

• 论 著 •

B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例与胃癌患者 TNM 分期、淋巴结转移的关系及对患者生存时间的预测^{*}

李 强¹, 黄思宇^{1△}, 闵 倩², 张洪涛¹, 谢 猛¹

安徽省阜阳市第二人民医院:1. 肿瘤科;2. 检验科, 安徽阜阳 236015

摘 要:目的 探讨 B 细胞、CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg)比例与胃癌患者 TNM 分期、淋巴结转移的关系及对患者生存时间的预测价值。方法 选择 2015 年 1 月至 2017 年 12 月该院收治的胃癌患者 80 例作为胃癌组,选取同期在该院体检的健康者 50 例作为对照组。比较两组外周血 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例,以及不同 TNM 分期、淋巴结转移的胃癌患者 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例的差异,分析 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例与胃癌患者 TNM 分期、淋巴结转移的关系,记录所有胃癌患者随访的生存情况。通过 Kaplan-Meier 法进行生存分析且行 Log-rank 检验,相关性分析采用多元线性回归分析。结果 胃癌组外周血 B 细胞水平低于对照组($P<0.05$),CD4⁺CD25⁺Treg 比例高于对照组($P<0.05$);不同 TNM 分期、淋巴结转移情况的胃癌患者 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);胃癌患者外周血 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例与 TNM 分期、淋巴结转移均存在相关性($P<0.05$);随访半年, B 细胞低表达患者有 62 例,平均生存时间为(24.06±5.13)个月;高表达患者 17 例,平均生存时间为(34.09±5.22)个月,差异有统计学意义($P<0.05$);CD4⁺CD25⁺Treg 比例高表达患者 60 例,平均生存时间为(23.17±5.09)个月;低表达患者 19 例,平均生存时间为(35.12±5.07)个月,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 胃癌患者的外周血 B 细胞水平降低,CD4⁺CD25⁺Treg 比例升高,胃癌患者外周血 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例与 TNM 分期、淋巴结转移均存在相关性,外周血 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例可作为预测胃癌患者生存时间的指标。

关键词: B 细胞; CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞; 胃癌; TNM 分期; 淋巴结转移; 生存时间

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.12.013 **中图法分类号:**R446.6

文章编号:1673-4130(2022)12-1467-04 **文献标志码:**A

Relationship between the expression of B cells,CD4⁺CD25⁺Treg cells with TNM stage and lymph node metastasis in patients with gastric cancer and its predictive value of survival time^{*}

LI Qiang¹, HUANG Siyu^{1△}, MIN Qian², ZHANG Hongtao¹, XIE Meng¹

1. Department of Oncology; 2. Department of Clinical Laboratory, Fuyang Second People's Hospital, Fuyang, Anhui 236015, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between the expressions of B cells, CD4⁺CD25⁺regulatory T cells (Treg) with the relationship between TNM stage and lymph node metastasis in patients with gastric cancer and its predictive value for survival time gastric cancer. **Methods** A total of 80 patients with gastric cancer admitted to our hospital from January 2015 to December 2017 were selected as the gastric cancer group, and 50 healthy subjects who underwent physical examination in our hospital in the same period were selected as the control group. The expression levels of B cells and CD4⁺CD25⁺Treg in the two groups were detected, and the proportion of peripheral blood B cells and CD4⁺CD25⁺Treg in the two groups were compared. The proportion of B cells and CD4⁺CD25⁺Treg in gastric cancer patients with different TNM stages and lymph node metastasis were compared. The relationship between the proportion of B cells, CD4⁺CD25⁺Treg and TNM stage and lymph node metastasis in patients with gastric cancer was analyzed. The survival of all patients with gastric cancer were recorded. Survival analysis was performed by Kaplan-Meier method and Log-rank test. Multiple linear regression analysis was used for correlation analysis. **Results** The proportion of peripheral blood B cells in gastric cancer group was less than that in control group ($P<0.05$), and the proportion of CD4⁺CD25⁺Treg was more than that in control group ($P<0.05$). There were significant differences in the proportion of B cells and CD4⁺CD25⁺Treg in gastric cancer patients with different TNM stages and

^{*} 基金项目:安徽省卫生健康委员会科研项目(2018R01220)。

作者简介:李强,男,主治医师,主要从事恶性肿瘤发生机制方面的研究。△ 通信作者, E-mail: bqb778856@163.com。

lymph node metastasis ($P < 0.05$). The proportion of peripheral blood B cells and $CD4^+CD25^+$ Treg in patients with gastric cancer were correlated with TNM stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$). Following up for half a year, there were 62 patients with low B cell expression, with an average survival time of (24.06 ± 5.13) months and 17 patients with high B cell expression, with an average survival time of (34.09 ± 5.22) months. Kaplan-Meier survival curve showed that there was significant difference in the survival time between the two groups ($P < 0.05$). The mean survival time was (23.17 ± 5.09) months in 60 patients with high expression of $CD4^+CD25^+$ Treg and (35.12 ± 5.07) months in 19 patients with low expression. Kaplan-Meier survival curve showed that there was significant difference in the survival time between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** The proportion of peripheral blood B cells in patients with gastric cancer might decrease and the proportion of $CD4^+CD25^+$ Treg might increase. The proportion of peripheral blood B cells and $CD4^+CD25^+$ Treg in patients with gastric cancer is correlated with TNM stage and lymph node metastasis. B cells and $CD4^+CD25^+$ Treg can be used as indicators to predict the prognosis and survival time of patients with gastric cancer.

Key words: B cells; $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells; gastric cancer; TNM staging; lymph node metastasis; survival time

胃癌是全球最常见的恶性肿瘤之一。该病每年的发病率约为 17/10 000, 严重影响了患者的健康和安全, 并给患者家属造成了巨大经济负担^[1]。目前, 胃癌的临床疗效不显著, 预后不良, 尤其是进展期胃癌。尽管部分患者进行了根治性胃切除术, 但 5 年生存率仅为 20% 左右, 因此, 对胃癌发病机制的研究有助于提高临床疗效和改善预后^[2]。有研究发现, 胃癌可由多种复杂的内、外因素引起, 这些因素导致细胞结构破坏和基因表达异常, 胃癌的发生和发展可能与多种癌基因和淋巴细胞(包括 B 细胞)的激活以及抑癌基因的失活有关^[3]。另有研究发现, $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞(Treg)属于 $CD4^+$ Treg 亚群, 与肿瘤免疫抑制有一定关系, 其可以调节 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 的激活和增殖, 并调节免疫应答^[4]。目前, 关于 Treg 与胃癌病理特征相关性的研究较少。基于此, 本文主要探讨了 B 细胞、 $CD4^+CD25^+$ Treg 的表达与胃癌患者 TNM 分期、淋巴结转移的关系, 并分析了上述细胞表达情况对患者预后生存时间的预测价值, 旨在为临床胃癌的诊断和治疗提供一定的参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2015 年 1 月至 2017 年 12 月本院收治的胃癌患者 80 例作为胃癌组。纳入标准: (1) 通过内镜或病理检查证实为胃癌; (2) 入组前未进行放化疗; (3) 临床资料完整; (4) 所有患者均知情同意参与本研究; (5) 均无认知障碍。排除标准: (1) 合并其他恶性肿瘤; (2) 凝血功能异常; (3) 无法完成本研究所有检查项目; (4) 检查结果无效; (5) 中途退出研究。胃癌组中男 52 例, 女 28 例; 年龄 35~75 岁, 平均 (50.12 ± 5.23) 岁; 肿瘤最大径: ≤ 5 cm 共 38 例, > 5 cm 共 42 例; TNM 分期: I 期 20 例, II 期 12 例, III 期 40 例, IV 期 8 例; 分化程度: 高分化 13 例, 中分化 23 例, 低分化 44 例; 肿瘤位置: 胃体 41 例, 幽门及胃窦 19 例, 贲门及胃底 20 例; 病理类型均为胃腺癌, 其

中管状腺癌 33 例, 乳头状腺癌 27 例, 黏液腺癌 20 例; 发生淋巴结转移 52 例, 未发生淋巴结转移 28 例。选取同期在本院体检的健康者 50 例作为对照组, 其中男 32 例, 女 18 例; 年龄 35~75 岁, 平均 (51.03 ± 6.02) 岁。两组性别、年龄等一般资料比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 B 细胞水平的检测 将正常胃组织和胃癌组织获得的淋巴细胞调到 $2 \times 10^9/L$ 后进行离心, 在试管中加入 40 μL $CD4^+$ 试剂和 40 μL $CD19^+$ 试剂, 重悬, 室温下避光孵育 15 min; 磷酸盐缓冲液洗涤后, 用流式细胞仪检测并用软件分析。

1.2.2 $CD4^+CD25^+$ Treg 比例的检测 采集所有研究对象清晨空腹外周静脉血 5 mL, 肝素抗凝后, 用梯度离心法分离淋巴细胞, 用不含胎牛血清 1640 培养基洗涤两次, 然后用含 1% 胎牛血清的完全 1640 培养基进行重塑, 接着将淋巴细胞计数并稀释至 $1 \times 10^6/mL$, 取 1 mL 细胞悬液于试管中, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 分别将 20 μL 异硫氨酸荧光素 (FITC) 标记的 $CD4$ 抗体和 20 μL 荧光素 PE 标记的 $CD25$ 抗体在 4 $^{\circ}C$ 冰箱中暗孵 30 min, 然后离心, 用 1% 胎牛血清蛋白-磷酸盐缓冲液洗涤两次, 稀释至 300 μL ; 用贝克曼库尔特 Gallios 流式细胞仪(苏州赛恩斯仪器有限公司)测定淋巴细胞表面各荧光素的荧光强度, 并用空白和阴性对照消除非特异性和自发荧光。每次分析 10 000 个细胞, 用二维 dot-plot 散点图保存, 在 FITC- $CD4$ /PE- $CD25$ 双参数图上计算 $CD4^+CD25^+$ Treg 比例, $CD4^+CD25^+$ Treg 比例 = $CD4^+CD25^+$ Treg/ $CD4^+$ Treg $\times 100\%$ 。

1.3 观察指标 (1) 比较两组外周血 B 细胞、 $CD4^+CD25^+$ Treg 比例; (2) 比较不同 TNM 分期、淋巴结转移的胃癌患者 B 细胞、 $CD4^+CD25^+$ Treg 比例的差异; (3) 分析 B 细胞、 $CD4^+CD25^+$ Treg 比例与胃癌患

者 TNM 分期、淋巴结转移的关系;(4)记录所有胃癌患者随访的生存情况。所有患者随访 3 年,共失访 2 例,胃癌组失访 1 例,对照组失访 1 例,失访原因均为更换联系方式或联系方式错误。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行数据分析。计数资料以百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验;正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析且行 Log-rank 检验;相关性采用多元线性回归分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组外周血 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例比较 胃癌组外周血 B 细胞水平低于对照组 ($P < 0.05$),CD4⁺CD25⁺Treg 比例高于对照组 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 两组外周血 B 细胞、CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg 比例比较(% , $\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	B 细胞	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg
胃癌组	80	13.26±1.22	19.22±4.06
对照组	50	16.18±0.26	10.23±2.07
<i>t</i>		16.666	14.509
<i>P</i>		<0.001	<0.001

2.2 不同 TNM 分期、淋巴结转移的胃癌患者 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例比较 不同 TNM 分期、淋巴结转移的胃癌患者 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 不同 TNM 分期、淋巴结转移的胃癌患者 B 细胞、CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg 比例比较(% , $\bar{x} \pm s$)			
临床特征	<i>n</i>	B 细胞	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg
TNM 分期			
I 期	20	14.23±2.33	15.26±2.06
II 期	12	13.03±2.06	17.32±3.17
III 期	40	12.22±2.04	19.36±4.06
IV 期	8	11.06±2.14	20.22±4.12
<i>F</i>		4.023	4.226
<i>P</i>		0.011	0.009
淋巴结转移			
是	52	11.13±2.06	22.23±5.17
否	28	14.06±2.07	15.26±3.06
<i>t</i>		6.058	6.533
<i>P</i>		<0.001	<0.001

2.3 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例与胃癌患者 TNM 分期的关系 以 TNM 分期(定义“Ⅰ期”=1,“Ⅱ期”=2,“Ⅲ期”=3,“Ⅳ期”=4)作为因变量,将不同 TNM 分期胃癌患者外周血 B 细胞、CD4⁺CD25⁺

Treg 比例作为自变量,纳入多元线性回归模型,结果显示,胃癌患者外周血 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例与 TNM 分期均存在相关性($P < 0.05$),见表 3。

表 3 B 细胞、CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg 比例与胃癌患者 TNM 分期的关系					
变量	<i>B</i>	标准误	<i>Beta</i>	<i>t</i>	<i>P</i>
B 细胞	-0.152	0.043	-0.351	-3.565	0.001
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg	0.069	0.020	0.333	3.382	0.001

2.4 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例与胃癌患者淋巴结转移的关系 以淋巴结转移(定义“是”=1,“否”=2)作为因变量,将不同淋巴结转移胃癌患者外周血 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例作为自变量,纳入多元线性回归模型,结果显示,胃癌患者外周血 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例与淋巴结转移均存在相关性($P < 0.05$),见表 4。

表 4 B 细胞、CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg 比例与胃癌患者淋巴结转移的关系					
变量	<i>B</i>	标准误	<i>Beta</i>	<i>t</i>	<i>P</i>
B 细胞	0.073	0.018	0.320	4.154	<0.001
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg	-0.051	0.006	-0.617	-8.000	<0.001

2.5 B 细胞对胃癌患者生存时间的预测 随访半年,B 细胞低表达患者有 62 例,平均生存时间为(24.06±5.13)个月;高表达患者 17 例,平均生存时间为(34.09±5.22)个月,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞对胃癌患者生存时间的预测 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞高表达患者 60 例,平均生存时间为(23.17±5.09)个月;低表达患者 19 例,平均生存时间为(35.12±5.07)个月,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨 论

胃癌常发生在胃黏膜和胃腺上皮中。最常见的组织学类型是腺癌,发生在胃窦的小弯曲处^[5]。近年来,虽然全世界胃癌患者的发病率和病死率呈缓慢下降趋势,但由于国内人口老龄化较严重,新发胃癌患者数量仍居高不下,病死率仍处于我国疾病病死率的前列^[6]。虽然约 55%的胃癌患者在治疗时仅表现为非特异性胃肠道消化不良,且在胃癌早期通常没有明显症状,大多数患者就诊时已进展到胃癌晚期,只能通过彻底的淋巴结清扫进行保守治疗^[7]。晚期患者手术预后差,并发症多,因此找到可预测其生存时间的指标对于降低患者的病死率具有十分重要的临床意义。

B 细胞作为体液免疫的重要介导细胞,主要在抗原刺激下分化为浆细胞,产生免疫球蛋白(Ig),参与体液免疫^[8]。有研究发现,被肿瘤组织浸润的 B 细胞

可以产生 IgG 抗体,识别肿瘤组织中的抗原并抑制其生长^[9]。CD4⁺CD25⁺Treg 是 CD4⁺Treg 亚群的成员,其可能导致机体免疫功能降低,以及白细胞介素-2 水平升高,使抗 CD3 和抗 CD28 单克隆抗体的联合作用处于无反应状态。此外,其还具有免疫抑制作用,表现为在细胞抗原受体接收激活的信号刺激后,抑制 CD4⁺和 CD8⁺细胞的活化和增殖^[10]。以往的研究发现,CD4⁺CD25⁺Treg 在预防免疫性疾病、抑制神经系统疾病和肿瘤免疫反应中起着非常重要的作用^[11]。其作用不依赖于细胞因子,而仅通过细胞间接触^[12-13]。目前,关于 CD4⁺CD25⁺Treg 与胃癌患者临床特征的关系研究较少。探讨其相关性有助于胃癌早期诊断、客观评估病情,为临床治疗提供参考依据。

本研究结果显示,胃癌组外周血 B 细胞水平低于对照组($P<0.05$),CD4⁺CD25⁺Treg 比例高于对照组($P<0.05$);本研究结果还显示,不同 TNM 分期、淋巴结转移的胃癌患者 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例差异均有统计学意义($P<0.05$);进一步分析发现,胃癌患者外周血 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例与 TNM 分期、淋巴结转移均存在相关性($P<0.05$),提示 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例可对胃癌患者的 TNM 分期、淋巴结转移产生一定的影响。相关研究结果显示,在淋巴细胞性间质性胃癌中,B 细胞高浸润组分化程度较高,TNM 分期较低;EB 病毒(EBV)阴性淋巴细胞性间质性胃癌中,B 细胞高侵袭组 TNM 分期低于低侵袭组,提示 B 细胞可能有助于降低肿瘤 TNM 分期^[14]。另有研究显示,胃癌患者术前外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 比例在不同 TNM 分期患者中差异有统计学意义($P<0.05$),Ⅲ期和Ⅳ期胃癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 比例明显高于Ⅰ期($P<0.05$),Ⅳ期胃癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 比例也明显高于Ⅱ期($P<0.05$),提示 TNM 分期越高,术前外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 比例越高^[15]。上述结果提示,在肿瘤进展过程中,外周血中 CD4⁺CD25⁺Treg 的水平增加,说明外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 可能影响肿瘤的进展。另外,生存分析发现,不同 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例的胃癌患者的生存时间差异有统计学意义($P<0.05$),提示 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 可作为预测胃癌患者预后的指标。

综上所述,胃癌患者的外周血 B 细胞水平降低,CD4⁺CD25⁺Treg 比例增加,胃癌患者外周血 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例与 TNM 分期、淋巴结转移均存在相关性,外周血 B 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 可作为预测胃癌患者预后情况的指标。

参考文献

[1] MACHLOWSKA J, BAJ J, SITARZ M, et al. Gastric

Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 4012.

[2] JOHNSTON F M, BECKMAN M. Updates on Management of Gastric Cancer[J]. Curr Oncol Rep, 2019, 21(8): 67.

[3] NAKAMURA S, PONZONI M. Marginal zone B-cell lymphoma: lessons from Western and Eastern diagnostic approaches[J]. Pathology, 2020, 52(1): 15-29.

[4] SAKAGUCHI S, MIKAMI N, WING J B, et al. Regulatory T Cells and Human Disease[J]. Annu Rev Immunol, 2020, 26(38): 541-566.

[5] THRIFT A P, EL-SERAG H B. Burden of Gastric Cancer[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020, 18(3): 534-542.

[6] YUSEFI A R, BAGHERI LANKARANI K, BASTANI P, et al. Risk Factors for Gastric Cancer: a Systematic Review[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2018, 19(3): 591-603.

[7] TAN Z. Recent Advances in the Surgical Treatment of Advanced Gastric Cancer: a Review[J]. Med Sci Monit, 2019, 25(13): 3537-3541.

[8] MENG X, MIN Q, WANG J Y. B Cell Lymphoma[J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1254(20): 161-181.

[9] RAWLINGS D J, METZLER G, WRAY-DUTRA M, et al. Altered B cell signalling in autoimmunity[J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17(7): 421-436.

[10] 陆威, 李永翔, 张尚鑫, 等. 胃癌患者外周血及癌组织中 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞、转录因子 Foxp3 的表达及临床意义[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(7): 790-793.

[11] GRYGOROWICZ M A, BORYCKA I S, NOWAK E, et al. Lenalidomide potentiates CD4⁺CD25⁺Treg-related suppression of lymphoma B-cell proliferation[J]. Clin Exp Med, 2017, 17(2): 193-207.

[12] HOMBACH A A, ABKEN H. Most Do, but Some Do Not; CD4⁺CD25⁻T Cells, but Not CD4⁺CD25⁺Treg Cells, Are Cytolytic When Redirected by a Chimeric Antigen Receptor (CAR)[J]. Cancers (Basel), 2017, 9(9): 112.

[13] TRAN G T, HODGKINSON SJ, CARTER N, et al. Autoantigen specific IL-2 activated CD4⁺CD25⁺T regulatory cells inhibit induction of experimental autoimmune neuritis[J]. J Neuroimmunol, 2020, 15(341): 577186.

[14] ALLIE S R, RANDALL T D. Resident Memory B Cells[J]. Viral Immunol, 2020, 33(4): 282-293.

[15] 王海玮, 柴丽丽, 杨国青, 等. 胃癌患者外周血调节性 T 细胞水平与免疫抑制状态及病理特征的关系研究[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(17): 3365-3369.

(收稿日期: 2021-10-11 修回日期: 2022-02-22)