

• 论 著 •

外周血乳酸及细胞毒性 T 淋巴细胞在口腔鳞状细胞癌中的临床应用研究*

赵 红¹, 冯芝恩², 李德龙², 段立莉¹, 栗景蕊^{1△}

首都医科大学附属北京口腔医院: 1. 检验科; 2. 口腔颌面-头颈肿瘤科, 北京 100050

摘要:目的 探讨外周血乳酸(LA)和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)水平在口腔鳞状细胞癌(简称鳞癌)发生、发展中的意义。方法 选取 2018 年 11 月至 2020 年 9 月在北京口腔医院住院的口腔鳞癌患者 50 例(I~II 期 25 例, III~IV 期 25 例)作为试验组, 同期健康陪护家属 70 例作为对照组。检测所有研究对象外周血 LA、淋巴细胞计数及 CTL 水平, 并分析上述指标在试验组与对照组及不同 TNM 分期口腔鳞癌患者中的水平变化。结果 试验组外周血 LA 水平高于对照组, CTL 水平低于对照组, 差异均有统计学意义($P<0.05$); III~IV 期口腔鳞癌患者外周血 LA 水平高于 I~II 期患者, CTL 水平低于 I~II 期患者, 差异均有统计学意义($P<0.05$); LA 水平与 CTL 呈负相关($r=-0.551, P<0.05$)。结论 口腔鳞癌患者外周血 LA 水平与 CTL 呈负相关, 二者与口腔鳞癌的发生、发展相关, 可作为潜在的口腔鳞癌病情评估的筛查指标。

关键词: 口腔鳞癌; 乳酸; 细胞毒性 T 淋巴细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.11.014

中图法分类号: R739.8

文章编号: 1673-4130(2021)11-1342-04

文献标志码: A

Clinical application research of peripheral lactic acid and cytotoxic T lymphocyte in patients with oral squamous cell carcinoma*

ZHAO Hong¹, FENG Zhien², LI Delong², DUAN Lili¹, LI Jingrui^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Oral Maxillofacial-Head

and Neck Oncology, Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Abstract: **Objective** To investigate the significance of the levels of peripheral lactic acid (LA) and cytotoxic T lymphocyte (CTL) in occurrence and development of oral squamous cell carcinoma. **Methods** From November 2018 to September 2020, 50 patients with oral squamous cell carcinoma in Beijing Stomatological Hospital were selected as experimental group (25 cases of stage I—II, 25 cases of stage III—IV), and 70 healthy accompanying family members of inpatients in the same period as the control group. The levels of LA, lymphocyte count and CTL in peripheral blood of all subjects were detected, and the changes of the above indicators in the experimental group, control group and patients with oral squamous cell carcinoma of different TNM stages were analyzed. **Results** The level of peripheral blood LA in the experimental group was higher than that in the control group, the level of CTL was lower than that in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$); The level of peripheral blood LA in patients with stage III—IV oral squamous cell carcinoma was higher than that in patients with stage I—II, and the level of CTL was lower than that in patients with stage I—II, the difference was statistically significant ($P<0.05$); The level of LA was negative correlated with CTL ($r=-0.551, P<0.05$). **Conclusion** There is a negative correlation between the level of LA and CTL in peripheral blood of patients with oral squamous cell carcinoma, and the two are related to the occurrence and development of oral squamous cell carcinoma, and can be used as a screening indicator for the evaluation of potential oral squamous cell carcinoma.

Key words: oral squamous cell carcinoma; lactic acid; cytotoxic T lymphocytes

早在 1930 年, 奥托·沃伯格就证明了癌细胞即使在氧气存在的条件下也依赖糖酵解作用, 这种现象

* 基金项目: 北京市医院管理局临床医学发展专项“扬帆”计划项目(XMLX201819); 北京口腔医院学科建设基金项目(18-09-20)。

作者简介: 赵红, 女, 副主任技师, 主要从事临床生化方面的研究。△ 通信作者, E-mail: lijingrui1983@163.com。

本文引用格式: 赵红, 冯芝恩, 李德龙, 等. 外周血乳酸及细胞毒性 T 淋巴细胞在口腔鳞状细胞癌中的临床应用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(11): 1342-1345.

被称为有氧糖酵解,即“Warburg 效应”^[1]。与正常细胞相比,肿瘤细胞具有代谢表型改变的特点。肿瘤细胞可以利用糖酵解产生能量,并产生大量乳酸(LA)。有研究表明,LA 对人细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的增殖和细胞因子产生的抑制率高达 95%,细胞毒活性可降低 50%^[2],使机体细胞免疫功能下降,从而为癌细胞的生长扩散提供有利条件。口腔鳞状细胞癌(简称鳞癌)是指发生于口腔内,以鳞状细胞为主的恶性肿瘤。癌细胞可以发生于牙龈、硬腭、舌体、颊黏膜、嘴唇等等多种器官,属于头颈部恶性程度最高、危害性最大的肿瘤^[3]。目前,肿瘤微环境代谢变化引起的 CTL 的变化在口腔鳞癌中的作用研究相对较少。本文通过测定分析健康者与不同临床分期的口腔鳞癌患者外周血 LA 及 CD8⁺T 细胞水平,从口腔鳞癌患者代谢水平与机体免疫功能的关系方面,探讨 LA 及 CTL 在口腔鳞癌发生、发展中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2018 年 11 月至 2020 年 9 月在本院口腔颌面-头颈肿瘤科住院治疗的口腔鳞癌患者 50 例为试验组。纳入标准:年龄 20~70 岁,经病理组织学诊断为鳞癌且未进行放化疗处置者。排除标准:(1)既往有其他肿瘤史者;(2)伴有其他系统性疾病者;(3)不愿意参与此项研究者。试验组年龄 20~70 岁;男 26 例,女 24 例;舌癌 18 例,牙龈癌 11 例,口底癌 11 例,颊癌 5 例,唇癌 5 例;TNM 分期[美国癌症联合会(AJCC)第八版]Ⅰ~Ⅱ期 25 例,Ⅲ~Ⅳ期 25 例。另选择同期在本院口腔颌面-头颈肿瘤科住院患者的陪护家属且身体健康者 70 例为对照组,年龄 20~70 岁,其中男 36 例,女 34 例。2 组年龄、性别构成差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究方案获得首都医科大学附属北京口腔医院伦理委员会批准(审查批件号:CMUSH-IRB-KJ-PJ-2018-14),所有研究对象均签署了知情同意书。

1.2 仪器与试剂 白洋离心机购自北京白洋医疗器械有限公司, Sysmex XS-500i 血细胞分析仪购自日本 Sysmex 公司, Siemens RXL-MAX 生化分析仪购自德国 Siemens 公司, FACSCalibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司。血常规检测试剂为血细胞分析仪配套试剂, LA 测定试剂为生化分析仪配套试剂。Fc 受体封闭剂、PerCP-Cy5.5 标记的 CD3 单克隆抗体(CD3-PerCP-Cy5.5)、异硫氰基荧光素(FITC)标记的 CD8 单克隆抗体(CD8-FITC)均购自达科为生物技术股份有限公司,一次性含氟化钠真空采血管和一次性 EDTA 抗凝真空采血管购自美国 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集与处理 采用一次性含氟化钠真空采血管和一次性 EDTA 抗凝真空采血管,每管内采集

所有研究对象空腹外周静脉血 2 mL。一次性含氟化钠真空采血管内外周血以 2 500 r/min 离心 10 min,取上层血浆立即进行 LA 含量测定。一次性 EDTA 抗凝真空采血管内外周血颠倒混匀 8 次后即进行血常规检测,完成血常规检测后的标本用于流式细胞分析。

1.3.2 标本检测 用全血细胞分析仪进行血常规检测,得出淋巴细胞计数。对分离的血浆立即用全自动生化分析仪及 LA 测定试剂盒检测 LA 水平。从 EDTA 抗凝管中取 100 μ L 新鲜静脉血,加入 Fc 受体封闭剂 5 μ L,室温孵育 10 min 后,分别加入 CD3-PerCP-Cy5.5、CD8-FITC 各 3 μ L,在室温下避光孵育 20 min,然后加入红细胞裂解液 2 mL,室温避光裂解红细胞 15 min,350 $\times$ g 离心 5 min,弃去上清液,加入磷酸盐缓冲液(PBS)2 mL 离心洗去血红蛋白,并重新悬浮于 300 μ L PBS 中,用流式细胞仪检测 2 组 CD3⁺和 CD8⁺双阳性 T 细胞的百分比。根据淋巴细胞计数及 CD3⁺和 CD8⁺双阳性 T 细胞的百分比计算出 2 组研究对象外周血 CTL 的绝对值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,样本方差齐性检验采用 F 检验,方差齐的 2 组间样本均数比较采用 t 检验;计数资料以频数表示;采用 Pearson 相关分析 LA 水平与 CTL 的相关性。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 试验组与对照组外周血 LA、淋巴细胞计数及 CTL 水平比较 对 2 组外周血 LA、淋巴细胞计数及 CTL 水平进行方差齐性检验,2 组的 LA、淋巴细胞计数及 CTL 水平方差齐。采用 t 检验对 2 组外周血 LA、淋巴细胞计数及 CTL 水平进行比较,结果显示,试验组 LA 水平高于对照组,淋巴细胞计数和 CTL 水平低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 试验组与对照组 LA、淋巴细胞计数及 CTL 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	LA (mmol/L)	淋巴细胞计数 ($\times 10^9$ /L)	CTL ($\times 10^9$ /L)
对照组	70	1.98 $\pm$ 1.0	2.00 $\pm$ 0.48	0.34 $\pm$ 0.22
试验组	50	3.98 $\pm$ 1.0	1.63 $\pm$ 0.66	0.26 $\pm$ 0.17
<i>P</i>		<0.001	<0.001	0.023

2.2 不同 TNM 分期口腔鳞癌患者外周血 LA、淋巴细胞计数及 CTL 水平比较 对 Ⅰ~Ⅱ期、Ⅲ~Ⅳ期口腔鳞癌患者外周血 LA、淋巴细胞计数及 CTL 水平进行方差齐性检验,2 组不同 TNM 分期口腔鳞癌患者的 LA、淋巴细胞计数及 CTL 水平方差齐。采用 t

检验对 2 组不同 TNM 分期口腔鳞癌患者外周血 LA、淋巴细胞计数及 CTL 水平进行比较,结果显示,Ⅲ~Ⅳ期口腔鳞癌患者的 LA 水平高于Ⅰ~Ⅱ期,CTL 水平低于Ⅰ~Ⅱ期,差异均有统计学意义($P<0.05$),而淋巴细胞计数差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 不同 TNM 分期口腔鳞癌患者 LA、淋巴细胞计数及 CTL 水平比较($\bar{x}\pm s$)

TNM 分期	<i>n</i>	LA (mmol/L)	淋巴细胞计数 ($\times 10^9$ /L)	CTL ($\times 10^9$ /L)
Ⅰ~Ⅱ期	25	3.28±0.8	1.84±0.62	0.36±0.17
Ⅲ~Ⅳ期	25	4.68±0.6	1.54±0.71	0.17±0.10
<i>P</i>		<0.001	>0.05	<0.001

2.3 口腔鳞癌患者 LA 水平与 CTL 水平的相关性分析 Pearson 相关分析显示,随着口腔鳞癌患者 LA 水平升高,CTL 水平相应降低,其 LA 水平与 CTL 呈负相关($r=-0.551, P<0.05$),见图 1。

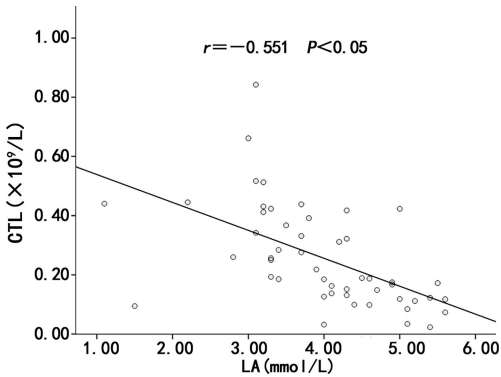


图 1 口腔鳞癌患者 LA 水平与 CTL 间关系散点图

3 讨 论

口腔鳞癌患者 LA 水平与健康者比较明显升高,说明肿瘤细胞糖酵解作用增强,使 pH 值下降。肿瘤微环境的缺氧状态可以上调编码葡萄糖转运蛋白和 LA 脱氢酶基因,从而增加了 LA 的分泌,且糖酵解作用也产生大量 LA。GATENBY 等^[4]提出肿瘤细胞的这种“糖酵解代谢”具有生长优势,是人类侵袭性癌症进化的必要条件。WALENTA 等^[5-7]发现肿瘤组织中 LA 水平与肿瘤转移的发生率以及癌症患者总体生存率的降低之间存在相关性。FISCHER 等^[2]的研究中也提示了 140 例患有不同实体肿瘤的患者血清 LA 水平与肿瘤负荷之间可能相关。本研究显示,在不同临床分期的口腔鳞癌患者中,Ⅲ~Ⅳ期口腔鳞癌患者 LA 水平明显高于Ⅰ~Ⅱ期患者($P<0.05$),表明 LA 水平与口腔鳞癌的发展可能相关,这一指标对预测肿瘤的发生和发展有一定的指导意义。

口腔鳞癌患者外周血淋巴细胞计数水平明显低于健康者($P<0.05$),与机体抗肿瘤免疫有关,说明细

胞免疫在口腔鳞癌中发挥着重要作用。但在不同分期的口腔鳞癌患者中,Ⅲ~Ⅳ期口腔鳞癌患者同Ⅰ~Ⅱ期口腔鳞癌患者比较,外周血淋巴细胞计数水平差异无统计学意义($P>0.05$)。可能是由于随着肿瘤的进展,主要是 CTL 的作用逐渐减弱^[8],淋巴细胞亚群比例发生变化,而淋巴细胞计数作为口腔鳞癌进展程度的筛查指标灵敏度较差。

根据 SAVINA 等^[9]的研究结果,针对肿瘤抗原的有效免疫反应需要活化和募集 CD8⁺ T 细胞,从而发挥细胞毒效应。本研究中口腔鳞癌患者相对健康者而言,发挥细胞毒作用的 CD8⁺ T 细胞水平明显降低,且口腔鳞癌晚期患者相对于早期患者而言,CTL 下降更为明显($P<0.05$),也反映了肿瘤发生、发展过程中机体免疫监视状况的变化,越是进展到口腔鳞癌的晚期,CTL 水平的下降越明显,从而更有利于癌细胞的浸润生长。FISCHER 等^[2]的研究中显示,浸润性 CTL 在进入肿瘤部位后不久就失去了重要的功能,其关键特征是细胞溶解能力受阻。口腔鳞癌可来源于一些恶性病变,如黏膜白斑。如果病变提示口腔上皮发育不良,则恶性转化的可能性增加^[10]。机体免疫系统在识别肿瘤前体细胞中发挥重要作用。根据免疫监视和免疫编辑假说,肿瘤细胞可以逃避免疫系统的监视。这个假说认为宿主和恶性细胞之间的相互作用是由 3 个阶段驱动的,即消除期、平衡期、逃逸期。一些肿瘤细胞在消除阶段被识别并清除,一些恶性转化细胞能够存活至平衡期。在逃逸期,持续生存的细胞增殖为肿瘤^[11]。口腔鳞癌患者中也存在着明显的细胞免疫功能降低。

LA 水平与 CTL 的相关性分析显示,随着口腔鳞癌患者 LA 水平升高,CTL 水平相应降低,说明肿瘤细胞特有的代谢特征会对机体免疫系统产生影响,并在口腔鳞癌的进展中发挥作用。LA 可以抑制人 CTL 的增殖,从而利于肿瘤细胞的转移生长。LA 酸中毒常见于大多数实体瘤患者,且影响免疫细胞的浸润^[12]。单羧酸转运蛋白-1(MCT-1)是细胞转运 LA 的蛋白,在心脏、肝脏、小肠、骨髓、骨骼肌、脾脏、大脑等组织中高表达^[13],其对 LA 的转运依赖于细胞质与胞外 LA 的水平梯度。有报道指出淋巴细胞也有 MCT-1、MCT-2、MCT-4 的表达^[14]。肿瘤微环境中高水平的 LA 阻碍了 MCT-1 向 T 细胞外转运 LA,从而干扰了 T 细胞的代谢和功能,影响机体的免疫功能。活化的 T 细胞利用糖酵解作用依赖于 LA 的有效分泌^[15]。如果 LA 积累在细胞内,则会干扰其新陈代谢,最终抑制 CTL 的增殖和活化。口腔鳞癌患者在 LA 升高的同时伴随着 CTL 的下降,可能与肿瘤微环境中高水平 LA 的积累有关。

综上所述,口腔鳞癌患者外周血 LA 水平的增高

伴随着 CTL 水平的下降,说明癌细胞的糖酵解代谢可能会对机体免疫系统产生影响,提示了口腔鳞癌患者肿瘤微环境中高水平的 LA 积累使 CTL 中的 LA 分泌受阻,干扰了 T 细胞代谢,抑制其细胞毒性效应的发挥。外周血 LA 和 CTL 水平与口腔鳞癌的发生、发展有关,可以作为潜在的口腔鳞癌病情评估的筛查指标。

参考文献

[1] WARBURG O. On the facultative anaerobiosis of cancer cells and its use in chemotherapy [J]. Munch Med Wochenschr, 1961, 103: 2504-2506.

[2] FISCHER K, HOFFMANN P, VOELKL S, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells[J]. Blood, 2007, 109: 3812-3819.

[3] CHI A C, DAY T A, NEVILLE B W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma: an update[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(5): 401-421.

[4] GATENBY R A, GILLIES R J. Why do cancers have high aerobic glycolysis[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(11): 891-899.

[5] WALENTA S, WETTERLING M, LEHRKE M, et al. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers[J]. Cancer Res, 2000, 60(4): 916-921.

[6] WALENTA S, SALAMEH A, LYG H, et al. Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis[J]. Am J Pathol, 1997, 150(2): 409-415.

[7] WALENTA S, SCHROEDER T, MUELLER-KLIESER

W. Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology[J]. Curr Med Chem, 2004, 11(16): 2195-2204.

[8] 彭功玲, 王龙强, 李强, 等. Lumina B 型乳腺癌与肿瘤浸润叉状头/翅膀状螺旋转录因子+调节性 T 淋巴细胞和 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞预后的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(11): 1975-1977.

[9] SAVINA A, AMIGORENA S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells[J]. Immunol Rev, 2007, 219: 143-156.

[10] 程俊鑫, 白贺天, 常治楠, 等. 口腔黏膜癌前病变和口腔癌动物模型的研究进展[J]. 华西口腔医学杂志, 2020, 38(2): 198-204.

[11] DUNN G P, OLD L J, SCHREIBER R D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting[J]. Immunity, 2004, 21(2): 137-148.

[12] 齐瑞丽, 张勇丹, 王华庆, 等. 免疫检查点抑制剂联合抗血管生成治疗恶性肿瘤的作用机制[J]. 临床肿瘤学杂志, 2020, 25(7): 664-668.

[13] 董贤文, 付琳, 张丽, 等. 消化道上皮单羧酸转运蛋白 1 (MCT1) 跨膜转运功能的调控机理[J]. 核农学报, 2021, 35(2): 349-356.

[14] MEREZHINSKAYA N, OGUNWUYI S A, MULLICK F G, et al. Presence and localization of three lactic acid transporters (MCT1, -2, and -4) in separated human granulocytes, lymphocytes, and monocytes [J]. Histochem Cytochem, 2004, 52(11): 1483-1493.

[15] 罗雨虹. T 细胞的效应功能受有氧糖酵解的转录后调控[J]. 生理科学进展, 2013, 44(3): 199.

(收稿日期: 2020-11-09 修回日期: 2021-01-20)

(上接第 1341 页)

[6] 中华人民共和国卫生部. 工作场所空气中有害物质监测的采样规范: GBZ159—2004[S]. 北京: 北京标准出版社, 2004: 1-13.

[7] OHSUMI A, MARSEU K, SLINGER P, et al. Sevoflurane attenuates ischemia-reperfusion injury in a rat lung transplantation model[J]. Ann Thorac Surg, 2017, 103(5): 1578-1586.

[8] REICH A, EVERDING A S, BULLA M, et al. Hepatitis after sevoflurane exposure in an infant suffering from primary hyperoxaluria type 1[J]. Anesth Analg, 2004, 99(2): 370-372.

[9] CHUNG W, PARK S, HONG J, et al. Sevoflurane exposure during the neonatal period induces long-term memory impairment but not autism-like behaviors[J]. Pediatr Anesth, 2015, 25(10): 1033-1045.

[10] CHUNG W, MIN J R, HEO J Y, et al. Sevoflurane exposure during the critical period affects synaptic transmission and mitochondrial respiration but not long-term behavior in mice[J]. Anesthesiology, 2017, 126(2): 288-

299.

[11] AMORIM M A S, GOVÊIA C S, MAGALHES E, et al. Effect of dexmedetomidine in children undergoing general anesthesia with sevoflurane: a meta-analysis[J]. Rev Bras Anesthesiol, 2017, 67(2): 193-198.

[12] XIE H, SHE G M, WANG C, et al. The gender difference in effect of sevoflurane exposure on cognitive function and hippocampus neuronal apoptosis in rats[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(4): 647-657.

[13] ALI S, MICHAEL G, MARTIN S. DNA-dependent protein kinase: effect on DSB repair, G2/M checkpoint and mode of cell death in NSCLC cell lines[J]. Int J Radiat Biol, 2019, 95(9): 1-37.

[14] MARTIN F, THOMAS K, ANTONIA Z, et al. Absence of DNA double-strand breaks in human peripheral blood mononuclear cells after 3 Tesla magnetic resonance imaging assessed by γH2AX flow cytometry[J]. Europ Radiol, 2018, 28(3): 1149-1156.

(收稿日期: 2020-09-25 修回日期: 2020-12-31)