

## 结直肠癌患者外周血中淋巴细胞亚群的变化

李波

**[摘要]** 目的 探讨结直肠癌患者外周血中淋巴细胞亚群的表达变化及其与疾病发生发展的关系。方法 选取148例结直肠癌患者(结直肠癌组)和267例体检人员(对照组),采用流式细胞技术检测外周血中淋巴细胞亚群CD<sup>4+</sup>、CD<sup>8+</sup>、CD<sup>19+</sup>、CD<sup>25+</sup>、CD<sup>44+</sup>及CD<sup>56+</sup>等细胞计数比例,结合临床病理资料及随访数据进行分析。结果 结直肠癌组患者外周血中CD<sup>8+</sup>比例高于对照组,CD<sup>4+</sup>、CD<sup>19+</sup>、CD<sup>44+</sup>比例与CD<sup>4+</sup>/CD<sup>8+</sup>比值低于对照组,差异均有统计学意义( $t$ 分别=-3.72、2.44、4.50、2.17、2.32,  $P$ 均<0.05)。在结直肠癌组患者的亚组分析中,结直肠癌患者中CD<sup>8+</sup>、CD<sup>56+</sup>、CD<sup>8+</sup>/CD<sup>28+</sup>、CD<sup>4+</sup>/CD<sup>8+</sup>的变化与淋巴结转移和病理分期相关( $t$ 分别=-2.39、2.09、-3.08、2.67、-2.32、2.57、-2.73、2.34,  $P$ 均<0.05)。结论 结直肠癌患者外周血淋巴细胞亚群变化明显,患者的细胞免疫增强,而体液免疫和固有免疫受到抑制。

**[关键词]** 结直肠癌; 免疫状态; 淋巴细胞亚群

### Change of peripheral blood lymphocyte phenotypes subsets in patients with colorectal cancer LI Bo.

Department of Colorectal Surgery, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the relationship between the change of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with colorectal cancer and the influence on the disease development. **Methods** A total of 148 patients with colorectal cancer (CRC group) and 267 volunteers (control group) were selected to test the percentages of lymphocyte subsets distribution (CD<sup>4+</sup>, CD<sup>8+</sup>, CD<sup>19+</sup>, CD<sup>25+</sup>, CD<sup>44+</sup> and CD<sup>56+</sup>) by flow cytometry in peripheral blood. The clinical characteristics and follow-up data were combined to analyse with the outcome. **Results** The proportion of CD<sup>8+</sup> in the CRC group were significantly higher than the control group, whereas the CD<sup>4+</sup>, CD<sup>19+</sup>, CD<sup>44+</sup> and CD<sup>4+</sup>/CD<sup>8+</sup> were significantly lower ( $t$ =-3.72, 2.44, 4.50, 2.17, 2.32,  $P$ <0.05). In the subgroup analyzes of CRC patients, the change of CD<sup>8+</sup>, CD<sup>56+</sup>, CD<sup>8+</sup>/CD<sup>28+</sup>, and CD<sup>4+</sup>/CD<sup>8+</sup> were significantly related to lymph node metastasis and pathological stages ( $t$ =-2.39, 2.09, -3.08, 2.67, -2.32, 2.57, -2.73, 2.34,  $P$ <0.05). **Conclusion** The peripheral blood lymphocyte subsets in patients with colorectal cancer are changed. The cellular immunity is enhanced and the humoral immunity/inherent immunity is suppressed relatively.

**[Key words]** colorectal cancer; immune status; lymphocyte phenotypes

结直肠癌是我国常见的消化道恶性肿瘤之一,近年来发病率逐渐上升,严重危害人民大众健康。本次研究采用流式细胞检测技术,根据白细胞表面抗原分化群(clusters of differentiation, CD)对淋巴细胞亚群的分类来检测结直肠癌患者和体检人群外周血中的淋巴细胞亚群细胞分布情况,同时结合临床病理资料及随访数据进行分析,旨在探讨淋巴细胞亚群与结直肠癌发生发展的关系。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2005年9月至2010年9月浙江省肿瘤医院期间148例结直肠癌患者为结直肠癌组,其中男性87例、女性61例;年龄28~84岁,平均年龄(55.62±11.37)岁;分期采用2016版NCCN结直肠癌TNM标准对术后常规病理进行分期,其中浸润深度T1 2例、T2 17例、T3 110例、T4 19例;淋巴结转移N0 62例、N1 50例、N2 36例;远处转移阴性134例、阳性14例;病理分期I期11例、II期48例、III期75例、IV期14例。所有病例均由肠镜活检病理确诊为结直肠

腺癌,患者抽血检测前未被诊断为其他恶性肿瘤,未行放化疗等抗肿瘤治疗,排除严重感染性疾病或自身免疫性疾病。选择同期267例健康体检的成年人作为对照组,其中男性147例、女性120例;年龄36~81岁,平均年龄(53.9±28.32)岁。两组年龄、性别比较,差异均无统计学意义( $P$ 均>0.05)。

1.2 方法 被检者于清晨空腹抽静脉血2 ml,乙二胺四乙酸钾盐抗凝,获得标本后立即送检。采用FACS Calibur流式细胞仪(由美国Becton Dickinson公司生产)和配套的淋巴细胞亚群检测试剂盒(Smolest IMK-Lymphocyte),试剂盒中的双色荧光抗体为异硫氰酸荧光素和藻红蛋白标记的鼠抗人单克隆抗体(catalog No.340182)。试管内加相应单抗20 μl,加入待测血浆100 μl,混匀后室温避光30 min充分反应。加2 ml溶血素两次,震荡混匀,室温避光5 min,1200 r/min离心5 min,去上清后加磷酸盐缓冲液震荡混匀,1200 r/min离心5 min,倒去上清,加固定液300 μl震荡混匀待检测。

1.3 检测指标 采用System II系统软件进行数据处理。光路流路较准后再进行荧光补偿,最后行流式细胞仪分析检测各淋巴细胞亚型的比例。患者随访方式为门诊+电话随访,定义终点事件为死亡,自确诊日期开始计算总生存期,随访截止日期为2015年6月10日,失访者在生存分析中以最近一次随访日期作为截尾值处理。

1.4 统计学方法 采用SPSS 18.0统计学软件。计

量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。将各项淋巴细胞的检测结果按常规区间划分为降低、正常、升高三档,然后作为因变量纳入生存分析。计量资料组间比较采用 $t$ 检验;计数资料比较采用 $\chi^2$ 检验。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组淋巴细胞亚型检测结果见表1

表1 两组淋巴细胞各亚型的比较

淋巴细胞亚型	结直肠癌组	对照组
CD <sup>3+</sup> 总T淋巴细胞	67.71±10.43	66.48±10.58
CD <sup>4+</sup> 辅助T淋巴细胞	38.74±10.67*	41.34±10.23
CD <sup>8+</sup> 细胞毒T细胞	20.89±8.60*	17.85±6.67
CD <sup>4+</sup> /CD <sup>8+</sup> 比值	2.13±1.38*	62.75±1.62
CD <sup>19+</sup> B淋巴细胞	7.77±4.35*	79.66±3.96
CD <sup>25+</sup> 白介素2受体	25.80±8.51	27.30±8.02
CD <sup>44+</sup> 黏附分子	72.14±15.22*	75.24±13.14
CD <sup>56+</sup> 自然杀伤细胞	17.19±8.17	18.69±10.38

注:\*,与对照组比较, $P<0.05$ 。

由表1可见,结直肠癌组患者外周血中CD<sup>8+</sup>比例高于对照组,CD<sup>4+</sup>、CD<sup>19+</sup>、CD<sup>44+</sup>比例与CD<sup>4+</sup>/CD<sup>8+</sup>比值低于对照组,差异均有统计学意义( $t$ 分别=-3.72、2.44、4.50、2.17、2.32, $P$ 均<0.05)。结直肠癌组患者的CD<sup>3+</sup>总T淋巴细胞、CD<sup>25+</sup>白介素2受体和CD<sup>56+</sup>自然杀伤细胞与对照组比较,差异均无统计学意义( $t$ 分别=-1.14、1.79、0.72, $P$ 均>0.05)。

### 2.2 淋巴结转移状态和病理分期情况比较见表2

表2 淋巴结转移状态和病理分期情况的比较

淋巴细胞亚型	淋巴转移状态		病理分期	
	N 阴性	N 阳性	I+II期	III+IV期
CD <sup>8+</sup> 细胞毒T细胞	18.92±9.00	22.30±8.07	18.92±8.67	22.21±8.37
CD <sup>4+</sup> /CD <sup>8+</sup> 比值	2.86±2.16	2.04±1.31	2.82±2.11	2.09±1.41
CD <sup>8+</sup> /CD <sup>28-</sup> (Ts)	9.38±5.38	13.50±7.57	9.55±5.44	13.28±7.58
CD <sup>56+</sup> 自然杀伤细胞	26.36±11.92	21.90±9.13	27.03±11.74	21.64±9.17

由表2可见,结直肠癌患者中CD<sup>8+</sup>、CD<sup>56+</sup>、CD<sup>8+</sup>/CD<sup>28-</sup>、CD<sup>4+</sup>/CD<sup>8+</sup>的变化与淋巴结转移和病理分期相关( $t$ 分别=-2.39、2.09、-3.08、2.67、-2.32、2.57、-2.73、2.34, $P$ 均<0.05)。

2.3 生存分析 148例结直肠癌患者截止至末次随访时间,平均随访时间为(4.13±1.56)年,存活96人,死亡52人。多因素COX分析显示,淋巴结转移情况是患者预后的独立预测因子( $\chi^2=8.95$ , $P<0.05$ )。

## 3 讨论

淋巴细胞亚群分析是检测细胞和体液免疫功能的重要方法,反映机体当前的免疫状态,并可以辅助诊断某些疾病如自身免疫病、变态反应性疾病、恶性肿瘤等。目前认为在肿瘤免疫中的效应细胞主要包括T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞等,CD<sup>3+</sup>总T细胞分为CD<sup>4+</sup>辅助T细胞和CD<sup>8+</sup>细胞毒T细胞,B淋巴细胞的表面抗原原有CD<sup>19</sup>和CD<sup>20</sup>,

自然杀伤细胞的表面抗原包括CD<sup>16</sup>、CD<sup>56</sup>等,调节性T细胞表面抗原原有CD<sup>25</sup>(白介素2受体),而CD<sup>44</sup>为黏附分子。

在正常机体内,细胞免疫、体液免疫和固有免疫系统维持着相互间平衡的关系。肿瘤患者往往都伴有免疫功能的抑制或紊乱<sup>[1,2]</sup>。一般认为,肿瘤的免疫应答以细胞免疫为主,而CD<sup>8+</sup>细胞毒T细胞是负责杀伤肿瘤细胞的主要的效应细胞,既往许多研究观察到在肿瘤患者外周血中CD<sup>8+</sup>细胞比例升高,CD<sup>4+</sup>、CD<sup>4+</sup>/CD<sup>8+</sup>比值及CD<sup>19+</sup>下降的现象<sup>[3-5]</sup>。本次研究结果显示,结直肠癌组患者外周血中CD<sup>8+</sup>比例高于对照组,CD<sup>4+</sup>、CD<sup>19+</sup>、CD<sup>4+</sup>比例与CD<sup>4+</sup>/CD<sup>8+</sup>比值低于对照组( $P$ 均 $<0.05$ )。提示结直肠癌患者在细胞免疫方面出现强化,而CD<sup>4+</sup>辅助T淋巴细胞及其参与的体液免疫出现相对减弱,两者之间存在明显差异,相应的CD<sup>4+</sup>/CD<sup>8+</sup>比值减低( $P<0.05$ ),可以提示肿瘤患者普遍存在免疫抑制的情况,而不仅仅只是两种免疫系统在结构比例上的调整。

本次研究在结直肠癌患者亚组间比较的结果显示,结直肠癌患者中CD<sup>8+</sup>、CD<sup>56+</sup>、CD<sup>8+</sup>/CD<sup>28+</sup>、CD<sup>4+</sup>/CD<sup>8+</sup>的变化与淋巴结转移和病理分期相关( $P$ 均 $<0.05$ )。发现淋巴结转移阳性和病理分期晚的患者CD<sup>8+</sup>和CD<sup>8+</sup>/CD<sup>28+</sup>的比例出现明显上调,而CD<sup>56+</sup>和CD<sup>4+</sup>/CD<sup>8+</sup>的比例出现下降。CD<sup>8+</sup>细胞毒T细胞比例的进一步上升提示可能随着肿瘤的进展,肿瘤抗原的暴露机会增多,导致以CD<sup>8+</sup>为代表的细胞免疫系统进一步增强,这与Patel等<sup>[6]</sup>在宫颈癌中观察到的结果类似。而相应的,抑制性T细胞的增多和自然杀伤细胞的减少则提示肿瘤进展可能通过某些因素的调节使机体的非特异免疫出现抑制,肿瘤细胞可以通过免疫逃逸更容易出现进一步的扩散和进展,表现为淋巴转移的概率增加,患者的临床病理分期偏晚。本次研究的生存分析中显示,淋巴结转移情况是患者预后的独立预测因子( $P<0.05$ )。但未发现检测指标中淋巴细胞的任何一项亚型与患者预后相关。究其原因,

可能是由于淋巴细胞亚群的变化只能反映的患者瞬时的免疫状态,不能完全体现患者的整体情况以及后续治疗产生的影响,因此无法判断患者在经历不同诊疗后的预后情况。当然也有可能是因为结直肠癌患者预后较好,而本次研究的随访时间还不够长,需要进行更长时间的随访和观察。

综上所述,在结直肠癌发生发展的过程中,机体免疫状态调节肯定扮演了重要角色,淋巴细胞亚群的改变则能作为其表象被检测仪器所识别,但本次研究中的几种亚型还未能很好地体现其敏感性及其特异性。如何能找到准确评估分期及预后的标记物,尚有待于进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Lee JJ, Lin CL, Chen TH, et al. Changes in peripheral blood lymphocyte phenotypes distribution in patients with oral cancer/oral leukoplakia in Taiwan[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2010, 39(8): 806-814.
- 2 Jia Y, Xu L, Lin Q, et al. Levels of lymphocyte subsets in peripheral blood prior treatment are associated with aggressive breast cancer phenotypes or subtypes[J]. Med Oncol, 2014, 31(6):981.
- 3 Chen WK, Song M, Chen FJ, et al. Analysis of serum t-lymphocyte subsets and NK cell activity in patients with hypopharyngeal squamous cell carcinoma[J]. Chinese J Cancer, 2006, 25(10):1300-1302.
- 4 Cho Y, Miyamoto M, Kato K, et al. CD<sup>4+</sup> and CD<sup>8+</sup> T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2003, 63(7):1555-1559.
- 5 Das S, Karim S, Datta Ray C, et al. Peripheral blood lymphocyte subpopulations in patients with cervical cancer[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2007, 98(2):143-146.
- 6 Patel S, Chiplunkar S. Host immune responses to cervical cancer[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2009, 21(1):54-59.

(收稿日期 2016-07-26)

(本文编辑 蔡华波)