

· 临床研究 ·

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.09.006

ILC2和MDSC及其相关细胞因子IL-13和iNOS在宫颈癌中的表达及其列线图模型的构建和评价

王碧辉^{1a,2},朱玥洁^{1b},张玉莲^{1a,2},吴雨峰^{1a,2},丁剑冰³,陈志芳^{1a,2}(1. 新疆医科大学第一附属医院 a. 妇科; b. 生殖助孕中心,新疆 乌鲁木齐 830011;2. 省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室,新疆 乌鲁木齐 830011;3. 新疆医科大学 公共卫生学院,新疆 乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的:**研究2型固有淋巴样细胞(ILC2)和髓源性抑制细胞(MDSC)及其相关细胞因子IL-13和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在宫颈癌(CC)中的表达,并基于其构建CC发病风险的列线图预测模型。**方法:**采集2022年5月至2024年1月在新疆医科大学第一附属医院手术切除的40例CC组织及100例外周血作为CC组,选取同期收治的30例子宫肌瘤经CC筛查为阴性的宫颈组织和100例正常健康个体外周血作为对照组。用多重免疫荧光技术(mIF)及免疫组化染色(IHC)法检测两组组织中ILC2和MDSC细胞浸润及其相关细胞因子IL-13和iNOS的表达;使用流式细胞术和ELISA技术分别检测两组外周血中ILC2和MDSC及IL-13和iNOS的表达差异;通过Person相关性分析评估其相关性;使用单因素和多因素Logistic分析来确定ILC2和MDSC及IL-13和iNOS是否为CC发病的独立危险因素,再利用R软件建立免疫预测模型,使用ROC曲线下面积(AUC值)、Hosmer-Lemeshow检验、校准曲线、临床决策曲线和临床影响曲线来分别评估模型。**结果:**CC组中ILC2及MDSC及其相关细胞因子IL-13和iNOS均高于对照组(均 $P < 0.05$),且其均呈正相关(均 $P < 0.05$);经过单因素及多因素Logistic回归分析显示,ILC2、MDSC及IL-13、iNOS均是CC发病的独立危险因素(均 $P < 0.05$);基于这些危险因素的CC发病列线图,经过验证提示,该列线图模型具有一定的临床实用价值。**结论:**ILC2和MDSC及其相关的细胞因子IL-13和iNOS在CC组织及外周血中均呈高表达,基于这些危险因素构建的预测模型具有良好的预测能力和一定的实用性,为CC的早期诊断和治疗提供了一种简便有效的辅助工具。

[关键词] 宫颈癌;2型固有淋巴样细胞;髓源性抑制细胞;白细胞介素13;诱导型一氧化氮合酶;列线图模型;诊断

[中图分类号] R737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)09-0878-10

Expression of ILC2s, MDSCs and associated cytokines IL-13, iNOS in cervical cancer and construction and evaluation of a nomogram model

WANG Bihui^{1a,2}, ZHU Yuejie^{1b}, ZHANG Yulian^{1a,2}, WU Yufeng^{1a,2}, DING Jianbing³, CHEN Zhifang^{1a,2} (1. a. Department of Gynecology; b. Reproductive Assistance Center, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang, China; 2. State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention and Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia, Urumqi 830011, Xinjiang, China; 3. School of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), along with their associated cytokines IL-13 and inducible nitric oxide synthase (iNOS), in cervical cancer (CC), and to construct a nomogram prediction model for assessing the risk of CC based on these factors. **Methods:** Samples were collected from May 2022 to January 2024 at the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, including 40 cases of CC tissue and 100 cases of peripheral blood as the CC group. Concurrently, cervical tissues from 30 cases of uterine fibroids screened negative for CC and peripheral blood from 100 healthy individuals were selected as the control group. Multiple immunofluorescence technology (mIF) and immunohistochemical staining (IHC) were utilized to detect the infiltration of ILC2s and MDSCs in tissue samples from both groups, along with the expression levels of related cytokines IL-13 and iNOS. Flow cytometry (FCM) and ELISA were employed to assess the differences in ILC2s, MDSCs, IL-13, and iNOS expression in peripheral blood samples. Pearson correlation was used to assess their correlations. Univariate and multivariate logistic analyses were performed to determine whether ILC2s, MDSCs, IL-13, and iNOS are independent risk factors for CC. An immune prediction model was established using R software, and the model was evaluated using the area under the ROC curve (AUC value), Hosmer-Lemeshow test, calibration curve, clinical decision curve, and clinical impact curve.

[基金项目] 国家自然科学基金(No.82160545);省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室基金(No.SKL-HIDCA-2022-5)

[作者简介] 王碧辉(1995—),女,博士生,主要从事妇科肿瘤相关的基础和临床的研究。E-mail:340126247@qq.com

[通信作者] 陈志芳,E-mail:645286940@qq.com

Results: The levels of ILC2, MDSC, IL-13 and iNOS were all significantly higher in the CC group compared to the control group (all $P < 0.05$). Furthermore, they were positively correlated (all $P < 0.05$). Univariate and multivariate logistic regression analyses indicated that ILC2, MDSC, IL-13, and iNOS are independent risk factors for the development of CC (all $P < 0.05$). Subsequently, a nomogram based on these risk factors was developed and verified to have practical clinical value. **Conclusion:** ILC2, MDSC, and their associated cytokines IL-13 and iNOS are highly expressed in CC tissues and peripheral blood. The prediction model incorporating these risk factors has predictive capabilities and clinical utility, providing a valuable and accessible tool for early diagnosis and treatment of cervical cancer.

[Key words] cervical cancer (CC); group 2 innate lymphoid cell (ILC2); myeloid-derived suppressor cell (MDSC); interleukin-13 (IL-13); inducible nitric oxide synthase (iNOS); nomogram; diagnosis

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(9): 878-887. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.09.006]

宫颈癌(cervical cancer, CC)是女性中最常见的癌症之一,约占女性所有癌症的12%,是女性第四大常见癌症,仅次于乳腺癌、结肠癌和肺癌。CC是发展中国家妇女癌症死亡的第二大原因,估计全球每年有52.8万新发病例和26.6万病死病例^[1]。肿瘤发展的复杂过程涉及肿瘤细胞与宿主免疫系统之间的相互作用。这种相互作用可能导致肿瘤细胞对免疫系统的免疫逃逸,从而促使肿瘤的恶性生长、转移和复发^[2]。近年来,2型固有淋巴样细胞(group 2 innate lymphoid cell, ILC2)在肿瘤中的作用越来越受到人们的关注^[3]。ILC2对白细胞介素-25(interleukin-25, IL-25)、胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)和IL-33产生应答,并依赖于GATA结合蛋白3(GATA-binding protein 3, GATA3)和视黄酸受体相关孤儿受体- α ^[4]。ILC2可以通过分泌促肿瘤细胞因子如IL-4、IL-5、IL-13和双调蛋白(amphiregulin, AREG)来刺激肿瘤生长^[5]。髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)于2007年首次被提出^[6]。MDSC是一种异质性的未成熟骨髓细胞群,在肿瘤进展过程中具有免疫抑制和增殖作用^[7]。有研究^[8-10]表明,ILC2分泌的IL-13可调节MDSC分泌诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS),进而促进肿瘤的发生发展。但是ILC2和MDSC及其细胞因子IL-13及iNOS在CC中的作用尚不清楚,此外国内外关于CC发病风险的基于免疫的列线图(nomogram)预测模型的研究鲜有报道。因此,本项目研究目的是分析ILC2和MDSC及其细胞因子IL-13和iNOS在CC中的表达情况,并开发和验证一个基于ILC2和MDSC及其细胞因子IL-13和iNOS的列线图来筛查CC,通过该模型可以提高CC的早期诊断率和生存率,从而降低患者的死亡率。这项研究对于提供经济有效的CC筛查方案具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 资料

选取2022年5月至2024年1月在新疆医科大学第一附属医院妇科住院行手术治疗或病理活检的CC

组织石蜡标本40例(研究组),年龄28~80(53.70 ± 11.61)岁;选取同期收治良性子宫肌瘤经CC筛查为阴性且行子宫全切患者的正常宫颈组织30例(对照组),年龄49~71(58.00 ± 5.85)岁。选取2023年1月至2024年1月在新疆医科大学第一附属医院妇科住院行手术治疗或病理活检的CC患者的外周血100例(研究组),年龄26~83(53.82 ± 12.45)岁;选取同期健康人群的外周血100例(对照组),年龄31~80(54.44 ± 11.39)岁。

纳入标准:(1)符合CC诊断标准,并经术后病理检查已确诊;(2)知情同意;(3)术前未行放化疗治疗。排除标准:(1)伴有其他恶性肿瘤者;(2)重要器官功能障碍者;(3)术前接受放疗、化疗及生物治疗者;(4)精神病史或存在语言、认知功能障碍者;(5)临床、随访资料不全者;(6)无法完全配合治疗者。所有病理切片均经两名病理专家确诊。

本研究方案经新疆医科大学第一附属医院伦理委员会审批通过(伦理审批号:220525-02),研究对象均充分知情并签署了知情同意书。

1.2 主要试剂

多重免疫荧光所用的抗体CD3(货号:17617-1-AP)、GATA3(货号:10417-1-AP)、双重免疫荧光所用的小鼠抗CD11b抗体(货号:21851-1-AP)、CoraLite594标记的山羊抗鼠抗体(货号:SA00013-3)、CoraLite488标记的山羊抗兔抗体(货号:SA00013-2)、兔抗iNOS抗体(货号:18985-1-AP)和HRP标记的山羊抗兔抗体(货号:SA00001-2)均购自武汉三鹰生物技术有限公司,兔抗CD45抗体(货号:A00555-3)和兔抗IL-13抗体(货号:A00077)均购自武汉博士德生物工程有限公司,五色多重荧光免疫组化染色试剂盒(货号:abs50029)购自北京爱必信生物技术有限公司,兔抗CD33抗体(货号:AB30371)购自英国Abcam公司,DAPI溶液(即用型)(货号:C0065)购自北京索莱宝科技有限公司,DAB显色试剂盒(货号:ZLI-9018)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 采用多重免疫荧光法(multiple immunofluorescence, mIF)检测CC组织中ILC2和MDSC的浸润

切片预处理:石蜡切片经过烤片逐级脱蜡至水,切片置于Tris-EDTA抗原修复液中95℃处理15 min,滴加封闭用山羊血清室温下处理60 min。

多重荧光染色:①在预处理后的切片上滴加一抗CD3(1:200),室温下处理1 h,使用五色多重荧光免疫组化染色试剂盒(抗兔二抗),按照生产厂家说明书进行滴加二抗后室温下处理10 min,滴加荧光染料620(1:100),室温下避光处理10 min,将切片避光再次进行微波修复,待其自然冷却至室温后滴加封闭用山羊血清,室温下处理60 min,滴加一抗GATA3(1:100),4℃下处理过夜,次日室温静置1 h,滴加试剂盒中的二抗,室温下避光处理10 min,滴加荧光染料520(1:100),室温下避光处理10 min,将切片避光再次进行微波修复,待其自然冷却至室温后,滴加封闭用山羊血清,室温下处理60 min,滴加一抗CD45(1:100),室温静置1 h,滴加试剂盒中的二抗,室温下避光处理10 min,滴加荧光染料700(1:100),室温下避光处理10 min,滴加试剂盒中DAPI(1:100),室温下避光处理10 min,上述步骤间均用PBST冲洗5 min×3次。②在预处理后的切片上滴加一抗CD33(1:100)和CD11b(1:200),4℃下处理过夜,次日室温静置1 h,滴加CoraLite594标记羊抗鼠IgG(1:200)和CoraLite488标记羊抗兔IgG(1:200),37℃下避光处理30 min,滴加DAPI室温下避光处理10 min,上述步骤间均用PBST冲洗5 min×3次。

在经①、②染色的切片上滴加抗淬灭剂封片,通过尼康共聚焦显微镜进行观察、拍照,利用彩色图像分析系统(FIJI2.9.0)分析CD45(红色)、GATA3(绿色)、CD33(红色)、CD11b(绿色)的相对荧光强度,并通过GraphPad Prism软件进行统计分析。

1.4 免疫组化法(IHC)检测CC组织中IL-13和iNOS的表达

石蜡切片经过烤片逐级脱蜡至水,切片置于Tris-EDTA抗原修复液中95℃处理15 min,待其自然冷却至室温后,滴加3%过氧化氢室温下处理10 min,滴加0.3%Triton-100,室温下处理10 min,滴加封闭用山羊血清,室温下处理60 min,分别滴加一抗iNOS(1:200)、IL-13(1:100),4℃下处理过夜,室温静置1 h,滴加二抗(1:200),室温下处理60 min,DAB显色,苏木素复染,上述步骤间均用PBST冲洗5 min×3次,脱水、透明、中性树胶封片,光镜下观察。应用彩色图像分析系统(FIJI2.9.0)进行图像分析:光密度校正,在HIS颜色模式下选中染色阳性区域,过滤背

景干扰,测定每个视野的积分光密度(integral optical density, IOD)值及阳性区域面积(Area)值。每张切片随机选取5个完整而不重叠的高倍镜视野(×200),测定每个视野下阳性区域的IOD值和Area值,计算平均光密度值(MOD) = IOD/Area,以每组所有视野的MOD值的平均值作为该组的测量值,并通过GraphPad Prism软件进行统计分析。

1.5 ELISA法检测CC及对照组患者血清中IL-13和iNOS的含量

全部研究对象在空腹条件下采集5 mL肘静脉血,置于无抗凝剂采血管中,以1 500×g离心5 min,分离血清,保存于-80℃备检血清IL-13和iNOS。血清IL-13和iNOS水平检测采用酶联免疫吸附试验,操作参照试剂盒(上海江莱生物科技有限公司)说明书进行。用加样枪向每个反应孔分别加100 μL血清或倍比稀释的标准品,37℃反应90 min;洗板1次,向每个反应孔加100 μL生物素化抗体工作液,37℃反应60 min;重复洗板3次,在洁净的吸水纸上拍干;向每个反应孔加100 μL酶结合物工作液,37℃反应30 min;洗板5次,在洁净的吸水纸上拍干;向每个反应孔加90 μL底物溶液,37℃反应15 min;最后,向每个反应孔加50 μL终止液,立即用Thermo Fisher全波长酶标仪检测450 nm波长下的光密度(D)值;以标准品的浓度为横坐标,D值为纵坐标,绘制标准曲线,计算血清中IL-13和iNOS水平。

1.6 流式细胞术检测CC组及对照组外周血中ILC2和MDSC

EDTA真空抗凝采血管取人外周血全血。每个样本管分别加入100 μL抗凝全血。ILC2检测方案^[11]:向样本管加入相应体积的LIN(CD3、CD4、CD8、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD33、CD34、CD203c、FcεRIα),CD45-APC,CD127-PE,CRTH2-PE-CF594,CD117-PE-CyTM5流式抗体;MDSC检测方案^[12]:向样本管加入相应体积的HLA-DR-PE,CD11b-ECD,CD33-APC,CD14-APC-A700,CD15-PC5.5流式抗体。室温下避光处理15~30 min。制备1×红细胞裂解液:取10×红细胞裂解液,按照体积1(10×红细胞裂解液):9(蒸馏水)稀释。每100 μL全血加入2 mL 1×红细胞裂解液,室温裂解8~12 min,至细胞悬液呈澄清透明状,以500×g离心5 min,洗涤细胞,离心后弃上清液。每管加入500 μL PBS洗液,上机检测。上机:调取当次流式细胞检测方案,调节合适电压及补偿,进行细胞圈门分析。亦可置于4℃冰箱,避光暂存,等待上机。数据分析:完成检测后,拷取“.fcs”格式原始文件,使用FlowJo_V10软件进行圈门分析和画图。

1.7 免疫列线图的建立及验证

收集CC组及对照组患者外周血ILC2和MDSC及血清IL-13和iNOS的数值。模型变量确定后,将病例按1:1比例随机分成训练集及验证集。训练集中,将各临床变量进行单因素分析,结合单因素分析结果,纳入二元Logistic回归模型,筛选有统计学意义的变量进行列线图模型的构建,从而计算出妇女发生CC的预测概率。通过Bootstrap自抽样1 000次方法对训练集构建的列线图模型进行自举验证。使用内部验证数据时,首先比较训练集和验证集中列入指标是否有差异,排除选择偏倚(表1)。然后在验证集中分别再次计算受试者工作特征曲线(ROC)曲线下面积(AUC),评价列线图模型的识别性能。通过Hosmer-Lemeshow(H-L)拟合优度检验和校准曲线来分别对所构建模型的拟合度、校准度进行评价。 $P < 0.05$ 的统计结果意味着列线图模型预测结果与观测结果并不完全匹配;当 $P > 0.05$,说明模型拟合效果良好。通过绘制临床决策曲线(decision curve analysis, DCA)和临床影响曲线(clinical impact curve, CIC)评价免疫列线图模型的临床实用性。

1.8 统计学处理

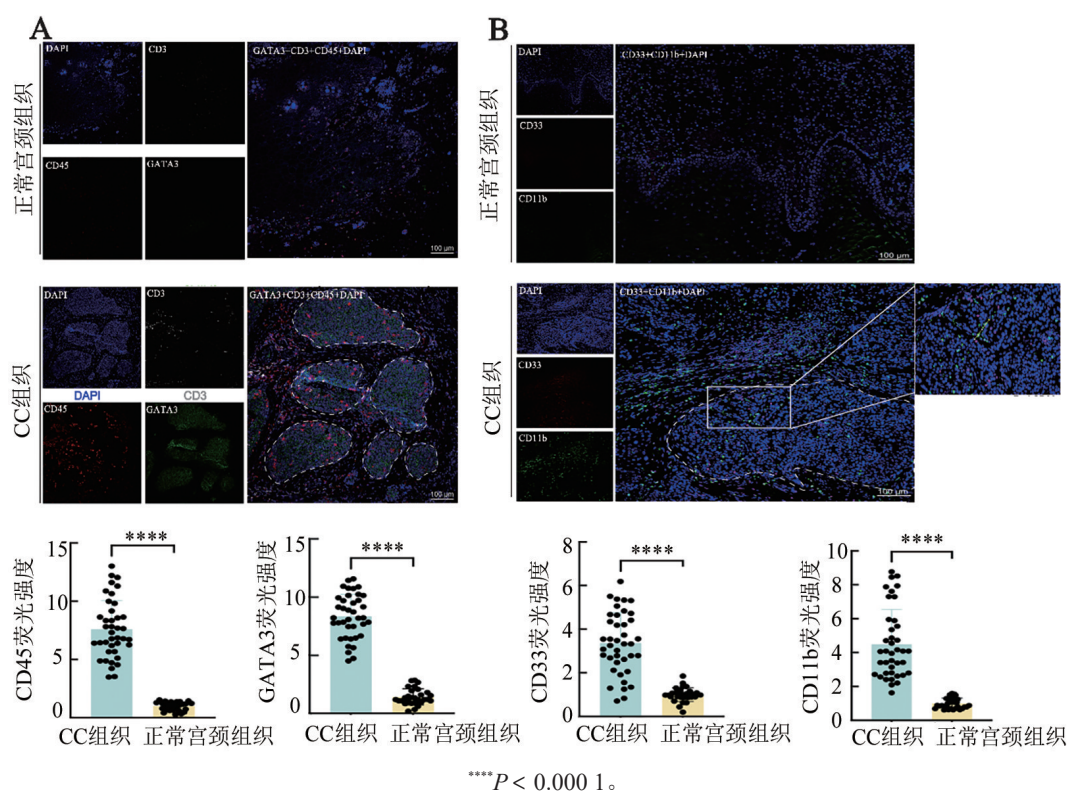
以SPSS 22.0软件和GraphPad Prism 9.3.1软件分析数据。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两

组间比较采用 t 检验。不符合正态分布的计量资料采用中位数(M)和四分位数间距(P25, P75)表示,两组比较选择非参数检验。计数资料以频数[n, (%)]表示,组间比较采用卡方检验。将 $P < 0.05$ 纳入多因素Logistic回归分析CC患者预后的独立影响因素。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。通过GraphPad Prism 9.3.1软件用Person相关性分析细胞及其细胞因子的关系: $r > 0$ 表示正相关, $r < 0$ 表示负相关, $0 \leq |r| < 0.3$ 表示不相关, $0.3 \leq |r| < 0.5$ 表示弱相关, $0.5 \leq |r| < 0.8$ 表示中度相关, $0.8 \leq |r| < 1$ 表示强相关。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 宫颈组织中ILC2、MDSC浸润及其细胞因子IL-13、iNOS的表达

mIF检测结果(图1)显示,CC组织中癌巢周围(虚线处为癌巢)ILC2($GATA3^+CD3^-CD45^+$)^[3]和MDSC($CD33^+CD11b^+$)浸润比正常宫颈组织均明显增多(均 $P < 0.05$)(图1D);IHC检测结果(图2)显示,ILC2细胞相关细胞因子IL-13在细胞质中表达,MDSC相关细胞因子iNOS在细胞核和细胞质中表达,且CC组组织样本中IL-13和iNOS的表达均高于正常宫颈组织(均 $P < 0.05$)。



A: mIF 法检测 CD45(红)、GATA3(绿)和 CD3(灰白)在 CC 组织和正常宫颈组织中的表达;

B: mIF 法检测 CD33(红)和 CD11b(绿)在 CC 组织和正常宫颈组织中的浸润。

图1 mIF 法检测 ILC2、MDSC 在 CC 组织和正常宫颈组织中的浸润

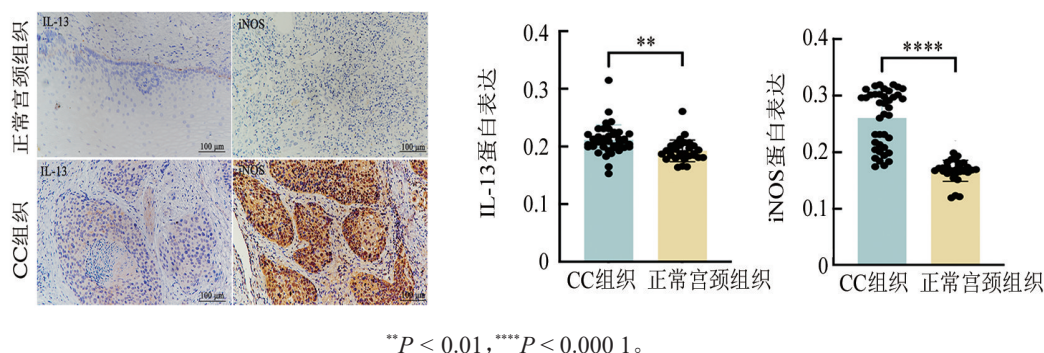


图2 IHC法检测IL-13,iNOS在CC组织和正常宫颈组织中的表达

2.2 外周血中 ILC2、MDSC 及其细胞因子 IL-13、iNOS 的表达

流式细胞术检测结果(图3)显示,CC患者外周

血中 ILC2 和 MDSC 数量均高于对照组(均 $P < 0.05$) (表2);ELISA 结果(图4)显示,CC患者外周血中 IL-13 和 iNOS 水平均高于对照组(均 $P < 0.05$)。

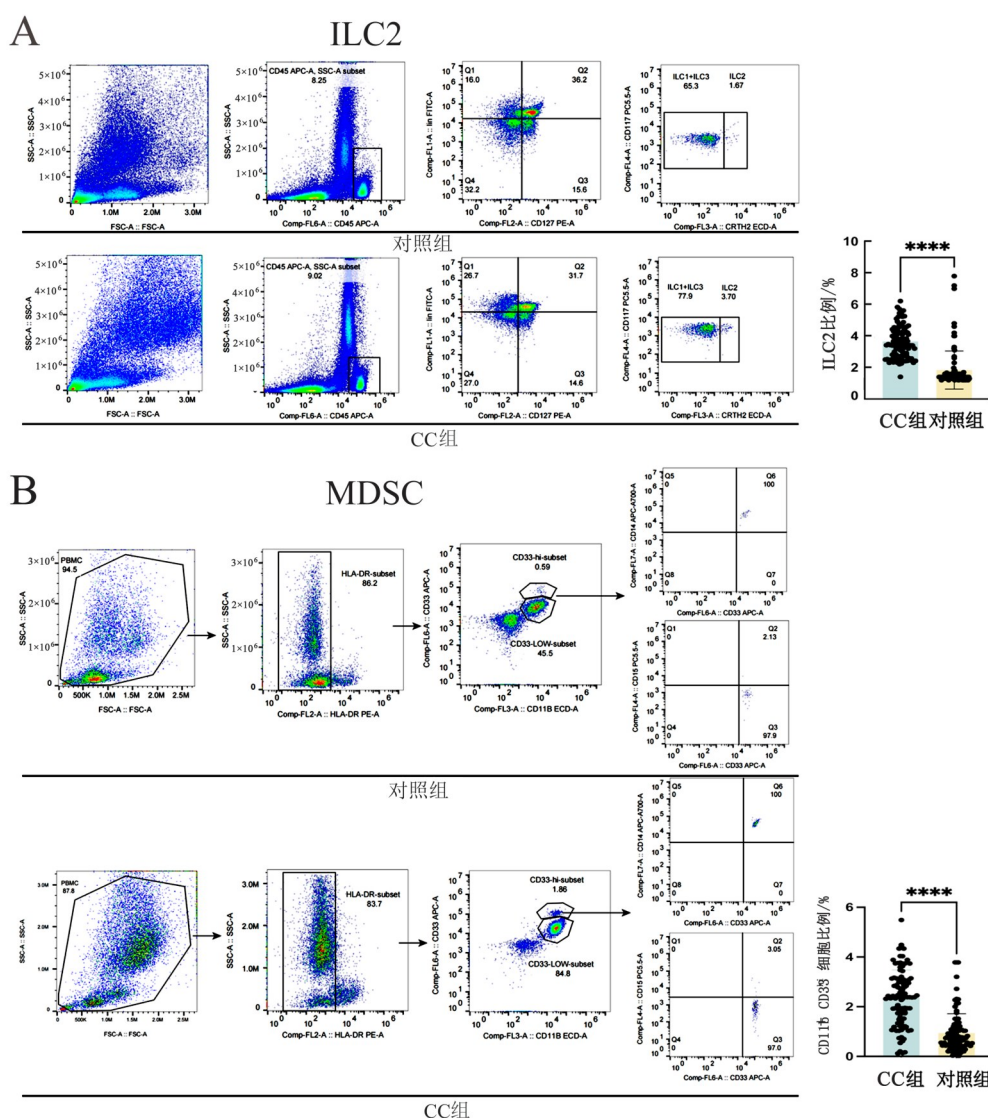


图3 流式细胞术检测CC患者和对照组人群外周血中的ILC2(A)和MDSC(B)

2.3 CC患者外周血 ILC2、MDSC 数量及 iNOS、IL-13 含量的相关性

Person相关性分析结果(图5)显示,CC患者中 ILC2 和 MDSC 水平呈正相关,相关性强度为中等程度($r = 0.55$,

$P < 0.0001$), IL-13和MDSC水平呈正相关, 相关性强度为中等程度($r = 0.62, P < 0.0001$), IL-13和iNOS水平呈正相关, 相关性强度为中等程度($r = 0.63, P < 0.0001$)。

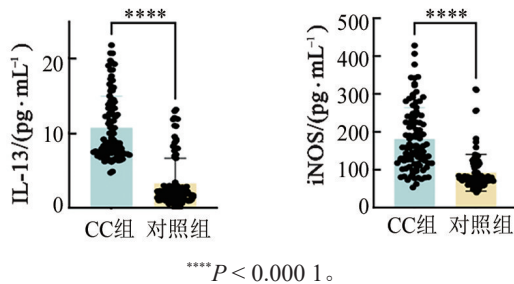


图4 ELISA法检测CC组和对照组人群外周血中IL-13和iNOS的含量

2.4 免疫列线图模型的建立

在训练集和验证集中, 通过单因素及多因素分析结果(表1、2)显示 ILC2和MDSC及其相关的细胞

因子 iNOS和IL-13是CC发病的独立危险因素。结合这四个独立的预测因子构建列线图模型(图6), 这些指标对应的每一个数值别在分数量表上的分数相加得出总评分, 并将总分向下投影到总分量表上, 从而可建立预测CC发生概率的列线图。

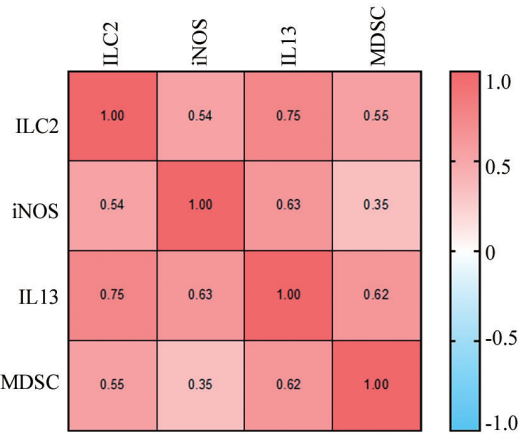


图5 ILC2、MDSC及其相关的细胞因子IL-13、iNOS相关性分析

表1 训练集中CC预测因素的单因素和多因素Logistic回归分析

指 标	单因素分析	多因素分析		
	<i>P</i>	OR 值	95% <i>CI</i>	<i>P</i> 值
ILC2	< 0.000 1	2.912	1.477, 5.743	0.002
iNOS	< 0.000 1	1.019	1.002, 1.036	0.030
IL-13	< 0.000 1	1.929	1.345, 2.764	< 0.000 1
MDSC	< 0.000 1	6.222	1.783, 21.72	0.004

表2 验证集中CC预测因素的单因素和多因素Logistic回归分析

指 标	单因素分析	多因素分析		
	<i>P</i> 值	OR 值	95% <i>CI</i>	<i>P</i> 值
ILC2	< 0.000 1	6.104	2.161, 17.243	0.001
iNOS	< 0.000 1	1.016	1.002, 1.031	0.025
IL-13	< 0.000 1	1.510	1.171, 1.948	0.001
MDSC	< 0.000 1	2.959	1.274, 6.872	0.012

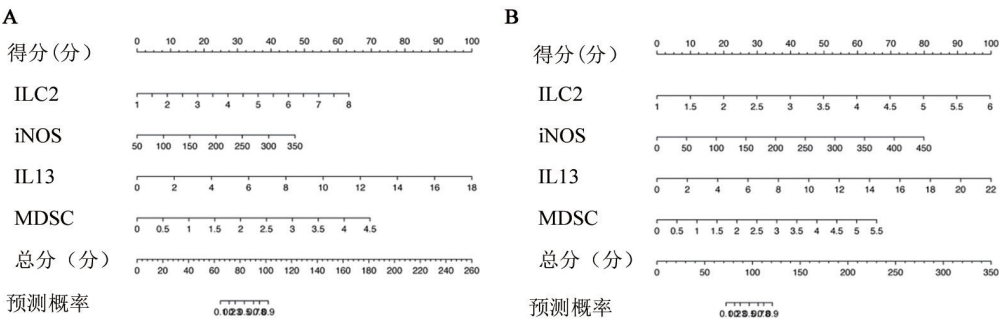


图6 通过整合 ILC2、MDSC、iNOS和IL-13建立免疫列线图

2.5 免疫列线图模型的验证

使用内部验证数据时, 首先比较训练集和验证

集中列入指标是否有差异, 排除选择偏倚(表3)。

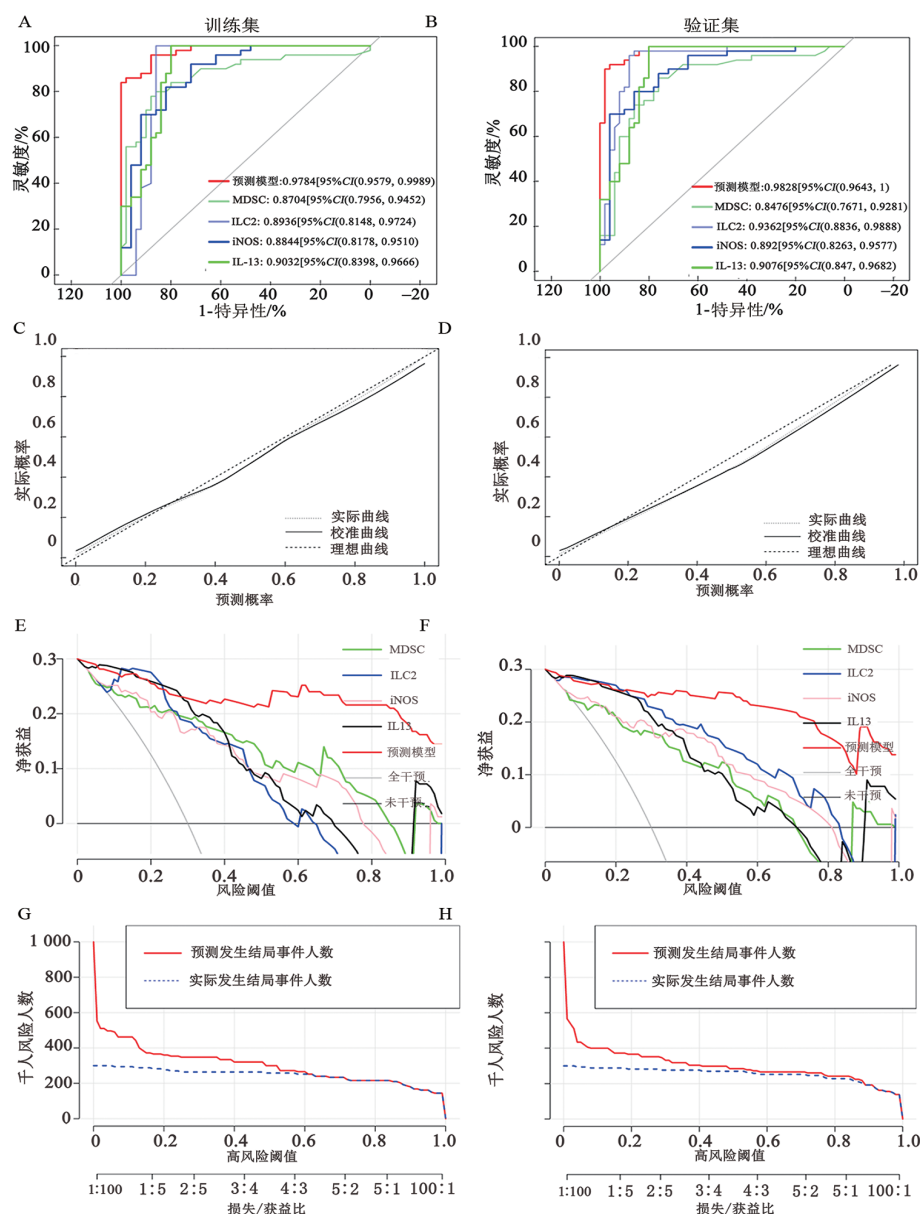
CC的免疫预测模型中训练集和验证集的ROC曲

线的 AUC 分别为 0.978 4[95%CI(0.957 9, 0.998 9)], 0.982 8[95%CI(0.964 3, 1)](图 7A、B)。应用 Hosmer-Lemeshow 拟合优度检验和校准曲线评价模型的拟合度和校准度, Hosmer-Lemeshow 检验在训练集中 $\chi^2 = 7.928 1, P = 0.440 5$, 验证集中 $\chi^2 = 2.017 6, P = 0.980 5$, 两者 P 值均 > 0.05 , 说明模型拟合效果良好。训练集校

准曲线与验证集校准曲线总体走形大体一致(图 7C、D)。在本研究中的 DCA 表明, 当阈值概率在 0~1 范围内时, 使用列线图预测 CC 的净收益大于全部治疗或不治疗方案, 表明该免疫列线图模型具有一定的临床实用性(图 7E、F); 在本研究中的 CIC 结果表明该免疫列线图模型有一定的临床影响价值(图 7G、H)。

表 3 训练集和验证集的各指标基线图

指 标	训练集	验证集	t	P
ILC2	2.89 ± 1.61	2.61 ± 1.23	1.379	0.169 6
iNOS	132.23 ± 68.20	143.90 ± 93.80	1.006	0.315 6
IL-13	6.72 ± 4.58	7.24 ± 6.00	0.698	0.486 0
MDSC	1.56 ± 1.06	1.74 ± 1.32	1.046	0.296 7



A、B: 免疫预测模型在训练集(A)和验证集(B)中 ROC 曲线的 AUC 值; C、D: 免疫预测模型在训练集(C)和验证集(D)中校准曲线; E、F: 免疫预测模型在训练集(E)和验证集(F)中 DCA 曲线; G、H: 免疫预测模型在训练集(G)和验证集(H)中 CIC 曲线。

图 7 免疫列线图模型在验证集及训练集中的验证

3 讨论

尽管CC筛查和接种HPV疫苗已被广泛使用,但CC在发病率和病死率方面仍是全球第四大女性癌症负担^[13-14]。因此,寻找经济易得的评价指标来协助临床检查结果,进而准确判断CC患者具有重要的临床意义。在这项研究中,通过结合分析CC患者的组织及外周血中ILC2、MDSC及其相关的细胞因子IL-13和iNOS,本研究建立了一种基于上述4种指标的免疫相关列线图模型,可以协助临床诊断CC。

ILC是一个全新的细胞家族,在许多生理和病理过程中发挥着重要作用。最初分为三大类作为ILC1、ILC2和ILC3^[15],后来进行了修订,并添加了自然杀伤(NK)细胞和淋巴组织诱导剂(lymphoid tissue inducer, LTi)细胞的亚群,获得了五个不同的细胞组(NK细胞、ILC1、ILC2、ILC3和LTi细胞)^[16]。其中,ILC2被视为调节2型免疫功能的“组织哨兵”,存在于身体的大多数组织中,包括肺、肠道、鼻息肉、血液、皮肤、脂肪、肝和大脑等,它感测其周围微环境内的扰动并通过分泌细胞因子快速响应,使其成为协调有效免疫应答的第一响应者之一^[17-18]。ILC2与Th2细胞非常相似,在肿瘤发生中具有双重作用^[19]。WU等^[20]发现,间质来源的PGD2通过激活ILC2-Treg细胞轴促进正常和恶性造血干/祖细胞的增殖;而WAN等^[21]研究发现,ILC2来源的IL-9可激活CD8⁺T细胞,促进结直肠癌的抗肿瘤效应。但ILC2在CC中的作用机制尚不明确。

ILC2亚群作为固有Th2细胞对应物产生2型细胞因子IL-4、IL-5、IL-9、IL-13和AREG^[4, 22]。其中,IL-13是ILC2的主要效应因子,可在多种实体瘤中通过其共享的受体链,即穿膜异源二聚体IL-13受体 α -1介导信号转导和调节细胞功能,诱导多种恶性肿瘤的形成,并在其进展、生长和肿瘤免疫中发挥重要作用^[23]。在感染性疾病、哮喘和皮肤自身免疫的2型免疫的背景下发现ILC2似乎是IL-13的最初来源^[9]。据报道,不同实体瘤患者的血清IL-13浓度升高与MDSC水平升高相关。事实上,MDSC在肿瘤微环境中聚集,它们强烈抑制T细胞和NK细胞的抗癌功能,并发挥多种其他促肿瘤作用^[24]。现已证实,在癌症病理条件下,MDSC通过调节巨噬细胞产生细胞因子来下调抗肿瘤免疫反应,并上调免疫抑制因子的表达,如iNOS^[25]。有研究^[9]表明,ILC2有利于释放大量IL-13,至少在小鼠中,促进MDSC活化和扩增。在不同实体瘤的患者中MDSC水平增加与血清IL-13浓度升高相关^[26]。TRABANELLI等^[9]发现,ILC2通过分泌IL-13上调iNOS抑制T细胞和NK细胞功能发

挥促肿瘤作用,从而损害有效的白血病细胞清除。CHEVALIER等^[27]强调,ILC2/IL-13轴促进MDSC增殖和抑制功能。ZHAO等^[28]发现,肺内ILC2可能通过其衍生的IL-13激活MDSC通路促进三阴性乳腺癌肺转移。JOU等^[29]发现,固有的IL-25-ILC2-MDSC轴促进肠道肿瘤发生发展。YUE等^[19]研究发现,增强IL-13的产生促进肿瘤的发展,从而促进ILC2-MDSC轴的形成。LIU等^[30]发现,肥胖可能增强ILC2-MDSC轴在晚期乳腺癌中的免疫抑制作用。目前,ILC2在肺癌^[31]、结直肠癌^[29]中呈高表达,且ILC2和MDSC的增加与抗肿瘤反应受损相关^[29]。然而ILC2-IL-13-MDSC-iNOS在CC中的表达情况及作用机制尚不清楚。因此在本研究中,首先通过mIF检测发现,CC组织中ILC2细胞和MDSC细胞比正常宫颈组织浸润的多;通过IHC检测发现,相关细胞因子IL-13、iNOS在CC组织中高表达;此外通过流式细胞术及ELISA法发现,CC患者外周血中ILC2和MDSC及其相关的细胞因子IL-13和iNOS比正常健康人外周血中表达更多,且彼此呈正相关,提示ILC2-IL-13-MDSC-iNOS促进CC发生发展,均与以上研究相符。但其具体机制仍需进一步研究。

免疫细胞及细胞因子在肿瘤中的诊断价值的研究少之甚少。在本研究中,通过单因素及多因素分析后发现ILC2、MDSC及其细胞因子IL-13和iNOS是CC发病的独立危险因素。列线图或者诺曼图能够将复杂的回归方程转换为直观的直线图形,从而更清晰地展示预测模型的结果。本研究在Logistic回归分析的基础上,利用列线图成功构建了基于免疫相关的预测CC发病的风险模型。经内部验证,发现列线图模型ROC曲线的AUC分别为0.978 4 [95%CI(0.9579,0.998 9)],0.982 8 [95%CI(0.964 3, 1)],经过Hosmer-Lemeshow检验发现两者P值均>0.05,说明模型拟合效果良好。校准曲线显示模型预测曲线与理想曲线走形一致,基本重叠,说明该预测模型得出的预测值与实际观察值基本符合,对CC诊断具有较好的预测价值。最后,通过临床决策曲线及临床影响曲线分析发现该免疫列线图模型的临床应用前景良好。

然而,由于本研究具有小样本量、单中心和回顾性研究的特点,所以难以完全排除由于地域限制和病例选择而产生的偏差。因此,在将结论应用于临床前,仍需要进一步进行大样本、前瞻性和多中心的研究来验证这些结果。同时ILC2-IL-13-MDSC-iNOS在CC中的具体机制仍需进一步深入地研究。

综上所述,ILC2、MDSC以及与之相关的IL-13、iNOS细胞因子被确认为CC发病的独立危险因素。

建立的免疫列线图模型能够准确预测CC的发病风险,对临床工作有一定的指导意义,提示这种新的ILC2-IL-13-MDSC-iNOS轴可能是治疗癌症的有价值的靶点。

[参考文献]

- [1] XIAO M L, MA F H, LI Y, *et al.* Multiparametric MRI-based radiomics nomogram for predicting lymph node metastasis in early-stage cervical cancer[J]. *J Magn Reson Imaging*, 2020, 52(3): 885-896. DOI: 10.1002/jmri.27101.
- [2] KURODA H, MABUCHI S, YOKOI E, *et al.* Prostaglandin E2 produced by myeloid-derived suppressive cells induces cancer stem cells in uterine cervical cancer[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(91): 36317-36330. DOI: 10.18632/oncotarget.26347.
- [3] JACQUELOT N, SEILLET C, WANG M Y, *et al.* Blockade of the co-inhibitory molecule PD-1 unleashes ILC2-dependent antitumor immunity in melanoma[J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(7): 851-864. DOI: 10.1038/s41590-021-00943-z.
- [4] RUF B, GRETEN T F, KORANGY F. Innate lymphoid cells and innate-like T cells in cancer-at the crossroads of innate and adaptive immunity[J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23: 351-371. DOI: 10.1038/s41568-023-00562-w.
- [5] ALAMA A, LEVANDUSKI E, DENZ P, *et al.* Fungal mycobiome drives IL-33 secretion and type 2 immunity in pancreatic cancer[J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(2): 153-167. DOI: 10.1016/j.ccell.2022.01.003.
- [6] GABRILOVICH D I, BRONTE V, CHEN S H, *et al.* The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells[J/OL]. *Cancer Res*, 2007, 67(1): 425[2024-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1941787/>. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3037.
- [7] LI K, SHI H H, ZHANG B X, *et al.* Myeloid-derived suppressor cells as immunosuppressive regulators and therapeutic targets in cancer[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 362[2024-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8497485/>. DOI: 10.1038/s41392-021-00670-9.
- [8] ITO A, AKAMA Y, SATOH-TAKAYAMA N, *et al.* Possible metastatic stage-dependent ILC2 activation induces differential functions of MDSCs through IL-13/IL-13R α 1 signaling during the progression of breast cancer lung metastasis[J/OL]. *Cancers*, 2022, 14(13): 3267[2024-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35805039/>. DOI: 10.3390/cancers14133267.
- [9] TRABANELLI S, CHEVALIER M F, MARTINEZ-USATORRE A, *et al.* Tumour-derived PGD2 and NKp30-B7H6 engagement drives an immunosuppressive ILC2-MDSC axis[J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 593[2024-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5605498/>. DOI: 10.1038/s41467-017-00678-2.
- [10] JOVANOVIC I P, PEJNOVIC N N, RADOSAVLJEVIC G D, *et al.* Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells[J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(7): 1669-1682. DOI: 10.1002/ijc.28481.
- [11] PRAKASH BABU S, CHEN Y K, BONNE-ANNEE S, *et al.* Dysregulation of interleukin 5 expression in familial eosinophilia [J]. *Allergy*, 2017, 72(9): 1338-1345. DOI: 10.1111/all.13146.
- [12] PAL S, NANDI M, DEY D, *et al.* Myeloid-derived suppressor cells induce regulatory T cells in chronically HBV infected patients with high levels of hepatitis B surface antigen and persist after antiviral therapy[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2019, 49(10): 1346-1359. DOI: 10.1111/apt.15226.
- [13] ZHONG G L, ZHAO Q, CHEN Z L, *et al.* TGF- β signaling promotes cervical cancer metastasis *via* CDR1as[J/OL]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 66[2024-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10064584/>. DOI: 10.1186/s12943-023-01743-9.
- [14] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [15] ARTIS D, SPITS H. The biology of innate lymphoid cells[J]. *Nature*, 2015, 517(7534): 293-301. DOI: 10.1038/nature14189.
- [16] KLOSE C S N, ARTIS D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis[J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(7): 765-774. DOI: 10.1038/ni.3489.
- [17] MAZZURANA L, CZARNEWSKI P, JONSSON V, *et al.* Tissue-specific transcriptional imprinting and heterogeneity in human innate lymphoid cells revealed by full-length single-cell RNA-sequencing[J]. *Cell Res*, 2021, 31(5): 554-568. DOI: 10.1038/s41422-020-00445-x.
- [18] SPITS H, MJÖSBERG J. Heterogeneity of type 2 innate lymphoid cells[J]. *Nat Rev Immunol*, 2022, 22(11): 701-712. DOI: 10.1038/s41577-022-00704-5.
- [19] YUE J W, GUO H, XU P, *et al.* Activation of the GPR35 on ILC2 drives immunosuppression to promote lung cancer progression[J]. *Am J Cancer Res*, 2023, 13(6): 2426-2438. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10326596/>.
- [20] WU L M, LIN Q Q, MA Z L, *et al.* Mesenchymal PGD₂ activates an ILC2-Treg axis to promote proliferation of normal and malignant HSPCs[J]. *Leukemia*, 2020, 34(11): 3028-3041. DOI: 10.1038/s41375-020-0843-8.
- [21] WAN J, WU Y Q, HUANG L, *et al.* ILC2-derived IL-9 inhibits colorectal cancer progression by activating CD8⁺ T cells[J]. *Cancer Lett*, 2021, 502: 34-43. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.01.002.
- [22] ARIFUZZAMAN M, WON T H, YANO H, *et al.* Dietary fiber is a critical determinant of pathologic ILC2 responses and intestinal inflammation[J/OL]. *J Exp Med*, 2024, 221(5): e20232148[2024-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10955042/>. DOI: 10.1084/jem.20232148.
- [23] ZHANG Y, ZHU K L, WANG X, *et al.* Roles of IL-4, IL-13, and their receptors in lung cancer[J/OL]. *J Interferon Cytokine Res*, 2024, 2024: Online ahead of print[2024-05-10]. <http://doi.org/10.1089/jir.2024.000>. DOI: 10.1089/jir.2024.0008.
- [24] LASSER S A, OZBAY KURT F G, ARKHYPPOV I, *et al.* Myeloid-derived suppressor cells in cancer and cancer therapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2024, 21(2): 147-164. DOI: 10.1038/s41571-023-00846-y.
- [25] MA T M, RENZ B W, ILMER M, *et al.* Myeloid-derived suppressor cells in solid tumors[J/OL]. *Cells*, 2022, 11(2): 310[2024-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35053426/>. DOI: 10.3390/cells11020310.
- [26] GABITASS R F, ANNELS N E, STOCKEN D D, *et al.* Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are

- associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60(10): 1419-1430. DOI: 10.1007/s00262-011-1028-0.
- [27] CHEVALIER M F, TRABANELLI S, RACLE J, *et al.* ILC2-modulated T cell-to-MDSC balance is associated with bladder cancer recurrence[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(8): 2916-2929. DOI: 10.1172/JCI89717.
- [28] ZHAO N, ZHU W W, WANG J, *et al.* Group 2 innate lymphoid cells promote TNBC lung metastasis via the IL-13-MDSC axis in a murine tumor model[J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99: 107924[2024-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34217145/>. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107924.
- [29] JOU E, RODRIGUEZ-RODRIGUEZ N, FERREIRA A F, *et al.* An innate IL-25-ILC2-MDSC axis creates a cancer-permissive microenvironment for Apc mutation-driven intestinal tumorigenesis [J/OL]. *Sci Immunol*, 2022, 7(72): eabn0175[2024-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7612821/>. DOI: 10.1126/sciimmunol.abn0175.
- [30] LIU W, LI B Y, LIU D, *et al.* Obesity correlates with the immunosuppressive ILC2s-MDSCs axis in advanced breast cancer [J/OL]. *Immun Inflamm Dis*, 2024, 12(3): e1196[2024-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10949396/>. DOI: 10.1002/iid3.1196.
- [31] BAHHAR I, EŞ Z, KÖSE O, *et al.* The IL-25/ILC2 axis promotes lung cancer with a concomitant accumulation of immune-suppressive cells in tumors in humans and mice[J/OL]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1244437[2024-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10540623/>. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1244437.
- [收稿日期] 2024-05-16 [修回日期] 2024-07-26
[本文编辑] 向正华