

CD8 阳性 T 细胞亚群在肺癌外周血的检测及分析

丁露,夏云红,王为民,姚荣杰,孟曼

(合肥市第二人民医院肿瘤内科,安徽 合肥 230000)

摘要:**目的** 检测肺癌患者外周血清中 CD8⁺T 细胞亚群 CD28⁺ 及 CD57⁺ 的表达程度,探讨其临床意义。**方法** 合肥市第二人民医院经细胞学或病理学诊断为肺癌的初次治疗患者 30 例, TNM 分期(UICC,第 7 版)Ⅲ期 12 例,Ⅳ期 18 例。病理类型腺癌 15 例,鳞癌 8 例,小细胞肺癌 7 例。流式细胞仪分别检测肺癌患者组治疗前后及健康对照组人群的血清中 CD8⁺T 细胞 CD28⁺ 和 CD57⁺ 的表达水平,分析该表达水平变化及与肺癌临床分期和病理学类型之间的关系。**结果** 肺癌患者治疗前血清中 CD28⁺T 细胞亚群比例为(12.34±3.72)%,CD57⁺T 细胞亚群比例为(19.53±5.26)%。而健康对照组血清中 CD28⁺T 细胞亚群比例为(23.53±4.15)%,CD57⁺T 细胞亚群比例为(11.37±2.73)%,差异有统计学意义($P<0.05$),该类指标与肿瘤病理类型无关,而随着不同临床分期增加,CD8⁺CD57⁺T 细胞未见差异,而 CD8⁺CD28⁺T 细胞表达差异有统计学意义($P<0.05$)。经两周期化疗后,缓解组(完全缓解+部分缓解)患者血清中 CD28⁺、CD57⁺T 细胞亚群比与健康对照组患者相比,差异无统计学意义($P>0.05$),而未缓解组(稳定+进展)患者的 CD28⁺、CD57⁺T 细胞亚群比例分别为(10.62±2.74)%、(20.45±4.36)%。与健康对照组差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 肺癌患者血清中 CD8⁺CD28⁺T 细胞表达较正常人群明显减低,而 CD8⁺CD57⁺T 细胞表达较正常人群明显升高,联合该两种 T 细胞亚群检测不仅可以了解肺癌患者免疫状况,同时可以评估肺癌患者预后,有一定临床应用价值。

关键词:肺肿瘤;CD8 阳性 T 淋巴细胞;抗原,CD28;抗原,CD57

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.10.020

Detection and analysis of CD8⁺ T lymphocyte subsets in peripheral blood of patients with lung cancer

DING Lu, XIA Yunhong, WANG Weimin, YAO Rongjie, MENG Man

(Department of Oncology, The Second People's Hospital, Hefei, Anhui 230000, China)

Abstract:**Objective** To detect and analyze the expression levels of CD28⁺ and CD57⁺, and subsets of CD8⁺ T cells, in peripheral blood of patients with lung cancer as well as to explore the clinical significance. **Methods** A total of 30 initially treated patients cytologically or pathologically diagnosed as lung cancer in The Second People's Hospital of Hefei were enrolled in the study, including 12 cases of stage III and 18 cases of stage IV according to TNM system (UICC, the 7th edition) or 15 cases of glandular cancer, 8 cases of squamous cancer and 7 cases of small cell lung cancer according to pathology types. The expression levels of CD28⁺ and CD57⁺ in healthy subjects and patients with lung cancer before and after treatment were tested by flow cytometry. The correlation between expression alteration and clinical stages as well as pathology types of lung cancer was studied. **Results** Compared with healthy subjects, there was significant differences in ratio of CD28⁺/CD57⁺ [(12.34±3.72)% vs. (23.53±4.15)%, (19.53±5.26)% vs. (11.37±2.73)%, respectively; $P<0.05$], and CD28⁺/CD57⁺ levels were not associated with pathology types. There was no difference in CD8⁺CD57⁺ T cells with the increase of different clinical stages, and the expression of CD8⁺CD28⁺ T cells was statistically significant ($P<0.05$). Compared with healthy subjects, after 2-week chemotherapy, the ratio of CD28⁺/CD57⁺ in response arm (complete response and partial response) was not significantly different ($P>0.05$), while that in non response arm (stable disease and advanced disease) was significantly different [(10.62±2.74)% vs. (20.45±4.36)%, $P<0.05$]. **Conclusions** Compared with healthy subjects, the expression level of CD8⁺CD28⁺ in serum of patients with lung cancer is significantly lower while the expression level of CD8⁺CD57⁺ is significantly higher in patients with lung cancer. The combination of these two T cell subsets is helpful to effectively evaluate the immunity and prognosis of patients with lung cancer, and has certain clinical application value.

Key words: Lung neoplasms; CD8-positive T-lymphocytes; Antigens, CD28; Antigens, CD57

人体免疫功能与肺癌的发生、发展及转移有着相当密切的关系^[1],当人体出现免疫功能下降甚至免疫缺陷时,肿瘤发病率会明显增高。免疫衰老与 T 淋巴细胞表型及功能密切相关,当机体逐渐衰老

时,初始型 T 细胞比例出现降低,而记忆型 T 细胞逐渐增加,其中以 CD8⁺T 细胞的改变较为明显^[2],而免疫衰老同某些恶性肿瘤发生相关,因此对 CD8⁺T 细胞亚群的检测具有十分重要的意义。本

研究拟通过检测正常人群及肺癌患者外周血中 CD8⁺CD57⁺ T 细胞水平的变化,评估其临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采集 2015 年 4 月至 2016 年 5 月入住合肥市第二人民医院明确诊断为肺癌的初次治疗患者 30 例,其中男性患者 21 例,女性患者 9 例,年龄范围 39 ~ 79 岁,年龄 (56.0 ± 14.3) 岁; TNM 分期(UICC,第 7 版)Ⅲ期 12 例,Ⅳ期 18 例。病理类型腺癌 15 例,鳞癌 8 例,小细胞肺癌 7 例。所有患者均经细胞学或病理学证实。所有患者均经过全身化疗 2 周期后,以实体瘤疗效评价标准(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST)评价疗效,按缓解组(完全缓解 + 部分缓解)和未缓解组(稳定 + 进展)进行分组,其中缓解组 13 例,未缓解组 17 例。健康对照组取自本院门诊体检健康者,共 35 例,其中男性 19 例,女性 16 例,年龄范围 35 ~ 70 岁,年龄 (55.0 ± 15.7) 岁。所有入组患者及健康对照组人群均排除其他肿瘤、无风湿免疫性疾病,且未使用激素等免疫抑制剂。本研究获合肥市第二人民医院伦理委员会批准,所有患者或近亲属均签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 采用 CD8-PE、CD28-FITC、CD57-FITC 单克隆抗体试剂购自美国 Beckman-Coulter 公司,流式细胞仪系美国 Beckman-Coulter 公司产品。

1.3 检测方法 分别采集肺癌患者周期性化疗前后及健康对照组清晨空腹静脉血 2 mL,加入 EDTA 抗凝管后摇匀。取抗凝全血 100 μL,各加入荧光标记单克隆抗体 20 uL 混匀,设相应同型对照。避光室温孵育 30 min 后,加入 1% 草酸铵 2 mL,充分摇匀,孵育 10 min;离心 (1 500 r · min⁻¹, 10 min) 弃去上清,每管加入 PBS 洗涤液 500 μL 后离心 10 min (1 500 转),弃去上清,重复 2 次,加入 100 μL PBS 混匀后,应用流式细胞仪检测,采用 BDFACSDiva 软件分析获取细胞,样品于 6 h 内检测。

1.4 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 20.0 统计软件进行方差分析及两两比较,组内数据比较采用配对 *t* 检验,当 *P* < 0.05 表示为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌组患者血清中 T 细胞亚群表达与健康对照组的比较 30 例肺癌患者血清中 CD8⁺CD28⁺ T 细胞表达水平低于健康对照组人群,而肺癌患者血清中 CD8⁺CD57⁺ T 细胞表达水平显著高于健康对照组人群,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 肺癌患者与健康对照组外周血 T 细胞亚群的表达水平/(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD8 ⁺ CD28 ⁺	CD8 ⁺ CD57 ⁺
健康对照组	35	23.53 ± 4.15	11.37 ± 2.73
肺癌组	30	12.34 ± 3.72	19.53 ± 5.26
<i>t</i> 值		10.23	10.36
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05

2.2 经治疗后不同疗效的肺癌患者与健康对照组 T 细胞亚群水平的比较 肺癌患者经含铂类药物为基础的两周期化疗后,缓解组患者血清中 CD8⁺CD28⁺ 及 CD8⁺CD57⁺ T 细胞水平与健康对照组相近,差异无统计学意义 (*P* > 0.05),而未缓解组患者血清中 CD8⁺CD28⁺ 及 CD8⁺CD57⁺ T 细胞水平与健康对照组相比差异有统计学意义 (*P* < 0.05),见表 2。

表 2 不同疗效肺癌患者与健康对照组外周血 T 细胞亚群表达水平/(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD8 ⁺ CD28 ⁺	CD8 ⁺ CD57 ⁺
健康对照组	35	23.53 ± 4.15	11.37 ± 2.73
未缓解组	17	10.62 ± 2.74	20.45 ± 4.36
缓解组	13	22.34 ± 3.52	9.02 ± 1.61
<i>F</i> 值		7.76	6.52
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05

2.3 不同病理学类型及临床分期肺癌患者 T 细胞亚群比较 对于不同病理类型肺癌患者,其 CD8⁺CD28⁺ 及 CD8⁺CD57⁺ T 细胞水平差异无统计学意义 (*P* > 0.05),随着临床分期增加,CD8⁺CD57⁺ T 细胞表达程度亦差异无统计学意义 (*P* > 0.05),而 CD8⁺CD28⁺ T 细胞水平随之逐渐增加,差异有统计学意义 (*P* < 0.05),见表 3。

表 3 不同病理类型及临床分期的肺癌患者 T 细胞亚群水平的检测结果/(%, $\bar{x} \pm s$)

临床因素	例数	CD8 ⁺ CD28 ⁺	CD8 ⁺ CD57 ⁺
病理类型			
腺癌	15	11.56 ± 2.51	19.37 ± 3.48
鳞癌	8	13.64 ± 3.89	18.29 ± 2.47
小细胞肺癌	7	10.28 ± 1.56	21.63 ± 5.45
<i>F</i> 值		1.03	1.22
<i>P</i> 值		>0.05	>0.05
临床分期			
Ⅲ期	12	12.64 ± 1.38	19.15 ± 2.16
Ⅳ期	18	15.86 ± 0.81	21.47 ± 4.62
<i>t</i> 值		2.43	1.72
<i>P</i> 值		<0.05	>0.05

3 讨论

肿瘤的发生、侵袭过程中,承担自身免疫功能的淋巴细胞发挥了重要作用,是构成机体细胞免疫的重要因素之一^[3]。反应免疫功能的细胞表型 CD 抗原是重要标志,并且会随着疾病的转归发生相应变化。机体对肿瘤细胞的免疫反应大多是由 CD8⁺ T 细胞主导完成的。而肺癌患者细胞免疫功能的下降,常导致肺癌病情加重甚至死亡。

CD8⁺ T 细胞即细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL),在宿主抗病毒和抗肿瘤等免疫应答中发挥重要作用。CD28 分子是 T 细胞中最主要的共刺激分子,为 T 细胞活化提供第二信号,通常 CD28 在 CTL 表达水平约为 50%,而当发生多种疾病时,CTL 上 CD28 表达下降^[4]。机体抗肿瘤免疫应答时,需 CD28 与 B7 相互作用产生第二信号才可使 T 细胞活化,活化的 CD4⁺ 细胞分泌 IL-2、IFN- γ 等细胞因子,由 CD8⁺ 细胞毒性免疫细胞发挥直接杀伤,以防止形成克隆无反应状态。当 CD28 表达下降时,可能对 CD4⁺ 及 CD8⁺ 细胞的活化和增殖有着直接影响,因而造成机体对肿瘤免疫力下降,导致肿瘤的发生。有文献报道^[5-7] CD8⁺ CD28⁺ T 细胞表达水平在多种肿瘤中下降,张晓倩等^[8] 指出肺癌患者外周血中 CD8⁺ CD28⁺ T 细胞水平较健康对照组显著减少,因此 CD28 表达水平下降可能系肺癌患者免疫功能降低的重要因素。

CD57(leu-7)是人类 NK 细胞的标志,当其特异性结合靶细胞上的配体后,可以激活 NK 细胞的细胞毒作用。CD57 也部分表达于 T 淋巴细胞,通常为 CTL 的表面,其与 CTL 的效应功能有关^[9]。CD57 是一种糖蛋白,其分子量为 110kD,CD57⁺ T 细胞主要存在于骨髓,其在外周血中数量很少,为 5%~10%。在骨髓和其他器官移植术后、类风湿性关节炎及 AIDS 患者,CD57⁺ T 细胞水平均增高^[10],提示该细胞在导致免疫异常的疾病中发挥一定作用。也有文献报道老年人 CD8⁺ CD57⁺ T 细胞明显高于青年人^[11],表明其在免疫衰老中有着一定意义,而肿瘤常发生于老年患者,因而肿瘤患者中可能出现 CD8⁺ CD57⁺ T 细胞表达水平的相应升高。有相关报道显示,CD57 可以产生大量 IFN- γ ,且产生能力与数量相关^[12],而 IFN- γ 对肿瘤免疫发挥着重要作用。IFN- γ 能够直接抑制肿瘤细胞增殖,增加表面 MHC 抗原和肿瘤坏死因子表达,抗肿瘤血管生成等。由此可见,CD8⁺ T 细胞表面 CD57 增多可能体现肺癌患者免疫功能下降。

本研究结果表明:肺癌患者 CD8⁺ T 细胞表面

CD28 表达水平显著下降,而 CD57 较健康对照组明显升高,两组人群相比较 CD28 及 CD57 均差异有统计学意义($P < 0.05$)。通过两疗程化疗后,缓解组病情逐渐好转,与健康对照组比较差异无统计学意义,而未缓解组的患者 CD28⁺ T 细胞和 CD57⁺ T 细胞较健康对照组仍差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示经化疗好转后,肺癌患者的免疫功能得到一定程度恢复,患者体内的肿瘤细胞数减少。本研究同时分析了临床因素与 CD28 和 CD57 的相关性,结果表明 CD8⁺ CD28⁺ T 细胞及 CD8⁺ CD57⁺ T 细胞的表达在肺癌患者不同组织学类型方面差异无统计学意义($P > 0.05$),而随着临床分期的增加,CD8⁺ CD57⁺ T 细胞表达率也未发现明显变化,究其原因,可能系本研究入组的为Ⅲ期和Ⅳ期中晚期肺癌患者,且多数为老年患者,临床分期和年龄选择不具代表性所致。而 CD8⁺ CD28⁺ T 细胞表达随着临床分期增加呈现逐渐升高,提示晚期肺癌患者免疫力降低,进一步表明 CD28⁺ T 细胞增高水平可能与病情进展密切相关。研究结果表明该两组指标可能为肺癌免疫功能下降的原因,检测其表达可能评估肺癌患者疗效及预后。

参考文献

- [1] KENNOEDY R, CELID E. Multiple roles for CD4⁺ T cells in anti-tumor immune responses[J]. Immunol Rev, 2008, 222(1): 129-144.
- [2] WIKBY A, JOHANSSON B, OLSSON J, et al. Expansions of peripheral blood CD8 T-lymphocyte subpopulations and an association with cytomegalovirus seropositivity in the elderly: the Swedish NONA immune study[J]. Exp Gerontol, 2002, 37(2/3): 445-453.
- [3] GONG MC, LATOUCHE JB, KEAUSE A, et al. Cancer patient T cells genetically targeted to prostate-specific membrane antigen specifically lyse prostate cancer cells and release cytokines in response to prostate-specific membrane antigen[J]. Neoplasia, 1999, 1(2): 123-127.
- [4] AROSA FA. CD8⁺ CD28⁻ T cells: certainties and uncertainties of a prevalent human T-cell subset[J]. Immunol Cell Biol, 2002, 80(1): 1-13.
- [5] 刘晓光, 金秀国, 刘波, 等. 结肠癌患者外周血淋巴细胞 CD8 和 CD28 的表达[J]. 肿瘤学杂志, 2007, 13(1): 68-69.
- [6] 宋丁, 王燕云. CD8⁺ CD28⁻ T 细胞在原发性肝癌患者外周血的表达及意义[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(4): 493-494.
- [7] 杜晓辉, 刘利利, 宁宁, 等. 胃癌患者血清调节性 T 细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞的检测及意义[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(12): 2704-2706.
- [8] 张晓倩, 李金星, 高伟, 等. 肺癌患者外周血 CD8⁺ CD28⁺、CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 淋巴细胞水平变化及意义[J]. 山东医药, 2012, 52(34): 42-44.