有效地促进胰腺癌放射治疗患者造血功能和免疫机能的恢复,实现免疫微环境的稳态,降低消化道不良反应,提高治疗疗效。在后期的研究中还需加大样本量进一步探讨rhIL-12的临床效应,深入验证其潜在的放射防护和抗肿瘤免疫介质作用。

参考文献:

- [1] Zhang L, Feng D, Hu Y, et al. IL-12 augments antitumor responses to cycled chemotherapy [J]. *J Immunother*, 2015, 8(4):137-144.
- [2] Jones OP, Melling JD, Ghaneh P. Adjuvant therapy in pancreatic cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(40):14733-14746.
- [3] Sehgal R, Alsharedi M, Larck C, et al. Pancreatic cancer survival in elderly patients treated with chemotherapy[J]. *Pancreas*, 2014, 43(2):306-310.
- [4] Zaatar AM, Lim CR, Bong CW, et al. Whole blood transcriptome correlates with treatment response in nasopharyngeal carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31:76.
- [5] Wang P, Leung AW, Xu C. Low-intensity ultrasound-induced cellular destruction and autophagy of nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Exp Ther Med*, 2011, 2(5):849-852.
- [6] Neta R, Stiefel SM, Finkelman F, et al. IL-12 protects bone marrow from and sensitizes intestinal tract to ionizing radiation[J]. *J Immunol*, 1994, 153(9):4230-4237.
- [7] Basile LA, Ellefson D, Gluzman-Poltorak Z, et al. Hema-MaxTM, a recombinant human interleukin-12, is a potent mitigator of acute radiation injury in mice and non-human primates[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2):e30434.
- [8] Zundler S, Neurath MF. Interleukin-12: functional activities and implications for disease[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015, 26(5):559-568.
- [9] Zilocchi C, Stoppacciaro A, Chiodoni C, et al. Interferon-gamma-independent rejection of interleukin 12-transduced carcinoma cells requires CD4⁺T cells and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor [J]. *J Exp Med*, 1998, 188(1):133-143.
- [10] Valgardsdottir R, Capitanio C, Texido G, et al. Direct involvement of CD56 in CIK mediated lysis of CD56 hematopoietic target cells [J]. *Exp Hematol*, 2014, 42(12):1013-1021.
- [11] Le Garff-Tavernier M, Decocq J, de Romeuf C, et al. Analysis of CD161CD56dim NK cells from CLL patients: evidence supporting a therapeutic strategy with optimized anti-CD20 monoclonal antibodies [J]. *Leukemia*, 2011, 25(1):101-109.
- [12] Miller JS. Therapeutic applications: natural killer cells in the clinic[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2013, 2013:247-253.
- [13] Zhang S, Pan SB, Lyu QH, et al. Postoperative regulatory T-Cells and natural killer cells in stage I nonsmall cell lung cancer underwent video-assisted thoracoscopic lobectomy or thoracotomy[J]. *Chin Med J*, 2015, 128(11):1502-1509.
- [14] Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, et al. Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon- γ production [J]. *Blood*, 1997, 90(7):2541-2548.