

## CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 与 CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群 与进展期鼻咽癌患者预后的关系\*

530021 南宁 广西医科大学附属肿瘤医院化疗一科

李永强, 刘志辉<sup>1</sup>, 胡晓桦, 林燕, 廖小莉, 梁嵘, 原春玲, 廖思娜

**【摘要】目的** 探讨外周血 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 与 CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群对预测进展期鼻咽癌患者预后的潜在价值。**方法** 收集本院 2011 年 4 月至 2011 年 10 月收治的 53 例进展期鼻咽癌患者(鼻咽癌组)的外周静脉血样本,应用葡聚糖-泛影葡胺密度梯度离心法收集淋巴细胞并用流式细胞仪检测 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 与 CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群的百分比。根据联合放化疗后随访 18 个月的结果分析 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 与 CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup> T 细胞亚群水平与鼻咽癌复发的关系。同时选取 29 例健康志愿者作对照(对照组)。**结果** 鼻咽癌组的外周血 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 和 CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup> T 淋巴亚群占总淋巴细胞的百分率为(10.6±2.7)%和(1.9±0.6)%,与对照组的(7.7±2.0)%和(2.9±1.0)%相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。参照对照组外周血 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 和 CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup> T 淋巴亚群占总淋巴细胞百分率的 95% 置信区间分别为(6.9~8.5)%和(2.5~3.2)%,将鼻咽癌组的 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T 细胞分为正常组( $\leq 8.5\%$ )和升高组( $> 8.5\%$ ),CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup> T 细胞分为正常组( $\geq 2.5\%$ )和降低组( $< 2.5\%$ )。鼻咽癌外周血 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T 细胞升高组在治疗后 18 月内的复发率为 32.1%,明显高于正常组的 8.7% ( $P < 0.05$ ); CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup> T 细胞降低组和正常组的复发率分别为 23.3% 和 19.0%,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群是潜在的可评价进展期鼻咽癌患者复发风险的预测因子。

**【关键词】** T 淋巴细胞亚群; 鼻咽癌; 复发风险

中图分类号: R739.63 文献标识码: A 文章编号: 1009-0460(2013)12-1108-04

### The relationship of CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> and CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup> T cells with the prognosis in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma

LI Yongqiang, LIU Zhihui, HU Xiaohua, LIN Yan, LIAO Xiaoli, LIANG Rong, YUAN Chunling, LIAO Sina.  
Department of First Chemotherapy, Affiliated Cancer Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Corresponding author: LIU Zhihui, E-mail: lzhh101@sina.com

**【Abstract】 Objective** To compare the differences of the proportions of CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> and CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup> T cells in peripheral blood between patients with advanced nasopharyngeal carcinoma(NPC) and healthy volunteers, and explore the potential significance of the aberrant lymphocyte subpopulations of T cells for prognosis in NPC patients. **Methods** Twenty-nine healthy volunteers (control group) and 53 patients with advanced NPC(NPC group) were recruited. The peripheral venous blood samples were harvested and the peripheral lymphocytes were isolated and collected by ficoll-hypaque density centrifugation. The proportions of CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> and CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup> T cells were measured by flow cytometry. The relationship between the aberrant proportions of these T cells and the risk of relapse in NPC patients was analyzed according to the follow-up data of 18 months after chemoradiotherapy. **Results** The proportion of CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T cells in NPC group was(10.6±2.7)%, higher than(7.7±2.0)% in control group( $P < 0.05$ ), whereas the proportion of CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup> T cells in NPC group was(1.9±0.6)%, lower than(2.9±1.0)% in control group( $P < 0.05$ ). According to the 95% confidence interval of the proportions of CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> and CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup> T cells in control group, the NPC group was divided into normal ( $\leq 8.5\%$ ) and elevated( $> 8.5\%$ ) CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T subgroup or normal( $\geq 2.5\%$ ) and reduced( $< 2.5\%$ ) CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup> T subgroup. The relapse rate of elevated CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T subgroup within 18 months after treatment was 32.1%, higher than 8.7% of normal sub-

\* 基金项目:广西壮族自治区自然科学基金资助项目(2010GXNSFA013244)

<sup>1</sup> 通讯作者, E-mail: lzhh101@sina.com

group with significant difference ( $P < 0.05$ ). No difference was observed between subgroups of CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup>T. **Conclusion** The proportion of CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>T cells is a potential prognostic factor for the risk of relapse in patients with advanced NPC.

**[Key Words]** Lymphocyte subpopulations of T cells; Nasopharyngeal carcinoma; Risk of relapse

我国南方是鼻咽癌的高发地区,每年的新发男性病例比例高达 20/10 万<sup>[1-2]</sup>。放疗联合同期化疗是鼻咽癌治疗的基本原则,并已经被证实可有效改善鼻咽癌患者的预后<sup>[3-4]</sup>。然而,即使接受了规范的联合放化疗,治疗后 1~2 年内鼻咽癌的复发却不少见。短期内的肿瘤复发或进展不仅意味联合放化疗的失败,还预示患者的预后不良。特殊的 T 细胞亚群(如 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>)已被证实与头颈部肿瘤的预后密切相关<sup>[5]</sup>。成熟的 T 细胞表面表达有与特异性的识别抗原(如肿瘤)相结合的分子结构,称为 T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR),在抗原识别和应答能力方面有重要意义。本研究通过检测并比较进展期鼻咽癌患者外周血最主要的调节 T 细胞(regulatory/suppressor T cells, Treg),即 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>T 细胞及 CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup>T 细胞的亚群与正常志愿者的差别,试图寻找具有预测价值的可评价鼻咽癌联合放化疗后复发风险的敏感指标。现将结果报告如下。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 病例来源于广西医科大学附属肿瘤医院自 2011 年 4 月至 2011 年 10 月收治的 53 例进展期鼻咽癌患者(鼻咽癌组),其中男性 38 例,女性 15 例,平均年龄( $47 \pm 8$ )岁。病理组织学检查均为鳞状细胞癌,其中低分化 46 例,中分化 7 例。临床分期:Ⅱ期 24 例(T<sub>1</sub>N<sub>1a-1b</sub>M<sub>0</sub>11 例,T<sub>2</sub>N<sub>0-1b</sub>M<sub>0</sub>13 例),Ⅲ期(T<sub>1-2</sub>N<sub>2</sub>M<sub>0</sub>)29 例。所有患者均签署知情同意书。纳入标准:(1)均经鼻咽部病理组织活检确诊;(2)由主诊医师根据国际抗癌联盟(UICC, 2010 年第七版 TNM 分期)的诊断指南明确诊断处于临床进展期;(3)愿意接受标准化的联合放化疗。排除标准:(1)已有放疗或化疗史;(2)已有远处转移;(3)处于其他重大疾病的活动期。同时选取 29 例健康志愿者作对照(对照组),其中男性 20 例,女性 9 例,平均年龄( $45 \pm 10$ )岁,均未合并肿瘤。两组患者的年龄、性别构成均衡可比。

**1.2 治疗方法** 鼻咽癌组全部接受的标准化疗程为 6~7 周鼻咽癌根治性放射治疗(即原发病灶常规体外照射并行颈淋巴结预防性或根治性外照

射)。根据影像学检查确定照射野,对鼻咽部病灶进行常规外照射,剂量为每周 5 次,每次 2.0Gy,连续 6~7 周,鼻咽部肿瘤累计照射总量 60~70Gy。同时根据颈部淋巴结转移情况,对颈淋巴结进行预防性或根治性放射,照射总量为 45 或 60Gy。同期化疗与放疗同时开始,根据以往报道单独给予顺铂<sup>[6-7]</sup>。具体方案:每周第 1 次放疗后静脉滴注顺铂,2h 内给予 40mg/m<sup>2</sup>。每周 1 次,共 6~7 周。入组患者中有 2 例患者未能完成联合放化疗,不纳入淋巴细胞亚群检测及随访研究。

**1.3 主要试剂与仪器** Histopaque 单核细胞分离液购自美国 Sigma 公司;AIM-V 培养基购自美国 Invitrogen 公司;CD4、CD25 或 CD28、TCR 单克隆荧光抗体均购自英国 Abcam 公司。离心机购自日本 Kokusan 公司;流式细胞仪购自美国 BD Biosciences 公司。

**1.4 外周血淋巴细胞收集** 所有鼻咽癌患者在接受联合放化疗前抽取外周静脉血样本,应用葡聚糖-泛影葡胺密度梯度离心法收集外周血淋巴细胞。具体过程:取 5ml 的静脉血样本置于抗凝(肝素化)离心管,用无菌 PBS 溶液按 1:1 比例稀释后,沿管壁加入另一含有 10ml 密度为 1.077g/ml 的 Histopaque 单核细胞分离液(含多聚蔗糖和泛影酸钠),400g 离心 40min。经过充分离心后,由于不同的比重,血浆、单核细胞(主要为淋巴细胞)、红细胞和多核白细胞分别位于上清液、中层及离心管底部。收集中层的单核细胞,淋巴细胞条件培养基 AIM-V 培养基充分洗涤 3 次后,在冰箱 -80℃ 低温保存。

**1.5 流式细胞仪检测** 无菌 PBS 溶液重悬前期收集的淋巴细胞,将细胞悬液按每管  $5 \times 10^3$  的细胞数分装到流式细胞管。分别加入 CD4、CD25 或 CD28、TCR 单克隆抗体避光室温下孵育 1h 后,按流式细胞仪标准操作步骤上机分选细胞。异硫氰荧光素(FITC)用于标记 CD4 及 CD28 抗体,藻红蛋白(PE)用于标记 CD25 及 TCR 抗体。检测不同荧光标记的阳性细胞占总细胞数的百分率,并应用 FACSDiva™ 软件(美国 BD Biosciences 公司产品)分析数据,结果以四象限的点阵图表示。每个样本均重复检测 3 次。同时设置空白对照和阴性对照,以排除自发荧

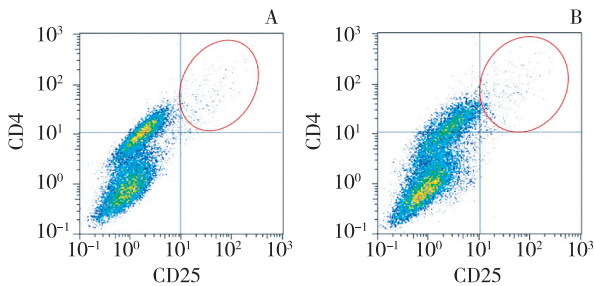
光和非特异性荧光。检测出的  $CD4^+/CD25^+$  及  $CD28^+/TCR^+$  亚群水平用占 T 细胞总数的百分构成比表示。

**1.6 随访** 通过定期复诊的方式对入组患者进行随访观察。联合放化疗 3、6、9、12 及 18 个月后再要求患者回院复查,通过 CT 检查患者原发病灶及颈淋巴结情况,如需要进一步行影像学检查如胸部 CT。患者不定时主动回院就诊的数据同时记录在案。每月均电话回访入组患者。通过观察联合放化疗 18 个月内肿瘤是否有复发,以评价患者的预后情况。肿瘤复发指有明确影像学证据,治疗后原有病灶已经缩小或消失,在随访期间发现再次复发或增大(包括鼻咽部及颈部淋巴结);同时也包括经影像学检查证实的新发远端病灶。随访在 18 个月后结束,1 例患者失访,失访率为 2.0%。

**1.7 统计学分析** 应用 SPSS 11.0 版软件进行统计学处理。组间率的比较用  $t$  检验或  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 鼻咽癌组外周血  $CD4^+/CD25^+$  T 淋巴细胞亚群水平** 鼻咽癌组的外周血  $CD4^+/CD25^+$  T 淋巴亚群占总淋巴细胞的百分率为  $(10.6 \pm 2.7)\%$ ,高于对照组的  $(7.7 \pm 2.0)\%$ ,差异有统计学意义( $P = 0.00$ )。见图 1。

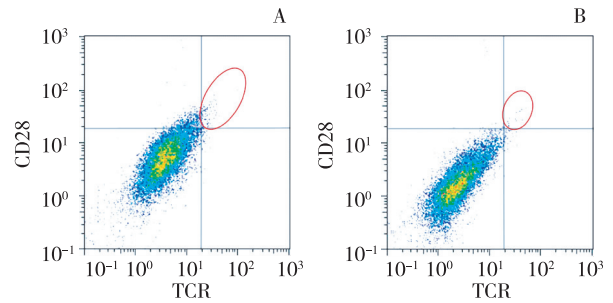


A:对照组;B:鼻咽癌组

图 1 两组患者外周血  $CD4^+/CD25^+$  T 淋巴细胞亚群水平的比较

**2.2 鼻咽癌组外周血  $CD28^+/TCR^+$  T 淋巴细胞亚群水平** 鼻咽癌组的外周血  $CD28^+/TCR^+$  T 淋巴亚群占总淋巴细胞的百分率为  $(1.9 \pm 0.6)\%$ ,低于对照组的  $(2.9 \pm 1.0)\%$ ,差异有统计学意义( $P = 0.00$ )。见图 2。

**2.3  $CD4^+/CD25^+$  T 淋巴亚群异常与鼻咽癌复发的关系** 依据对照组外周血  $CD4^+/CD25^+$  T 淋巴亚



A:对照组;B:鼻咽癌组

图 2 两组患者外周血  $CD28^+/TCR^+$  T 淋巴细胞亚群水平的比较

群占总淋巴细胞的百分率的 95% 置信区间(CI)为  $(6.9 \sim 8.5)\%$ ,将鼻咽癌组分为:正常组( $n = 23$ ,  $CD4^+/CD25^+$  T 细胞  $\leq 8.5\%$ )和升高组( $n = 28$ ,  $CD4^+/CD25^+$  T 细胞  $> 8.5\%$ )。升高组在治疗后 18 个月内的复发率为 32.1%,明显高于正常组的 8.7% ( $P < 0.05$ )。

**2.4  $CD28^+/TCR^+$  T 淋巴亚群异常与鼻咽癌复发的关系** 依据对照组外周血  $CD28^+/TCR^+$  T 淋巴亚群占总淋巴细胞的百分率的 95% CI 为  $(2.5 \sim 3.2)\%$ ,将鼻咽癌组分为:正常组( $n = 21$ ,  $CD28^+/TCR^+$  T 细胞  $\geq 2.5\%$ )和降低组( $n = 30$ ,  $CD28^+/TCR^+$  T 细胞  $< 2.5\%$ )。降低组和正常组在治疗后 18 个月内的复发率分别为 23.3% 和 19.0%,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

免疫系统功能缺陷常见于各种人类肿瘤。对宿主(即人体)免疫系统功能的抑制是越来越引人关注的肿瘤细胞恶性生物学行为<sup>[8]</sup>。通过破坏免疫系统的正常功能,体内肿瘤细胞逃避了免疫监视与杀伤。鼻咽癌对肿瘤放疗及化疗普遍敏感<sup>[9-11]</sup>,然而即使在严格遵循标准化治疗方案的情况下,个别患者的治疗效果却并不理想,如治疗后的短期复发、进展和转移等。造成这种治疗效果个体化差异的原因复杂多样,不仅与临床分期有关,也可能与患者免疫系统受抑制的程度有关。T 淋巴细胞介导下的免疫反应是机体识别与抵抗肿瘤最主要的形式。本研究旨在通过检测两组可反映机体免疫系统功能状况的 T 淋巴细胞亚群,并根据随访数据来探讨 T 淋巴细胞亚群异常与短期复发风险的潜在联系。

不同 T 细胞的功能由胞膜表面分子(如 CD4、

CD84、CD25 等)的表达来决定,因此不同亚群的 T 细胞数可反映免疫系统的功能状态。CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T 细胞是最重要的 Treg 细胞,正常情况下精确地调控免疫反应,维持免疫自稳性,防止免疫反应的过度活化而损伤自身组织器官。同行的前期研究报道已经显示,CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T 淋巴亚群在头颈肿瘤患者中升高<sup>[5]</sup>。CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T 细胞对各种 T 细胞和 B 细胞均有明显的抑制作用,这导致了体液免疫及细胞免疫反应的抑制,与患者低下的抗肿瘤相关免疫反应密切相关。本研究不仅证实了进展期鼻咽癌患者的 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 的 T 淋巴细胞百分率明显高于正常对照人群( $P < 0.05$ ),更进一步显示了升高的 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T 淋巴细胞与鼻咽癌的复发风险有关( $P < 0.05$ )。

CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup> T 细胞亚群是另一组可评价机体免疫状态的敏感指标。成熟的 T 细胞表面表达有与特异性的识别抗原(如肿瘤)相结合的分子结构,称为 TCR,而 CD28 则为功能性 T 淋巴细胞活化提供刺激的信号。CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群与 T 淋巴细胞介导的细胞免疫有关,也为体液免疫提供各种活化信号(各种白细胞介素)。本研究结果显示,鼻咽癌组的 CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup> T 细胞亚群低于对照组( $P < 0.05$ ),再次证实了鼻咽癌患者的免疫功能普遍受到了抑制。

同期放化疗对鼻咽癌原发肿瘤及区域淋巴结转移灶的疗效十分确切,但机体已经受到抑制的免疫系统功能能否随之逐步恢复尚存在不少争议。然而几乎可以肯定的是,长期功能低下的免疫系统为肿瘤复发提供了有利的外环境。本研究结果显示,升高的调节性 T 细胞与进展期鼻咽癌的复发风险相关。以后将进一步探讨 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 与 CD28<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群对预测鼻咽癌患者 5 年生存期的临床意义。特定的 T 淋巴细胞亚群不仅可作为检测肿瘤治疗效果及判断患者预后的敏感指标,其本身也是潜在的肿瘤治疗靶点。在日益强调个体化治疗的今天,除严格遵循标准化联合放化疗方案以外,积极探索针对鼻咽癌患者的免疫辅助治疗,纠正患者受抑制的免疫系统功能,对降低肿瘤复发率、改善患者预后具有迫切的现实意义。

综上所述,CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群是潜在的可评价进展期鼻咽癌患者复发风险的预测因

子,可在临床上进行推广。

## 参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [2] Tao Q, Chan AT. Nasopharyngeal carcinoma: molecular pathogenesis and therapeutic developments[J]. Expert Rev Mol Med, 2007, 9(12):1-24.
- [3] Chen QY, Wen YF, Guo L, et al. Concurrent chemoradiotherapy vs radiotherapy alone in stage II nasopharyngeal carcinoma: phase III randomized trial[J]. J Natl Cancer Inst, 2011, 103(23):1761-1770.
- [4] Lee AW, Tung SY, Chua DT, et al. Randomized trial of radiotherapy plus concurrent-adjuvant chemotherapy vs radiotherapy alone for regionally advanced nasopharyngeal carcinoma [J]. J Natl Cancer Inst, 2010, 102(15):1188-1198.
- [5] Schaefer C, Kim GG, Albers A, et al. Characteristics of CD4 + CD25 + regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer[J]. Br J Cancer, 2005, 92(5):913-920.
- [6] Chen Y, Liu MZ, Liang SB, et al. Preliminary results of a prospective randomized trial comparing concurrent chemoradiotherapy s adjuvant chemotherapy with radiotherapy alone in patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma in endemic regions of china [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008, 71(5):1356-1364.
- [7] Chan AT, Teo PM, Ngan RK, et al. Concurrent chemotherapy-radiotherapy compared with radiotherapy alone in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: progression-free survival analysis of a phase III randomized trial[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(8):2038-2044.
- [8] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5):646-674.
- [9] Lee N, Xia P, Quivey JM, et al. Intensity-modulated radiotherapy in the treatment of nasopharyngeal carcinoma: an update of the UCSF experience[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2002, 53(1):12-22.
- [10] Kam MK, Teo PM, Chau RM, et al. Treatment of nasopharyngeal carcinoma with intensity-modulated radiotherapy: the Hong Kong experience [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 60(5):1440-1450.
- [11] Baujat B, Audry H, Bourhis J, et al. Chemotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma: an individual patient data meta-analysis of eight randomized trials and 1753 patients [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006, 64(1):47-56.

收稿日期:2013-07-22; 修回日期:2013-09-06