

流式细胞术对食管癌、贲门癌患者 T 细胞亚群的分析

沈玉光¹,高宗人¹,许金良¹,杨宗林²,赵婷茹³

The Analysis of T Lymphocyte Subsets Using FCM to the Peripheral Blood of Patients with Esophageal or Cardiac Carcinoma

SHEN Yu-guang¹,GAO Zong-ren¹,XU Jin-liang¹,YANG Zong-lin²,ZHAO Ting-ru³

1. Department of Thoracic Surgery, He nan Tumor Hospital, Zhengzhou 450008, China; 2. Department of Thoracic Surgery, People Hospital of Jiange County; 3. Department of Pathology, He nan Tumor Hospital

Abstract :Objective To measure the state of cellular immunity of patients with esophageal or cardiac carcinoma by flow cytometry. **Methods** Venous blood was obtained from 145 patients with esophageal or cardiac carcinoma and 18 healthy volunteers. Percentages of CD3⁺,CD4⁺,CD8⁺,NK cell and CD4⁺/CD8⁺ ratio were measured by flow cytometry. and explored the relationship between clinical stage and T lymphocyte subproportion. **Results** Compared to controls, 145 patients with esophageal or cardiac carcinoma had significant higher percentages of CD8⁺ T cells. No differences in the percentages of CD3⁺, CD4⁺ T cells and the CD4⁺/CD8⁺ ratio between patients and normal controls were observed. Although there were not differences in the percentages of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells between the stage 0 and the controls, However, the patients who had advanced carcinoma(stage , ,) had significant higher percentages of CD8⁺ T cells and lower CD4⁺ T cells than that of the controls. The tumor-node-metastasis (TNM) stage and lymphocyte node involvement was not related to the T-cell subsets. **Conclusion** Analyses of T Lymphocyte subset can provide useful information on the function of the patients with esophageal or cardiac carcinoma.

Key words : Esophageal carcinoma; Cardiac carcinoma; T lymphocyte subsets; Flow cytometry; Clinical stage

摘要:目的 采用流式细胞术方法检测食管癌、贲门癌患者细胞免疫功能。方法 应用三色免疫荧光流式细胞仪测定 145 名食管癌和贲门癌患者及 18 例正常对照者外周血 T 细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、NK 细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值。结合临床病理结果探讨二者之间的关系。结果 (1) 食管癌、贲门癌患者外周血中 CD8⁺ T 淋巴细胞比例较正常对照组明显升高 (P=0.030);CD3⁺、CD4⁺ 亚群较正常值降低,但是没有统计学差异。NK 细胞两组比较也没有显著性差异;(2) 早期(0、期)食管癌、贲门癌病人和健康对照组之间 T 细胞各亚群相比没有统计学差异;中、晚期(、期)食管癌、贲门癌病人和健康对照组相比:CD4⁺ 明显降低 (P=0.023);CD8⁺ 则明显升高 (P=0.021);CD4⁺/CD8⁺ 较正常有所下降,但是没有显著性差异;淋巴结阴性患者和淋巴结阳性患者比较 T 细胞各亚群没有明显差异。结论

外周血 T 细胞亚群的检测有助于提高对食管癌患者的病情,临床分期以及机体免疫状态的判断,晚期食管癌患者机体免疫状态成紊乱型改变。

关键词:食管癌;贲门癌;T 细胞亚群;流式细胞术;临床分期

中图分类号:R735.1 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2006)11-0818-03

0 引言

恶性肿瘤患者往往伴有机体免疫机能低下和紊乱,免疫机能低下和紊乱对肿瘤发生发展到一定

的作用。流式细胞术分析 T 细胞亚群具有快速、多参数、可定量、操作简便等优点,国外已有较多报道。食管癌、贲门癌患者的机体免疫状态尤其是细胞免疫状态国内已有报道,但所用研究方法多为传统的免疫细胞学方法。本研究通过三色免疫荧光流式细胞术分析 145 名食管癌、贲门癌患者外周血 T 细胞亚群,并结合临床病理分期,分析食管癌、贲门癌患者细胞免疫状态的改变及其临床意义。

收稿日期:2005-10-19;修回日期:2005-12-01

作者单位:1. 450008 郑州,河南省肿瘤医院胸外科;2. 四川省广元市剑阁县人民医院胸外科;3. 河南省肿瘤医院病理科

作者简介:沈玉光(1972-),男,硕士,主治医师,主要从事胸部肿瘤的研究



1 资料和方法

1.1 资料和方法

收集 2004 年 6 月~2005 年 8 月在我科住院治疗的 145 名食管癌及贲门癌患者,所有病例抽血化验前均未行放、化治疗,并均经胃镜活检证实诊断。年龄 29~85 岁,男性 105 名,女性 40 名,平均年龄 61.03 岁。食管癌 116 例,贲门癌 29 例。病理类型食管癌鳞癌 113 例,贲门癌腺癌 28 例,食管腺鳞癌 2 例,贲门腺鳞癌 1 例,食管小细胞癌 1 例。其中 127 名患者经手术治疗并有相应的术后病理结果。18 名患者未行手术治疗(转放疗科 8 人,转内科 5 人,其他原因未治出院 5 人)。以 18 名健康成年人作为对照组。145 名患者和健康对照组于入院进行治疗之前清晨空腹抽静脉血 2ml,EDTA 钾盐抗凝。获得标本后立即送检。

1.2 肿瘤分期

肿瘤分期根据 CT、胸片、腹腔 B 超及手术后病理结果采用 UICC 的 TNM 分期标准,其中 0 期原位鳞癌 1 例; I 期 16 例; II 期 59 例; III 期 47 例; IV 期 4 例;没有分期资料 18 例。

1.3 试剂和仪器

试剂:美国 Couter 公司进口试剂,包括 CD4 - FITC/ CD8 - PE/ CD3 - Percp 三色标记的单克隆抗体。仪器:美国 Couter 公司 Epics XI 型流式细胞仪。

1.4 三色免疫荧光染色

取 CD4 - FITC/ CD8 - PE/ CD3 - Percp 三色标记的单克隆抗体 20μl 加入试管管底,加入待检验的经 EDTA 钾盐抗凝的全血 50μl,混匀,避光室温下染色 15min。然后加入 Optilyse[®]C 溶血素 500μl,充分混合后立即上机检测。

1.5 流式细胞仪分析

使用 Couter 公司配套的 System 系统软件数据处理系统。先进行光路流路的较准,较准后进行荧光补偿,然后上样本检测。

1.6 统计学分析

检测结果以均数 ±标准差表示。利用 SPSS 10.0 处理试验结果,两组之间均数比较采用独立样本的双侧 t 检验, P < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 T 细胞亚群

CD3⁺、CD4⁺ 亚群较正常值降低,但是没有统计学差异。NK 细胞两组比较也没有显著性差异,表 1。

表 1 食管、贲门癌患者和正常对照组 T 细胞亚群比较

组别	例数	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NK 细胞
患者	145	67.76 ±10.45	36.41 ±9.50	34.00 ±10.83	1.24 ±0.66	16.02 ±8.59
健康对照组	18	70.49 ±7.38	41.08 ±5.09	30.37 ±3.77	1.36 ±0.21	12.82 ±4.89
P		0.44	0.45	0.03*	0.16	0.27

*食管癌、贲门癌患者外周血中 CD8⁺ T 淋巴细胞比例较正常对照组明显升高 (P < 0.05)

2.2 T 细胞亚群和临床病理分期的关系

2.2.1 早期病人和健康对照组 T 细胞亚群比较

早期食管癌、贲门癌病人和健康对照组之间 T 细胞各亚群相比没有统计学差异,见表 2。

表 2 早期患者和健康对照组 T 细胞亚群比较

组别	例数	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NK 细胞
早期患者	17	66.37 ±9.96	36.53 ±8.56	31.49 ±15.82	1.39 ±0.66	17.51 ±11.54
健康对照组	18	70.49 ±7.38	41.08 ±5.09	30.37 ±3.77	1.36 ±0.21	12.82 ±4.89
P		0.29	0.16	0.82	0.89	0.16

2.2.2 中、晚期食管癌、贲门癌病人和健康对照组 T 细胞亚群比较

CD4⁺/8CD⁺ 较正常有所下降,但是没有显著性差异,见表 3。

表 3 中、晚期患者和健康对照组 T 细胞亚群比较

组别	例数	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NK 细胞
中晚期患者	110	67.60 ±10.70	36.12 ±9.71	34.39 ±10.60	1.21 ±0.68	15.66 ±8.28
健康对照组	18	70.49 ±7.38	41.08 ±5.09	30.37 ±3.77	1.36 ±0.21	12.82 ±4.89
P		0.30	0.02*	0.02*	0.13	0.32

*中、晚期食管癌、贲门癌病人和健康对照组相比: CD4⁺ 明显降低; CD8⁺ 则明显升高 (P < 0.05)

2.2.3 淋巴结阴性病人和淋巴结阳性病人 T 细胞亚群比较

淋巴结阴性患者和淋巴结阳性患者各 T 细胞亚群比较无显著性差异。

表 4 淋巴结阴性组和淋巴结阳性组比较

组别	例数	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NK 细胞
淋巴结阴性组	66	67.11 ±10.84	35.81 ±9.44	34.44 ±11.13	1.19 ±0.58	16.78 ±9.81
淋巴结阳性组	61	67.78 ±10.36	36.57 ±9.69	33.53 ±11.07	1.28 ±0.77	14.95 ±7.40
P		0.72	0.66	0.64	0.46	0.24

注: 6 例探查病人按淋巴结阳性处理

3 讨论

机体抗肿瘤免疫效应以细胞免疫为主, T 细胞介导的细胞免疫在机体抗肿瘤效应中起重要作用。根据 T 细胞表面分化抗原的不同, T 细胞主要可以分为两大类: CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞。CD4⁺ 主要是辅助性 T 淋巴细胞 (Th), CD8⁺ 包括细胞毒 T 淋巴细胞 (CTL) 和抑制性 T 淋巴细胞 (Ts)。CD4⁺ T 淋巴细胞在抗肿瘤细胞免疫中发挥核心的作用。通过抗 CD4⁺ 抗体或者 CD4⁺ 基因敲除动物试验研

究显示:缺乏 CD4⁺ T 淋巴细胞的试验动物不能产生抗体特异性的 CD8⁺ T 淋巴细胞^[1,2],而且 CD4⁺ T 细胞通过分泌的 IL-2 等细胞因子对于 CD8⁺ T 淋巴细胞功能的维持是不可缺少的^[3]。显然,机体通过 CD4⁺ T 淋巴细胞来达到调节细胞免疫的目的。恶性肿瘤患者 CD4⁺ T 细胞亚群的变化情况报道不一,但多数研究 CD4⁺ T 细胞亚群在恶性肿瘤患者中减少^[4,5]。本研究虽然中晚期食管癌患者 CD4⁺ T 细胞明显降低,但在早期,CD4⁺ T 细胞的变化无明显的统计学差异。已知淋巴细胞的数量不是由淋巴干细胞生产的多少来决定的,而是通过成熟淋巴细胞自我稳定性的增殖进行调控^[6,7]。早期,机体自稳定机制尚可以发挥作用,当 CD4⁺ T 细胞减少时,即很快出现 CD4⁺ T 细胞增殖从而保持相对的稳定。由于早期没有明显的免疫功能变化,提示肿瘤细胞能够逃脱免疫破坏而得以发生、发展。本研究显示:CD8⁺ T 细胞在患者体内明显高于对照组。由于目前国内多数单位开展的 T 细胞亚群检测只是检测各亚群的比例而不是绝对值,因此,可能存在两种原因:一是由于 CD4⁺ T 淋巴细胞比例减少,相应地导致 CD8⁺ T 淋巴细胞比例增加;二是 CD8⁺ T 淋巴细胞绝对值增加。对于第一种可能性,进一步开展 T 细胞亚群绝对数量的测定可以明确;对于第二种可能,有学者认为 CD8⁺ T 淋巴细胞可以根据功能进一步分为抑制性 T 淋巴细胞(T_s)和细胞毒 T 淋巴细胞(T_c),晚期肿瘤患者存在抑制性 T 淋巴细胞(T_s)的增加。由于目前区分 T_s和 T_c尚有一定困难,需进一步研究证实。

机体肿瘤免疫是抗肿瘤细胞免疫和肿瘤免疫抑制、免疫逃避之间的平衡。CD4⁺ T 细胞所占比例的下降必然导致 CD8⁺ T 细胞比例的增加,从而形成 CD4⁺/CD8⁺ 比值的下降。Dick 等^[8]认为:CD4⁺/CD8⁺ 的比值可以反映机体的抗肿瘤免疫状态,大致反映上述两者之间的平衡关系。晚期肿瘤患者外周血中 CD4⁺/CD8⁺ 比值下降,甚至比值倒置,说明患者免疫处于抑制状态。本研究显示:食管癌、贲门癌患者 CD4⁺/CD8⁺ 虽然有下降但无统计学意义。在 Dick 研究对象多为远处转移的晚期患者,本文研究对象均为外科待术的病人,145 名患者中只有 4 例病人,这种研究对象构成的差异导致了不同的

结果。

NK 细胞对肿瘤具有非特异性的杀伤作用,被认为是机体抗肿瘤免疫的第一道防线。不需要致敏即可发挥对肿瘤细胞的攻击作用。近年来研究表明:NK 细胞不仅在非特异性抗肿瘤免疫中发挥重要作用,并且具有激活和增强树突状细胞的功能,因此,NK 细胞起到连接非特异性免疫和特异性免疫的作用^[9]。但是,由于 NK 细胞在细胞毒淋巴细胞中所占比例很小^[10],并且在外周血淋巴细胞中只占 15%^[11],所以目前认为其在抗肿瘤的细胞免疫中的作用没有 T 淋巴细胞突出。本研究显示:食管癌、贲门癌患者的 NK 细胞和健康对照组没有明显差异。

参考文献:

- [1] Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, et al. The central role of CD4⁺ T cells in the antitumor immune response[J]. *J Exp Med*, 1998,188(12):2357-2368.
- [2] Goedegebuure, P., T. Eberlein. The role of CD4⁺ tumor-infiltrating lymphocytes in human solid tumors. *Immunol Res*, 1995,14(2):119-131.
- [3] Rosenberg S A, Yang J C, Schwartzentruber D J, et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma [J]. *Nat Med*, 1998,4(3):321-327.
- [4] Saito T, Shimoda K, Kinoshita, T, et al. Prediction of operative mortality based on impairment of host defense systems in patients with esophageal cancer[J]. *J Surg Oncol*, 1993,52(1):1-8.
- [5] Mitropoulos D, Alamanis C, Deliveliotis C, et al. T-lymphocyte subsets in the peripheral blood of patients with renal cell carcinoma[J]. *Acta Urol Belg*,1995,63(3):21-25.
- [6] Khaled AR, Durum SK. The role of cytokines in lymphocyte homeostasis. *Biotechniques*, 2002,Suppl:40-45.
- [7] Surh CD, Sprent J. Regulation of naive and memory T-cell homeostasis[J]. *Microbes Infect*, 2002,4(1):51-56.
- [8] Dick H M. Monoclonal antibody in clinical medicine[J]. *Br Med J*, 1985,291(6498):762-764.
- [9] Degli-Esposti MA. & Smyth, M.J. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take center stage[J]. *Nature Rev Immunol*,2005,5(2):112-124.
- [10] Pross H F, Lotzova E. Role of natural killer cells in cancer [J]. *Nat Immun*, 1993,12(4-5):279-292.
- [11] Cooper M A, Fehniger T A, Caligiuri M A. The biology of human natural killer-cell subsets[J]. *Trends Immunol*, 2001,22(11):633-640.

[编辑:周永红]