参考文献

[1] 谭璇,江霞,刘义兰,等.人文关怀现代护理模式在儿童斜视矫正术后疼痛护理中的应用[J].护理研究,2016,30(32):4068-4070.

[2] 魏艳飞,陈金卯,陈霞琳,等.单眼外直肌超常量后徙联合拮抗肌截短术治疗大角度知觉性外斜视的临床疗效分析[J].眼科新进展,2016,36(9):860-862.

[3] 代书英,孙卫锋,王娟.不同年龄共同性内斜视患者手术对远近立体视觉恢复的影响[J].医学综述,2016,22(2):389-392.

[4] 王小然.护理干预对小儿斜视矫正术的影响探讨[J].临床研究,2016,24(4):184-185.

[5] 李辉,许江涛.部分调节性内斜视术后远期疗效的观察[J].中国实用眼科杂志,2016,34(10):1054-1057.

[6] JOO J,PARK S,PARK HJ,et al.Ramosetron versus ondansetron for postoperative nausea and vomiting in strabismus surgery patients[J].BMC Anesthesiology,2016,16(1):41.

[7] GUNTON KB.Impact of strabismus surgery on health-related quality of life in adults[J].Curr Opin Ophthalmol,2014,25(5):406-410.

[8] 封利霞,姚婕颖,陈丽,等.视差辨别正确率检测在间歇性外斜视术后立体视功能评估中的应用价值[J].中华眼科杂志,2016,52(8):584-588.

[9] 谭叶辉,廖武,曾广川,等.新鲜羊膜在儿童共同性斜视缝线调整显微手术中的应用[J].国际眼科杂志,2016,16(11):2166-2168.

[10] 陈娟,陈志钧,梅芳.儿童间歇性外斜视的临床特点及斜视矫正术后患儿双眼视功能的恢复[J].四川大学学报(医学版),2016,47(1):138-140.

[11] 郭智一,许江涛.儿童共同性外斜视矫正术后立体视觉康复的临床观察[J].中国斜视与小儿眼科杂志,2016,24(1):5-8.

[12] 刘桂芝,常超,闫书妹,等.斜视矫正术中眼心反射的动态心电图观察[J].郑州大学学报(医学版),2016,51(3):386-389.

[13] 王娟,刘素江.间歇性外斜视儿童手术前后双眼单视功能的临床分析[J].国际眼科杂志,2018,18(6):1160-1162.

[14] GRASSER EK,ERNST B,THURNHEER M,et al.QT interval shortening after bariatric surgery depends on the applied heart rate correction equation[J].Obes Surg,2017,27(4):973-982.

[15] 张晖,唐宁,李燕利,等.斜视矫正手术对双眼视觉功能影响的临床研究[J].现代生物医学进展,2014,14(5):895-898.

[16] 杨影.成人共同性斜视术后双眼融合功能训练对术后眼位及三级视功能的影响[J].实用医学杂志,2014,6(20):3259-3261.

[17] 刘斐.显微镜下斜视矫正手术治疗斜视的临床效果[J].中外医疗,2016,35(22):5-8.

[18] 石晶,谭小波,杨洁,等.三种斜视矫正手术患者术后眼球屈光状态变化[J].山东医药,2016,56(39):97-99.

(收稿日期:2017-08-15,修回日期:2017-11-06)

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2019.10.032

◇临床医学◇

高级别胶质瘤病人放化疗前后淋巴细胞亚群变化及意义

张洋洋,高劲,陶振超,何健,杨丽萍,杨婧,周燕,黄一凡

作者单位:中国科技大学附属第一医院西区、安徽省肿瘤医院头颈放疗科,安徽 合肥 230031

通信作者:高劲,男,主任医师,研究方向为头颈肿瘤放射治疗学,E-mail:gj11667@126.com

摘要:目的 探讨高级别胶质瘤(high grade glioma,HGG)术后病人同步放化疗前后外周血淋巴细胞亚群变化及其对预后的影响。**方法** 收集2012年6月至2017年7月间安徽省肿瘤医院收治的51例HGG术后病人为研究对象,检测同步放化疗前后病人外周血淋巴细胞亚群变化,并依据同步放化疗前$CD4^+/CD8^+$比值将病人分为$CD4^+/CD8^+\geq1$及$CD4^+/CD8^+<1$两组,采用Kaplan-Meier法计算无进展生存率(progression-free survival,PFS)、总生存率(overall survival,OS)以及中位无进展生存期(median progression-free survival,mPFS)和中位总生存期(median overall survival,mOS)。**结果** HGG术后病人外周血$CD4^+CD25^+$细胞水平及$CD4^+/CD8^+$比值经同步放化疗后均有下降($P<0.05$)。其余指标差异无统计学意义。中位随访时间14个月,范围为2~60个月,2例失访。1、2、3年全组病人PFS和OS分别为51.8%,38.3%,31.9%和71.3%,43.3%,37.2%。$CD4^+/CD8^+\geq1$组病人mPFS及中位mOS均高于$CD4^+/CD8^+<1$组(16个月比9个月,$P=0.004$;36个月比11个月,$P=0.031$)。**结论** 同步放化疗可降低HGG病人外周血$CD4^+CD25^+$细胞水平及$CD4^+/CD8^+$比值;放化疗前$CD4^+/CD8^+$比值可以作为评价HGG术后病人预后的有效指标,$CD4^+/CD8^+$比值低,预后差。

关键词:胶质瘤; CD4淋巴细胞计数; CD8阳性T淋巴细胞; CD4-CD8比值; 白细胞介素2受体α亚单位; 预后

Changes of lymphocyte subsets in patients with high grade glioma before and after chemoradiotherapy and its significance

ZHANG Yangyang,GAO Jin,TAO Zhenchao,HE Jian,YANG Liping,YANG Jing,ZHOU Yan,HUANG Yifan

Author Affiliation: Department of Head and Neck Radiotherapy, The First Affiliated Hospital of USTC West District, Anhui Provincial Cancer Hospital, Hefei, Anhui 230031, *China*

Abstract: Objective To explore the relationship between changes of lymphocyte subsets in patients with high grade glioma after concurrent chemoradiotherapy, and to analyze its influence on prognosis. **Methods** A total of 51 patients with postoperative high grade glioma who admitted to Anhui Provincial Cancer Hospital from June 2012 to July 2017 were choose as study objects. The changes of lymphocyte subgroups were detected before and after chemoradiotherapy. Based on $CD4^+/CD8^+$ ratio before chemoradiotherapy, patients with high grade glioma were assigned into two groups: $CD4^+/CD8^+ \geq 1$ and $CD4^+/CD8^+ < 1$. The progression free survival (PFS), overall survival (OS), median progression-free survival (mPFS) and median overall survival (mOS) were calculated by the Kaplan-Meier method. **Results** The lever of $CD4^+CD25^+$ and the ratio of $CD4^+/CD8^+$ were decreased in patients with postoperative high grade glioma after chemoradiotherapy ($P < 0.05$). The difference of the other indicators was not statistically significant. The median follow-up time was 14 months (2-60 months), two patients were lost to follow-up. PFS rates in the 1-, 2-, and 3-year were 51.8%, 38.3% and 31.9%, respectively, and OS rates was 71.3%, 43.3% and 37.2%, respectively. mPFS and mOS in $CD4^+/CD8^+ \geq 1$ group were higher than those of $CD4^+/CD8^+ < 1$ group (16 months *vs.* 9 months, $P = 0.004$; 36 months *vs.* 11 months, $P = 0.031$). **Conclusions** The lever of $CD4^+CD25^+$ and the ratio of $CD4^+/CD8^+$ were decreased in the HGG patients after chemoradiotherapy. The ratio of $CD4^+/CD8^+$ before radiotherapy can be considered as an index to evaluate prognosis in patients with postoperative high grade glioma. The prognosis is poor in patients with low raito of $CD4^+/CD8^+$.

Key words: Glioma; CD4 lymphocyte count; CD8-positive T-lymphocytes; CD4-CD8 ratio; Interleukin-2 receptor alpha subunit; Prognosis

脑胶质瘤是最常见的颅内肿瘤，其中高级别胶质瘤（high grade glioma，HGG）约占脑胶质瘤的77.5%[1]。手术联合放化疗可改善胶质瘤病人预后[2]。但高级别胶质病人的预后相对较差[3]。免疫功能失调是恶性胶质瘤发生、发展的一个重要因素。有研究报道T淋巴细胞亚群与胶质瘤恶性程度相关，术前$CD4^+/CD8^+$比值可评估预后[4]。但对于接受术后放化疗的脑胶质瘤病人仍缺乏有效的免疫评估指标。本研究通过对51例HGG术后病人同步放化疗前后淋巴细胞亚群变化的检测，探讨同步放化疗对病人外周血淋巴细胞亚群的影响以及$CD4^+/CD8^+$比值对评估HGG病人预后的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2012年6月至2017年7月安徽省肿瘤医院头颈放疗科收治的HGG术后病人51例，所有纳入病人均有影像学和病理诊断证实。同时排除HIV阳性、肝肾功能异常、预计生存期小于或等于3个月、合并严重疾病的病人。符合入组标准的病人年龄范围为10~76岁，中位年龄44岁。其中男性23例，女性28例。年龄≤60岁45例，年龄＞60岁6例。病理Ⅲ级23例，病理Ⅳ级28例。KPS功能状态评分＞70分38例，KPS评分≤70分13例。肿瘤最大径≤5 cm 30例，肿瘤最大径＞5 cm 21例。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求，病人或近亲属对研究方案签署知情同意书。

1.2 治疗情况 51例病人均接受基于MRI-CT融合的调强适形放射放疗（intensity-modulated radiotherapy，IMRT）。GTV（大体肿瘤靶区）/GTVtb（大体肿瘤瘤床靶区）根据病人术前及术后MRI的T1增强和T2-FLAIR图像进行勾画，包括瘤床及残留肿瘤体积；CTV_1为GTV外扩2~3 cm。CTV_2为GTV外扩1 cm。PGTV/PGTVtb、PTV_1、PTV_2分别由GTV/GTVtb、CTV_1、CTV_2均匀外扩3 mm。95%PGTV/PGTVtb：54~66 Gy/27~30 f（2.0~2.2 Gy/f），中位剂量60Gy；95%PTV_1：47.6~54 Gy/27~30 f（1.7~2.0 Gy/f），中位剂量50 Gy；95%PTV_2：54~60.9 Gy/27~30 f（2.0~2.1 Gy/f），中位剂量56 Gy。同期化疗采用替莫唑胺（Temozolomide，TMZ）（先灵葆雅公司，S016900）口服，剂量为75 $mg \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$。

1.3 外周血淋巴细胞亚群检测 分别抽取51例HGG病人放化疗开始前1 d和放化疗结束后第1天静脉血3 mL，静置1 h后立即送检。采用美国BD公司流式细胞仪（型号BD FACSCALIBUR）检测外周血淋巴细胞亚群[$CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD4^+/CD8^+$、自然杀伤细胞（NK）、$CD4^+CD25^+$]水平。用流式细胞仪采集淋巴细胞窗内5 000个细胞，Cellquest软件计算标记阳性细胞百分比。

1.4 随访及评价标准 放化疗结束后第1年每3个月，第2~3年每6个月，第4年及以后每12个月复查1次颅脑MRI，评估肿瘤缩退情况。随访期间按照RANO标准（Response Assessment in Neuro-Oncology，神经肿瘤反应评价标准）评价疗效。采用无进展生存率（progression-free survival，PFS）、总生存率（overall survival，OS）以及中位无进展生存期（median progression-free survival，mPFS）和中位总生存期（median overall survival，mOS）作为观察指标，从手术当天起算，终点事件为复发和死亡。

1.5 统计学方法 采用SPSS 19.0统计学软件进行统计分析。观测资料中的计量资料，以$\bar{x} \pm s$表示，两组间比较采用成组t检验，组内比较采用配对t检

验。生存分析模型为Kaplan-Meier法，两组生存率比较为Log-rank检验。检验水准$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 外周血淋巴细胞亚群水平比较 51例HGG病人经同步放化疗后外周血$CD4^+CD25^+$水平及$CD4^+/CD8^+$比值较治疗前均有下降，差异有统计学意义（$P<0.05$）。$CD3^+$，$CD4^+$，$CD8^+$及NK细胞水平与放化疗前后变化差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表1。

2.2 生存率分析 全组中位随访时间为14个月，范围为2~60个月，2例失访，随访率96.1%。mOS为20个月，1、2、3年总生存率分别为71.3%，43.3%，37.2%。mPFS为10个月，1、2、3年无进展生存率分别为51.8%，38.3%，31.9%。

2.3 单因素分析$CD4^+/CD8^+$比值对生存率的影响 采用Kaplan-Meier模型进行Log-rank检验显示，41例同步放化疗前$CD4^+/CD8^+\geq1$组病人的mPFS及mOS分别为16个月和36个月，10例$CD4^+/CD8^+<1$组mPFS及mOS分别为9个月和11个月，两组比较均差异有统计学意义（mPFS $P=0.004$；mOS $P=0.031$）。见图1，2。

3 讨论

长期以来，中枢神经系统因具有血脑屏障一直被认为是免疫豁免区。但多项研究表明T淋巴细胞可进入中枢神经系统，并同相应的抗原结合，激活免疫应答[5]。Dunn等[6]发现脑血管内皮细胞、星形胶质细胞及血管平滑肌细胞均具有类抗原提呈细胞作用。在病理条件下，T淋巴细胞、NK细胞和巨噬细胞等可突破血脑屏障向脑内浸润[7]，这些均提示脑胶质瘤的发生、发展与机体免疫功能密切相关。

T淋巴细胞是淋巴细胞亚群中最主要组分，而$CD4^+/CD8^+$比值是反映机体免疫功能的重要敏感指标[8]。通常，在机体内$CD4^+/CD8^+$比值处于一个相对平衡的状态，由此保证机体免疫内环境的稳态。当病人免疫功能下降时，其$CD4^+/CD8^+$比值将低于正常值。有研究报道手术可提高胶质瘤病人的$CD4^+/CD8^+$比值，改善病人免疫功能[9]。Campian等[10]报道放疗联合替莫唑胺可改变胶质母细胞瘤病人外周血单核细胞水平，打破免疫平衡，倾向于免疫抑制。本研究检测了HGG术后病人外周血淋巴细胞亚群于放化疗前后的变化，结果显示经过同期放化疗后$CD4^+/CD8^+$比值出现下降趋势，提示同期放化疗可能会抑制T淋巴细胞功能，从而影响病人免疫功能。因此通过评估放化疗前后T淋巴细胞亚群变化，对于免疫功能下降的病人，尽早介入营养支持与增强免疫功能治疗可能会改善病人预后。

与此同时，本课题组发现$CD4^+CD25^+$T淋巴细胞水平经同步放化疗后也出现下降。而$CD4^+CD25^+$T淋巴细胞是调节性T细胞中最重要的一类，具有免疫无能性和免疫抑制性两大特性[11]，能够促使肿瘤细胞发生免疫耐受和逃逸。EL Andaloussi等[12]首次报道在胶质母细胞瘤组织中$CD4^+CD25^+$T细胞浸润增加的同时，外周血中$CD4^+CD25^+$T细胞数目也随之增加，换而言之，通过检测外周血$CD4^+CD25^+$细胞水平可进一步评估肿瘤组织浸润情况。

表1 高级别胶质瘤病人51例放化疗前后淋巴细胞亚群水平比较/（%，$\bar{x}\pm s$）

时间	$CD4^+CD25^+$	$CD3^+$	$CD3^+CD4^+$	$CD3^+CD8^+$	$CD4^+/CD8^+$	NK
放化疗前	12.47±3.95	63.40±15.19	34.49±7.78	27.97±11.28	1.39±0.53	23.08±8.98
放化疗后	10.22±2.44	64.80±15.24	32.19±8.23	30.89±9.82	1.10±0.31	23.68±19.36
t值	4.931	−0.618	1.989	−1.955	4.552	−0.220
P值	0.000	0.540	0.052	0.056	0.000	0.827

注：NK为自然杀伤细胞

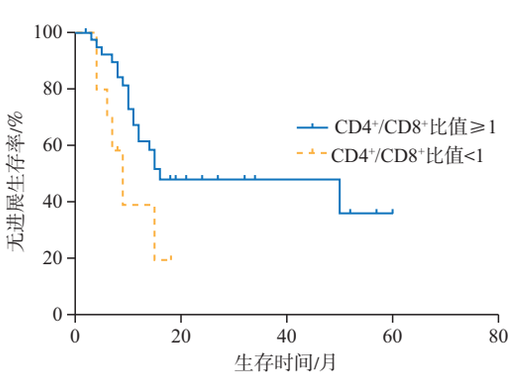

图1 $CD4^+/CD8^+$比值≥1与$CD4^+/CD8^+$比值＜1高级别胶质瘤51例无进展生存曲线比较

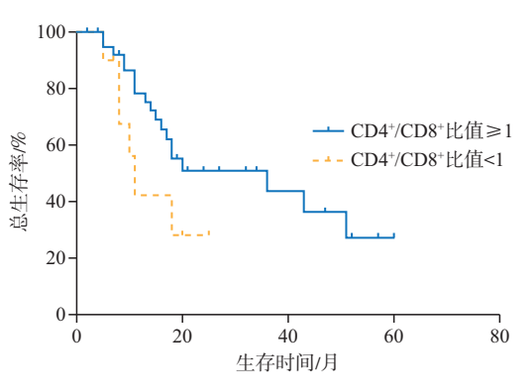

图2 $CD4^+/CD8^+$比值≥1与$CD4^+/CD8^+$比值＜1高级别胶质瘤51例总生存曲线比较

结合本组外周血检测结果,同步放化疗在一定程度上降低了胶质瘤病人的$CD4^+CD25^+$T细胞水平,降低了免疫抑制作用,防止肿瘤细胞的免疫逃避,对改善预后起着促进作用。但其发生机制可能需要进一步阐明。

影响胶质瘤预后的临床因素有病理的分级、手术的切除范围、年龄以及KPS评分等[13-14]。但目前依然缺乏对同步放化疗疗效的预后评估指标。Shi等[15]研究发现$CD4^+/CD8^+$比值与脑胶质瘤恶性程度呈负相关性,$CD4^+/CD8^+$比值越低,肿瘤恶性度越高,免疫抑制作用越明显,机体对肿瘤的抑制能力越差,由此可能会影响病人的预后。鉴于肿瘤发生、发展与机体免疫应答密切相关,本研究进一步探讨了同步放化疗前外周血$CD4^+/CD8^+$比值与预后的相关性。结果显示$CD4^+/CD8^+$比值是影响HGG术后病人PFS和OS的独立预后因素,$CD4^+/CD8^+\geq1$的病人预后要优于$CD4^+/CD8^+<1$的病人,这与徐春华等[16]的研究结果基本一致。可见,放化疗前$CD4^+/CD8^+$比值低的病人,免疫功能低下,术后复发、进展时间相对较早,导致生存时间缩短,影响预后。

此外,研究者发现胶质瘤的发生、发展及复发在很大程度上取决于为数不多的胶质瘤干细胞。这些细胞具有很强的DNA修复、抗凋亡、自我更新及多项分化能力,这使得放化疗均不敏感[17]。Yao等[18]发现复发胶质瘤病人胶质瘤干细胞的比例明显增高,而后者可抑制T细胞增殖,诱导细胞毒性T细胞凋亡,增强了肿瘤细胞的免疫逃避可能。因此,对于那些放化疗不敏感或复发的HGG病人,需要我们更加关注机体免疫功能的调节。尽早的有效评估病人免疫功能,及时介入免疫增强治疗可能会提高病人的生存期。

综上所述,同期放化疗降低了HGG病人外周血$CD4^+CD25^+$细胞水平及$CD4^+/CD8^+$比值。$CD4^+/CD8^+$比值低的病人,容易出现复发,生存期较短,预后较差。放化疗前$CD4^+/CD8^+$比值可以作为评价HGG术后病人预后的有效指标。

参考文献

[1] OSTROM QT, GITTLEMAN H, FARAH P, et al.CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006—2010[J].Neuro Oncol, 2013, 15 Supp12 ii1-56.

[2] 《中国中枢神经系统胶质瘤诊断和治疗指南》编写组.中国中枢神经系统胶质瘤诊断与治疗指南(2015)[J].中华医学杂志, 2016,96(7):485-509.

[3] ARAI H, IKOTA H, SUGAWARA K, et al.Nestin expression in brain tumors: its utility for pathological diagnosis and correlation with the prognosis of high-grade gliomas[J].Brain Tumor Pathol, 2012,29(3):160-167.

[4] 牟永告,邓星海,严苏丽,等.脑胶质瘤患者T淋巴细胞亚群检测的临床意义[J].中华神经医学杂志,2009,8(12):1244-1247.

[5] GIOMETTO B, BOZZA F, FARESIN F, et al.Immune infiltrates and cytokines in gliomas[J].Acta Neurochir (Wien), 1996, 138 (1):50-56.

[6] DUNN GP, DUNN IF, CURRY WT.Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma[J].Cancer Immun, 2007, 7:12.

[7] TAKESHITA Y, RANSOHOFF RM.Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models[J].Immunol Rev, 2012, 248(1):228-239.

[8] 陈萍萍,石松生,陈春美,等.胶质瘤患者围术期外周血T细胞亚群和自然杀伤细胞活性的变化及其临床意义[J].中华实验外科杂志,2014,31(11):2577-2579.

[9] 范学政,游潮,黄进能,等.神经纤毛蛋白-1和CD4+CD25+Treg在人脑胶质瘤中的表达及意义[J].中华神经外科杂志,2014, 30(10):1065-1068.

[10] CAMPIAN JL, PIOTROWSKI AF, YE X, et al.Serial changes in lymphocyte subsets in patients with newly diagnosed high grade astrocytomas treated with standard radiation and temozolomide [J].J Neurooncol, 2017, 135(2):343-351.

[11] BRAGA M, QUECCHIA C, CAVALLUCCI E, et al.T regulatory cells in allergy[J].Int J Immunopathol Pharmacol, 2011, 24(1 suppl): 55S-64S.

[12] EL ANDALOUSSI A, LESNIAK MS.An increase in CD4+CD25+ FOXP3+ regulatory T cells in turn or infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme[J].Neuo-Oncol, 2006, 8(3):234-243.

[13] 李凯新,孔月,董百强,等.放疗联合替莫唑胺治疗术后高级别脑胶质瘤的临床分析[J].中华放射肿瘤学杂志,2017,26(2): 133-137.

[14] BADIYAN SN, MARKOVINA S, SIMPSON JR, et al. Radiation therapy dose escalation for glioblastoma multiforme in the era of temozolomide[J].Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2014, 90(4):877-885.

[15] SHI X, YI C, WANG X, et al.13N-ammonia combined with 18F-FDG could discriminate between necrotic high-grade gliomas and brain abscess[J].Clin Nucl Med, 2015, 40(3):195-199.

[16] 徐春华,刘越,肖利民,等.不同级别脑胶质瘤患者手术前后外周血T淋巴细胞免疫细胞水平变化及意义[J].重庆医学,2016, 45(2):180-182.

[17] BINELLO E, GERMANO IM.Targeting glioma stem cells: a novel framework for brain tumors[J].Cancer Sci, 2011, 102(11):1958-1966.

[18] YAO Y, TAO R, WANG X, et al.B7-H1 is correlated with malignancy-grade gliomas but is not expressed exclusively on tumor stem-like cells[J].Neuro Oncol, 2009, 11(6):757-766.

(收稿日期:2018-01-29,修回日期:2018-04-16)