

• 论 著 •

肺癌患者外周血及组织中 $\gamma\delta$ T 细胞的分布特征及意义*

尚文雯¹, 徐 睿¹, 陈 献¹, 姚莎莎¹, 金淑贤², 张晓洁^{1△}

(1. 南京医科大学第一附属医院检验学部/国家重点临床检验专科建设单位, 江苏南京 210029;

2. 南京医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 江苏南京 210029)

摘要:目的 探讨肺癌患者外周血和组织中 $\gamma\delta$ T 细胞及其亚群的分布特征及临床意义。方法 流式细胞术检测 10 例肺癌患者外周血、20 例健康对照者外周血、15 例肺癌患者癌组织及其癌旁正常组织中 $\gamma\delta$ T 细胞、V δ 1 T 细胞和 V δ 2 T 细胞的表达水平。结果 肺癌患者外周血中 V δ 2 T 细胞的表达水平显著低于健康对照者, 差异有统计学意义($P < 0.001$); 肺癌患者癌组织中浸润的 $\gamma\delta$ T 细胞($P < 0.001$)和 V δ 1 T 细胞($P < 0.001$)表达水平显著高于癌旁正常组织; 肺癌患者癌组织中浸润的 V δ 1 T 细胞表达水平与淋巴结转移相关($P < 0.05$)。结论 肺癌患者外周血及癌组织中 $\gamma\delta$ T 细胞及其亚群具有截然不同的分布特征, 癌组织浸润的 V δ 1 T 细胞表达水平与淋巴结转移有关, 提示 $\gamma\delta$ T 细胞及其亚群可能参与肺癌病程的进展。

关键词:肺癌; $\gamma\delta$ T 细胞; V δ 1 T 细胞; V δ 2 T 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.11.003

中图法分类号:R734.2

文章编号:1673-4130(2020)11-1291-05

文献标识码:A

Distribution characteristics and significance of $\gamma\delta$ T cells in peripheral blood and tissues of patients with lung cancer*

SHANG Wenwen¹, XU Rui¹, CHEN Xian¹, YAO Shasha¹, JIN Shuxian², ZHANG Xiaojie^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China/National Key Clinical Laboratory Specialty Construction Unit, Nanjing, Jiangsu 210029, China; 2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution and clinical significance of $\gamma\delta$ T cells and their subsets in peripheral blood and tissues of patients with lung cancer. **Methods** Flow cytometry was used to detect the expression of $\gamma\delta$ T cells, V δ 1 T cells and V δ 2 T cells in peripheral blood of 10 lung cancer patients, 20 healthy controls, the cancer tissue and the adjacent normal tissues of 15 lung cancer patients. **Results** The expression level of V δ 2 T cells in the peripheral blood of lung cancer patients was significantly lower than that of the healthy control group($P < 0.001$), the expression levels of $\gamma\delta$ T cells($P < 0.001$) and V δ 1 T cells($P < 0.001$) infiltrated in the cancer tissues of lung cancer patients were significantly higher than those in the adjacent normal tissues, and the expression level of V δ 1 infiltrated in the cancer tissues of lung cancer patients was significantly higher than that in the normal tissues; correlated with lymph node metastasis($P < 0.05$). **Conclusion** The distribution of $\gamma\delta$ T cells and their subsets in peripheral blood and cancer tissues of patients with lung cancer is quite different. The expression level of V δ 1 T cells infiltrated by cancer tissues is related to lymph node metastasis, suggesting that $\gamma\delta$ T cells and their subsets may be involved in the progression of lung cancer.

Key words: lung cancer; $\gamma\delta$ T cells; V δ 1 T cells; V δ 2 T cells

肺癌的发病率和病死率位居全球恶性肿瘤之首, 发病率逐年上升。其中, 非小细胞肺癌(NSCLC)占所有肺癌的 85.00%左右, 约 75.00%的患者发现时已为晚期, 5 年生存率很低^[1]。传统肿瘤疗法包括手术、

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81772779); 江苏省六大高峰人才项目(2015-WSN-034); 江苏省六个一工程拔尖人才项目(LGY2017068); 江苏省重点人才基金项目(ZDRCA2016003); 江苏省“科教强卫”实验诊断学重点实验室项目(ZDXKB2016005)。

作者简介: 尚文雯, 女, 技师, 主要从事肿瘤免疫与分子诊断研究。△ 通信作者, E-mail: njzhangxj@163.com。

本文引用格式: 尚文雯, 徐睿, 陈献, 等. 肺癌患者外周血及组织中 $\gamma\delta$ T 细胞的分布特征及意义[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(11): 1291-

化疗和放疗对 NSCLC 的治疗效果欠佳,不能有效改善患者的生存期和生活质量。近年来免疫治疗包括肿瘤浸润性 T 淋巴细胞疗法(TIL)、嵌合抗原受体 T 细胞疗法(CAR-T)、T 细胞受体疗法(TCR-T)及免疫卡控点修饰法(CTLA-4、PD-1/PDL1)等免疫治疗方法已取得较大进展,逐渐应用于 NSCLC 的治疗,但由于 NSCLC 复杂的肿瘤免疫微环境,其治疗效果与预期仍有很大差距^[2-3]。因此进一步深入研究肺癌的免疫抑制微环境,有助于打破肿瘤形成的免疫耐受,为肺癌的免疫治疗提供更为广阔的前景。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究经南京医科大学第一附属医院(下称本院)伦理委员会批准,所有患者或家属均签署知情同意书。病例纳入标准:(1)年龄 20~70 岁初诊患者,未曾接受过其他外科手术、放化疗及免疫抑制治疗;(2)临床诊断明确,且均经细胞学或组织学病理确诊;(3)无其他恶性肿瘤病史,无其他严重并发症;(4)健康对照者为同期体检健康者。本研究根据纳入标准收集了 2017 年 7 月至 2018 年 10 月就诊于本院的 15 例肺癌患者的癌组织及其相应癌旁正常组织(距癌>5 cm),并收集相对应的 10 例肺癌患者外周血,患者年龄 35~70 岁,平均 61 岁;男 8 例,女 7 例;其中肺腺癌 13 例,肺鳞癌 2 例;根据国际抗癌联盟(UICC)第 8 版肺癌 TNM 分期标准^[4],I 期 2 例,II 期 12 例,III 期 1 例;有淋巴结转移 7 例,无淋巴结转移 8 例。同时收集同期 20 例年龄匹配的体检健康者外周血作为健康对照组,健康对照组年龄 32~70 岁,平均 58 岁;男 11 例,女 9 例。

1.2 单个核细胞制备 外周血用 Ficoll 淋巴细胞分离液(TBD,中国)密度梯度离心获得单个核细胞(PBMC)。新鲜的肺癌组织和癌旁正常组织用无菌外科剪剪碎,加入含有 DNase I (50 U/mL, Sigma)、透明质酸酶(100 μ g/mL, Sigma)、胶原酶 IV (1 mg/mL, Sigma)和 L-谷氨酰胺(2 μ mol/L, Sigma)的 RPMI 1640 培养基中室温摇床消化 2 h。100 mm 筛网(BD Falcon, 美国)过滤后获得单细胞悬液,用 Percoll 细胞分离液(GE Health Care Life Sciences, 美国)梯度离心得到组织浸润的单个核细胞。

1.3 流式细胞术 取 1×10^6 个单个核细胞,加入 Alexa Fluor 750-anti-CD45, Alexa Fluor 700-anti-CD3, BV421-anti-TCR $\gamma\delta$, FITC-anti-V δ 1 和 PE-anti-V δ 2 流式抗体(Biolegend, 美国),室温下避光孵育 20 min,进行细胞膜表面标记,洗涤后加入 300 μ L PBS 重悬细胞,FACS Aria II (BD Biosciences, 美国)流式细胞仪检测。以 FSC 和 SSC 定义淋巴细胞,从 CD45⁺ 阳性门里分析 CD3⁺ $\gamma\delta$ ⁺ T 细胞的比例,并从 $\gamma\delta$ ⁺ T 阳性门里分析 V δ 1 T、V δ 2 T 细胞所占比例。

1.4 统计学处理 用 SPSS20.0 统计学软件进行数据处理,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,同 1 例肺癌患者癌组织及其癌旁正常组织中各变量的比较采用配对 *t* 检验,其余各组变量的比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

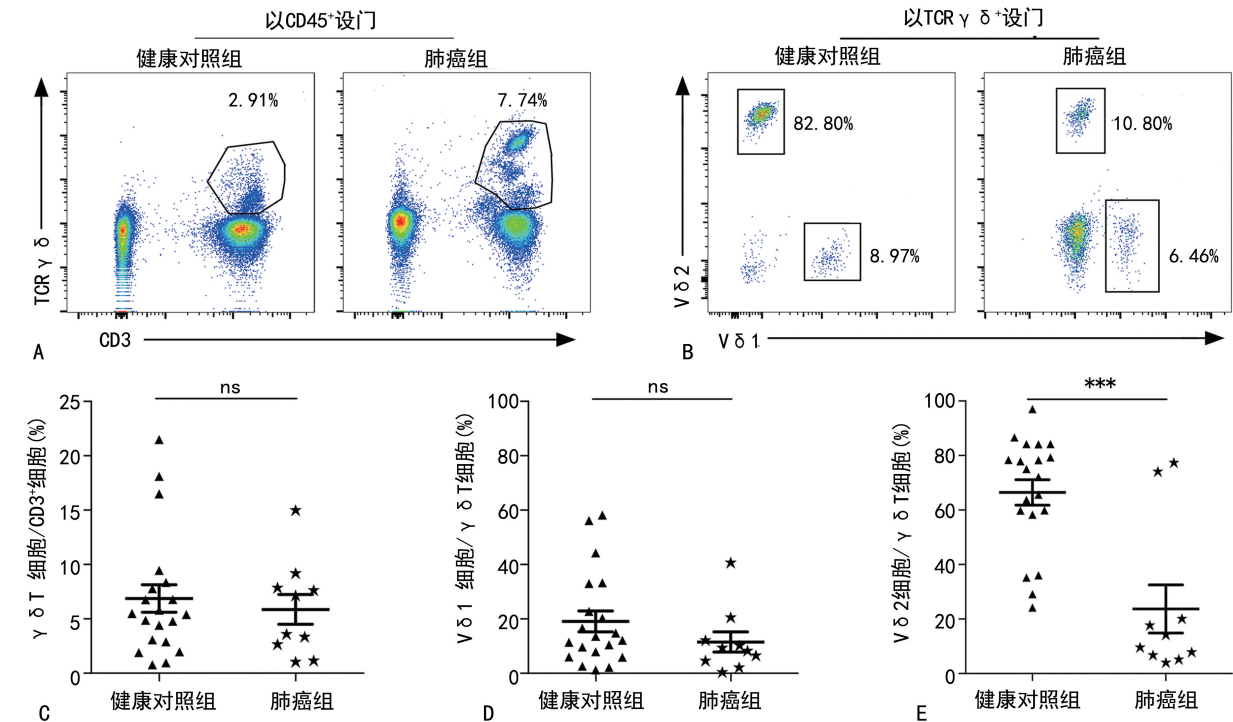
2.1 肺癌患者外周血 $\gamma\delta$ T 细胞、V δ 1 T 细胞和 V δ 2 T 细胞的表达水平 图 1A、B 分别显示 1 例健康对照者和 1 例肺癌患者外周血中 $\gamma\delta$ T 细胞、V δ 1 T、V δ 2 T 细胞的流式检测图。以健康对照者为例,其外周血中 $\gamma\delta$ T 细胞比例为 2.91%,V δ 1 T 细胞比例为 8.97%,V δ 2 T 细胞比例为 82.80%。图 1C、D、E 显示 $\gamma\delta$ T 细胞、V δ 1 T 细胞、V δ 2 T 细胞表达比例的统计学分析结果。健康对照组外周血中 $\gamma\delta$ T 细胞比例为 $(6.87 \pm 1.27)\%$,V δ 1 T 细胞比例为 $(19.13 \pm 3.85)\%$,V δ 2 T 细胞比例为 $(66.45 \pm 4.65)\%$;肺癌患者外周血中 $\gamma\delta$ T 细胞 $(5.87 \pm 1.38)\%$ 和 V δ 1 T 细胞 $(11.50 \pm 3.70)\%$ 的表达水平与健康对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);而 V δ 2 T 细胞 $(23.69 \pm 8.84)\%$ 表达水平则显著低于健康对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 肺癌患者癌组织浸润的 $\gamma\delta$ T 细胞、V δ 1 T 细胞和 V δ 2 T 细胞的表达水平 图 2A、B 分别显示同 1 例肺癌患者癌组织和癌旁正常组织中 $\gamma\delta$ T 细胞、V δ 1 T、V δ 2 T 细胞的流式检测图。以癌旁正常组织为例,其 $\gamma\delta$ T 细胞比例为 25.10%,V δ 1 T 细胞比例为 47.90%,V δ 2 T 细胞比例为 1.65%。图 2C、D、E 显示 $\gamma\delta$ T 细胞、V δ 1 T 细胞、V δ 2 T 细胞表达比例的统计学分析结果。肺癌患者癌旁正常组织中浸润的 $\gamma\delta$ T 细胞比例为 $(23.25 \pm 2.06)\%$,V δ 1 T 细胞比例为 $(48.80 \pm 4.23)\%$,V δ 2 T 细胞比例为 $(4.10 \pm 1.34)\%$;癌组织中浸润的 $\gamma\delta$ T 细胞 $(32.68 \pm 2.83)\%$ 和 V δ 1 T 细胞 $(63.92 \pm 4.17)\%$ 水平显著高于癌旁正常组织,差异具有统计学意义($P < 0.05$);而癌组织中浸润的 V δ 2 T 细胞表达水平 $(1.60 \pm 0.53)\%$ 则与癌旁正常组织比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 肺癌患者外周血和癌组织中 $\gamma\delta$ T 细胞、V δ 1 T 细胞和 V δ 2 T 细胞的分布特征 本文进一步比较肺癌患者外周血和癌组织中浸润的 $\gamma\delta$ T 细胞、V δ 1 T 细胞和 V δ 2 T 细胞的表达水平,如图 3A、B、C 所示:肺癌患者癌组织中浸润的 $\gamma\delta$ T 细胞 $[(32.68 \pm 2.83)\% \text{ vs. } (5.87 \pm 1.38)\%, t = 7.319, P < 0.001]$ 和 V δ 1 T 细胞 $[(63.92 \pm 4.17)\% \text{ vs. } (11.50 \pm 3.70)\%, t = 8.815, P < 0.001]$ 的水平明显高于外周血,而 V δ 2 T 细胞的水平则明显低于外周血,差异具有统计学意义 $[(1.60 \pm 0.53)\% \text{ vs. } (23.69 \pm 8.84)\%, t = 3.082, P < 0.01]$ 。

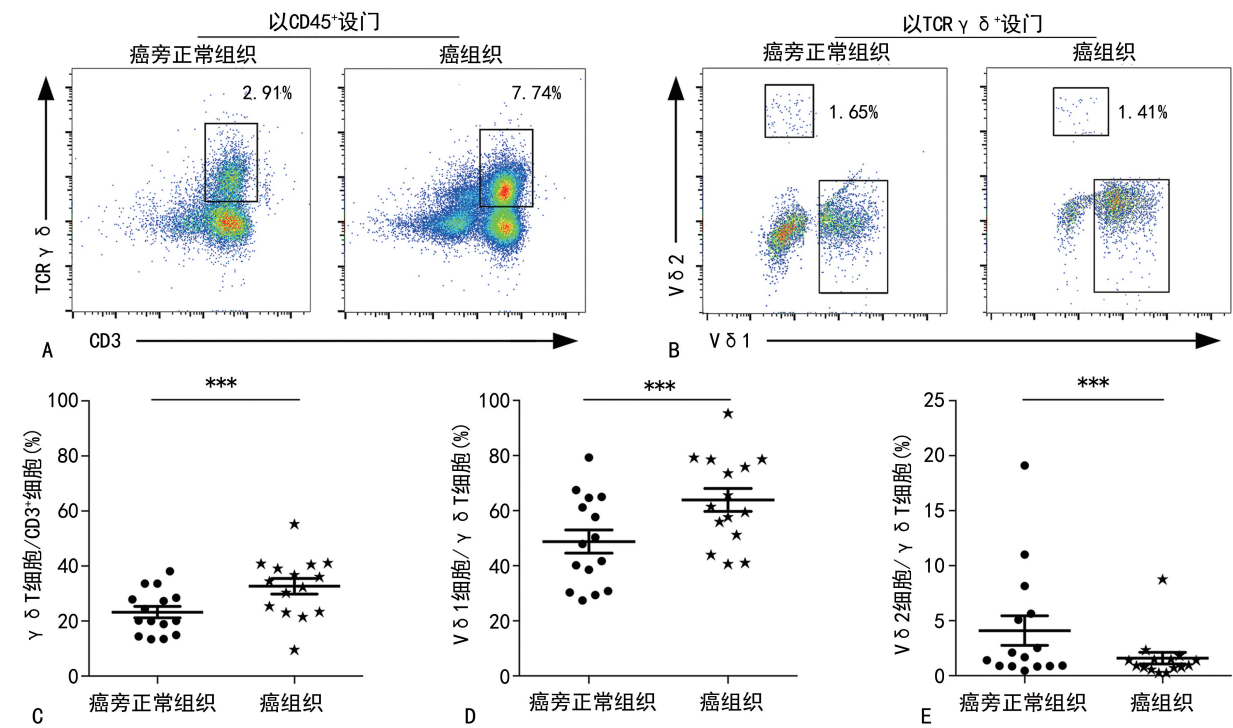
2.4 肺癌患者癌组织浸润的 $\gamma\delta$ T 细胞、V δ 1 T 细胞和 V δ 2 T 细胞的水平与淋巴结转移的关系 本文进一步将 15 例肺癌患者分为有淋巴结转移组和无淋巴结转移组,并比较癌组织中浸润的 $\gamma\delta$ T 细胞、V δ 1 T 细胞和 V δ 2 T 细胞的表达水平,如图 4A、B、C 所示:有淋巴结转移的肺癌患者浸润的 V δ 1 T 细胞水平显

著高于无淋巴结转移的患者,差异具有统计学意义 [(57.87 $\pm$ 4.94)% *vs.* (40.86 $\pm$ 5.44)%, *t*=2.289, *P*<0.05)];而浸润的 $\gamma\delta$ T 细胞[(24.79 $\pm$ 1.95)% *vs.* (21.91 $\pm$ 3.54)%, *t*=0.683, *P*>0.05)和 V δ 2 T 细胞的水平差异无统计学意义[(2.50 $\pm$ 1.44)% *vs.* (5.51 $\pm$ 2.14)%, *t*=1.131, *P*>0.05]。



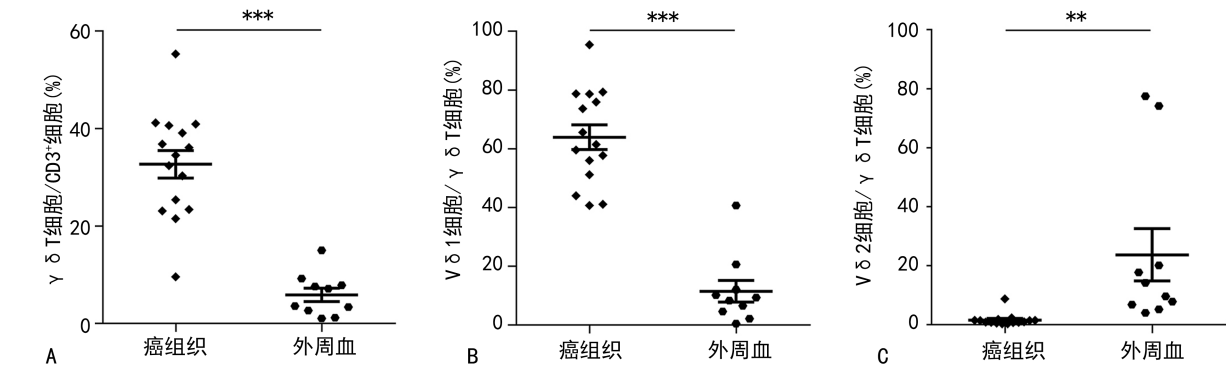
注:健康对照组 20 例,肺癌组 10 例;*** 表示 *P*<0.001;ns 表示差异无统计学意义。

图 1 流式细胞术检测肺癌组和健康对照组外周血中 $\gamma\delta$ T 细胞、V δ 1 T 细胞和 V δ 2 T 细胞的表达水平



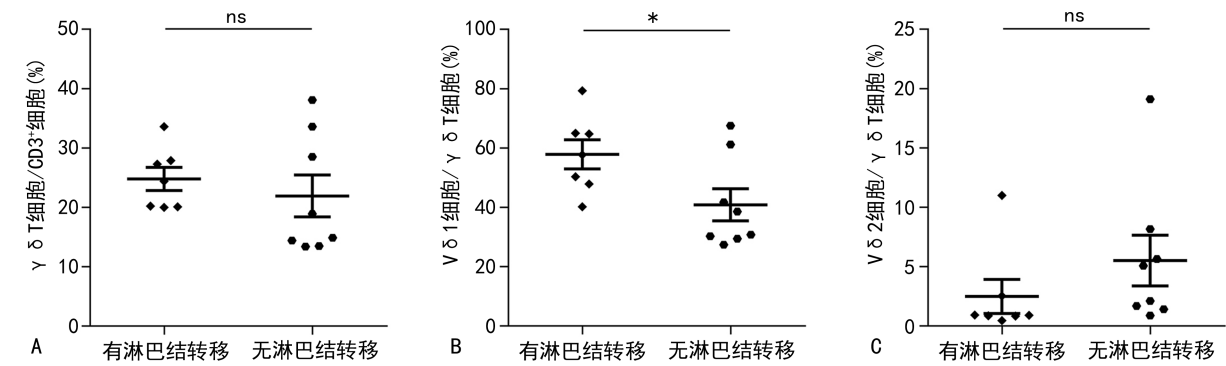
注:癌旁正常组织 15 例,癌组织 15 例,*** 表示 *P*<0.001。

图 2 流式细胞术检测肺癌患者癌组织和癌旁正常组织中浸润的 $\gamma\delta$ T 细胞、V δ 1 T 细胞和 V δ 2 T 细胞的表达水平



注:癌组织 15 例,外周血 10 例; * 表示 $P<0.01$, *** 表示 $P<0.001$ 。

图 3 肺癌患者外周血和癌组织中 $\gamma\delta$ T 细胞、V δ 1 T 细胞和 V δ 2 T 细胞的表达水平



注:有淋巴结转移 7 例,无淋巴结转移 8 例; * 表示 $P<0.05$, ns 表示差异无统计学意义。

图 4 肺癌患者癌组织浸润的 $\gamma\delta$ T 细胞、V δ 1 T 细胞和 V δ 2 T 细胞的水平与淋巴结转移的关系

3 讨 论

$\gamma\delta$ T 细胞是一类广泛分布于外周血和黏膜上皮组织的非组织相容复合体限制性固有 T 淋巴细胞。既往研究表明, $\gamma\delta$ T 细胞可以通过多种机制介导抗肿瘤免疫效应,如释放穿孔素和颗粒酶介导靶细胞的凋亡;释放 γ -干扰素等细胞因子参与抗肿瘤免疫调节;抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用;通过乙型跨膜糖蛋白 (FasL) 和肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 途径发挥抗肿瘤作用;NK 细胞 2D 受体 (NKG2D) 直接识别并杀伤靶细胞^[5-6],因此 $\gamma\delta$ T 细胞具有广泛的抗肿瘤谱。然而,越来越多的证据表明, $\gamma\delta$ T 细胞既可发挥细胞毒效应杀伤肿瘤细胞,又能介导肿瘤细胞的免疫逃逸^[7]。

据报道,不同的 $\gamma\delta$ T 细胞亚群具有不同的免疫效应功能,其中 V δ 1 T 细胞在上皮性肿瘤中具有免疫抑制作用。RÓNG 等^[8]研究发现,直肠癌组织中浸润的 V δ 1 T 细胞比例显著增高,并与肿瘤分期呈正相关关系,而 V δ 2 T 细胞比例显著降低,与肿瘤分期呈负相关关系,V δ 1 T 细胞具有免疫抑制作用,可以抑制初始 CD4⁺ T 细胞的增殖,而 V δ 2 T 细胞具有杀伤活性,可以杀伤直肠癌细胞;MA 等^[9]研究表明,乳腺癌组织中 $\gamma\delta$ T 细胞的增高是其临床预后的独立危险因素,与肿瘤大小、临床分期、淋巴结转移、术后生存时

间等不良临床结局相关,且 V δ 1 T 细胞可以抑制初始 T 细胞和效应 T 细胞的功能,阻滞抗原提呈细胞 DC 的成熟来参与肿瘤免疫抑制^[10-11]。LU 等^[12]研究显示,V δ 2 T 细胞与 ATM/ATR 通路联合可以增强对卵巢癌细胞的杀伤作用。与之相符,本研究发现,肺癌患者癌组织中以 V δ 1 T 细胞的细胞亚群为主,且 $\gamma\delta$ T 细胞和 V δ 1 T 细胞的比例较癌旁组织明显升高;而外周血中 V δ 2 T 细胞显著降低,说明 $\gamma\delta$ T 细胞的两种不同亚群可能在外周血和肿瘤组织中发挥着不同的效应功能。

肿瘤浸润的 $\gamma\delta$ T 细胞可以通过募集免疫抑制细胞等方式帮助肿瘤免疫抑制微环境的建立,促进肿瘤的发生发展。乳腺癌细胞分泌的趋化因子 IP-10 可招募外周 $\gamma\delta$ T 细胞到肿瘤局部,阻断 IP-10 介导的 $\gamma\delta$ T 的迁移可以增强肿瘤特异性 T 细胞的抗肿瘤效应^[13]。对结直肠癌的研究发现, $\gamma\delta$ T17 细胞可通过分泌多种细胞因子如白细胞介素-17A 促进骨髓来源的抑制性细胞 (MDSCs) 的招募、增殖和存活,帮助维持肿瘤的免疫抑制微环境,促进肿瘤进展^[14]。胰腺癌组织浸润的 $\gamma\delta$ T 细胞通过抑制 $\alpha\beta$ T 细胞的活化促进胰腺癌的进展^[15]。本研究结果提示,肺癌患者癌组织中以 V δ 1 T 细胞亚群浸润为主,增高的 V δ 1 T 细胞与肺癌患者的淋巴结转移相关,表明癌组织中浸润的

V δ 1 T 细胞可能在促进肺癌的病程进展中发挥重要的作用。当然,有关 $\gamma\delta$ T 细胞及其亚群在肺癌组织中表达及与临床特征的关系还需要更大样本的研究, $\gamma\delta$ T 细胞及其亚群在肺癌肿瘤微环境中发挥的免疫功能及机制也值得进一步深入探讨。

4 结 论

深入研究 $\gamma\delta$ T 细胞及其亚群可能有助于判断肺癌患者的免疫状况及预后,有望为肺癌免疫检测与免疫治疗提供潜在的靶点。本文的研究显示,肺癌患者癌组织表达高水平的 V δ 1 T 细胞,且与淋巴结转移相关,可能有望成为肺癌免疫治疗的潜在靶点。

参考文献

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.

[2] FRYDRYCHOWICZ M, BORUCZKOWSKI M, KOLEC-KA-BEDNARCZYK A, et al. The dual role of treg in cancer[J]. Scand J Immunol, 2017, 86(6): 436-443.

[3] TAKEUCHI Y, NISHIKAWA H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity[J]. Int Immunol, 2016, 28(8): 401-409.

[4] TRAVIS W D, ASAMURA H, BANKIER A A, et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for coding t categories for subsolid nodules and assessment of tumor size in part-solid tumors in the forthcoming eighth edition of the tm classification of lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2016, 11(8): 1204-1223.

[5] ADAMS E J, GU S, LUOMA A M. Human gamma delta T cells: Evolution and ligand recognition[J]. Cell Immunol, 2015, 296(1): 31-40.

[6] 代玉梅, 凌雪莹, 李彦媚, 等. 妊娠糖尿病患者外周血 $\gamma\delta$ T 细胞的改变及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(18): 2497-2499.

[7] WU D, WU P, QIU F, et al. Human gammadelta T-cell

subsets and their involvement in tumor immunity[J]. Cell Mol Immunol, 2017, 14(3): 245-253.

[8] RÓNG L, LI K, LI R, et al. Analysis of tumor-infiltrating gamma delta T cells in rectal cancer[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(13): 3573-3580.

[9] MA C, ZHANG Q, YE J, et al. Tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer[J]. J Immunol, 2012, 189(10): 5029-5036.

[10] PENG G, WANG H Y, PENG W, et al. Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway[J]. Immunity, 2007, 27(2): 334-348.

[11] YE J, MA C, HSUEH E C, et al. Tumor-derived gammadelta regulatory T cells suppress innate and adaptive immunity through the induction of immunosenescence[J]. J Immunol, 2013, 190(5): 2403-2414.

[12] LU J, DAS M, KANJI S, et al. Induction of ATM/ATR pathway combined with Vgamma2 Vdelta2 T cells enhances cytotoxicity of ovarian cancer cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(7): 1071-1079.

[13] YE J, MA C, WANG F, et al. Specific recruitment of gammadelta regulatory T cells in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2013, 73(20): 6137-6148.

[14] WU P, WU D, NI C, et al. gammadeltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer[J]. Immunity, 2014, 40(5): 785-800.

[15] DALEY D, ZAMBIRINIS C P, SEIFERT L, et al. Gammadelta T cells support pancreatic oncogenesis by restraining alphabeta T cell activation[J]. Cell, 2016, 166(6): 1485-1499.

(收稿日期: 2019-04-03 修回日期: 2019-12-10)

(上接第 1290 页)

[14] 魏新素, 刘永太, 秦勇. 铜绿假单胞菌耐药机制的研究及新治疗策略[J]. 农垦医学, 2018, 40(4): 349-353.

[15] 税剑, 邹明祥, 王海晨, 等. 铜绿假单胞菌临床分离株生物膜、群体感应相关基因及耐药性分析[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(4): 254-257.

[16] 徐静静, 郭阳, 杨虹, 等. 葡萄糖对铜绿假单胞菌生物膜形成能力的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(1): 33-

35.

[17] 林萍, 赵雨璠, 吴悦, 等. 壳聚糖及其季铵盐对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响[J]. 检验医学, 2012, 27(10): 854-857.

[18] 王玉春. 泛耐药铜绿假单胞菌的感染现状及危险因素分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(9): 1168-1169.

(收稿日期: 2019-08-12 修回日期: 2019-12-29)