

胃癌患者外周血 T 淋巴细胞亚群和 NK 细胞分析

雷子颖¹, 王俞¹, 罗嘉莉², 阮强¹, 王佳泓¹, 唐鸿生¹ (1. 广州医科大学附属肿瘤医院腹部综合外科; 2. 广州医科大学肿瘤学系, 广东 广州 510095)

【摘要】 目的 研究胃癌患者外周血 T 淋巴细胞亚群以及自然杀伤细胞(natural killer cell, NK) 数的变化及其临床意义。方法 使用全自动流式细胞仪检测 68 例胃癌患者外周血中 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD4⁺/CD8⁺和 NK 细胞水平, 并将其与对照组 32 例健康人群进行比较分析。结果 胃癌患者与对照组健康人群相比, CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD4⁺/CD8⁺比值以及 NK 细胞均明显下降($P<0.05$), CD8⁺T 细胞则明显升高($P<0.05$)。随着胃癌患者 TNM 分期进展, 肿瘤病灶大于 5 cm 和淋巴结转移, CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞及 NK 细胞均进一步下降 ($P<0.05$); CD8⁺T 细胞则进一步升高; CD4⁺/CD8⁺比值亦下降。结论 胃癌患者细胞免疫功能低下, 且与肿瘤分期相关, 分期越晚, 免疫功能越低。

【关键词】 胃癌; T 淋巴细胞亚群; NK 细胞

Analysis of T lymphocyte subsets and NK cells in peripheral blood of patients with gastric cancer LEI Zi-ying¹, WANG Yu¹, LUO Jia-li², RUAN Qiang¹, WANG Jia-hong¹, TANG Hong-sheng¹. 1. Department of Abdominal Surgery, Affiliated Cancer Hospital & Institute of Guangzhou Medical University, 2. Department of oncology, Guangzhou medical university. No. 78, Hengzhigang Road, Guangzhou 510095, Guangdong, China Corresponding author: TANG Hong-sheng, Email: 15913139343@163.com

【Abstract】 **Objective** To study the changes of T-lymphocyte subsets and NK cell in peripheral blood from patients with gastric cancer and their clinical significance. **Methods** Flow Cytometry was performed to count and analyze T-lymphocytes and NK cell in peripheral blood of 68 patients with gastric cancer and 32 normal controls. **Results** Compared with the normal controls, the percentage of CD3⁺T cell, CD4⁺T cell, NK cell and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ decreased obviously in the case group ($P<0.05$). With the progress of patients with different TNM stage, tumor lesions larger than 5 cm and lymph node metastasis, the percentage of CD3⁺T cell, CD4⁺T cell and NK cell in advanced gastric cancer group were significantly lower than those in early gastric cancer group ($P<0.05$); while the percentage of CD8⁺T cell was significantly higher than those in early gastric cancer group ($P<0.05$); the ratio of CD4⁺/CD8⁺ also decreased obviously in the advanced gastric cancer group. **Conclusion** Cellular immune function in patients with gastric cancer is obviously abnormal. A remarkable significance is found in the different TNM stage, the cellular immune function is lower in patients with poor stage.

【Key words】 Gastric cancer; T-Lymphocyte subsets; NK cell

肿瘤免疫学在近年来的肿瘤研究中起到主导地位, 肿瘤的发生、发展、侵袭、转移、疗效及预后等与宿主机体的免疫状态密切相关。淋巴细胞作为机体细胞免疫调节的重要组成成分, 是机体免疫应答过程中起关键作用的细胞群, 其中由 T 淋

巴细胞介导的细胞免疫功能在抗肿瘤过程中起核心调节作用, 同时机体免疫功能状态也是发生恶性肿瘤的主要原因之一^[1]。通过检测肿瘤患者外周血中淋巴细胞亚群是评估机体免疫功能状态的重要手段, 近年来, 淋巴细胞亚群在感染性疾病、风湿免疫性疾病及恶性肿瘤的研究中越来越受到国内外学者的重视^[2]。研究表明, 淋巴细胞亚群比例不仅可以反映机体的免疫功能状态和间接反映

基金项目: 广东省教育厅自然科学基金(2015KTSCX114)

通信作者: 唐鸿生, E-mail: 15913139343@163.com

肿瘤微环境的变化,还可以用来评估肿瘤进展的快慢、化疗药物的疗效,因此具有非常重要的临床应用价值^[3,4]。以健康人群作为参照,通过检测对比胃癌患者与健康人群外周血中淋巴细胞各亚群的分布情况,旨在为临床最佳综合治疗提供有价值的参考资料。

1 资料和方法

1.1 资料

1.1.1 胃癌组 病例来源为2012年9月至2013年11月入住广州医科大学附属肿瘤医院腹外二科的68例胃癌患者,见表1。其中男性47例,女性21例;年龄42~71(59.1±8.7)岁,中位年龄57岁。所有患者均经胃镜病理活检及术后病理检查证实为胃癌,其中腺癌39例,印戒细胞癌22例,鳞状细胞癌7例;据TNM分期,Ⅰ期14例,Ⅱ期23例,Ⅲ期19例,Ⅳ期12例。采血取得患者及其亲属的知情同意。所有胃癌患者采血前均未接受过放化疗及免疫治疗。

1.1.2 对照组 选取同期体检的健康人群32例作为对照组,其中男18例,女14例,年龄41~65(56.84±9.1)岁,中位年龄54岁,两组年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$)。所有研究对象均无肿瘤及免疫相关性疾病。对照组采血取得受试对象的知情同意。

表1 胃癌患者临床资料

临床因素	分布数据
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	59.1±8.7
性别[例(%)]	
男	47(69.1)
女	21(30.9)
病理类型[例(%)]	
腺癌	39(57.4)
印戒细胞癌	22(32.4)
鳞状细胞癌	7(10.3)
TNM分期[例(%)]	
Ⅰ期	14(20.6)
Ⅱ期	23(33.8)
Ⅲ期	19(27.9)
Ⅳ期	12(17.6)

1.1.3 主要仪器与试剂 仪器为流式细胞仪FAC-Saliur(美国BD公司)。试剂为单克隆抗体CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、NK细胞(CD3⁻CD16⁺CD56⁺),均为BD Pharmingen产品(美国BD公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验方法 所有受试者均在入院时抽取早晨空腹静脉血5ml,加入到EDTA抗凝的真空管中,混匀。通过直接免疫荧光标记法检测胃癌组及健康人群对照组外周血中淋巴细胞各亚群水平。取流式细胞仪试管,每管各加入100 μl抗凝外周血,然后各加入20 μl带有荧光素标记的CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD16⁺CD56⁺抗体,充分混匀,避光条件下常温孵育15 min后,每管中加入红细胞裂解液1000 μl,充分混匀,避光孵育10 min后,室温下2000 r/min离心5 min,弃上清液。每管加入3 ml PBS,2000 r/min离心5 min洗涤两遍;最后再向每管加入500 μl PBS,充分混匀重悬细胞,使用流式细胞仪上机检测荧光标记,每个样品收集细胞数10000个,采用FlowJo分析软件计算淋巴细胞的百分比结果。

1.2.2 统计分析 数据均使用SPSS 19.0软件进行统计分析,数值用($\bar{x}\pm s$)表示。两组间的比较采用两个独立样本 t 检验, $P<0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌患者与健康对照组外周血T淋巴细胞亚群、B细胞以及NK细胞的比较 胃癌患者与健康对照组相比,CD3⁺T细胞、CD4⁺T细胞、CD4⁺/CD8⁺比值以及NK细胞比例均明显下降($P<0.05$);CD8⁺T细胞比例则明显升高($P<0.05$),以上各项指标的差异均有显著性。见表2。

2.2 胃癌患者不同TNM分期与外周血T淋巴细胞亚群、B细胞以及NK细胞的关系 随着胃癌患者TNM分期进展,CD3⁺T细胞、CD4⁺T细胞、CD4⁺/CD8⁺比值以及NK细胞比例均下降。Ⅱ期、Ⅲ期、Ⅳ期与Ⅰ期相比,CD3⁺T细胞比例下降,有显著性差异($P<0.05$);Ⅲ期、Ⅳ期与Ⅰ期以及Ⅳ期与Ⅱ期相比,CD4⁺T细胞比例下降,有显著性差异($P<0.05$);Ⅲ期、Ⅳ期与Ⅰ期及Ⅱ期相比,NK细胞比例亦下降,有显著性差异($P<0.05$);Ⅲ期、Ⅳ期与Ⅰ期以及Ⅳ期与Ⅱ期、Ⅲ期相比,CD4⁺/CD8⁺比值下降,有显著性差异($P<0.05$),而其余各期相互比较均无统计学意义。CD8⁺T细胞比例则明显升高,Ⅲ期、Ⅳ期与Ⅰ期以及Ⅳ期与Ⅱ期相比,差异有显著性($P<0.05$)。(见表3)。

2.3 胃癌患者不同病灶大小、淋巴结转移情况与

表2 胃癌患者与健康对照组外周血T淋巴细胞亚群以及NK细胞的比较($\bar{x}\pm s, \%$)

检测指标	Health (n=32)	Gastric cancer (n=68)	t	P
CD3 ⁺	68.56±6.15	60.19±9.63	4.497	<0.001**
CD4 ⁺	38.65±6.57	29.63±12.35	3.875	<0.001**
CD8 ⁺	24.19±4.46	32.08±7.98	5.214	<0.001**
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.57±0.40	0.98±0.54	5.505	<0.001**
NK (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	19.56±5.02	15.32±7.22	2.995	0.003*

注: *P<0.05; **P<0.001

表3 胃癌患者不同TNM分期与外周血T淋巴细胞亚群以及NK细胞的关系($\bar{x}\pm s, \%$)

检测指标	I期 (n=14)	II期 (n=23)	III期 (n=19)	IV期 (n=12)
CD3 ⁺	65.42±6.70	61.30±8.08*	60.80±9.14*	59.34±12.36*
CD4 ⁺	36.17±10.40	31.18±11.56	26.58±12.12*	22.35±11.65* [△]
CD8 ⁺	24.72±5.28	25.27±5.65	30.54±8.22*	35.17±8.32* [△]
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.44±0.44	1.12±0.46	0.96±0.47*	0.56±0.34* ^{△▲}
NK (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	19.24±6.18	18.49±5.82	11.61±5.81* [△]	9.38±5.96* [△]

注: *与I期相比 P<0.05; △与II期相比 P<0.05; ▲与III期相比 P<0.05

外周血T淋巴细胞亚群以及NK细胞的关系 胃癌患者肿瘤病灶的大小不同、是否有淋巴结转移,其CD3⁺T细胞、CD4⁺T细胞、CD4⁺/CD8⁺比值以及NK细胞水平均不一样。肿瘤病灶大于5.0 cm与病灶小于5 cm的胃癌患者相比,CD3⁺T细胞、CD4⁺T细胞、CD4⁺/CD8⁺比值以及NK细胞比例均下降,而CD8⁺T细胞比例则明显升高,有显著性差异(P<0.05)。有淋巴结转移与无淋巴结转移的胃癌患者相比,CD3⁺T细胞和CD4⁺T细胞比例均下降,但差异无统计学意义;CD4⁺/CD8⁺比值以及NK细胞比例亦下降,有显著性差异(P<0.05)。而CD8⁺T细胞比例则明显升高,有显著性差异(P<0.05)。见表4。

3 讨论

外周血中淋巴细胞亚群是反映机体免疫功能状态的重要指标,细胞之间的微平衡是维持机体免疫系统稳定的核心环节。免疫系统根据对肿瘤免疫应答的机制可分为特异性应答和非特异性应答,多种免疫细胞及其分泌的产物参与该过程中,它们之间相互影响、相互调节、相辅相成,共同完

成免疫监视功能^[5]。虽然机体有免疫监视功能,但是由于肿瘤细胞存在多种免疫逃逸机制,导致免疫系统无法有效识别及杀灭肿瘤细胞,恶性肿瘤依然会发生并持续进展。

根据淋巴细胞在机体免疫应答过程功能的不同,可将淋巴细胞主要分为T淋巴细胞、B淋巴细胞和NK细胞三类。众所周知,机体的细胞免疫主要由T淋巴细胞介导,而体液免疫由B细胞(CD3⁻CD19⁺)介导、非特异性免疫则由NK细胞(CD3⁻/CD16⁺CD56⁺)、单核细胞及巨噬细胞介导。CD3⁺分子是T淋巴细胞标志物,进一步依据淋巴细胞是否表达CD4⁺和CD8⁺将T淋巴细胞分为CD4阳性T淋巴细胞和CD8阳性T淋巴细胞两个亚群。CD4⁺T细胞通过分泌细胞因子协助体液免疫和细胞免疫,辅助机体完成免疫调节,又被称为辅助性T淋巴细胞(helper T cell, Th)。而CD8⁺T具有特异性杀伤功效,是机体最重要的细胞毒效应细胞(cytotoxic T cell, Tc)。在正常生理状态下,CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞两种淋巴细胞亚群间保持动态平衡以保证机体正常的免疫功能稳定。对肿瘤细胞可进行正常地免疫监视及有效杀伤肿瘤细胞^[6]。

表4 不同病灶大小、淋巴结转移情况与外周血T淋巴细胞亚群以及NK细胞的关系($\bar{x}\pm s, \%$)

检测指标	<5 cm (n=28)	≥5 cm (n=40)	t	P	是 (n=48)	否 (n=20)	t	P
CD3 ⁺	64.03±6.39	58.04±10.00	2.792	0.007*	59.90±9.52	64.07±10.69	1.587	0.117
CD4 ⁺	33.47±12.83	27.00±11.34	2.193	0.032*	28.04±12.91	33.56±9.84	1.713	0.091
CD8 ⁺	24.98±5.33	32.23±8.22	4.098	<0.001**	32.55±8.38	25.22±4.66*	3.672	<0.001**
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.25±0.57	0.88±0.47	2.926	0.005*	0.88±0.42	1.39±0.55*	4.155	<0.001**
NK (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	19.63±5.78	12.18±7.87	4.265	<0.001**	13.21±7.96	20.16±6.52*	3.448	0.001*

注: *P<0.05; **P<0.001

恶性肿瘤患者常常伴随免疫调节系统异常,表现为可反映细胞免疫功能的T淋巴细胞亚群发生改变。有研究表明,乳腺癌患者的CD3⁺T淋巴细胞、CD3⁺CD4⁺T淋巴细胞以及NK细胞含量明显低于正常人,而CD3⁺CD8⁺T淋巴细胞比例则明显上升,CD4⁺/CD8⁺比值下降^[7-9]。在临床上通常通过检测肿瘤患者外周血中T淋巴细胞亚群的变化来评估机体的免疫功能状态及患者的病情变化,可协助指导使用免疫调节剂及其他药物治疗肿瘤患者,以评估疗效。

而本研究结果显示:在胃癌患者T淋巴细胞亚群中CD3⁺T细胞、CD4⁺T细胞、CD4⁺/CD8⁺比值以及NK细胞比例均低于健康人,而CD8⁺T淋巴细胞要比健康人高,且与肿瘤分期相关,分期越晚,免疫功能越低,差异具有统计学意义。以上结果提示胃癌患者的免疫辅助治疗应围绕提高CD3⁺T细胞、CD3⁺CD4⁺T淋巴细胞以及NK细胞的数量以提高胃癌患者免疫功能。综上所述,机体免疫系统功能与恶性肿瘤的发生、发展密切相关,通过流式细胞仪分析胃癌患者外周血淋巴细胞亚群检测有助于指导临床治疗及预后评价。

参考文献

- [1] Schmidt T, van Mackelenbergh M, Wesch D, et al. Physical activity influences the immune system of breast cancer patients [J]. *Journal of cancer research and therapeutics*, 2017, 13(3): 392-398.
- [2] Wang Y, Cheng XJ, Yin AH, et al. Relationship between sleep disorders and lymphocyte subsets and cytokines in patients with lung cancer [J]. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 2018, 32(5): 1231-1237.
- [3] Waki K, Yamada T, Yoshiyama K, et al. PD-1 expression on peripheral blood T-cell subsets correlates with prognosis in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer science*, 2014, 105(10): 1229-1235.
- [4] Di Gennaro P, Gerlini G, Caporale R, et al. T regulatory cells mediate immunosuppression by adenosine in peripheral blood, sentinel lymph node and TILs from melanoma patients [J]. *Cancer letters*, 2018, 417: 124-130.
- [5] Tosato F, Bernardi D, Sanzari MC, et al. Biological variability of lymphocyte subsets of human adults' blood [J]. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 2013, 424: 159-163.
- [6] Emerson R, Sherwood A, Desmarais C, et al. Estimating the ratio of CD4⁺ to CD8⁺ T cells using high-throughput sequence data [J]. *Journal of immunological methods*, 2013, 391(1-2): 14-21.
- [7] Nasr Ghalib N, Nasrullayeva GM, Qaziyev AY, et al. T-Lymphocyte Subset (CD4/CD8) Ratios of Breast Cancer Patients in Basra-Iraq and Baku-Azerbaijan [J]. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 2016, 17(S3): 175-177.
- [8] Wang K, Shen T, Siegal GP, et al. The CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes at the tumor-host interface has prognostic value in triple-negative breast cancer [J]. *Human pathology*, 2017, 69: 110-117.
- [9] Nagase H, Takeoka T, Urakawa S, et al. ICOS(+) Foxp3(+) TILs in gastric cancer are prognostic markers and effector regulatory T cells associated with *Helicobacter pylori* [J]. *International journal of cancer*, 2017, 140(3): 686-695.