

• 论 著 •

乳腺癌患者围术期活化细胞毒性 T 细胞百分率的动态变化及临床意义

杨月香¹, 朱晴晖^{2△}, 冯艳玲¹

(1. 上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心病理科 201508; 2. 上海市普陀区人民医院检验科 200060)

摘要:目的 观察乳腺癌患者围术期活化细胞毒性 T 细胞(CTL)百分率的动态变化,探讨乳腺癌患者外周血活化 CTL 检测在乳腺癌患者围术期病情监测中的价值。方法 采用流式细胞术,以前向散射光和侧向散射光信号参数界定全血标本中的淋巴细胞,用 CD3-FITC、CD8-APC、CD38-PE 单克隆抗体分别检测淋巴细胞表面 CD3、CD8、CD38 抗原。所建方法分别对 33 例乳腺癌患者和 20 例健康志愿者的总 T 细胞(CD3⁺)和 CTL(CD3⁺CD8⁺)中活化 CTL(CD3⁺CD8⁺CD38⁺)的百分率进行检测,确定参考范围,并观察 33 例乳腺癌患者围术期总 T 细胞和 CTL 中 CD3⁺CD8⁺CD38⁺ 细胞百分率的动态变化。结果 健康人群 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺ 和 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺CD8⁺ 的百分率分别为(13.46±4.08)%和(29.98±9.11)%。33 例乳腺癌患者术前 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺[(10.44±6.61)%]和 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺CD8⁺[(22.34±10.68)%]均显著低于健康人群($P<0.05$);术后第 1 天 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺[(9.64±6.16)%]明显低于术前($P<0.01$);术后第 7 天 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺[(12.67±7.73)%]和 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺CD8⁺[(27.42±10.65)%]均明显高于术前($P<0.05$);与健康对照差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 观察乳腺癌患者围术期 CD3⁺CD8⁺CD38⁺ 细胞百分率的动态变化在乳腺癌围术期病情监测中有重要意义,有助于及时获知患者体内活化 CTL 恢复情况,利于患者选择合适的化疗时机。

关键词:乳腺癌; 淋巴细胞亚群; 活化杀伤性 T 淋巴细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.05.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)05-0579-03

Dynamic change of activated cytotoxic T cells percentage during perioperative period in patients with breast cancer and its clinical significance

YANG Yuexiang¹, ZHU Qinghui^{2△}, FENG Yanling¹

(1. Department of Pathology, Affiliated Shanghai Municipal Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China; 2. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Putuo District, Shanghai 200060, China)

Abstract: Objective To observe the dynamic change of activated cytotoxic T lymphocyte(CTL) percentage during perioperative period in the patients with breast cancer and to explore the value of detecting the peripheral blood activated CTL in monitoring the perioperative condition of breast cancer patients. **Methods** The lymphocytes in whole blood were defined by forward scatter and side scatter (FSC/SSC) signal parameters by adopting flow cytometry (FCM), the CD3, CD8 and CD38 antigens on lymphocyte surface were detected by CD3-FITC, CD8-APC and CD38-PE monoclonal antibody, respectively. The CD3⁺CD8⁺CD38⁺ percentage in 20 healthy people were detected with the established method to determine the reference ranges, and the dynamic changes of CD3⁺CD8⁺CD38⁺ cells percentage in total T cells and cytotoxic T cells of 33 patients with breast cancer during perioperative period were observed. **Results** The percentages of CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺ and CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺CD8⁺ in healthy group were (13.46±4.08)% and (29.98±9.11)%, respectively. Both the CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺[(10.44±6.61)%] and CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺CD8⁺[(22.34±10.68)%] before operation in 33 patients with breast cancer were significantly lower than those in healthy group ($P<0.05$); CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺[(9.64±6.16)%] on postoperative 1 d was significantly lower than that in preoperation ($P<0.01$); CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺[(12.67±7.73)%] and CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺CD8⁺[(27.42±10.65)%] on postoperative 7 d were significantly higher than those in preoperation ($P<0.05$), the difference with the healthy control had no statistical significance($P>0.05$). **Conclusion** Observing the dynamic change of CD3⁺CD8⁺CD38⁺ cells percentage has an important significance for monitoring the perioperative condition of the patients with breast cancer, contributing to get the activated CTL recovery situation of the patients and to choose the correct chemotherapy occasion for the patients.

Key words: breast cancer; lymphocyte subsets; activated cytotoxic T lymphocyte

T 淋巴细胞(简称 T 细胞)来源于骨髓中的淋巴样干细胞,在胸腺中发育成熟。T 细胞具有高度的异质性,根据其表面标志和功能特征, T 细胞主要分为 CD4⁺ 和 CD8⁺ 两大亚群,各亚群之间相互调节,共同发挥其免疫学功能。成熟的 T 细胞一般只表达 CD4 或 CD8 分子,即 CD4⁺ T 细胞或 CD8⁺ T 细胞^[1]。CD8⁺ T 细胞主要是细胞毒性 T 细胞(CTL),可特异性地直接杀伤靶细胞,其分泌的颗粒溶解素进入靶细胞,可直接

溶解肿瘤细胞或杀灭靶细胞内的病原体^[2]。在机体免疫系统的抗肿瘤免疫机制中,细胞免疫发挥着抗肿瘤的主导作用^[3], CTL 是抗肿瘤免疫功能的主要执行者。CD38 是 CD8⁺ CTL 活化的标志^[4],而 CTL 的活化是抗肿瘤免疫的必要前提。本研究纳入了乳腺癌患者 33 例和作为对照的健康者 20 例,观察了乳腺癌患者围术期 CD3⁺CD8⁺CD38⁺ 细胞百分率的动态变化,旨在探讨乳腺癌患者活化 CTL 检测在乳腺癌围术期病情

监测中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2010 年 11 月至 2014 年 10 月上海市普陀区人民医院术后病理学确诊的乳腺癌患者 33 例纳入本研究(患者组),女 32 例、男 1 例,年龄 35~88 岁,平均 50 岁,术前均未进行放化疗,同时排除自身免疫性疾病、免疫缺陷病、肝肾疾患、复发乳腺癌、糖尿病等。另外,选取健康志愿者 20 例作为对照组,女 17 例、男 3 例,年龄 27~71 岁,平均 45 岁。患者组与对照组在年龄、性别方面比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 仪器和试剂

1.2.1 主要仪器 美国 BD 公司 FACS Calibur 流式细胞仪、离心机等。

1.2.2 主要试剂 (1)流式细胞仪检测使用的抗体:荧光素标记的单克隆抗体(McAb)、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 CD3 抗体(抗 CD3-FITC)、别藻青蛋白(APC)标记的 CD8 抗体(抗 CD8-APC)、藻红蛋白(PE)标记的 CD38 抗体(抗 CD38-PE) IgG1 型;同型对照,mouse IgG1-PE。(2)溶血素为 BD 公司产品;(3)磷酸盐缓冲液(PBS)为 BD 公司产品。

1.3 方法 采集静脉血 2 mL,用乙二胺四乙酸二钾(EDTA- K_2)抗凝,吸全血 1 mL 于 1 支离心管,向其中加入磷酸盐缓冲液(PBS) 1 mL,涡旋使其混匀后离心 5 min(3 000 r/min),弃上清。另取两支 Falcon 管并向其中加入荧光素标记的 McAb:测定管加入抗 CD3-FITC、抗 CD8-APC 和抗 CD38-PE 各 5 μ L,对照管加入抗 CD3-FITC、抗 CD8-APC 和 IgG1-PE 各 5 μ L;向两管中加入全血 50 μ L,室温避光温育 30 min,加入溶血剂 500 μ L,室温避光温育 10 min 继离心 5 min,弃上清,加入 PBS 500 μ L 混匀离心 5 min;弃上清加入 PBS 500 μ L 重洗一遍,弃上清加入 PBS 300 μ L 重悬,上流式细胞仪检测。利用侧向散射光(SS)和前向散射光(FS)选取细胞群检测细胞表面 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺、CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺CD38⁺。数据经 Cell Quest 软件获取和分析,每个样本每次检测 10 000 个细胞。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20 进行数据处理,测得的 T 细胞亚群百分率以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术前活化 CTL 百分率的比较 乳腺癌患者术前活化 CTL(CD3⁺CD8⁺CD38⁺) 在淋巴细胞(CD3⁺) 和 CTL(CD3⁺CD8⁺) 中的百分率均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 乳腺癌患者术前活化 CTL 百分率与对照组的比较			
组别	<i>n</i>	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD38 ⁺ / CD3 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD38 ⁺ / CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)
患者组	33	10.44±6.61*	22.34±10.68*
对照组	20	13.46±4.08	29.98±9.11

注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。

2.2 乳腺癌患者围术期活化 CTL 百分率的变化 乳腺癌患者术前、术后第 1 天、术后第 7 天的 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺(%) 分别为 (10.44±6.61)%、(9.64±6.17)%、(12.67±7.73)%,CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺CD8⁺(%) 分别为 (22.34±10.68)%、(22.10±9.41)%、(27.42±10.65)%。乳腺癌患者

术后第 1 天 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺(%) 显著低于术前($P<0.05$),术后第 7 天较术后第 1 天明显上升($P<0.01$)且显著高于术前($P<0.05$);乳腺癌患者术后第 1 天 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺CD8⁺(%) 与术前比较差异无统计学意义,术后第 7 天较术后第 1 天明显上升($P<0.01$)且显著高于术前($P<0.01$)。术后第 7 天患者 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺(%) 和 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺CD8⁺(%) 与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

CD38 分子是单链 II 型跨膜糖蛋白^[5],广泛表达于造血细胞及非造血细胞系,具有许多复杂而又独特的生物学特性及功能^[6]。临床研究发现 CD38 分子是慢性 B 淋巴细胞白血病的预测因子^[7],已用于监测肾移植后巨细胞病毒感染^[8]和系统性红斑狼疮的病情^[9],并可作为反映艾滋病患者病情进展^[10]、EB 病毒相关肝炎^[11]和疱疹病毒感染^[12]疗效的监测指标。

在机体免疫系统的抗肿瘤免疫机制中,细胞免疫发挥着主导作用^[13],其中 T 细胞参与的免疫应答在杀伤肿瘤细胞中的作用尤为关键^[14],CTL 为 CD8⁺T 细胞,是免疫应答的主要效应细胞之一,可特异性杀伤靶细胞,在肿瘤免疫和抗病毒感染的免疫中发挥重要作用^[3,15],CTL 活化以 CD38 为标志,观察其活化对肿瘤治疗有重要意义。

本研究显示,乳腺癌患者术前 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺(%) 和 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺CD8⁺(%) 均明显低于对照组,提示个体由于活化 CTL 的数量不足,导致肿瘤的“免疫逃逸”,可能与乳腺癌的发生相关;乳腺癌患者围术期 CD3⁺CD8⁺CD38⁺ 细胞呈现如下规律:术后第 1 天 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺ 明显低于术前,术后第 1 天后 CD3⁺CD8⁺CD38⁺ 细胞百分率上升,术后第 7 天 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺、CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺CD8⁺ 百分比术前明显增高,且与健康对照差异无统计学意义。乳腺癌患者围术期 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺(%) 和 CD3⁺CD8⁺CD38⁺/CD3⁺CD8⁺(%) 的变化提示:(1)手术治疗使机体产生应激反应,机体的免疫活性细胞的数量下降,导致活化 CTL 百分率下降;(2)随患者术后机体的恢复,其免疫活性细胞数量逐步恢复,活化 CTL 百分率也在上升,于术后第 7 天恢复到健康对照的水平,这可能与患者藉手术脱离荷瘤状态后,解除了肿瘤对其免疫功能的抑制有关。

术后化疗是乳腺癌患者治疗的重要组成部分,对患者而言,选择合适的化疗时机至关重要^[16],如果患者在术后免疫活性细胞数量尚未恢复时化疗,会对其免疫系统发挥免疫监视和免疫杀伤功能产生极为不利的影响,不利于患者术后恢复^[17]。对乳腺癌患者术前和术后动态监测 CD3⁺CD8⁺CD38⁺ 百分率可以及时获知活化 CTL 的恢复情况,为患者选择合适的化疗时间点提供有益的参考,避免化疗对机体免疫系统的过度损伤。

综上所述,术前和术后动态监测乳腺癌患者的活化 CTL 百分率,有助于患者术后选择个性化的治疗方案。

参考文献

[1] Canavan JB, Afzali B, Scottà C, et al. A rapid diagnostic test for human regulatory T-cell function to enable regulatory T-cell therapy[J]. Blood, 2012, 119(8): e57-e66.
[2] Müller I, Altherr D, Eyrich M, et al. Tumor antigen-specific T cells for immune monitoring of dendritic cell-trea-

- ted glioblastoma patients[J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(9): 1146-1161.
- [3] 周光炎. 免疫学原理[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2007:279-282.
- [4] Malavasi F, Funaro A, Roggero S, et al. Human CD38: a glycoprotein in search of a function[J]. *Immunol Today*, 1994, 15(3):95-97.
- [5] Zhao YJ, Zhu WJ, Wang XW, et al. Determinants of the membrane orientation of a Calcium signaling enzyme CD38[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853(9): 2095-2103.
- [6] Mehta K, Shahid U, Malavasi F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions[J]. *FASEB J*, 1996, 10(12):1408-1417.
- [7] Hartman WR, Pellemounter LL, Moon I, et al. CD38 expression, function, and gene resequencing in a human lymphoblastoid cell line-based model system[J]. *Leuk Lymphoma*, 2010, 51(7):1315-1325.
- [8] 费继光, 吴培根, 陈立中, 等. 测定 CD38⁺ CD8⁺ T 淋巴细胞在监测肾移植后巨细胞病毒感染中的作用[J]. *中华肾脏病杂志*, 2002, 18(4):251-253.
- [9] Pavon EJ, Zumaquero E, Rosal-Vela A, et al. Increased CD38 expression in T cells and circulating anti-CD38 IgG autoantibodies differentially correlate with distinct cytokine profiles and disease activity in systemic lupus erythematosus patients[J]. *Cytokine*, 2013, 62(2):232-243.
- [10] Dentone C, Fenoglio D, Schenone E, et al. Increased CD38 expression on T lymphocytes as a marker of HIV dissemination into the central nervous system[J]. *HIV Clin Trials*, 2015, 16(5):190-196.
- [11] Petrova M, Muhtarova M, Nikolova M, et al. Chronic Epstein-Barr virus-related hepatitis in immunocompetent patients[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(35): 5711-5716.
- [12] Rollenhagen C, Lathrop MJ, Macura SL, et al. Herpes simplex virus type-2 stimulates HIV-1 replication in cervical tissues: implications for HIV-1 transmission and efficacy of anti-HIV-1 microbicides[J]. *Mucosal Immunol*, 2014, 7(5):1165-1174.
- [13] Qiu Y, Xu MB, Yun MM, et al. Hepatocellular carcinoma-specific immunotherapy with synthesized α 1,3- galactosyl epitope-pulsed dendritic cells and cytokine-induced killer cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(48): 5260-5266.
- [14] O'hara GA, Welten SP, Klenerman P, et al. Memory T cell inflation: understanding cause and effect[J]. *Trends Immunol*, 2012, 33(2):84-90.
- [15] Chu HH, Chan SW, Gosling JP, et al. Continuous effector CD8⁺ T cell production in a controlled persistent infection is sustained by a proliferative intermediate population [J]. *Immunity*, 2016, 45(1):159-171.
- [16] Japp AS, Kursunel MA, Meier S, et al. Dysfunction of PSA-specific CD8⁺ T cells in prostate cancer patients correlates with CD38 and Tim-3 expression[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2015, 64(11):1487-1494.
- [17] 黄义文, 黄芝华, 胡炳强. 乳腺癌手术治疗和术后放疗化疗后局部复发及防治分析[J]. *实用癌症杂志*, 2001, 16(6): 658-659.

(收稿日期:2016-09-02 修回日期:2016-10-24)

(上接第 578 页)

- al. The influence of changing host immunity on 1918-19 pandemic dynamics[J]. *Epidemics*, 2014, 8(1):18-27.
- [2] Quinn SC, Kumar S. Health inequalities and infectious disease epidemics: a challenge for global health security [J]. *Bio Secur Bioterror*, 2014, 12(5):263-273.
- [3] 王路, 刘旻, 程江. 新疆石河子地区上半年呼吸道感染病原体的 IgM 抗体检测结果分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(7):895-896.
- [4] 荀春华, 张贤敏, 高志亮, 等. 九江地区 1672 例呼吸道感染患者呼吸道病原体的 IgM 的检测和分析[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(3):391-393.
- [5] 丁伟, 李雪梅, 谭洪波, 等. 1197 例患者呼吸道感染病原体 IgM 检测结果分析[J]. *检验医学与临床*, 2016, 13(6): 724-726.
- [6] Polverino E, Torres a. diagnostic strategies for healthcare-associated pneumonia[J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2009, 30(1):36-45.
- [7] Nutter S, Cheung M, Adler-Shohet FC, et al. Evaluation of indirect fluorescent antibody assays compared to rapid influenza diagnostic tests for the detection of pandemic influenza A (H1N1) pdm09 [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33097.
- [8] Chang HY, Chang LY, Shao PL, et al. Comparison of real-time polymerase chain reaction and serological tests for the confirmation of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children with clinical diagnosis of atypical pneumonia[J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2014, 47(2):137-144.
- [9] Cannon GA, Carr MJ, Yandle Z, et al. A low density oligonucleotide microarray for the detection of viral and atypical bacterial respiratory pathogens[J]. *J Virol Methods*, 2010, 163(1):17-24.
- [10] Lee I, Barton TD. Viral respiratory tract infections in transplant patients-Epidemiology, recognition and management[J]. *Drugs*, 2007, 67(10):1411-1427.
- [11] Amin AN, Cerceo EA, Deitelzweig SB, et al. The hospitalist perspective on treatment of Community-Acquired bacterial pneumonia[J]. *Postgrad Med*, 2014, 126(2):18-29.
- [12] Kim CK, Choi J, Callaway Z, et al. Clinical and epidemiological comparison of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in Seoul, Korea, 2003-2008[J]. *J Korean Med Sci*, 2010, 25(3):342-347.

(收稿日期:2016-09-04 修回日期:2016-10-26)