

• 论 著 •

恶性肿瘤患者外周血淋巴细胞免疫表型检测的临床意义

章梁君¹, 钟锦莎², 钟辉秀¹, 刘伟平¹, 殷明刚¹, 杨新春¹

(1. 自贡市第一人民医院检验科, 四川自贡 643000; 2. 成都中医药大学, 四川成都 610072)

摘要:目的 研究恶性肿瘤患者外周血淋巴细胞免疫表型变化及其临床意义。方法 采用流式细胞术检测 167 例恶性肿瘤患者组(包括呼吸道癌、胃肠道癌、生殖系统癌)外周血中 T 淋巴细胞亚群、CD19⁺ B 细胞、CD3⁻CD56⁺ 自然杀伤细胞(NK)细胞、CD3⁺CD56⁺ 自然杀伤 T 细胞(NKT)细胞免疫表达水平, 设 170 例健康对照组进行对比分析, 并根据有无肿瘤转移和化疗周期进行分析。结果 恶性肿瘤患者总淋巴细胞绝对值, CD3⁺CD4⁺ 比例明显低于健康对照组($P<0.05$), 而 CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺、CD3⁻CD56⁺ 比例却明显高于健康对照组($P<0.05$)。肿瘤转移患者组 CD3⁺CD4⁺ 比例明显低于未发生肿瘤转移患者组($P=0.011$), 而 CD3⁺CD8⁺、CD3⁻CD56⁺、CD3⁺CD56⁺ 比例明显高于未发生肿瘤转移患者组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。在化疗治疗中, CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD56⁺、CD3⁻CD56⁺ 比例随着化疗周期增加而逐渐增高, 而 CD3⁺CD8⁺ 比例呈逐渐降低。结论 在肿瘤的发生、发展和治疗中, 细胞免疫功能起主导地位, 可作为临床监测肿瘤患者细胞免疫功能状态的指标之一。

关键词: 辅助性 T 淋巴细胞; 细胞毒性 T 淋巴细胞; 自然杀伤细胞; 自然杀伤 T 细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.24.024

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)24-3565-03

Clinical significance of detecting peripheral blood lymphocyte immunophenotype in patients with malignant carcinoma

Zhang Liangjun¹, Zhong Jinsha², Zhong Huixiu¹, Liu Weiping¹, Yin Minggang¹, Yang Xinchun¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Zigong Municipal First People's Hospital, Zigong, Sichuan 643000, China;

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610072, China)

Abstract: **Objective** To investigate the change of peripheral blood lymphocyte immunophenotype in the patients with malignant carcinoma and its clinical significance. **Methods** The flow cytometry was adopted to detect the expression levels of peripheral blood T lymphocyte subpopulations, CD19⁺ cells, CD3⁻CD56⁺ cells, CD3⁺CD56⁺ cells in 167 patients with malignant carcinoma (including respiratory tract cancers, gastrointestinal cancers and reproductive system cancer) and 170 normal controls as the healthy control group. The contrastive analysis was performed. Furthermore the analysis was conducted according to whether having tumor metastasis and chemotherapeutic cycles. **Results** The total absolute value of the lymphocytes and the proportion of CD3⁺CD4⁺ cells in the patients with malignant carcinoma were significantly lower than those in the healthy control group ($P<0.05$), but the proportions of CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD56⁺ and CD3⁻CD56⁺ cells were significantly higher than those in the healthy control group ($P<0.05$). The proportion of CD3⁺CD4⁺ cells in the patients with tumor metastasis were significantly lower than those in the ones without tumor metastasis; but the proportions of CD3⁺CD8⁺, CD3⁻CD56⁺ and CD3⁺CD56⁺ cells were significantly higher than those in the ones without tumor metastasis, the differences were statistically significant ($P<0.05$). In the chemotherapy treatment, the proportions of CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD56⁺ and CD3⁻CD56⁺ cells were gradually increased with the increase of chemotherapeutic cycles, but the proportion of CD3⁺CD8⁺ cells was gradually reduced. **Conclusion** In the process of development, progression and treatment of tumor, the cellular immunity function plays a dominant role, which could be used as one of indexes for clinically monitoring the cellular immune function in the patients with tumor.

Key words: T helper cells; cytotoxic T cell; natural killer cell; natural killer T cell

恶性肿瘤的发生、发展与机体免疫系统功能状态密切相关。肿瘤患者通常伴有免疫抑制或损伤, 肿瘤免疫的效应机制主要是通过细胞免疫反应发挥作用。因此, 检测患者细胞免疫功能指标有助于判断病情和指导治疗, 目前已有研究表明 T 淋巴细胞亚群在恶性肿瘤进展和转移中起着重要的作用^[1], 但淋巴细胞所有亚型在整个肿瘤疾病过程中的变化情况, 目前国内报道较少, 因此, 本研究采用流式细胞术通过检测 167 例肿瘤患者和 170 例健康对照者外周血 CD3⁺CD4⁺ 辅助性 T 淋巴细胞(Th)、CD3⁺CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞(Tc)、CD19⁺ B 淋巴细胞、CD3⁻CD56⁺ 自然杀伤细胞(NK)、CD3⁺CD56⁺ 自然杀伤 T 细胞(NKT)在淋巴细胞中所占比例, 来探讨细胞免疫功能变化与病情发展的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 标本取自本院肿瘤科 2014 年 4 月至 2015 年 4 月的 167 例恶性肿瘤患者(其中发生肿瘤转移 90 例, 未发生肿瘤转移 77 例, 按肿瘤发生部位分为呼吸系统癌 74 例, 胃肠道系统癌 46 例, 生殖系统癌 25 例)的外周血, 全部病例均经病理证实。其中男 92 例, 女 75 例, 平均(58.67±10.61)岁。健康对照组 170 名, 为本院进行体检的人员, 其中男 101 例, 女 69 例, 平均(60.75±15.37)岁。各患者组与对照组在年龄、性别等构成方面的差异均无统计学意义($P>0.05$), 见表 1。
1.2 方法 所有观察对象抽取空腹静脉血 2 mL 置于乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝管中, 取 CD3、CD4、CD8、CD56、CD19 荧光标记的单克隆抗体(Beckman, 美国)各 20

作者简介: 章梁君, 女, 检验技师, 主要从事临床检验工作。

μL,分别加入 100 μL 抗凝的外周血,室温暗处反应 15 min,然后用细胞裂解液(Beckman,美国)溶解红细胞,PBS 洗细胞一次,流式细胞仪(美国 Beckman-Coulter,EPICS0-XL)测定 T 淋巴细胞亚群、B 淋巴细胞和 NK 淋巴细胞(CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD3⁻CD19⁺、CD3⁻CD56⁺、CD3⁺CD56⁺),在直方图中框出淋巴细胞群,再分别计数 5 000 个淋巴细胞中各标记细胞在淋巴细胞中的百分率。

表 1 一般资料比较							
指标	<i>n</i>	男/女 (<i>n</i> / <i>n</i>)	χ^2	<i>P</i>	年龄 ($\bar{x}\pm s$)	<i>t</i>	<i>P</i>
健康对照组	170	101/69	0.64	0.42	60.75±15.37	1.44	0.15
恶性肿瘤组	167	92/75			58.67±10.61		
未发生肿瘤转移	90	52/38	0.57	0.45	60.25±9.87	1.63	0.10
发生肿瘤转移	77	40/37			57.52±11.75		
瘤种							
呼吸道癌	74	35/39	3.07	0.08	59.42±12.65	0.65	0.51
胃肠道癌	46	26/20	0.13	0.72	56.78±13.45	1.59	0.11
生殖系统癌	21	13/8	0.05	0.83	57.34±9.56	0.99	0.32

1.3 统计学处理 用 SPSS16.0 统计软件处理数据,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 进行 *t* 检验及方差分析,*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 健康组和恶性肿瘤组淋巴细胞免疫表型检测结果比较 恶性肿瘤患者组总淋巴细胞绝对值、CD3⁺和 CD3⁺CD4⁺比例明显低于健康对照组(*P*<0.05),CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺、CD3⁻CD56⁺比例明显高于健康对照组(*P*<0.05)。恶性肿瘤患者外周血中 CD3⁻CD19⁺比例略低于健康对照组,但差异无统计学意义(*P*>0.05),见表 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

进一步按照肿瘤发生部位不同,分为呼吸道癌、胃肠道癌、生殖系统癌三组,结果显示,三组癌症与健康对照组相比总淋巴细胞绝对值、CD3⁺和 CD3⁺CD4⁺比例明显低于健康对照组,而 CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺、CD3⁻CD56⁺比例明显高于健康对照组,差异均有统计学意义(*P*<0.05),见表 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 未发生肿瘤转移和发生肿瘤转移患者淋巴细胞免疫表型检测结果的比较 167 例肿瘤患者中未发生肿瘤转移患者 90 例,发生肿瘤转移患者 77 例,结果显示,发生肿瘤转移患者组其 CD3⁺CD4⁺比例明显低于未发生肿瘤转移患者组,差异具有统计学意义(*P*=0.011),而 CD3⁺CD8⁺、CD3⁻CD56⁺、CD3⁺CD56⁺比例明显高于未发生肿瘤转移患者组,差异有统计学意义(*P*分别为 0.029、0.012 和 0.004);而其他指标总 T 淋巴细胞、CD3⁻CD19⁺在淋巴细胞所占比例在肿瘤有无发生转移患者间差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表 4。

2.3 不同化疗周期恶性肿瘤患者外周血淋巴细胞免疫表型测定结果比较 不同恶性肿瘤患者按照不同的病种、病期、患者的一般情况等因素决定化疗周期数,167 例肿瘤患者中未化疗患者组 42 例,化疗 1~3 周期患者 32 例,化疗 4~6 周期患者 73 例,化疗后大于 6 周 19 例,结果显示,CD3⁺CD4⁺比例在未化疗患者中比例最低为(28.64±14.29)%,随着化疗周期增加

而逐渐增高,化疗大于 6 周后患者与健康对照相比均无统计学差异(*P*>0.05);CD3⁺CD8⁺比例在化疗 1~3 周期患者中比例最高为(34.14±14.27)%,且随着化疗周期的增加其比例逐渐降低,同样的,化疗大于 6 周后患者与健康对照相比均无统计学差异(*P*>0.05)。在患者外周血 CD3⁺CD56⁺含量中,化疗周期间比例明显高于健康对照组(*P*<0.05),且呈逐渐增高趋势,大于 6 周期患者的比例最高为(6.85±3.67)%;同样的,CD3⁻CD56⁺含量随着化疗周期增加而逐渐增加,大于 6 周期患者的比例最高为(18.89±9.55)%,见表 5(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

表 4 未肿瘤转移和肿瘤转移患者淋巴细胞免疫表型检测结果比较(%)				
指标	未肿瘤转移 (<i>n</i> =90)	肿瘤转移 (<i>n</i> =77)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
总 T 淋巴细胞	68.77±11.36	67.12±12.88	0.26	0.61
CD3 ⁺ CD4 ⁺	32.64±10.45	28.14±12.18	2.56	0.01
CD3 ⁺ CD8 ⁺	29.68±12.85	33.84±11.45	2.19	0.03
CD3 ⁻ CD19 ⁺	10.67±7.08	11.10±8.63	0.13	0.61
CD3 ⁺ CD56 ⁺	4.90±3.95	6.89±4.84	4.13	0.00
CD3 ⁻ CD56 ⁺	13.74±8.79	17.05±7.72	2.47	0.01

3 讨 论

细胞免疫功能状态在肿瘤的发生、发展过程中对病情发展变化和预后起着重要的作用,而目前利用患者细胞免疫功能状态而进行抗肿瘤细胞免疫治疗技术已越来越多的应用于临床^[2-3],因此,对恶性肿瘤患者细胞免疫功能的评价和判断显得尤为重要。在抗肿瘤反应过程中细胞免疫是以 T 淋巴细胞为主,CD3⁺细胞代表为成熟淋巴细胞,也是细胞免疫中主要活性细胞,CD3⁺CD4⁺细胞代表为辅助性 T 淋巴细胞,它能分泌细胞因子从而活化单核细胞、巨噬细胞和 NK 细胞,增强吞噬细胞的抗感染能力进而发挥抗肿瘤功能,对细胞免疫起正调节作用,CD3⁺CD8⁺细胞代表为抑制性 T 淋巴细胞,不仅对靶细胞具有一定杀伤作用,而且能抑制机体免疫应答,对细胞免疫起负调节作用,CD3⁺CD4⁺细胞和 CD3⁺CD8⁺细胞在正常情况下处于动态平衡状态。目前 T 淋巴细胞亚群的检测研究已见于多种疾病,如自身免疫性疾病、肝脏疾病、血液系统疾病、心血管疾病等^[4-5],本研究结果发现,恶性肿瘤患者包括呼吸道癌组、胃肠道癌组和生殖系统癌组,与健康对照组相比总淋巴细胞绝对值、CD3⁺、CD3⁺CD4⁺比例明显降低,而 CD3⁺CD8⁺比例较健康对照组高,即 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺降低,说明肿瘤患者的细胞免疫功能处于免疫抑制状态,机体对识别和杀伤突变细胞的能力下降,造成机体免疫功能失衡。已有研究发现主要是由于肿瘤细胞微环境中存在许多免疫抑制因子能抑制 CD3⁺CD4⁺细胞的成熟和分化,同时 CD3⁺CD8⁺细胞显著增多,从而使患者处于免疫抑制状态^[6]。本研究进一步发现在未发生肿瘤转移组 CD3⁺CD4⁺比例明显高于发生肿瘤转移组,且 CD4⁺CD8⁺比例明显低于发生肿瘤转移组,差异具有统计学意义(*P*<0.05),提示了患者细胞免疫功能越受抑制,肿瘤细胞生长速度越猛,扩散越快,从而出现转移。以上结果与国内许多研究结果基本一致^[7-8]。因此,肿瘤患者动态监测 T 淋巴细胞亚群对肿瘤有无发生转移有一定的指导意义。本研

究另一项结果显示,CD3-CD19⁺ 比例在恶性肿瘤组和健康对照组间无统计学差异,说明体液免疫中发挥巨大作用的 B 淋巴细胞(主要以 CD3-CD19⁺ 为主)在恶性肿瘤疾病中变化较小,再次证明了细胞免疫在肿瘤疾病中的重要地位。

外周血中 NK 细胞是具有天然杀伤某些肿瘤细胞、病毒感染细胞等能力的淋巴细胞,而 NKT 细胞是一类共同表达 NK 细胞和 T 淋巴细胞表面标志物的细胞,该细胞是在 IL-2、IL-7 等多种细胞因子的诱导下产生,主要发挥细胞溶解效应^[9]。现阶段国内外已有许多研究表明 NK 和 NKT 细胞在自身免疫性疾病、病毒感染疾病、炎症疾病及肿瘤疾病均发挥重要的作用^[10-11]。本研究结果表明肿瘤患者组外周血中的 CD3⁻CD56⁺ 细胞、CD3⁺CD56⁺ 细胞比例与健康对照组相比均明显升高,反映了机体在抗肿瘤的免疫反应增强,提示恶性肿瘤患者体内的细胞免疫功能有促进激活 NK 和 NKT 细胞增殖现象。本研究进一步研究发现,在未发生肿瘤转移组 CD3⁺CD56⁺、CD3⁻CD56⁺ 比例明显低于发生肿瘤转移组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示在肿瘤细胞进一步扩散中 NKT 和 NK 细胞的抗肿瘤作用进一步增强。研究发现,NK 和 NKT 细胞在抗肿瘤免疫中起着相互相成作用,它们不仅能直接杀伤肿瘤细胞,NKT 细胞还能通过产生 IL-2 等细胞因子进一步激活 NK 细胞,从而使 NK 细胞进一步得到活化并提高其细胞毒活性,发挥着扩大免疫效应和抗肿瘤免疫功能^[12]。因此,监测 NK 和 NKT 细胞比例对肿瘤患者抗肿瘤能力检测具有重要的价值。

化疗是目前治疗肿瘤的常用手段之一,它可明显提高患者生存率和总生存时间,有研究表明,化疗疗法对机体的免疫功能同时具有促进和抑制的两面性作用^[13],其主要的机制为肿瘤化疗药物在杀伤癌细胞的同时,也必然对健康免疫细胞造成一定的伤害,但同时在肿瘤细胞大量减少的情况下,必然减少肿瘤细胞所释放的抑制因子,降低免疫抑制功能,从而使免疫功能得以恢复,因此,化疗中肿瘤患者的细胞免疫功能研究是目前研究的热点之一。本研究发现,随着化疗周期的增加,恶性肿瘤患者的 CD3⁺CD4⁺ 细胞比例逐渐增加,而 CD3⁺CD8⁺ 细胞比例呈逐渐减少趋势,且大于 6 周期化疗的患者与健康对照组相比,CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 细胞比例差异无统计学意义($P > 0.05$),说明随着化疗的进展恶性肿瘤患者的免疫状态逐渐恢复健康,由免疫抑制状态逐渐减弱,且患者的抵抗力在逐渐恢复中,且大于 6 周期化疗患者免疫功能已基本恢复健康。同样,CD3⁺CD56⁺、CD3⁻CD56⁺ 细胞比例随着化疗周期增加而逐渐增高,说明机体在免疫功能恢复的过程中,抗肿瘤能力在逐渐增强。由此可以得出,化疗会对机体细胞造成损伤,会抑制机体的免疫,但其在抑制免疫的同时又有免疫平衡的恢复和免疫功能的增强,且随着化疗周期的增加,化疗促进免疫的占据优势。

综上所述,细胞免疫功能在恶性肿瘤患者的发生、发展及治疗中起着重要的作用,主要表现在 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、

CD3⁺CD8⁺、CD3⁻CD56⁺ 和 CD3⁺CD56⁺ 细胞比例的变化,它们互相促进或者抑制,对患者机体免疫功能的失衡和抗肿瘤免疫起着重要的作用,这些指标可作为临床监视肿瘤免疫状态的重要指标之一,值得推广。

参考文献

- [1] 姜南阳,宋述安,王剑冰,等. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞与肿瘤及器官移植研究进展[J]. 检验医学与临床. 2015,12(9):1312-1313.
- [2] 单婵婵,吴昌平,蒋敬庭. 抗肿瘤细胞免疫治疗肿瘤患者的疗效评价[J]. 现代肿瘤医学. 2013,21(8):1882-1884.
- [3] 任军,黄红艳. 中国肿瘤细胞免疫治疗的现状与趋势[J/CD]. 转化医学研究:电子版,2014,4(3):63-69.
- [4] 冯广贵. 慢性乙型肝炎病毒感染外周血 T 细胞亚群变化分析[J]. 检验医学与临床. 2010,7(1):21-22.
- [5] 王晓乐,邱潮林,吴秀梅,等. SLE 患者外周血 T 细胞亚群凋亡特点及其相关机制的研究[J]. 中国免疫学杂志. 2010,26(14):348-359.
- [6] Ganesan AP, Johansson M, Ruffell B, et al. Tumor-infiltrating regulatory T cells inhibit endogenous cytotoxic T cell responses to lung adenocarcinoma[J]. J Immunol, 2013,191(4):2009-2017.
- [7] 师越. 恶性肿瘤患者外周血 T 细胞亚群检测结果回顾性分析[J]. 中国医学检验杂志, 2009,10(4):228-229.
- [8] 刘长安,孙武,邵玉霞,等. 大肠癌患者外周血 T 细胞亚群和 NK 细胞活性检测的临床意义[J]. 实用癌症杂志. 2001,16(5):476-478.
- [9] Finke S, T rojaneck B, Lefterova P, et al. Increase of proliferation rate and enhancement of antitumor cytotoxicity of expanded human CD3⁺CD56⁺ immunologic effector cells by receptor-mediated transfection with the in terleukin-7 gene[J]. Gene T her, 1998,5(1):31-39.
- [10] Hawryfar SM. Invariant natural killer T cells in immune surveillance and tumor immunotherapy: perspectives and potentials [J]. Arch Iran Med, 2008,11(2):186-187.
- [11] 麦迪娜·麦麦提明,姜振宇,叶壮,等. 人外周血 NK 细胞及 NKT 细胞受体及亚群的差异表达与类风湿关节炎的关系[J]. 中国免疫学杂志, 2014,30(24):1692-1696.
- [12] 王晓梦,于津浦. IL-2⁺IL-15 组合培养方案对乳腺癌患者外周血中 NK 细胞体外扩增的效果[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志. 2013, 20(6):654-660.
- [13] Roth AD. Chemotherapy in gastric cancer: A never ending saga [J]. Ann Oncol, 2003,14(2):175-177.

(收稿日期:2015-07-30)



(上接第 3564 页)

- [6] 洪纛. 机采血小板产量机测与实际符合率及采集效果影响因素分析[J]. 中国输血杂志, 2011,24(1):62-63.
- [7] 许友山. 机采血小板收集量与几项影响指标相关性的探讨. 现代检验医学杂志[J], 2007,22 (1):75-76.
- [8] 黎美娜,滕青,刘凯媚,等. Trima Accel 机采血小板质量的关键控制点[J]. 中国当代医药, 2013,20(26):34-36.

- [9] 何晓露. 机采血小板采集效果影响因素分析[J]. 中国实用医药, 2012,7(1):265-267.
- [10] 李爱萍,赵晓芳,白洁. 血细胞分离机在机采血小板采集常见报警故障分析及处理[J]. 医疗卫生装备, 2011,32(11):140-141.

(收稿日期:2015-07-16)