

· 临床论著 ·

CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞在膀胱癌中的分布及其临床意义

彭紫元 纪梓良 张琼丽 段永刚 镇万华 唐爱发 蔡志明

【摘要】 目的 研究调节性 T 细胞在膀胱癌患者组织和血液中的表达及其临床意义。**方法** 收集膀胱癌患者组织标本及其血液标本各 20 例,应用流式细胞术检测 T 淋巴细胞亚群的分布,实时定量 PCR 技术检测膀胱癌组织及癌旁组织细胞因子转化生长因子-β (TGF-β),白介素(IL)-4、-10、-12、-17 和干扰素-γ (IFN-γ)等表达水平,并分析调节性 T 细胞的表达与膀胱癌临床病理特征的关系。**结果** 与膀胱癌癌旁组织标本相比(3.58 ± 0.31)%,在膀胱癌中调节性 T 细胞显著增多(29.10 ± 0.75)% ($P < 0.01$),浸润性膀胱癌组织中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的数量与肿瘤分级和分期具有显著相关性($r = 0.73, P < 0.05$),而且抑制性细胞因子 TGF-β 和 IL-10 的表达量显著增多($P < 0.01$),IL-17 表达亦增多($P < 0.01$)。与健康对照组(5.2 ± 0.63)% 相比,膀胱癌患者外周血中调节性 T 细胞亦显著增多(15.68 ± 0.54)%,且膀胱癌组织中的调节性 T 细胞阳性细胞百分比较外周血中更多($P < 0.01$)。**结论** 膀胱癌患者组织及外周血均表现免疫抑制状态,膀胱癌组织的调节性 T 细胞阳性表达数量与临床病理特征具有相关性。

【关键词】 膀胱肿瘤; T 淋巴细胞,调节性; 免疫抑制; T 淋巴细胞亚群; 细胞因子类

Expression of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in human bladder carcinoma and its clinical significance

PENG Zi-yuan, JI Zi-liang, ZHANG Qiong-li, DUAN Yong-gang, ZHEN Wan-hua, TANG Ai-fa, CAI Zhi-ming.
Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Second People's Hospital, The First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen 518035, China

Corresponding author: CAI Zhi-ming, Email: caizhiming2000@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of regulatory T cells (Treg cells) in bladder carcinoma and patients' blood and its clinical significance. **Methods** The tissue and blood samples were collected from patients with bladder cancer ($n = 20$). T lymphocyte subsets were detected by flow cytometer and cytokines (TGF-β, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 and IFN-γ) in cancerous and paracancerous tissues were assessed by real-time PCR technology. Clinical pathologic factors were analyzed accordingly. **Results** A significant increase of the percentage of Treg cells was found in the bladder carcinoma compared with paracancerous tissues [(29.10 ± 0.75)%; $P < 0.01$], and inhibitory cytokines (TGF-β and IL-10) increased significantly in bladder carcinoma with a rise of IL-17. The percentage of Blood Treg cells increased significantly in carcinoma group compared with normal group but less than that of cancerous tissues in bladder carcinoma [(15.68 ± 0.54)%; $P < 0.01$]. **Conclusion** The overexpression of Treg cells from bladder carcinoma patients indicates an immunosuppressive regulatory profile and the percentage of cancerous Treg cells are associated with the clinical pathologic factors in bladder carcinoma.

【Key words】 Urinary bladder neoplasms; T-Lymphocytes, regulatory; Immune suppression; T-lymphocyte subsets; Cytokines

膀胱癌是常见的恶性肿瘤之一,在我国膀胱癌的

发病率和死亡率均居泌尿系统肿瘤首位。因其术后复发率高,对放、化疗敏感性差,术后需反复进行膀胱镜及其他检查。或使用药物或免疫制剂进行膀胱内灌注治疗和预防复发。因此,膀胱癌在美国是单个患者平均费用最为昂贵的恶性肿瘤^[1]。另一方面,由于膀胱癌可经尿道行无创性检查和手术治疗,故膀胱癌的治疗除了手术治疗之外常常伴有膀胱灌注化疗药物和免疫治疗等新兴治疗手段。研究报道,采用基因工程技术制备的 CD40L (Th1 细胞激活物) 和 IL-2 (Th1 细

DOI:10.3877/ema.j.issn.1674-0785.2013.11.115

基金项目: 国家“863”子课题“以膀胱癌建立肿瘤研究与诊断新技术”(2012AA02A208); 广东省医学科研基金(B2012319); 深圳市科技计划项目(医疗卫生类 201202023); 深圳市第二人民医院“育苗计划”(2012004)

作者单位: 518035 广东省,深圳市第二人民医院(深圳大学第一附属医院)检验科(彭紫元、张琼丽); 深圳市泌尿生殖系统肿瘤重点实验室(纪梓良、段永刚、镇万华、唐爱发、蔡志明)

通讯作者: 蔡志明, Email: caizhiming2000@163.com

表1 20例膀胱癌标本患者的资料

组别	例数	男/女 (例)	平均年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	临床 TNM 分期(例)						分级(例)		
				Ta	T1	T2	T3a	T3b	T4	I	II	III
非浸润性	8	5/3	53.3 ± 2.5	5	3	-	-	-	-	2	4	2
浸润性	12	8/4	51.5 ± 3.5	-	-	2	3	4	3	4	5	3

胞释放的细胞因子)在治疗大鼠膀胱癌模型中已获得成功^[2]。目前免疫治疗已逐渐成为在研究动物肿瘤模型以及人类癌症临床治疗试验的一个有潜力的手段^[3-4]。例如,卡介苗为膀胱腔内灌注的常用生物制剂,BCG与膀胱黏膜接触后引起膀胱黏膜的炎症反应,从而激发局部的细胞免疫反应,形成有胶原纤维包绕的成纤维细胞、巨噬细胞和淋巴细胞团,从而干扰肿瘤细胞的生长^[5]。

T细胞具有高度的异质性,根据其表面标志和功能特征,T细胞可分为不同的亚型,如Th细胞、CTL细胞和调节性T细胞(regulatory T cells, Treg cells),各亚群之间相互调节,共同发挥其免疫学功能。前期研究发现,以分泌IL-17为主要特征的CD4⁺辅助性T细胞,即Th17细胞在前列腺癌和卵巢癌的肿瘤发生过程中发挥重要作用^[6-7]。另一方面,亦有研究报道以免疫抑制为主要功能的Treg细胞主要分布于消化道肿瘤和肾癌的肿瘤浸润区,而且Treg的数量与肿瘤的快速进展具有密切相关性^[8-9]。Treg细胞主要以表达CD4⁺CD25⁺以及转录因子FoxP3为特征,且目前研究显示FoxP3是仅表达于Treg细胞^[10]。

Treg细胞可由胸腺内发育成熟后直接迁移至外周,也可由外周初始T细胞(Th0)经TGF-β等细胞因子诱导分化而来。其中在外周由组织特异性抗原和外来抗原刺激诱导产生的Treg细胞,称为诱导性调节性T细胞(induced regulatory T cells, iTreg)^[11]。在iTreg中主要有Tr1和Th3两种亚群。Tr1细胞主要分泌细胞因子白介素(IL)-10和转化生长因子β(TGF-β),而Th3细胞主要产生IL-10、TGF-β和IL-4。细胞因子IL-10和TGF-β皆以发挥免疫抑制作用见长,因此Tr1和Th3具有下调免疫应答的特性^[12]。然而,目前关于膀胱癌患者血液和组织中淋巴亚群分布与正常人相比是否有变化,特别是Treg细胞的数量与肿瘤浸润程度是否具有相关性目前尚不清楚。本课题拟研究膀胱癌患者外周血和组织中淋巴细胞亚群的分布和细胞因子的表达及其与临床病理特征之间的关系。

材料与方 法

1. 一般资料:收集深圳市第二人民医院泌尿外科2012年1月至2012年12月手术切除的膀胱癌组织标

本20例、癌旁组织20例,所有病例标本均经病理证实,且未接受放化疗治疗,临床资料完整(表1),同时收集20例患者的血液标本。收集健康志愿者外周血标本20例作为正常对照组,健康志愿者来自我院体检科进行年度体检的患者,各项检验指标均正常,无全身性疾病和严重器质性疾病,如心脏病、糖尿病、肺结核、肝病、血液病、高血压、精神病等;无长期接触放射线和有毒有害物质的等情况;无吸毒、酗酒、嗜烟等不良嗜好和冶游史;无遗传病史和遗传病家族史;无药物依赖史,一般体格检查均无异常。本研究实验设计采用回顾性研究,研究探讨膀胱癌患者外周血和组织中淋巴细胞亚群的分布和细胞因子的表达及其与临床病理特征之间的关系。本项研究已经取得深圳市第二人民医院(深圳大学第一附属医院)医学伦理委员会的批准,在取得患者的知情同意后收集标本。

2. 流式细胞术:膀胱癌组织、癌旁组织标本以及膀胱癌患者和健康志愿者外周血收集后,制备成细胞悬液^[13]。方法简述如下:膀胱癌组织标本用组织剪剪碎,胰蛋白酶和胶原酶消化后,制备成浓度(1~2)×10⁶的细胞悬液。外周血标本使用PBS溶液离心洗涤两次,制备成浓度(1~2)×10⁶的细胞悬液。取100 μl细胞悬液,分别加入CD45、CD3、CD4、CD8和CD25抗体(表2),另取100 μl细胞悬液标本选取相对应的同型对照抗体(Isotype control)同型对照组。孵育后,在样品中加入PBS缓冲液,离心洗涤,然后使用流式细胞仪(Epics XL 4CLR flow cytometer, Beckman Coulter, Cincinnati, USA)上机检测。用FlowJo软件(美国Tree Star公司)对所获得数据进行分析。

表2 所用流式抗体明细表

名称	标记	克隆	Isotype	来源
CD45	FITC	B3821F4A	IgG2b	Beckman Coulter
CD3	PE-Cy5	UCHT1	IgG1	Beckman Coulter
CD4	PE	SFC112T4D11	IgG1	Beckman Coulter
CD8	ECD	SFC121Thy2D3	IgG1	Beckman Coulter
CD4	FITC	13B8.2	IgG1	Beckman Coulter
CD25	PE	B1.49.9	IgG2a	Beckman Coulter

3. 总RNA提取及反转录反应:用Trizol试剂提取

组织 RNA,操作按照试剂盒说明书进行。核酸测定仪测其浓度及 A260/A280,比值要求在 1.8 ~ 2.0,同时用 0.01 琼脂糖胶电泳鉴定 RNA 质量。反转录反应:取上述总 RNA 1 μg 进行反转录反应,20 μl 体系。反转录条件:37 °C 10 min,42 °C 20min,99 °C 5min,获得的 cDNA -20 °C 保存。

4. 实时荧光定量 PCR 技术:使用 TaKaRa 公司 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒(DRR820A)进行实时定量 PCR,引物设计见表 3。PCR 程序:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火延伸 30 s,读板,40 个循环,插入溶解曲线。每个样本设 3 个重复管。将 PCR 产物做溶解曲线分析,确定产物特异性。所得产物的相对表达量通过对其 Ct 值用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

表 3 所用引物序列表

名称		引物序列
TGF-β	正向	CCCAGCATCTGCAAAGCTC
	反向	GTCAATGTACAGCTGCCGCA
IL-4	正向	ATGGGTCTCACCTCCCAACTGCTT
	反向	GTTTCCAACGTACTCTGGTTGGC
IL-10	正向	GCCTAACATGCTTCGAGATC
	反向	CTCATGGCTTTGTAGATGCC
IFN-γ	正向	AGTTATATCTTGCTTTTCA
	反向	ACCGAATAATTAGTCAGCTT
IL-12	正向	GGACAACAGTCAGTCTCGTTGC
	反向	GGAGGCTGCGAAGGATTTTG
IL-17	正向	GCTCCAGAAGGCCCTCAGA
	反向	AGCTTTCCCTCCGCATTGA
β-actin	正向	GGCATCGTGATGGACTCCG
	反向	GTCGGAAGGTGGACAGCGA

5. 统计学分析:采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,测量值以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,其中所得数据在两组之间比较采用 *t* 检验进行统计分析,参数之间相关性采用进行 Spearman 秩相关统计学分析。

结 果

1. CD4⁺CD25⁺Treg 细胞在膀胱癌组织和外周血中的表达:应用流式细胞术分析,以成熟淋巴细胞群 CD45^{high} 设门,所得 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞结果以占淋巴细胞群 CD45^{high} 百分比表示。结果与膀胱癌旁组织标本相比(3.58 ± 0.31)%,在膀胱癌中 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞显著增多(29.10 ± 0.75)%,二者之间具有统计学意义(图 1, *P* < 0.01)。膀胱癌患者外周血中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数为(15.68 ± 0.54)%,与正常健康人外周血 Treg 细胞数(5.20 ± 0.63)% 相比

显著增多(图 1, *P* < 0.01)。膀胱癌患者组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数较外周血中的亦更多,提示膀胱癌组织中浸润性 T 细胞主要为抑制性的 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞。

将 8 例非浸润性和 12 例浸润性膀胱癌患者的膀胱癌组织中和外周血中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的数量与肿瘤的分级分期做相关性分析。结果显示 10 例浸润性患者(83%)与非浸润性相比在外周血中更高水平的 CD4⁺CD25⁺细胞,浸润性膀胱癌患者外周血中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的表达与患者肿瘤分级和分期无显著相关性。但是,在浸润性膀胱癌组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的数量与肿瘤分级和分期具有显著相关性(*r* = 0.73, *P* < 0.05)。

2. 膀胱癌浸润性 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞可能为 Tr1 型:实时荧光定量 PCR 技术检测了膀胱癌组织的细胞因子 TGF-β、IL-4、IL-10、IL-12、IL-17 和 IFN-γ mRNA 等表达水平,其中 TGF-β 和 IL-10 在膀胱癌组织的表达水平与癌旁组织相比显著增高(图 2)。IL-4 在所有膀胱癌标本中均未检测到表达,而且在所有标本均未检测到 Th1 相关的 IL-12 表达,提示 Th1 抗肿瘤免疫细胞反应在肿瘤组织区域相对缺乏。该结果提示肿瘤组织标本中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的免疫应答可能为以分泌 TGF-β 及 IL-10 为主的 Tr1 型。同时,有 12 个(60%)肿瘤标本检测到 IFN-γ 的高表达,而 IFN-γ 的表达作为 T 细胞激活的标志,这就提示大部分肿瘤表达的 TGF-β 或 IL-10 可能是由于肿瘤激活的 CD4⁺T 细胞转化为 Treg 细胞。在 13 个膀胱癌组织标本(65%)中,亦检测到 IL-17 的高表达,与癌旁组织相比,具有统计学意义(*P* < 0.01)。结果提示,以分泌 IL-17 为主的 Th17 细胞亦有可能参与在肿瘤发生、发展。

讨 论

1986 年 Rosenberg 等^[14]首先报道了肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL),后续研究发现 TIL 多数为抑制性细胞亚群即 Treg 细胞,研究表明 Treg 细胞不但阻止抗肿瘤免疫,而且还是阻止肿瘤免疫治疗成功的重要障碍^[15]。因此,为了研制针对肿瘤有效的免疫治疗,如何控制肿瘤微环境中的免疫反应机制具有十分重要的意义。CD4⁺CD25⁺Treg 细胞对免疫耐受的维持是非常重要的,而且他们对肿瘤 T 细胞反应也有抑制作用。CD4⁺CD25⁺Treg 细胞通常对抗肿瘤免疫应答起抑制作用,但其对环磷酸胺敏感,故用环磷酸胺去除 Treg 细胞后可恢复对肿瘤的免疫应答^[16]。对 BALB/c 小鼠用抗 CD25 单抗清除 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞,结果小鼠的乳腺肿瘤消退而甲状腺

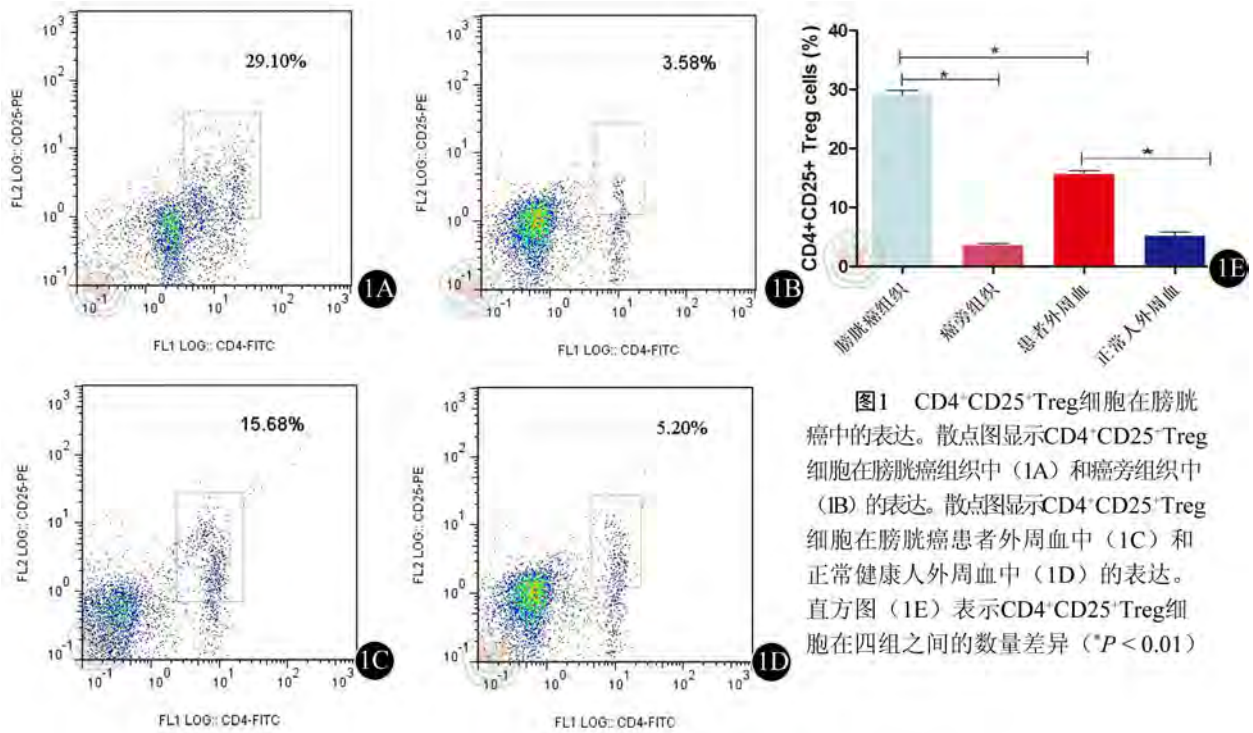


图1 CD4⁺CD25⁺Treg细胞在膀胱癌中的表达。散点图显示CD4⁺CD25⁺Treg细胞在膀胱癌组织中(1A)和癌旁组织中(1B)的表达。散点图显示CD4⁺CD25⁺Treg细胞在膀胱癌患者外周血中(1C)和正常健康人外周血中(1D)的表达。直方图(1E)表示CD4⁺CD25⁺Treg细胞在四组之间的数量差异(**P* < 0.01)

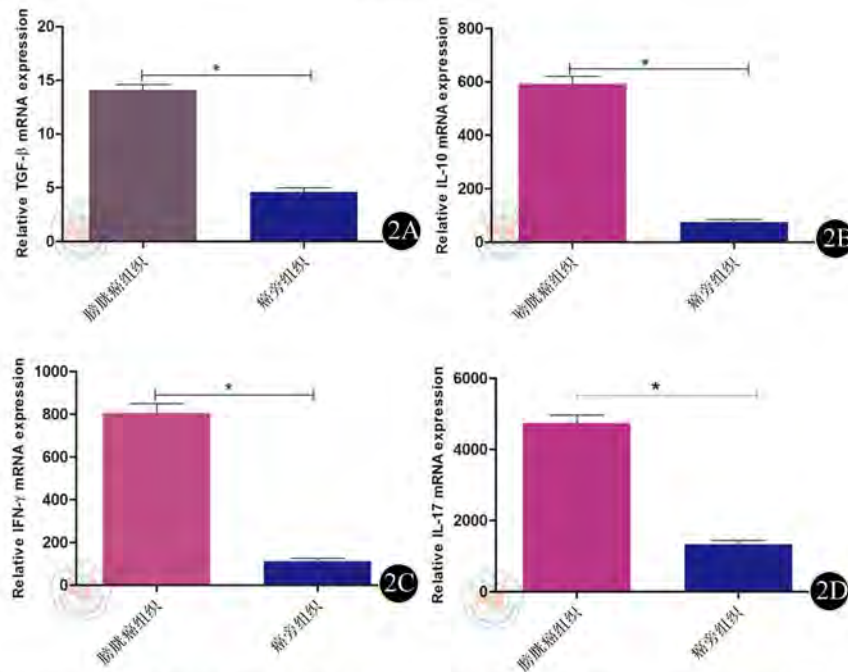


图2 细胞因子TGF-β (2A)、IL-10 (2B)、IFN-γ (2C) 和IL-17 (2D) mRNA在膀胱癌组织和癌旁组织中的表达水平(**P* < 0.01)

炎的易感性增加^[17]。体内试验显示 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞可抑制 CD4⁺T 细胞对肿瘤细胞刺激引起的 IFN 依赖的抗肿瘤免疫应答,并可抑制肿瘤抗原肽疫苗产生的长期的抗肿瘤作用^[18]。

我们的研究结果显示在人膀胱癌组织中以 Tr1 细胞为主要的 Treg 细胞亚型,特征为 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞和其分泌的抑制性细胞因子的广泛浸润在膀胱癌组织中。大部分膀胱癌标本检测到高水平的 IL-10 和 TGF-β mRNA,而 IL-12 和 IL-4 则完全不表达。由于患

者标本的异质性,因此没有研究患者阶段与分级与细胞因子的联系。肿瘤微环境中的 IL-10 和 TGF-β 严重的干扰了活化 T 细胞的杀伤肿瘤细胞效应。另外,结果显示,IFN-γ mRNA 在膀胱癌组织中检测到亦有较高水平的表达。这是否是细胞毒性 T 细胞或抗原刺激 Treg 细胞的抗肿瘤反应的结果,目前尚不清楚。而且,实验结果显示 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞在膀胱癌患者组织中和外周血中均有高水平的数量,可能提示外周 T

细胞对活化刺激没有免疫反应。Curiel 等^[19]研究发现,从卵巢癌患者组织中分选出的 CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg 细胞可抑制正常人 T 细胞的快速增殖,亦可抑制局部免疫应答的产生。

Kastelan 等^[20]研究发现,从非浸润性膀胱癌患者分离出的淋巴细胞已经对有丝分裂原的反应比正常人降低。而且,浸润性膀胱癌患者分离出的淋巴细胞对有丝分裂原的反应较浅表膀胱癌更为下降。这些结果与我们的结果从不同方面均提示膀胱癌的发生发展与机体免疫抑制有重要关系。如前所述,BCG 是一种广为接受的免疫治疗方式,常用于膀胱癌的辅助治疗,因此治疗前的免疫状况值得我们的注意。例如,患者的免疫状态可能解释 BCG 治疗的免疫耐受。在本实验中,CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的比例在患者中显著升高。然而,阳性细胞的比例在患者中各有差异。一般患者与正常人相比升高了 80%,而只有 4 例患者升高了 100%。因此,个体 Treg 细胞的水平对 BCG 治疗效果和新兴的生物治疗均有重要的提示意义。基于上述结果,提示膀胱癌患者的肿瘤微环境均以抑制性的 Tr1 细胞主导的免疫状态,并存在 Treg 细胞分泌的抑制性细胞因子 IL-10 和 TGF- β 大量表达。这些 Treg 细胞能够抑制自体的及异源性的正常人的 T 细胞发挥免疫应答效应。因此,评估膀胱癌患者的免疫状态与相关治疗反应和整体生存率的研究是必要的。

参 考 文 献

- [1] Miller BA, Kolonel LN, Bernstein L, et al. Racial/ethnic patterns of cancer in the United States 1988-1992, National Cancer Institute. DIANE Publishing, 1996.
- [2] Totterman TH, Loskog A, Essand M. The immunotherapy of prostate and bladder cancer. *BJU Int*, 2005, 96:728-735.
- [3] Couderc B, Zitvogel L, Douin-Echinard V, et al. Enhancement of anti-tumor immunity by expression of CD70 (CD27 ligand) or CD154 (CD40 ligand) costimulatory molecules in tumor cells. *Cancer Gene Ther*, 1998, 5:163-175.
- [4] Wysocki PJ, Karczewska-Dzionk A, Mackiewicz-Wysocka M, et al. Human cancer gene therapy with cytokine gene-modified cells. *Expert Opin Biol Ther*, 2004, 4:1595-607.
- [5] Ayari C, LaRue H, Hovington H, et al. Bladder tumor infiltrating mature dendritic cells and macrophages as predictors of response to Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *Eur Urol*, 2009, 55:1386-1395.
- [6] Sfnos KS, Bruno TC, Maris CH, et al. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res*, 2008, 14:3254-2361.
- [7] Kryczek I, Wei S, Zou L, et al. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J Immunol*, 2007, 178:6730-6033.
- [8] Ichihara F, Kono K, Takahashi A, et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cncer Res*, 2003, 9:4404-4408.
- [9] GriYths RW, Elkord E, Gilham DE, et al. Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56:1743-1753.
- [10] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2003, 4:330-336.
- [11] Bilate AM, Lafaille JJ. Induced CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30:733-758.
- [12] D'Orazio TJ, Niederkorn JY. A novel role for TGF-beta and IL-10 in the induction of immune privilege. *J Immunol*, 1998, 160:2089-2098.
- [13] Allam JP, Duan YG, Winter J, et al. Tolerogenic T cells, Th1/Th17 cytokines and TLR2/TLR4 expressing dendritic cells predominate the microenvironment within distinct oral mucosal sites. *Allergy* 2011, 66:532-539.
- [14] Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science*, 1986, 233:1318-1321.
- [15] Zou W. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6:295-307.
- [16] Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, et al. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol*, 2004, 34:336-344.
- [17] Wei WZ, Morris GP, Kong YC. Anti-tumor immunity and autoimmunity: a balancing act of regulatory T cells. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53:73-78.
- [18] Casares N, Arribillaga L, Sarobe P, et al. CD4⁺ CD25⁺ regulatory cells inhibit activation of tumor-primed CD4⁺ T cells with IFN-gamma dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination. *J Immunol*, 2003, 171:5931-5939.
- [19] Curiel TJ, Coukos G, Zou J, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 2004, 10:942-949.
- [20] Kastelan Z, Lukac J, Derezić D, et al. Lymphocyte subsets, lymphocyte reactivity to mitogens, NK cell activity and neutrophil and monocyte phagocytic functions in patients with bladder carcinoma. *Anticancer Res*, 2003, 23:5185-5189.

(收稿日期:2013-05-20)

(本文编辑:郝锐)