

· 临床检验研究论著 ·

常见恶性肿瘤患者机体淋巴细胞亚群和活化 T 淋巴细胞的分析

施爱军¹, 吴晓柳^{2△}, 沈宗丽², 戴立玲²

(1. 如东县中医院检验科, 江苏如东 226400; 2. 江苏省肿瘤医院分子生物室, 江苏南京 210009)

摘要:目的 对比研究常见恶性肿瘤患者术前与术中淋巴细胞亚群及活性 T 淋巴细胞差异状况, 研究手术对恶性肿瘤患者淋巴细胞亚群及其活化的影响。方法 利用流式细胞仪测 42 例常见恶性肿瘤患者手术前、中的淋巴细胞亚群及其活性细胞。结果 恶性肿瘤患者术中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 较术前有所降低, CD3⁺ 与 CD4⁺ 淋巴细胞差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与 CD8⁺ 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。NK、CD19⁺、CD3⁺ HLA-DR⁺ 明显升高, NK 细胞与 CD19⁺ 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 与 CD3⁺ HLA-DR⁺ 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 恶性肿瘤患者细胞免疫功能处于抑制状态, 手术使恶性肿瘤患者的细胞免疫功能进一步损害。手术、创伤等的应激反应使 NK、CD19⁺、活性 T 淋巴细胞的表达上升。恶性肿瘤患者建议手术前使用免疫反应调节剂增强患者的细胞免疫功能, 以确保术后的放、化疗等后续治疗的效果。

关键词: 恶性肿瘤; 淋巴细胞亚群; 活性 T 淋巴细胞; 流式细胞仪

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.20.016

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)20-2758-02

Analysis of lymphocyte subsets and activated T lymphocyte in patients with common malignant tumors

Shi Aijun¹, Wu Xiaoliu^{2△}, Shen Zongli², Dai Liling²

(1. Department of Clinical Laboratory, Rudong County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Rudong, Jiangsu 226400, China; 2. Room of Molecular Biology, Jiangsu Provincial Tumor Hospital, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: Objective To comparatively study the difference status of lymphocyte subsets and activated T lymphocyte between preoperation and intraoperation, and to investigate the influence of operation on lymphocyte subsets and their activation in the patients with malignant tumors. Methods The lymphocyte subsets and their activated cells were determined in 42 cases of common malignant tumors by the flow cytometry. Results The levels of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ cells during intraoperation were obviously decreased compared with preoperation, the difference in CD3⁺ and CD4⁺ had statistical significance ($P < 0.05$), while the difference of CD8⁺ had no statistical significance ($P > 0.05$). NK, CD19⁺, CD3⁺ HLA-DR⁺ were significantly increased, the difference of NK and CD19⁺ had no statistical significance ($P > 0.05$), while the difference with CD3⁺ HLA-DR⁺ had statistical significance ($P < 0.05$). Conclusion The cellular immune function in the patients with malignant tumor is in inhibitory status. Operation makes the cellular immune function to be further injured. The stress responses of operation and trauma increase the expression of NK, CD19 and activated T lymphocytes. It is suggested that the patients with malignant tumor should use the immune response modifier before operation to enhance the cellular immune function for ensuring the effect of postoperative radiochemotherapy sequential treatment.

Key words: malignant tumor; lymphocyte subsets; activated T lymphocyte; flow cytometry

食道癌和肺癌是人体最常见的恶性肿瘤, 和其他恶性肿瘤一样, 常常伴有免疫功能障碍, 随着肿瘤发展逐渐加重, 这种免疫功能障碍常常以细胞免疫为主。手术和创伤一般能引起免疫功能的抑制, 对肿瘤患者的免疫功能造成进一步的损害, 进而影响到术后的放、化疗等后续治疗。本研究通过检测食道癌和肺癌患者手术前和手术中淋巴细胞亚群和活性 T 淋巴细胞的变化, 观察手术对患者免疫功能的影响, 为临床免疫治疗提供有价值的参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 常见恶性肿瘤患者 42 例, 均经病理学确诊, 其中男性 25 例, 女性 17 例, 年龄 43~74 岁, 平均 58.56 岁。其中食管癌 21 例, 肺癌 18 例, 其他恶性肿瘤 3 例, 检测淋巴细胞亚群前均未经治疗。

1.2 仪器与试剂 选取 42 例未经免疫治疗的恶性肿瘤患者, 手术前和术中分别采血, 用 EDTA-2Na 抗凝送检, 本研究所用单克隆抗体试剂 (包括 CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PCY5、CD3-FITC/CD(16+56)-PE、CD19-FITC、CD3-FITC/HLA-DR-PE)

均购自美国 Coulter 公司。流式细胞仪由美国 Beckman Coulter 公司提供, 型号为 FC500。

1.3 方法 表型标记 100 μ L EDTA 抗凝全血加 20 μ L 荧光标记单克隆抗体, 室温孵育 15 min, 溶血洗涤 2 遍, 待测。流式细胞仪分析用 Flow-check 进行光路-流路校准, 每个样本检测 10 000 个细胞, 采用散射光 (FSC/SSC) 阈值设门, 圈出淋巴细胞, 再进一步分析淋巴细胞上的各种表型, 并同时检测活性 T 淋巴细胞。全部数据由流式细胞仪及软件 CXP 获取和分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计分析软件, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 分析采用 t 检验和方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

恶性肿瘤患者术前与术中淋巴细胞亚群和活性 T 淋巴细胞检测结果见表 1。结果表明, 恶性肿瘤患者术中 CD3⁺、CD4⁺ T 淋巴细胞比例较术前明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), CD3⁺ HLA-DR⁺ T 淋巴细胞比例明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 恶性肿瘤患者术前与术中淋巴细胞亚群与活性 T 淋巴细胞的比较(±s)

分组	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (%)	NK(%)	CD19 ⁺ (%)	CD3 ⁺ HLA-DR ⁺
术前	69.48±7.68*	39.04±9.73*	25.58±9.47	1.71±0.99	15.56±6.93	7.59±3.81	0.65±0.69*
术中	59.67±9.45	31.63±10.31	23.68±8.38	12.63±1.22	18.49±7.48	9.73±6.14	1.15±1.00

*: P<0.05, 与术中比较。

3 讨 论

外周血淋巴细胞表型的检测,常用组织染色法,或用 Ficoll-Hypaque 分离后再用流式细胞仪检测,本文参考流式细胞仪检测淋巴细胞分型的设门要求和办法,在检测中应用 FSC-SSC 进行设门,可直接检测外周血中淋巴细胞表型的表达,排除外周血中其他细胞对检测结果的影响,具有方便、直接、准确的优点。

本研究表明,食道癌和肺癌患者术中 CD3⁺、CD4⁺ T 淋巴细胞与术前相比均明显降低,差异有统计学意义(P<0.05)。与术前相比,NK、CD19⁺、CD3⁺HLA-DR⁺ T 淋巴细胞均显著增加,其中 CD3⁺HLA-DR⁺ T 淋巴细胞的差异有统计学意义(P<0.05)。

淋巴细胞是机体免疫系统中的一群重要细胞,是参与免疫调节和执行细胞免疫功能的免疫活性细胞,主要分为 T 淋巴细胞、B 细胞和 NK 细胞三大类,该三类细胞群中,均有各自功能不同亚群及活化细胞。当 T 淋巴细胞、B 细胞、NK 细胞及其亚群任意一种细胞的数量和功能发生异常时,就可能导致机体免疫功能紊乱并发生一系列的病理变化。T 细胞亚群是抗肿瘤免疫中重要的一类淋巴细胞^[1],主要包括 CD4⁺ T 细胞与 CD8⁺ T 细胞。CD4⁺ T 细胞作为辅助性 T 细胞能产生淋巴因子,增强 CD8⁺ T 细胞杀伤肿瘤细胞功能,具有辅助细胞免疫和体液免疫应答作用,CD8⁺ T 细胞作为抑制性 T 细胞和细胞毒性 T 细胞,是重要的效应细胞,两者之间的平衡维持着机体正常的免疫应答^[2-3],Ma 等^[4]研究认为免疫力低下的人群肿瘤发生率高,恶性肿瘤发生后又能产生免疫抑制因子抑制宿主的免疫功能^[5]。麻醉方法、麻醉药物和手术都参与了体内的免疫应答反应,钱卫等^[6]的研究表明,麻醉和手术明显抑制细胞免疫。本研究表明,术中细胞免疫受到的抑制明显,和文献报道相一致,CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞所占比例均低于术前,手术可导致机体短暂的免疫抑制,由于手术创伤导致的免疫应答反应,包括急性期免疫反应和抑制 IL-2 的产生^[7],说明恶性肿瘤患者在免疫已经受到抑制的情况下,经过手术的创伤和打击,免疫功能受到进一步的损害。B 细胞在受到手术等外界刺激后,经活化、增殖、分化以及伴随的体细胞突变和亲和力成熟过程,产生高亲和力抗体,故表现为增高。NK 细胞自身分泌的 IFN-γ、IFN-β 和 GM-CSF 等细胞因子参与机体的免疫功能调节,但同时说明手术中主要是细胞免疫受到明显抑制。HLA-DR 属于主要组织相容复合体 MHC II 类分子,由 α 和 β 两条重链通过非共价键连接,是免疫反应中重要的参与者,该抗原主要表达于活化 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和活化的 NK 细胞等,是淋巴细胞活化的晚期标志^[8]。活化的 T 淋巴细胞 CD3⁺HLA-DR⁺ 与一些疾病免疫状态的关系较为密切。T 淋巴细胞活化常常发生在因感染、抑制免疫排斥反应等导致的机体免疫活化状态。活化的 T 细胞通过上调其表面多种分子,增强 T/B 细胞的相互作用,传递 B 细胞活化和分化所需要的协同刺激信号,促进 B 细胞进一步分化为浆细胞并产生抗体。另一方面,活化的 Th 细胞通过分泌细胞因子参与抗体的

类别转换,对 B 细胞免疫应答起调节作用^[9]。HLA II 类抗原受控于 DP、DQ、DR 位点,分布于 B 淋巴细胞、巨噬细胞和活化的 T 淋巴细胞表面,将外源性抗原肽递呈 CD4⁺ T 淋巴细胞,手术过程中,细胞免疫受到抑制,活化 T 淋巴细胞受到手术等应激的刺激,反应性的增高以增强细胞免疫,调节机体的免疫平衡。故有较明显的增高,其与术后治疗的关系还有待进一步的研究,但也提示可与免疫功能联合检测用来监视患者术后的免疫功能。胡伯年等^[10]的研究表明恶性肿瘤患者术后一个月细胞免疫功能恢复正常。本研究提示恶性肿瘤患者手术治疗前应辅以免疫治疗,尽可能调节患者的免疫功能,减少手术给患者造成的免疫抑制,缩短恶性肿瘤患者术后细胞免疫功能恢复时间,以确保术后放、化疗的效果。术后也应积极给予免疫反应调节剂,减轻手术创伤对细胞免疫功能的抑制,防止肿瘤细胞的扩散与转移。

参考文献

- [1] Winter H, van den Engel NK, Ruttinger D, et al. Therapeutic T cells induce tumor-directed chemotaxis of innate immune cells through tumor-specific secretion of chemokines and stimulation of B16BL6 melanoma to secrete chemokines [J]. J Transl Med, 2007, 5(1): 56.
- [2] 韩晓红, 石远凯, 冯奉仪, 等. 流式细胞术肿瘤患者免疫功能变化 [J]. 实用肿瘤杂志, 1999, 14(5): 273-275.
- [3] 张宏伟, 吴昊. 外周血 T 细胞研究进展 [J]. 北京医学, 2006, 28(2): 108-109.
- [4] Ma D, Gu MJ. Immune effect of tumor-infiltrating lymphocytes and its relation to the survival of patients with ovarian malignancies [J]. J Tongji Med Univ, 1991, 11(4): 235.
- [5] Maehara Y, Tomisaki S, Oda S, et al. Lymph node metastasis and relation to tumor-growth potential and local immune response in advanced gastric cancer [J]. Cancer, 1997, 74(2): 224.
- [6] 钱卫, 黄冰, 潘灵辉, 等. 单肺通气麻醉对胸科术后患者免疫功能的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2008, 25(6): 872-874.
- [7] Stsnojevic-Bakic N, Vuckovic-Dekic L, Radomirovic S, et al. Influence of surgery and anesthesia on lymphocyte functions in breast cancer patients: in vitro effects of indomethacin [J]. Neoplasms, 1999, 46(1): 54-60.
- [8] Reddy M, Eirikis E, Davis C, et al. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mono-nuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function [J]. J Immunol Methods, 2004, 293(2): 127-142.
- [9] 刘芝翠, 王树军, 曾维宏, 等. T 细胞活化促进 B 细胞产生抗体机制的研究 [J]. 现代免疫学, 2012, 32(6): 450-456.
- [10] 胡伯年, 陈巍, 詹乾江, 等. 恶性肿瘤手术对机体淋巴细胞亚群的影响 [J]. 中国肿瘤临床与康复, 2001, 6(2): 35-36.

(收稿日期: 2014-05-11)