

• 临床检验研究论著 •

神经胶质瘤患者外周血淋巴细胞亚群检测的临床意义*

马学华¹, 张 莹¹, 滕 雷², 关秀茹¹, 崔兰英¹, 韩 伟³

(哈尔滨医科大学附属第一医院: 1. 检验科; 2. 神经外科; 3. 病理科, 黑龙江哈尔滨 150001)

摘要:目的 检测神经胶质瘤患者外周血淋巴细胞亚群及 CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞(Treg), 探讨其与胶质瘤发病的关系。方法 将 86 例神经胶质瘤患者作为胶质瘤组, 52 例健康体检者作为对照组。采用流式细胞术检测神经胶质瘤患者及健康人外周血中 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD3⁺HLA-DR⁺、CD3⁺T 淋巴细胞, CD3⁻CD19⁺B 淋巴细胞, CD3⁻CD16⁺56⁺自然杀伤细胞(NK)及 CD4⁺CD25⁺Treg 水平。结果 与对照组比较, 胶质瘤组患者外周血中 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺HLA-DR⁺及 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞百分比明显降低($P < 0.05$)。与低级别组比较, 高级别组胶质瘤患者外周血中上述 T 淋巴细胞百分比明显降低($P < 0.05$), CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞百分比升高($P < 0.05$)。与对照组相比, 胶质瘤患者外周血 CD3⁻CD19⁺B 淋巴细胞、CD3⁻CD16⁺56⁺NK 的百分比明显降低($P < 0.05$), CD4⁺CD25⁺Treg 百分比明显升高($P < 0.05$)。与低级别组比较, 高级别胶质瘤患者外周血 CD3⁻CD16⁺56⁺NK 百分比明显降低($P < 0.05$), CD4⁺CD25⁺Treg 百分比明显升高($P < 0.05$)。结论 淋巴细胞亚群的变化和 CD4⁺CD25⁺Treg 水平的升高与恶性肿瘤患者免疫功能低下及肿瘤的发生、发展密切相关。

关键词:神经胶质瘤; 流式细胞术; 淋巴细胞亚群; T 淋巴细胞, 调节

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.009

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)09-1080-03

Clinical significance of peripheral blood lymphocyte subsets detection in patients with glioma*

Ma Xuehua¹, Zhang Xuan¹, Teng Lei², Guan Xiuru¹, Cui Lanying¹, Han Wei³

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Neurosurgery; 3. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

Abstract: **Objective** To detect lymphocyte subsets and CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes(Treg) in peripheral blood from patients with glioma and investigate their relationship with glioma onset. **Methods** Eighty-six patients with glioma served as glioma group and fifty-two healthy people as control group. Flow cytometry was used to detect the levels of CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, CD3⁺T-lymphocytes and CD3⁻CD16⁺56⁺ natural killer cells(NK), as well as CD4⁺CD25⁺Treg in peripheral blood in patients with glioma and healthy people. **Results** Compared with control group, percentages of CD3⁺CD4⁺, CD3⁺HLA-DR⁺ and CD4⁺/CD8⁺T-lymphocytes in peripheral blood of patients in glioma group were decreased significantly($P < 0.05$). Percentages of T-lymphocytes above in high-grade glioma group were reduced markedly($P < 0.05$), while that of CD3⁺CD8⁺T-lymphocytes was increased($P < 0.05$) when compared with low-grade glioma group. Compared with control group, percentages of CD3⁻CD19⁺B-lymphocytes and CD3⁻CD16⁺56⁺NK in peripheral blood of patients in glioma group were decreased significantly($P < 0.05$), while that of CD4⁺CD25⁺Treg was increased($P < 0.05$). Percentage of CD3⁻CD16⁺56⁺NK in high-grade glioma group was reduced obviously($P < 0.05$), while that of CD4⁺CD25⁺Treg was increased significantly($P < 0.05$) when compared with low-grade glioma group. **Conclusion** Alteration of lymphocyte subsets and increasing level of CD4⁺CD25⁺Treg are closely related to immune dysfunction of patients with malignancy and tumor occurrence and development.

Key words: glioma; flow cytometry; lymphocyte subsets; T-lymphocytes, regulatory

神经胶质瘤是一种常见的神经系统肿瘤, 占神经系统原发性肿瘤的 50% 以上。美国癌症协会于 2001 年统计, 胶质瘤约占全年所有新发肿瘤的 1.4%, 病死人数占肿瘤总病死人数的 2.4%。胶质瘤级别越高, 患者生存期越短。恶性胶质瘤治疗后患者的平均生存期不足 1 年, 2 年生存率仅为 10%。神经胶质瘤呈侵袭性生长, 与正常脑组织无明显界限, 手术难以将其完全切除。同时, 胶质瘤又具有较高的增殖活性, 术后易复发。虽然近年来临床采用手术、放疗、化疗等常规治疗以及以基因和免疫治疗为主的新型生物疗法对胶质瘤进行治疗, 但其复发率及患者生存期并没有明显改善。因此, 目前神经胶质瘤仍然是预后很差的肿瘤之一。胶质瘤的发生与机体的免疫功能密切相关, 淋巴细胞亚群是其中最重要的指标之一, 各亚群的

比例变化与肿瘤的恶性程度及预后相关。1995 年 Sakaguchi 等^[1]发现 CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞(regulatory T lymphocyte, Treg)具有免疫抑制功能, 可能参与自身免疫性疾病及肿瘤的发生。研究表明, Treg 在肝癌、食管癌及肺癌等多种恶性肿瘤组织中以及肿瘤患者外周血液中的百分比明显增多^[2-4], 但 Treg 与神经胶质瘤的关系鲜见报道。本文采用流式细胞术分析不同分级胶质瘤患者外周血淋巴细胞亚群及 Treg 的比例, 以探讨其与肿瘤恶性程度的关系, 从而评估疾病状况, 并指导临床治疗。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2008 年 9 月至 2009 年 12 月于本院住院的神经胶质瘤患者 86 例作为胶质瘤组, 其中, 男 51 例, 女

* 基金项目: 黑龙江省教育厅基金资助项目(11521105)。作者简介: 马学华(1972~), 女, 硕士, 副主任技师, 主要从事肿瘤免疫的研究。

35 例; 年龄 32~83 岁, 中位(57.7±14.6)岁。将其按胶质瘤的恶性程度分为 2 组, 其中, 低级别组 57 例(WHO 分级为 II~III 级), 高级别组 29 例(WHO 分级为 IV 级)。所有病例均经组织病理学检查确诊。选择 52 例本院健康体检者作为对照组, 其中, 男 29 例, 女 23 例; 年龄 34~78 岁, 中位(56.5±10.3)岁。

1.2 仪器与试剂 主要仪器为 FACSCalibur 流式细胞仪, 购自美国 BD 公司。主要试剂为 SimulSET IMK Plus 试剂盒[包括 CD45-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)/CD14-PE、IgG1-FITC/IgG2a-PE、CD4-FITC/CD8-PE、CD3-FITC/CD19-PE、CD3-FITC/CD16⁺56-PE、CD3-FITC/HLA-DR-PE 6 种荧光抗体]及 CD4⁺CD25⁺Treg 试剂盒(包括 IgG1-FITC、IgG2a-PE、CD4-FITC、CD25-PE 荧光抗体)。

1.3 淋巴细胞亚群检测 (1)免疫荧光染色: 抽取待检患者清晨空腹静脉血 2 mL, 乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)-K2 抗凝, 6 个试管中分别加入 SimulSET IMK Plus 试剂盒 6 种荧光标记抗体 20 μL, 分别与 100 μL 全血混匀, 室温避光静置 20 min, 每个试管中加入 2 mL 红细胞裂解液, 混匀后室温避光反应 10 min, 离心 10 min(离心半径 14 cm, 1 000 r/min), 弃上清液, 磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤, 最后以 300 μL PBS 悬浮细胞。(2)流式细胞术分析: 首先用流式细胞仪 CaliBRITE 三色校准微球(美国 BD 公司), 通过 FACSComp 软件自动校准流式细胞仪, 调节激发光波长为 488 nm, 然后运行 SimulSET 软件, 获取细胞, 并分别报告淋巴细胞亚群的百分比。

1.4 CD4⁺CD25⁺Treg 检测 A 管中加入 IgG1-FITC、IgG2a-PE 各 20 μL, B 管中加入 CD4-FITC、CD25-PE 各 20 μL, 每管中加入 100 μL 全血, 混匀, 室温避光静置 20 min, 再加入 2 mL 红细胞裂解液, 混匀后室温避光反应 10 min, 离心 10 min(离

心半径 14 cm, 1 000 r/min), 弃上清液, PBS 洗涤, 以 300 μL PBS 悬浮细胞, 上机检测。

1.5 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质瘤患者及正常人外周血 T 淋巴细胞亚群的比较 与对照组比较, 胶质瘤患者外周血中 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞百分比、CD3⁺HLA-DR⁺活化 T 淋巴细胞及 CD4⁺/CD8⁺比值明显降低($P<0.05$), CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞有所升高, 但差异无统计学意义($P>0.05$), 见表 1。

2.2 不同分级胶质瘤患者外周血 T 淋巴细胞亚群的比较 与低级别组比较, 高级别组胶质瘤患者外周血中 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞百分比、CD4⁺/CD8⁺比值及 CD3⁺HLA-DR⁺活化 T 淋巴细胞百分比明显降低($P<0.05$), CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞百分比升高($P<0.05$), 见表 2。

2.3 胶质瘤患者及正常人外周血 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)及 CD4⁺CD25⁺Treg 的比较 与对照组相比, 胶质瘤患者外周血 CD3⁺T 淋巴细胞总数降低, 但差异无统计学意义($P>0.05$)。CD3⁻CD19⁺B 淋巴细胞、CD3⁻CD16⁺56⁺NK 的百分比明显降低($P<0.05$), CD4⁺CD25⁺Treg 百分比明显升高($P<0.05$), 见表 3。

2.4 不同分级胶质瘤患者外周血 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 及 CD4⁺CD25⁺Treg 的比较 与低级别组比较, 高级别胶质瘤患者外周血 CD3⁺T 淋巴细胞和 CD3⁻CD19⁺B 淋巴细胞百分比降低, 但差异无统计学意义($P>0.05$)。CD3⁻CD16⁺56⁺NK 百分比明显降低($P<0.05$), CD4⁺CD25⁺Treg 百分比明显升高($P<0.05$), 见表 4。

表 1 胶质瘤患者 T 淋巴细胞亚群百分比与对照组的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁺ HLA-DR ⁺
胶质瘤组	86	37.6±5.1 ^a	33.8±7.5 ^b	0.8±0.4 ^a	12.4±5.1 ^a
对照组	52	41.1±6.8	31.2±7.8	1.2±0.5	17.5±6.7

^a: $P<0.05$, ^b: $P>0.05$, 与对照组比较。

表 2 不同分级胶质瘤患者 T 淋巴细胞亚群百分比的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁺ HLA-DR ⁺
高级别组	57	35.4±5.2 ^a	34.5±7.2 ^a	0.7±0.4 ^a	11.4±4.8 ^a
低级别组	29	40.2±7.1	32.1±7.1	1.1±0.5	15.8±5.6

^a: $P<0.05$, 与低级别组比较。

表 3 胶质瘤患者 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 及 CD4⁺CD25⁺Treg 亚群百分比与对照组的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	CD3 ⁺ T 淋巴细胞	CD3 ⁻ CD19 ⁺ B 淋巴细胞	CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺ NK	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg
胶质瘤组	86	62.6±7.9 ^b	11.3±3.5 ^a	17.1±7.8 ^a	7.1±2.6 ^a
对照组	52	64.8±9.2	15.4±4.8	20.8±8.6	5.3±3.2

^a: $P<0.05$, ^b: $P>0.05$, 与对照组比较。

表 4 不同分级胶质瘤患者 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 及 CD4⁺CD25⁺Treg 亚群百分比的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	CD3 ⁺ T 淋巴细胞	CD3 ⁻ CD19 ⁺ B 淋巴细胞	CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺ NK	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg
高级别组	57	62.9±8.1 ^b	14.9±5.5 ^b	18.3±8.2 ^a	9.2±3.3 ^a
低级别组	29	63.1±8.6	15.8±5.1	21.9±9.1	6.1±2.9

^a: $P<0.05$, ^b: $P>0.05$, 与低级别组比较。

3 讨 论

神经胶质瘤发生的一个重要原因是患者细胞免疫或体液免疫功能失调。T 淋巴细胞是一种参与肿瘤免疫的重要细胞,包括 CD4⁺ 的辅助性 T 淋巴细胞(helper T lymphocyte, Th)和 CD8⁺ 的抑制/杀伤性 T 淋巴细胞。Th 活化后可分泌能够激活细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)、NK 和 B 淋巴细胞的细胞因子,促进这些细胞杀伤肿瘤的效应。CD8⁺ 可直接识别并杀伤肿瘤细胞,还可抑制 T、B 淋巴细胞活化,从而抑制机体的细胞免疫及体液免疫功能。CD4⁺ 和 CD8⁺ 淋巴细胞的相对稳定状态保证了机体的免疫平衡,二者比例的失衡会导致免疫功能失调^[5-7]。本研究中,胶质瘤患者 CD3⁺CD8⁺ 百分比升高,而 CD4⁺/CD8⁺ 比例显著降低,说明患者的免疫稳态破坏。CD3⁺HLA-DR⁺ 是 T 淋巴细胞活化的标志,胶质瘤组患者的该群细胞明显低于对照组,表明 T 淋巴细胞活化功能降低,使 T 淋巴细胞不能发挥辅助作用及杀伤效应,从而导致肿瘤的发生。胶质瘤患者的 B 淋巴细胞(CD3⁻CD19⁺ B 淋巴细胞)明显低于对照组,提示患者还存在体液免疫功能的失调。同时,随着胶质瘤恶性程度升高,患者外周血淋巴细胞亚群之间比例失调、免疫功能下降的趋势越来越明显。

CD4⁺CD25⁺Treg 存在于正常机体内,同时具有免疫无能和免疫抑制性,约占人类 CD4⁺ 细胞的 5%~10%,因此,具有独特的免疫调节作用。Treg 表达 CD4、CD25、细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 及叉头蛋白 3(forkhead box protein 3, FoxP3) 等^[1,8],可抑制机体的自身免疫反应和对外来异物的过度免疫反应,从而维持自身免疫耐受,阻止自身免疫性疾病的发生。近年来,研究发现 Treg 在移植免疫、肿瘤免疫等方面起着重要作用^[9-11]。Treg 受 T 淋巴细胞抗原受体介导的信号刺激活化后,分泌白细胞介素(interleukin, IL)-10、IL-4、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- β 等抑制性细胞因子,并通过细胞间直接接触来抑制 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞的增殖及活化。天然 Treg 是在胸腺髓质中发育的一个淋巴细胞亚群,在发育早期能够识别不同抗原,经胸腺选择发育后产生自身耐受性^[12],使机体对肿瘤免疫反应低下或无应答,导致了肿瘤的免疫逃逸。Treg 可抑制识别肿瘤细胞的肿瘤效应细胞的活化,因此,在介导机体肿瘤免疫耐受机制中起重要作用。本研究中,胶质瘤患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 比例增加,且与肿瘤的临床分期相关,IV 期患者外周血 Treg 水平高于 II~III 期患者,这提示肿瘤患者免疫功能失调与肿瘤患者外周血 Treg 比例增加有关,并且这种 Treg 介导的免疫耐受可能直接参与肿瘤的进展过程。

CD3⁺CD16⁺56⁺ NK 在杀伤突变细胞的早期起重要作用,通常肿瘤患者的 NK 功能降低。本研究结果表明,胶质瘤患者的 NK 水平低于对照组,而 CD4⁺CD25⁺Treg 水平升高。有学者将 K562 肿瘤细胞与 NK 共培养 4 h 后, K562 细胞溶解,说明 NK 可参与杀伤肿瘤细胞^[13],当 K562 肿瘤细胞与 NK 共培养前,将 NK 与 CD4⁺CD25⁺Treg 共培养 2 h, NK 介导的靶细胞的溶解作用显著降低。这表明, CD4⁺CD25⁺Treg 能够有效抑制 NK 介导的机体抗肿瘤作用。

以上结果表明,术前外周血淋巴细胞亚群及 CD4⁺CD25⁺Treg 检测可作为评估胶质瘤恶性程度的参考指标。CD4⁺CD25⁺Treg 水平的升高与恶性肿瘤患者免疫功能低下及肿瘤的发生、发展密切相关,去除这群细胞可能会有效诱导肿瘤免疫,为肿瘤患者提供一种新的治疗方法。

参考文献

- [1] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. *J Immunol*, 1995, 155(3): 1151-1164.
- [2] Feng X, Li B, Ye H, et al. Increased frequency of CD4⁺CD25⁺(high)FoxP3⁺ regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2011, 59(4): 309-314.
- [3] Xu T, Duan Q, Wang G, et al. CD4⁺CD25^{high} regulatory T cell numbers and FOXP3 mRNA expression in patients with advanced esophageal cancer before and after chemotherapy[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2011, 61(2): 389-392.
- [4] Karagöz B, Bilgi O, Gümüş M, et al. CD8⁺CD28⁻ cells and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of advanced stage lung cancer patients[J]. *Med Oncol*, 2010, 27(1): 29-33.
- [5] 陈莉, 吴丽娟, 胡宗海, 等. 消化系统肿瘤患者外周血 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞分析与临床意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(20): 2306-2307.
- [6] 熊彪, 邹尤宝. 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]. *国际检验医学杂志*, 2008, 29(10): 892-893.
- [7] 马学华, 张莹, 张娜, 等. 强直性脊柱炎患者外周血淋巴细胞亚群的检测及其临床意义[J]. *中国实验诊断学*, 2011, 15(10): 1765-1766.
- [8] Bach JF, Chatenoud L. Tolerance to islet autoantigens in type 1 diabetes[J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 131-161.
- [9] Afzali B, Mitchell PJ, Scott C, et al. Relative resistance of human CD4(+) memory T cells to suppression by CD4(+) CD25(+) regulatory T cells[J]. *Am J Transplant*, 2011, 11(8): 1734-1742.
- [10] Yamamoto T, Yanagimoto H, Satoi S, et al. Circulating CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2012, 41(3): 409-415.
- [11] Chen DY, Chen YM, Chen HH, et al. The associations of circulating CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells and TGF- β with disease activity and clinical course in patients with adult-onset Still's disease[J]. *Connect Tissue Res*, 2010, 51(5): 370-377.
- [12] Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, et al. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(11): 1032-1039.
- [13] Wolf AM, Wolf D, Steurer M, et al. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(2): 606-612.

(收稿日期: 2012-10-21)