

NK、Th17 和 Treg 细胞水平对结直肠癌患者术后复发预测价值的分析

张帆, 邱泰霖, 韩克松

摘要 目的: 探讨 NK、Th17 和 Treg 细胞水平对经腹腔镜根治术后的结直肠癌患者临床结局的影响, 并分析其预测结直肠癌患者的复发的价值。**方法:** 纳入 2016 年 1 月—2017 年 1 月行腹腔镜根治术治疗的原发结直肠癌患者 120 例进行随访。采集术后第一天外周血检测 NK、Th17 和 Treg 细胞数量, 采用两独立样本 *t* 检验分析其术后复发和未复发患者间差异; 利用 logistic 回归模型判断各指标与复发的关联; 最后采用 ROC 曲线分析其在预测结直肠癌术后复发的价值。**结果:** 术后复发组 NK 和 Th17 细胞水平显著低于未复发组 ($P<0.05$), 但 Treg 细胞水平复发组要高于未复发组 ($P<0.05$)。经 Logistic 回归分析发现, NK 细胞和 Th17 细胞是复发的保护性因素, 而 Treg 细胞是独立的危险因素。ROC 曲线分析表明, NK、Th17 和 Treg 细胞水平对预测术后复发具有一定的预测价值。**结论:** 结直肠癌患者其复发与 NK、Th17 和 Treg 细胞水平有关, 是结直肠癌患者术后预后的独立影响因素, 其对结直肠癌患者预后具有一定的影响, 预测患者术后复发具有一定的价值。

关键词: 结直肠癌; 免疫细胞; 复发; 影响因素

中图分类号: R735.3 文献标识码: A 文章编号: 1007-6948(2019)04-0448-05

doi: 10.3969/j.issn.1007-6948.2019.04.005

Analysis on Predictive Value of NK, Th17 and Treg Cells on Recurrence of Colorectal Carcinoma after Laparoscopic Resection ZHANG Fan, DI Tai-ling, HAN Ke-song *Department of General Surgery, China National Petroleum Corporation Central Hospital, Langfang (065000), China*

Abstract: Objective To investigate the influences of the levels of NK cells, Th17 cells and Treg cells on clinical outcomes of patients with colorectal carcinoma after laparoscopic resection, and to analyze their predictive value for postoperative recurrence. **Methods** The clinical data were collected from 120 patients with colorectal carcinoma who underwent laparoscopic resection from January, 2016 to January, 2017. The levels of NK cells, Th17 cells and Treg cells in peripheral blood were obtained and detected on day 1 postoperatively. Two independent t-test samples were used to analyze the difference between patients with recurrence and those without recurrence. Logistic regression model was used to determine the correlation between the indicators and recurrence. Finally, ROC curve was used to analyze its value in predicting recurrence of colorectal cancer after operation. **Results** We found that levels of NK cells and Th17 cells in recrudescence patients were lower than those in non-recrudescence patients ($P<0.05$), but the level of Treg cells in recrudescence patients were higher than that in non-recrudescence patients ($P<0.05$). Logistic regression analysis found that NK cells and Th17 cells were protective factors for recurrence, while Treg cells were independent risk factors. ROC curve analysis showed that the levels of NK cells, Th17 cells and Treg cells had certain predictive value for predicting postoperative recurrence. **Conclusion** Levels of NK cells, Th17 cells and Treg cells are associated with recurrence and independent prognostic influencing factors for postoperative patients with colorectal carcinoma, and its has a

certain value in predicting postoperative recurrence of patients.

Key words: Colorectal carcinoma; immune cells; recurrence; risk factors

基金项目: 廊坊市科技支撑计划项目 (2018013153)

中国石油天然气集团公司中心医院普通外科 (廊坊 065000)

通信作者: 张帆, E-mail: lipengjun1966@163.com

结直肠癌 (colorectal carcinoma, CRC) 是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 近年来我国的患病率和病死率都呈明显的上升趋势^[1], 据 2012 年肿瘤登记年报报道, 其发病率已跃居恶性肿瘤的第 3 位, 死亡率排第 5 位, 在北京、上海等大城市发病率更高^[2], 由其生存率较低, 严重威胁人民身心健康。因此对于结直肠癌的治疗成为临床研究的热点问题之一。但调查显示, 其复发率与常规开腹手术近似^[3], 因此如何早期预测、降低腹腔镜根治术的术后复发率, 延长患者的生存时间成为临床迫切解决的问题。有项研究表明^[4] 结直肠癌术后的复发与患者体内的免疫细胞如 NK、Th17 和效应 T 调节性 (Treg) 等水平有一定程度的关联, 而国内有关报道较少。本研究拟探讨 NK、Th17 和 Treg 免疫细胞水平对经腹腔镜根治术治疗后结直肠癌患者复发的影响, 从而采取有效的预防措施, 对提高腹腔镜结直肠癌根治术临床治疗效果, 延长患者的生存时间具有重要的临床价值和社会意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1 月—2017 年 1 月于中国石油天然气集团公司中心医院普通外科收治的结直肠癌患者 120 例 (结肠癌 78 例, 直肠癌 42 例) 作为研究对象, 所有结直肠癌患者均行腹腔镜根治术进行治疗。其中男性 75 例, 女性 45 例, 年龄 19~63 岁, 平均 (54.6 ± 13.1) 岁, 体重 51~79 kg, 平均体重 (60.4 ± 4.9) kg。

纳入标准: (1) 临床相关资料完整; (2) 术前均行纤维结肠镜及活检病理检查确诊为结直肠癌; (3) 术前均无肠梗阻、周围邻近或远处脏器肿瘤侵犯 (经肺部 X 片、术前上腹部彩超及腹部 CT 证实); (4) 术后能够被随访者; (5) 术后均采集外周血测定免疫功能。

排除标准: (1) 急诊手术患者; (2) 既往有腹部大手术史考虑存在严重腹腔粘连者; (3) 一般情况差或合并其它疾病不适合手术治疗的患者; (4) 姑息性切除手术患者; (5) 急性感染、慢性炎症性疾病患者; (6) 术前行放化疗者; (7) 术后未能完成随访; (8) 病例资料不完整。

所有研究对象均自愿参加本次研究, 并签署知情同意书, 本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 试剂与方法

1.2.1 试剂和仪器 鼠抗人 CD4-PC5、CD25-FITC、CD127-PE 单克隆抗体 (美国 Becton Dickinson

公司)、同型对照 IgG1-PC5、IgG1-FITC、IgG1-PE 和红细胞裂解液 (美国 Becton Dickinson 公司); FACSCalibur 细胞流式仪 (美国 BD 公司)。

1.2.2 方法 免疫相关细胞检测: (1) 所有研究对象行腹腔镜根治术后第一天采集晨起空腹肘静脉血 5 mL, 经 EDTA-2K 抗凝。(2) 采用流式专用试管, 加入 CD4-PC5、CD25-FITC、CD127-PE 抗体及同型对照各 20 μL, 振荡混匀后, 在室温下避光孵育 30 min; (3) 加入溶血素 1 mL, 在室温下避光孵育 10 min; (4) 加 PBS 1 mL, 振荡混匀; (5) 将流式专用试管放入高速离心机中, 并以 2000 r/min, 离心 5 min; (6) 弃上清, PBS 重复洗涤两次; (7) 取 1 mL PBS 悬液上机: 采用流式细胞仪进行分析, 采用 Cell Quest 软件进行上样, 检测 NK、Th17 和 Treg 细胞含量。

1.3 随访 从 2016 年 1 月第一例患者术后出院开始, 对纳入本次研究的所有患者进行随访, 计划随访 3 年。术后 1 年内每隔 3 个月对患者进行一次门诊复诊。此后根据患者情况每年至少行血生化及 CT 检查 1 次。如患者确诊复发 [局部复发 (包括吻合口复发、盆腔复发及会阴部复发等)、远处转移复发 (包括肝转移、肾转移、肺转移、骨转移及腹腔内广泛转移等)], 再次行腹腔镜根治术进行治疗。

1.4 观察指标 根据患者术后有无复发分为复发组与非复发组, 观察两组患者的一般资料 (年龄、性别、BMI 等)、肿瘤直径、原发灶部位、原发灶分期、术前 CEA 浓度、术前 CA19-9 浓度; 术前及术后 NK、Th17 和 Treg 免疫细胞水平以及是否进行化疗。

1.5 统计学处理 采用 SAS9.4 统计软件进行数据分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间差异采用两独立样本 *t* 检验。计数资料以例数 (%) 表示, 组间差异采用 χ^2 检验。先进行单因素分析, 初步筛选出术后复发的影响因素, 再进行多因素 Logistic 回归分析, 筛选出独立影响因素。采用 ROC 曲线分析 NK、Th17 和 Treg 细胞水平预测结直肠癌术腹腔镜根治术后复发的价值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般资料比较 共纳入 120 例患者, 结果发现复发患者 24 例, 未复发者 96 例。临床资料特征参数在两组患者间的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 两组患者治疗前临床病理特征分析

临床病理特征参数	未复发组 (n=96)	复发组 (n=24)	t/χ ²	P
年龄 (岁)	56.32 ± 10.79	58.34 ± 9.67	-0.837	0.405
性别 (n, %)			0.214	0.643
男	57(59.38)	13(54.17)		
女	39(40.63)	11(45.83)		
BMI(kg/m ²)	21.46 ± 2.95	22.72 ± 2.39	-1.938	0.055
肿瘤最大直径 (cm)	4.23 ± 0.87	3.86 ± 0.74	1.916	0.058
原发灶部位 (n, %)			1.319	0.251
结肠	60(62.50)	18(75.00)		
直肠	36(37.50)	6(25.00)		
Dukes 分期 (n, %)			4.816	0.090
A 期	40(41.67)	6(25.00)		
B 期	36(37.50)	8(33.33)		
C 期	20(20.83)	10(41.67)		
术前 CEA 浓度 (μg/L)	20.83 ± 4.69	22.89 ± 4.82	-1.914	0.058
术前 CA19-9 浓度 (U/mL)	56.08 ± 155.19	88.24 ± 136.17	-0.929	0.354
术后化疗方式 (n, %)			0.230	0.632
FOLFOX4	49(56.98)	21(61.76)		
氟尿嘧啶单药	37(43.02)	13(38.24)		

2.2 两组患者术后免疫细胞比例的分布情况 两 低于未复发组 ($P<0.05$), 但 Treg 细胞水平复发组
组患者术后复发组 NK 细胞、Th17 细胞水平显著 要高于未复发组 ($P<0.05$), 见表 2。

表 2 两组 NK、Th17 和 Treg 细胞水平比较

组别	例数 (n)	NK 细胞 (%)	Th17 细胞 (%)	Treg 细胞 (%)
未复发组	96	25.77 ± 3.55	14.89 ± 2.66	7.87 ± 1.57
复发组	24	19.77 ± 9.72 ^a	12.94 ± 1.73 ^a	9.53 ± 1.15 ^b
t		2.98	4.36	4.84
P		0.007	<0.0001	<0.0001

注: ^a表示与未复发组比较显著降低, $P<0.01$; ^b表示与未复发组比较显著升高, $P<0.01$

2.3 患者术后复发的多因素 Logistic 回归分析 为进一步了解以上因素与结直肠癌患者经腹腔镜根治术后复发的关系, 控制混杂因素, 以术后是否复发为因变量, 将年龄、性别、BMI、NK 细胞、Th17 细胞和 Treg 细胞水平作为自变量纳入 Logistic 回归模型中, 采用全变量法, 变量进入 水平 0.05, 剔除水平为 0.10, 进行多因素 Logistic 回归分析, 结果显示: Treg 细胞水平是影响结直肠癌术后复发的独立危险因素 ($OR=1.93 \geq 1$, $P<0.05$), 而 NK 细胞、Th17 细胞是保护性因素 (OR 分别为 0.88、0.68, $P<0.05$), 见表 3。

表 3 影响术后复发的多因素 Logistic 回归分析结果

变量	估计值	标准误	Wald χ ²	P	OR(95%CI)
常数项	-3.394	4.415	0.591	0.442	0.034(-)
年龄 (岁)	0.006	0.028	0.042	0.837	1.01 (0.95, 1.06)
性别	0.063	0.606	0.011	0.918	1.06 (0.32, 3.49)
BMI	0.195	0.110	3.135	0.077	1.22 (0.98, 1.51)
NK 细胞 (%)	-0.133	0.051	6.866	0.009 ^a	0.88 (0.79, 0.97)
Th17 细胞 (%)	-0.386	0.139	7.718	0.005 ^a	0.68 (0.52, 0.89)
Treg 细胞 (%)	0.657	0.242	7.390	0.007 ^a	1.93 (1.20, 3.10)

注: ^a表示与术后复发显著相关, $P<0.05$

2.4 NK、Th17 和 Treg 细胞水平预测 CRC 术后复发效能分析 对多因素 *logistic* 回归分析有统计学意义的指标分别进行 ROC 曲线分析, 将术后未复发组作为对照组, 术后复发组作为病例组, 进行指标的效能分析, 结果发现: NK、Th17 和 Treg 细胞的 ROC 曲线下面积差异有统计学意义 ($P < 0.05$), AUC 分别为: 0.697 (0.541, 0.853)、0.743 (0.644, 0.843) 和 0.797 (0.713, 0.880)。当 NK 细胞 (%) = 21.166 时, 诊断的灵敏度为 0.542, 特异度为 0.927, 阳性预测值为 0.650, 阴性预测值为

0.890; 当 Th17 细胞 (%) = 13.957 时, 诊断的灵敏度为 0.792, 特异度为 0.708, 阳性预测值为 0.404, 阴性预测值为 0.932; 当 Treg 细胞 (%) = 8.247 时, 诊断的灵敏度为 0.958, 特异度为 0.552, 阳性预测值为 0.348, 阴性预测值为 0.981。可见 Treg 细胞水平无论曲线下面积还是灵敏度都高; NK 细胞其预测复发的价值有限, 但是其特异度较高; 而 Th17 预测价值适中, 鉴别诊断价值更高 (表 4、图 1)。

表 4 NK、Th17 和 Treg 细胞对 CRC 复发预测效能分析

变量	AUC (95% CI)	P	cutpoint	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
NK 细胞 (%)	0.697(0.541,0.853)	0.0134 ^a	21.166	0.542	0.927	0.650	0.890
Th17 细胞 (%)	0.743(0.644,0.843)	<0.0000 ^a	13.957	0.792	0.708	0.404	0.932
Treg 细胞 (%)	0.797(0.713,0.880)	<0.0000 ^a	8.247	0.958	0.552	0.348	0.981

注: ^a表示预测术后复发价值具有显著意义, $P < 0.05$

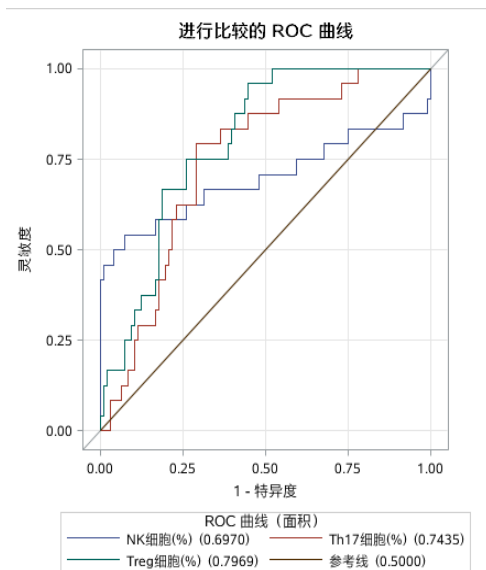


图 1 NK、Th17 和 Treg 细胞的 ROC 曲线及对 CRC 复发预测效能分析

3 讨论

由于 CRC 是复发率及转移率均较高且预后较差的消化道恶性肿瘤, 因此早发现、早诊断、早治疗对该病显得尤为重要。腹腔镜手术尽管属于一种微创手术, 具有手术创伤小、手术视野清晰、患者术后疼痛小、利于恢复等优点, 但患者术后复发率依然较高, 因此能早期诊断、预测患者复发情况的指标在临床上尤其重要。目前临床上主要采用 Dukes 和 TNM 分期法来判断 CRC 的预后和临床治疗指导, 由于微转移灶的存在, 使其具

有一定的局限性, 如 Dukes 分期较早的结直肠癌患者术后却迅速出现转移或死亡等提示可能存在微转移^[5]。近年来, 随着肿瘤免疫学的兴起, 研究肿瘤微环境中免疫细胞与肿瘤的发生、发生以及转移的报道逐渐增多, 使得免疫细胞在肿瘤特别是结直肠癌的诊断、病情监测、疗效评价、预后评估等方面已成为一种不可或缺的手段^[6-9]。

自然杀伤 (NK) 细胞是一群广泛分布于血液及外周淋巴器官中的重要先天效应细胞, 可保护宿主抵御外来细菌、病毒、寄生虫的入侵及清除体内肿瘤细胞, 起到天然免疫监视作用。故 NK 细胞活性是反映肿瘤患者的机体免疫功能状态常用指标, 可以作为肿瘤疗效和预后判定的参考指标之一。因理论上认为当患者机体免疫功能低下时, 休眠的肿瘤细胞可摆脱抑制状态而持续增殖, 导致疾病进展, 肿瘤复发和转移^[10]。本研究经多因素 *logistic* 回归分析发现, $OR = 0.855 < 1$, NK 水平是保护性因素, 且复发组的 NK 细胞水平显著低于未复发组 ($P < 0.05$), 说明可能是由于患者术后调节免疫功能低下的原因, 使得其复发组的 NK 水平降低从而导致其复发概率增加, 这和冯国丽^[10]研究结果一致。而 ROC 曲线分析提示 NK 细胞水平作为预测结直肠癌术后复发的标志具有一定的意义。

Th17 细胞是近年来发现的一类新的 CD4⁺ T 淋巴细胞亚群, 其在活化状态下能高表达 IL-17、

TNF- α 及 IL-6 而不表达 IFN- γ ，使其除具有促进炎症反应外，还参与机体的自身免疫以及肿瘤的免疫应答过程。尽管许多研究表明 Th17 细胞促进肿瘤的发生发展^[11-13]，但也有研究表明 Th17 细胞能分泌的 IL-17 具有上调肿瘤组织中的 CCL2、CCL20 以及招募 DC 等免疫细胞到肿瘤局部组织而发挥抑瘤效应^[14]。本研究经多因素 *logistic* 回归分析发现，OR=0.695<1，说明 Th17 水平是保护性因素，且复发组的 Th17 细胞水平显著低于未复发组，说明随着结肠癌进展，进展期癌组织中 Th17 细胞逐渐降低，故复发组其 Th17 含量较低，ROC 曲线分析表明 Th17 细胞水平可以作为结直肠癌术后预测复发的指标。

调节性 T 细胞 (Treg) 是一群通过抑制自身反应性 T 细胞而介导免疫耐受的负性调控细胞，约占人外周血中 5% 的 CD⁴⁺T 细胞。在维持机体自稳态、调控免疫应答方面起着重要的作用。其通过分泌 TGF- β 、IL-10 及其他免疫抑制性细胞因子或分泌颗粒酶 B 和穿孔素直接抑制 NK 细胞的活化或杀伤效应 T 细胞，还可通过抑制 APC 的成熟或促进 APC 细胞分泌抑制性酶 IDO 间接诱导效应 T 细胞失能^[15]，使得肿瘤细胞逃避免疫监视。多因素 *logistic* 回归分析发现，Treg 细胞水平是术后 CRC 复发的独立危险因素 (OR=1.857 \geq 1, P=0.0053<0.05)，且术后复发 CRC 患者 Treg 细胞水平要高于未复发的 CRC 患者 (P<0.05)，说明 CRC 患者外周血 Treg 细胞数量增高可能导致下调抗肿瘤免疫反应，促进肿瘤的免疫逃逸和疾病的进展，是患者预后差的一个信号，这和以往报道结果类似^[16-18]。而 ROC 曲线分析表明 Treg 细胞水平可以作为结直肠癌术后预测复发的指标。

综上所述，结直肠癌患者术后的 NK、Th17 和 Treg 细胞水平与复发有关，是结直肠癌患者术后预后的独立危险因素，虽然其作为判断预后的指标，其真实性和准确性还有待考证，但对于其的研究或许可以成为肿瘤患者的预后诊断、检测、干预治疗的新思路。

参考文献:

[1] Konishi K, Ikenaga M, Ohta K, et al. A Case of Liver Metastasis from Colorectal Cancer That Showed a Pathological Complete Response to mFOLFOX6 plus Cetuximab[J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2016, 43(8): 1003-1007.
 [2] 王磊, 宋顺心, 汪建平. 结直肠癌实验研究现状及展望[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 3(30): 429-430.
 [3] 梁毅超, 李国新, 陈平雁, 等. 腹腔镜结直肠癌手术与传统

开腹手术后复发率比较的 Meta 分析[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2008, 11(5): 414-420.
 [4] Ward-Hartstonge KA, McCall JL, McCulloch TR, et al. Inclusion of BLIMP-1+ effector regulatory T cells improves the Immunoscore in a cohort of New Zealand colorectal cancer patients: a pilot study[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(4): 515-522.
 [5] Mlecnik B, Bindea G, Pagès F, et al. Tumor immunosurveillance in human cancers[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2011, 30(1): 5-12.
 [6] 华红, 郝贵亮, 韩彩惠, 等. 血清 miR-21、miR-92 联合检测对结直肠癌诊断效能分析及术后复发的预测价值[J]. *山东医药*, 2018, 58(8): 81-83.
 [7] 刘玉奇, 章斌, 邓胜明, 等. 18 F-FDG PET/CT 对结直肠癌术后患者临床再分期、治疗策略及预后评估的价值[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2017, 37(10): 613-617.
 [8] 乔峰妮, 曹哲剑, 杨向东. 结直肠癌血清癌胚抗原、糖类抗原 19-9 表达水平及其临床价值探讨[J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(9): 1255-1258.
 [9] 王莹, 陈文彰, 于楠. 肿瘤标记物联合检测在结直肠癌中的意义[J]. *山西医药杂志*, 2015, 44(11): 1289-1291.
 [10] 冯国丽, 曾庆良, 宋璇, 等. CD4+、CD8+ 和 NK 在结直肠癌中的表达及其与淋巴结微转移关系的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 26(2): 159-161.
 [11] Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, et al. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis[J]. *J Immunol*, 2005, 175(9): 6177-89.
 [12] He S, Fei M, Wu Y, et al. Distribution and clinical significance of Th17 cells in the tumor microenvironment and peripheral blood of pancreatic cancer patients[J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(11): 7424-7437.
 [13] Zhang B, Rong G, Wei H, et al. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374(3): 533-537.
 [14] Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, et al. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity[J]. *Immunity*, 2009, 31(5): 787-798.
 [15] 于益芝, 曹雪涛. 调节性 T 细胞在肿瘤免疫和肿瘤免疫治疗中的作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(1): 1-6.
 [16] Salama P, Phillips M, Grieco F, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(2): 186-192.
 [17] Brudvik KW, Henjum K, Aandahl EM, et al. Regulatory T-cell-mediated inhibition of antitumor immune responses is associated with clinical outcome in patients with liver metastasis from colorectal cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(7): 1045-1053.
 [18] Deng L, Zhang H, Luan Y, et al. Accumulation of foxp3+ T regulatory cells in draining lymph nodes correlates with disease progression and immune suppression in colorectal cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(16): 4105-4112.

(收稿: 2018-10-12 发表: 2019-07-31)