

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.12.037

肿瘤细胞的放射抗拒特性与免疫调节^{*}

尹姣姣 综述,潘耀柱[△],白 海 审校

(中国人民解放军兰州军区兰州总医院血液科 730050)

[关键词] 放射疗法;免疫调节;辐射耐受性;白细胞介素-12

[中图分类号] R735

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)12-1695-03

在癌症患者治疗的过程中,大约有 70% 的患者需要放射治疗,然而肿瘤细胞的辐射抗拒特性是肿瘤放射治疗失败的根源。影响肿瘤细胞放射敏感性的因素有很多,归结起来有 3 个方面:(1)肿瘤细胞的外环境和肿瘤组织基质因素;(2)在细胞层次上的因素;(3)肿瘤细胞内分子或基因改变因素。目前,放射肿瘤学已经面临了一个新概念的出现,即免疫系统能够调节放射治疗中的抗肿瘤效应。以下就机体免疫系统在放射治疗中的作用及肿瘤细胞产生辐射抗拒特性的机制,和目前白细胞介素-12(IL-12)在放射治疗中的意义作一综述。

1 免疫系统在放射治疗中的作用

放射治疗是癌症治疗中一种重要的形式,它既可以用于单独治疗癌症也可以同化学治疗和外科手术治疗联用。放射治疗后肿瘤缩小的主要机制是损坏肿瘤细胞的 DNA,造成肿瘤细胞在分子水平上的损伤,然而,一个新的观点指出机体的免疫系统是保证有效的放射治疗所必需的,其中 T 细胞及其分泌的干扰素在此过程中具有重要作用。

有报道发现在模拟肿瘤的小鼠中,肿瘤组织和引流淋巴结(draining lymph nodes,DLN)产生的肿瘤特异性细胞毒性淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte,CTL)在放射治疗后抑制肿瘤的生长中具有重要作用^[1-2]。该细胞为 CD8⁺特异 T 细胞,通过抗 CD8 单克隆抗体技术消除 CD8⁺ T 细胞后,放射治疗的疗效几乎完全消失。另外,在手术切除 DLN 或者基因缺失(Aly/Aly)的小鼠中,肿瘤部位 CD8⁺ 肿瘤特异性 CTL 会明显减少,同时伴有放射治疗肿瘤疗效的减弱^[1]。这预示着 DLN 在放射诱导的 CTL 的激活和集聚过程中必不可少,也是抑制肿瘤必不可少的器官。

局部照射治疗肿瘤后,在同一机体内没有受到照射部位的肿瘤减小或消失,这种在没有照射部位产生的全身效应,称为肿瘤治疗中的异位效应^[3]。异位效应在肿瘤治疗和控制转移方面具有重要作用,将其用于临床肿瘤治疗有重要意义。有研究发现,异位效应的产生可能与死亡的肿瘤细胞相关^[4]。死亡的肿瘤细胞会分泌一种蛋白,即高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1),该蛋白会诱导树突状细胞(DC) Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 信号通路的激活,从而使肿瘤抗原特异性 T 细胞活化发挥杀伤周围肿瘤细胞的作用。在放射治疗的时候,DC 细胞通过 TLR4 和它的配体 MyD88 从死亡的肿瘤细胞获得有效的抗原信号,从而激活肿瘤抗原特异性 T 细胞。在对手术后留有阳性淋巴结的乳腺癌患者的研究观察中发现,与具有野生型 TLR4 基因的患者相比较,TLR4 基因缺失的患者肿瘤复发更快。由此可见,肿瘤

放射治疗后出现的异位效应也是通过免疫调节来实现的。

干扰素 γ (interferon gamma, IFN γ)是保证放射治疗疗效的必要细胞因子^[5]。实验发现对患有结肠癌的野生型小鼠进行局部放射治疗(15 Gy),肿瘤的体积会减小,而对于 IFN γ 敲除的小鼠则没有变化^[6]。研究证实了肿瘤内 IFN γ 的水平在放射治疗后 2 d 升高,这正好和肿瘤体积的减少相关,但这并不意味着 IFN γ 对肿瘤细胞有直接的细胞毒作用^[7]。51Cr 释放实验证实放射治疗后的肿瘤组织内 T 细胞展现出一种超强的溶解肿瘤细胞的能力,这依赖于 IFN γ 的产生。CD8⁺ T 细胞是 IFN γ 的主要产生者,通过抗体处理消除 CD8⁺ T 细胞,可以使细胞内 IFN γ 的水平下降 90%。消除 CD8⁺ T 细胞几乎剥夺了放射治疗肿瘤的作用^[6],由此可见,IFN γ 可能是 CD8⁺ T 细胞的下游效应分子,在放射治疗抗肿瘤中起了不可替代的作用^[5]。

2 放射治疗失败的原因

放射治疗对于原位肿瘤的治疗是一种非常有效的方法,但是并不是所有的个体都会得到同样的疗效^[8-9]。临幊上,经常把接受放射治疗的癌症患者分为两类:第一类人群是放射治疗应答人群,即采用放射治疗可以明显地控制或者治愈肿瘤;第二类人群是放射治疗不应答人群,即放射治疗肿瘤疗效低下^[10]。研究发现,放射治疗后,放射应答肿瘤免疫细胞有效增高,从而导致 IFN γ 和细胞毒性 T 细胞的急剧增加;无应答肿瘤内免疫细胞和 IFN γ 增加很少同时只存在轻微的 CTL 效应^[10]。

放射治疗原位肿瘤失败的原因很多,其中肿瘤和宿主的因素非常复杂。目前的肿瘤平衡模型提出存在细胞生长和细胞死亡这种平衡,免疫调节存在于放射诱导的肿瘤休眠中,肿瘤休眠是由肿瘤增殖和免疫细胞杀伤作用的平衡引起的^[11],免疫成分的消除会解除肿瘤的休眠状态而促使肿瘤复发。放射治疗的成功与否,免疫应答是关键,放射治疗后需要长时间的免疫活动来建立肿瘤休眠,因此放射治疗后增加免疫调节细胞有可能最大限度地增加放射治疗疗效。

3 肿瘤细胞产生放射抗拒性的机制

首先从分子水平探讨,应用基因分析技术确定在放射治疗敏感性和放射抗拒性肿瘤中表达量不同的基因有哪些,对于理解临幊出现的放射抗拒性肿瘤和提高放射治疗疗效具有重要意义。有报道证实在人类患有的癌症中与放射治疗敏感性相关的基因一般会与细胞凋亡、DNA 修复,生长因子,信号转导,细胞周期和细胞黏附、侵袭和转移,血管生成和缺氧有关。在这些基因中,BIRC2 是肿瘤放射应答的预警器。一些研究已经

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81372132);甘肃省自然科学基金资助项目(145RJZA199)。 作者简介:尹姣姣(1987—),检验技师,硕士,主要从事细胞自噬研究。 △ 通讯作者, E-mail:panyaozhu@163.com。

证实了在一些肿瘤类型中可以采用基因分析来判断放射治疗敏感性。Survivin是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis, IPA)家族的成员,是目前发现最强的凋亡抑制因子,Survivin功能复杂,具有抑制细胞凋亡,促进细胞转化并且参与细胞有丝分裂、血管生成和肿瘤细胞耐药性产生等作用。研究者发现,Survivin是惟一的单独与固有放射治疗敏感性相关的蛋白。除了Survivin,Bax、Bcl-2、Bcl-X(L)、COX2和P53、Arg72Pro多态性也与放射应答相关^[9]。

其次,从免疫调节水平看,研究发现放射治疗后,存在于引流淋巴结和肿瘤中的DC细胞都会被放射损伤的肿瘤细胞释放的危险相关分子模式(danger-associated molecular patterns, DAMPs)激活。随后,这些DC细胞具有了吞噬肿瘤抗原的能力,然后加工递呈给T细胞进一步地激活有效的抗肿瘤免疫应答。由于这种现象的起始因子是放射引起的肿瘤细胞损伤,因此当肿瘤细胞对放射损伤具有高修复能力,或肿瘤细胞不能释放DAMPs和肿瘤抗原,缺乏激活DC介导的放射治疗后免疫应答的能力时,肿瘤细胞即表现为放射抗拒。在B16黑素瘤模型中,放射治疗会引起血管细胞黏附因子(VCAM-1)在肿瘤血管壁的形成,这种细胞因子将会增强抗肿瘤免疫细胞的浸润。研究发现,与没有照射的Colon38肿瘤相比,照射后的肿瘤脉管系统中的VCAM-1会轻微的增高。或许,放射治疗后血管表型的变化,会影响免疫细胞浸润肿瘤的速率,最终也决定了肿瘤对放射治疗的应答与不应答^[12]。同时,肿瘤细胞的免疫原性对放射治疗后免疫应答的强度也具有重要作用,有些肿瘤细胞免疫原性强就能产生快且强的免疫应答,反之,免疫原性弱的肿瘤细胞就不容易产生免疫应答,这也是造成放射抗拒性的原因。

最后,在恶性肿瘤细胞中,肿瘤微环境中的因素也是诱导肿瘤放射抗拒性的一个重要原因。放射治疗一般通过诱导氧化压力来杀死肿瘤细胞。在分子水平上,乏氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)途径在肿瘤放射敏感性方面有重要作用^[13]。其中包括放射后HIF-1介导的对脉管系统的保护途径和HIF-1调节的葡萄糖和磷酸戊糖途径^[14]。这些异常的细胞代谢途径会增加肿瘤细胞抗氧化的能力,从而对抗由放射引起的氧化压力。由于氧气的存在会增加放射治疗的杀伤效力,因此肿瘤中氧气的状态是一个很重要的原因。在乏氧状态下的肿瘤细胞对放射治疗的敏感性降低^[15]。此外,一个潜在的缺氧环境可能意味着血管会减少运输氧气和免疫细胞进入肿瘤的能力,在一定水平上会影响免疫细胞对肿瘤的杀伤作用。

因此,肿瘤细胞的放射抗拒特性,是由个体的基因差异,免疫调节状况和放射后肿瘤微环境中的多种因素决定的。

4 细胞因子 IL-12

IL-12是一种异二聚体蛋白质,首先发现于人疱疹病毒(epstein-barr virus, EBV)转化的B细胞系中^[16]。IL-12是一种多功能的细胞因子,在固有免疫和获得性免疫中起到桥梁作用,同时在细胞介导的免疫应答中通过诱导Th1细胞的分化起到一个关键的调节作用。IL-12通过促进IFN γ 产生、增强自然杀伤细胞和T细胞的细胞活性来介导细胞免疫。另外,IL-12通过IFN γ 诱导基因和淋巴-血管内皮细胞间的交联,启动抗血管生成程序。依赖于IFN γ 的IL-12表达的肿瘤生长缓慢,与亲代肿瘤网状特点的血管相比,其血管生成更小。IL-12的这种免疫调节和抗血管生成能力,使它成为目前抗癌治疗的一个关键细胞因子。最新研究发现,恶性胶质瘤中的调节性T

细胞(Treg)具有抑制抗肿瘤免疫的作用,局部给予细胞因子IL-12,可以提高T细胞活性,逆转胶质瘤的免疫微环境,产生抗肿瘤的免疫应答,从而清除肿瘤。IL-12和CTLA-4封锁主要作用于CD4 $^+$ T细胞,从而引起FoxP3 $^+$ 调节性T细胞急剧减少,增加效应T细胞的数量^[17]。

事实上,将IL-12转染进肿瘤细胞可以增强完全治愈的放射治疗疗效^[18]。IL-12的这种作用需要CD8 $^+$ T细胞的调节,因为敲低CD8 $^+$ T细胞会部分解除放射治疗的效果。因此,IL-12疗法可以激活一个强大的免疫应答,研究发现,放射治疗后小鼠的一只腿植入外源性Colon38/IL-12的肿瘤被治愈,而另一只腿植入亲代Colon38的肿瘤没有被治愈^[12]。

应用含有IL-12的微球,在临床中可以模仿综合疗法(放射治疗联合免疫疗法)。例如,IL-12微球注入模拟临床环境的肿瘤中,与IL-12转染入肿瘤细胞相比更加贴近临床环境。由于放射治疗会造成外周淋巴细胞的凋亡,只有放射治疗后IL-12微球处理的肿瘤会显著延迟肿瘤的生长^[12]。因为,如果在放射治疗前给予IL-12,它可以使肿瘤活性淋巴细胞浸润或者活化,然而这些淋巴细胞对放射敏感,继而被射线杀伤而减少。与此相比,放射治疗后给予IL-12,它会保持放射治疗后产生的炎症微环境,进而促使抗肿瘤效应T细胞的产生。由此可见,放射治疗联合免疫疗法能够增强放射治疗疗效。

5 展望

放射疗法是肿瘤常规治疗中必不可少的治疗手段。但是,这种治疗手段并不能完全清除机体内的肿瘤细胞,而由于肿瘤细胞高度的变异性,在环境压力作用下会产生具有治疗抗性的肿瘤细胞,导致肿瘤复发。由于传统认为放射治疗,对机体免疫具有损伤和抑制作用,主要着眼于如何尽可能有效杀伤和清除肿瘤细胞,对治疗机制的研究也一直集中于对肿瘤细胞内在分子的调控作用上。近来研究结果显示,肿瘤细胞外在因素,特别是机体内的抗肿瘤免疫反应,在肿瘤常规治疗效应中具有重要作用,尤其是在清除和控制残存肿瘤细胞、延缓和防止肿瘤复发上发挥着尤为关键的作用。因此,对机体抗肿瘤免疫反应具有主导抑制作用的肿瘤免疫抑制微环境,必定在肿瘤常规治疗效应中起着更为重要的作用。深入系统地研究肿瘤免疫微环境,尤其是肿瘤常规治疗导致的肿瘤免疫微环境变化,可以加深对肿瘤抗肿瘤免疫反应和肿瘤免疫抑制微环境之间的相互作用及其作用机制的理解,从而建立更为合理的肿瘤治疗方案,发展有效的肿瘤治疗新策略。

参考文献

- [1] Akeshima T, Chamoto K, Wakita D, et al. Interleukin-30 expression in prostate cancer and its draining lymph nodes correlates with advanced grade and stage[J]. Cancer Res, 2010, 70(7): 2697-2706.
- [2] Di Meo S, Airolidi I, Sorrentino C, et al. Interleukin-30 expression in prostate cancer and its draining lymph nodes correlates with advanced grade and stage[J]. Clin Cancer Res, 2013, 20(3): 585-594.
- [3] Rodel F, Frey B, Multhoff G, et al. Contribution of the immune system to bystander and non-targeted effects of ionizing radiation[J]. Cancer Lett, 2013, 335(1): 105-113.
- [4] Lauber K, Ernst A, Orth M, et al. Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy[J]. Front Oncol, 2012, 2: 116.

- [5] Pusic AD, Pusic KM, Clayton BL, et al. IFN γ -stimulated dendritic cell exosomes as a potential therapeutic for remyelination[J]. *J Neuroimmunol*, 2013, 266(1/2):12-23.
- [6] Gerber SA, Sedlacek AL, Cron KR, et al. IFN- γ mediates the antitumor effects of radiation therapy in a murine colon tumor[J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(6):2345-2354.
- [7] Lee Y, Auh SL, Wang Y, et al. Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8 $^{+}$ T cells: changing strategies for cancer treatment[J]. *Blood*, 2009, 114(3):589-595.
- [8] Farnebo L, Jerhammar F, Ceder R, et al. Combining factors on protein and gene level to predict radioresponse in head and neck cancer cell lines[J]. *J Oral Pathol Med*, 2011, 40(10):739-746.
- [9] Farnebo L, Tiesenbock K, Ansell A, et al. Strong expression of survivin is associated with positive response to radiotherapy and improved overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients[J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(8):1994-2003.
- [10] Gerber SA, Lim JY, Connolly KA, et al. Radio-responsive tumors exhibit greater intratumoral immune activity than nonresponsive tumors[J]. *Int J Cancer*, 2013, 134(10):2383-2392.
- [11] Liang H, Deng L, Chmura S, et al. Radiation-induced equilibrium is a balance between tumor cell proliferation and T cell-mediated killing[J]. *J Immunol*, 2013, 190(11):5874-5881.
- [12] Lugade AA, Sorensen EW, Gerber SA, et al. Radiation-in-
- 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.12.038
- duced IFN-gamma production within the tumor microenvironment influences antitumor immunity[J]. *J Immunol*, 2008, 180(5):3132-3139.
- [13] Meijer TW, Kaanders JH, Span PN, et al. Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(20):5585-5594.
- [14] Horsman MR, Mortensen LS, Petersen JB, et al. Imaging hypoxia to improve radiotherapy outcome[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2012, 9(12):674-687.
- [15] Yaromina A, Thames H, Zhou X, et al. Radiobiological hypoxia, histological parameters of tumour microenvironment and local tumour control after fractionated irradiation[J]. *Radiother Oncol*, 2010, 96(1):116-122.
- [16] Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, et al. Interleukin-12: biological properties and clinical application [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(16):4677-4685.
- [17] Vom Berg J, Vrohlings M, Haller S, et al. Mechanism of IL-12 mediated alterations in tumour blood vessel morphology: analysis using whole-tissue counts[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(13):2803-2811.
- [18] Thaci B, Ahmed AU, Ulasov IV, et al. Depletion of myeloid-derived suppressor cells during interleukin-12 immunogene therapy does not confer a survival advantage in experimental malignant glioma[J]. *Cancer Gene Ther*, 2014, 21(1):38-44.

(收稿日期:2015-12-27 修回日期:2016-01-18)

肝癌 HSV-TK/GCV 自杀基因治疗的研究进展*

田海飞 综述, 曾燕[△] 审校

(重庆医科大学附属第二医院放射科 400010)

[关键词] 肝肿瘤; 基因疗法; 基因, 转基因, 自杀; 单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶基因/羟甲基无环鸟苷

[中图分类号] [文献标识码] A [文章编号] 1671-8348(2016)12-1697-04

GCV 是一种用于抗病毒感染的药物, HSV-TK 基因表达的胸苷激酶能将 GCV 磷酸化成 GCV-TP 取代 DNA 合成过程中的鸟嘌呤-5'-三磷酸, 成为 DNA 合成的竞争性抑制剂, 抑制 DNA 链延长, 通过诱导凋亡机制引起细胞死亡^[1]。其诱导细胞凋亡的机制还与激活 P53 通路、线粒体损伤、细胞毒作用等相关。HSV-TK/GCV 系统介导细胞毒作用中存在不可修复的双链 DNA 断裂, 抑制基因的同源修复能够显著增强 HSV-TK/GCV 系统的细胞毒作用^[2]。此外让转染了 HSV-TK 基因的细胞和 TK 基因阴性细胞共培养, 给予 GCV 后不仅 HSV-TK 基因阳性细胞死亡, TK 基因阴性细胞也发生死亡, 这种现象为旁观者效应。旁观者效应的产生机制与细胞间存在物质交换相关, 其中最重要的机制是细胞缝隙连接, 一些对

细胞缝隙连接形成起促进作用的药物如丹参酮 II A 等可以使旁观者效应明显增强^[3]。HSV-TK/GCV 系统通过直接杀细胞作用和旁观者效应显现出良好的抗肿瘤作用, 被广泛用于各种肿瘤的治疗研究。

1 HSV-TK 基因的载体

HSV-TK 基因要进入肿瘤细胞正常表达产生相应的酶, 需要载体协助穿透肿瘤细胞生物膜, 基因载体的选择对基因治疗系统的安全和效率至关重要。

1.1 病毒载体 大多数病毒可通过逆转录作用将自身基因整合到宿主细胞遗传物质中进行繁殖, 病毒具有高效的转染率, 但是病毒载体中常常存在与病毒自身复制及表达病原性物质相关的基因, 存在一些潜在的危险因素, 潜在生物安全隐患是

* 基金项目: 重庆市卫生局重点项目(2013-1-021)。 作者简介: 田海飞(1988—), 在读硕士, 主要从事腹部影像学研究。 △ 通讯作者, E-mail: 751403669@qq.com。