

肺肿瘤患者围手术期 CD28 及 T 细胞亚群检测的临床意义

程文国¹ 张有顺² 吴晓怡³

[摘要] 目的:检测肺肿瘤患者手术前后外周血 CD28 和 T 淋巴细胞亚群的表达变化并探讨其意义。方法:采用流式细胞术检测 63 例肺肿瘤患者手术前后外周血 CD28 及 T 淋巴细胞亚群的表达,并与健康对照组及肺良性肿瘤组作比较。结果:肺肿瘤组术前外周血中 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD8⁺CD28⁺ 水平明显低于健康对照组和肺良性肿瘤组,而 CD8⁺ 水平明显升高。肺肿瘤组 CD8⁺ 表达水平随着临床分期的进展而有显著升高,CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 和 CD8⁺CD28⁺ 水平随着临床分期的进展而有显著降低。不同病理分型的肺肿瘤患者之间外周血 CD28 及 T 细胞亚群水平无明显差异。肺肿瘤患者术后 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 和 CD8⁺CD28⁺ 表达显著升高;CD8⁺ 的表达明显降低,但仍未恢复至健康水平。结论:肺肿瘤患者 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 和 CD8⁺CD28⁺ 表达水平低下,从而影响 B7-CD28 共刺激通路,使 T 细胞不能有效的清除肿瘤,提示肺肿瘤患者机体免疫功能低下,施行手术切除肿瘤有助于改善患者的细胞免疫功能。

[关键词] 肺肿瘤; CD28; T 细胞亚群

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2014.06.006

[中图分类号] R734.2 **[文献标志码]** A

Detection of CD28 and T lymphocyte subset in perioperative period of patients with lung cancer

CHENG Wenguo¹ ZHANG Youshun² WU Xiaoyi³

(¹Yangzhou Maternal and Child Health Hospital Laboratory, Yangzhou, 225001, China; ²Medical Experimental Center, Dongfeng Hospital of Hubei University of Medicine; ³Yangzhou Maternal and Child Health Hospital Nursing)

Corresponding author: WU Xiaoyi, E-mail: wxy13797814281@163.com

Abstract Objective: To investigate the changes of CD28 and T lymphocyte subset in the peripheral blood from patients with lung cancer undergone modified radical operations and its significance. **Method:** The expression of CD28 and T lymphocyte subset on the peripheral blood lymphocytes (PBL) was measured by flow cytometric assay in 63 patients with lung cancer, and the data were compared and analyzed with that in normal control and lung benign tumor group. **Result:** Expression of CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ and CD8⁺CD28⁺ on PBL in patients with lung cancer was significantly lower before operation than that of normal control and lung benign tumor group. The proportion of CD8⁺ of the patients with lung cancer was remarkably higher before operation than that of the control group. The expression of CD8⁺ of lung cancer group were correlated significantly with the progress of clinical and has significantly increased. The expression of CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ and CD8⁺CD28⁺ of lung cancer group were correlated significantly with the progress of clinical and has decreased significantly. No significant differences between different pathological types of lung cancer patients in peripheral blood CD28 and T lymphocytes subsets. The expression of CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ and CD8⁺CD28⁺ was significantly increased in patients with lung cancer after operation. The expression of CD8⁺ was decreased, but has not been restored to health. **Conclusion:** The facts that low level of CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ and CD8⁺CD28⁺ of peripheral blood from lung cancer patients may influence the B7-CD28 costimulatory pathway, resulting in the failure of T lymphocytes to eliminate tumor cells effectively. Removal of the tumor may be benefit to improve the cellular immunity of the patients.

Key words lung cancer; CD28; T lymphocyte subsets

肿瘤的发生、发展与人体的免疫功能密切相

关^[1],随着肿瘤免疫学研究的不断深入,已明确以 T 淋巴细胞为主要效应细胞的细胞免疫是机体抗肿瘤的主要方式,肿瘤患者的免疫功能,尤其是 T 细胞免疫功能的变化与肿瘤免疫的关系越来越受到人们的重视。本文采用流式细胞仪检测 CD3⁺、

¹扬州市妇幼保健院检验科(江苏扬州,225001)

²湖北医药学院附属东风医院实验中心

³扬州市妇幼保健院护理部

通信作者:吴晓怡, E-mail: wxy13797814281@163.com

CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺和 CD8⁺CD28⁺在肺肿瘤患者手术前后外周血中的表达,以探讨肺肿瘤患者手术前后细胞免疫功能的变化及其与肿瘤生物学行为和手术的关系,为肺肿瘤患者的肿瘤进展和转移提供辅助诊断依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

病例纳入标准:①初次经临床、影像学 and 病理确诊的原发性肺肿瘤患者;②确诊后未接受任何放疗、化疗及抗肿瘤治疗,未用影响免疫功能的药物;③有手术切除适应证。剔除标准:①来源于其他系统的恶性肿瘤出现肺部转移的患者;②术中或术后出现严重合并症的患者;③同时患有其他心、肺、肾疾病及糖尿病等基础疾病的患者。选择符合上述标准的肺肿瘤患者 63 例,其中男 41 例,女 22 例;年龄 48~65 岁,平均 53.2 岁。根据国际抗癌联盟(UICC)的国际肺肿瘤 TNM 分期标准(第 7 版)进行临床分期,其中 I 期 4 例,II 期 25 例,III 期 10 例,IV 期 24 例,其中有淋巴结转移患者 36 例。病理类型:鳞癌 26 例、腺癌 23 例、小细胞癌 14 例。肺良性肿瘤组 45 例,其中男 29 例,女 16 例;年龄 45~67 岁,平均 50.1 岁;包括炎性假瘤 36 例,肺错构瘤 9 例。健康对照组选取门诊健康查体者 50 例,男 26 例,女 24 例;年龄 38~63 岁,平均 53.9 岁;均无心、肝、肺、肾等重要脏器疾患,肝肾功能正常,均无肿瘤家族史。各组性别、年龄经统计学分析均具有可比性。

1.2 仪器及试剂

荧光素标记的抗体:三标抗体 FITC-CD3-CD4-PE-CD8-PECy5、FITC-IgG1-IgG2-PE-IgG3-PE-Cy5。单标抗体 FITC-CD28、PE-CD8、FITC-IgG1、PE-IgG1 阴性参照,均购自美国 Coulter 公司。固定剂 Cylyse A、溶血素 Cylyse B、鞘液均购自德国 Partec 公司。流式细胞仪为 Partec PAS,德国 Partec 公司。

1.3 检测方法

外周血免疫细胞表面标记检测:每例患者(肺肿瘤组术前 3 d,术后 3~6 d;良性肿瘤组在未治疗前采血)及健康体检者均抽取静脉血 2 ml,肝素(10 U/ml)抗凝,2 h 内送检。取抗凝血 100 μ l 加入试

管中,每管中分别加入相应荧光抗体 20 μ l,每份标本设一同型阴性对照,对照中加入抗凝血 100 μ l,阴性参照抗体 20 μ l,混匀,室温避光 15 min,各加入 100 μ l 固定剂,室温避光 10 min,再加入 2 ml 溶血素,室温避光溶血 20 min。用同型对照确定荧光阴性范围后,依次上机检测标本,每份标本测定 10^4 以上淋巴细胞。

1.4 统计学分析

试验资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,SPSS13.0 软件统计试验数据, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 手术前后肺肿瘤组与对照组外周血淋巴细胞中 CD3、CD4、CD8 及 CD28 阳性细胞表达水平

手术前肺肿瘤组外周血中 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD8⁺CD28⁺水平明显低于健康对照组和肺良性肿瘤组($P < 0.01$),CD8⁺水平显著增高($P < 0.01$)。手术后与术前比较,肺肿瘤患者外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺和 CD8⁺CD28⁺表达显著升高($P < 0.01$),相关指标仍低于健康对照组($P < 0.01$);术后组 CD8⁺的表达明显低于术前组($P < 0.01$),高于健康对照组($P < 0.05$)。各指标在对照组与肺良性肿瘤组之间差异无统计学意义。结果见表 1。

2.2 肺肿瘤患者外周血 CD3、CD4、CD8、CD28 细胞表达水平与肺肿瘤临床病理参数的关系

不同病理类型的肺肿瘤患者之间的外周血 CD3、CD4、CD8、CD28 细胞表达水平虽有差异,但差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。III、IV 期肺肿瘤组 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺和 CD8⁺CD28⁺表达水平明显低于 I、II 期($P < 0.01$);CD8⁺则明显高于 I、II 期组(均 $P < 0.01$),差异均有统计学意义。有淋巴结转移组 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺和 CD8⁺CD28⁺表达水平明显低于无淋巴结转移组,CD8⁺则明显高于无淋巴结转移组,差异均具有统计学意义。结果见表 2。

3 讨论

肺肿瘤是最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率不断上升,但其发病机制目前仍不十分清楚,肿瘤的生成是一个极为复杂的过程,肿瘤的发

表 1 手术前后肺肿瘤组与对照组外周血 CD3、CD4、CD8、CD28 表达水平

% , $\bar{x} \pm s$

组别	例数	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD8 ⁺ CD28 ⁺
对照组	50	63.16 $\pm$ 5.85	37.81 $\pm$ 4.26	24.35 $\pm$ 3.21	1.55 $\pm$ 0.45	14.15 $\pm$ 2.21
肺良性肿瘤组	45	62.37 $\pm$ 5.64	36.51 $\pm$ 4.34	24.46 $\pm$ 3.28	1.49 $\pm$ 0.44	13.48 $\pm$ 2.11
肺肿瘤组						
术前	63	52.92 $\pm$ 5.05 ²⁾³⁾	25.17 $\pm$ 3.31 ²⁾³⁾	27.75 $\pm$ 3.59 ²⁾³⁾	0.93 $\pm$ 0.27 ²⁾³⁾	9.83 $\pm$ 2.03 ²⁾³⁾
术后	63	57.18 $\pm$ 5.26 ²⁾⁴⁾	31.23 $\pm$ 3.88 ²⁾⁴⁾	25.88 $\pm$ 3.67 ¹⁾⁴⁾	1.21 $\pm$ 0.32 ²⁾⁴⁾	12.01 $\pm$ 2.09 ²⁾⁴⁾

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与肺良性肿瘤组比较,³⁾ $P < 0.01$;与本组内术前比较,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD28⁺ 表达水平与肺肿瘤临床病理参数的关系 % , $\bar{x} \pm s$

组别	例数	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD8 ⁺ CD28 ⁺
病理类型						
鳞癌	26	53.45±5.25	25.47±3.61	27.81±3.69	0.92±0.23	9.33±2.13
腺癌	23	52.84±5.09	25.99±3.11	26.85±3.21	0.96±0.26	9.95±2.21
小细胞癌	14	52.06±4.87	25.92±3.41	26.23±3.19	0.98±0.26	10.56±2.25
临床分期						
I、II 期	29	55.31±4.97	28.82±3.58	24.48±3.11	1.16±0.28	11.68±2.25
III、IV 期	34	50.88±4.55 ¹⁾	22.16±3.13 ¹⁾	28.65±3.61 ¹⁾	0.79±0.21 ¹⁾	8.26±2.01 ¹⁾
淋巴结转移						
有	36	51.92±4.45	23.37±3.01	28.05±3.51	0.83±0.24	8.89±2.06
无	27	54.25±4.61 ²⁾	28.04±3.88 ³⁾	25.65±3.35 ³⁾	1.08±0.29 ³⁾	11.08±2.21 ³⁾

与 I、II 期组比较,¹⁾ $P<0.01$;与有淋巴结转移组比较,²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。

生、发展与机体的免疫功能密切相关。近年来的研究已明确细胞免疫是机体抗肿瘤免疫的主要方式,肿瘤患者以 T 细胞介导的细胞免疫存在不同程度的缺陷和紊乱,肿瘤患者的免疫功能,尤其是 T 细胞免疫功能的变化与肿瘤免疫的关系越来越受到人们的重视。

T 淋巴细胞是细胞免疫中的主要效应细胞,T 细胞亚群的检测是判断细胞免疫功能的重要指标,被广泛的应用于临床^[2]。T 淋巴细胞根据表面分化抗原可分为 CD4 和 CD8 两大亚群,其中 CD3⁺ 为辅助/诱导 T 细胞,具有协助体液免疫及细胞免疫的功能,CD8⁺ 为抑制/杀伤 T 细胞^[3],CD8⁺ T 细胞是杀伤肿瘤细胞的重要效应细胞。CD3⁺、CD8⁺ 细胞按一定比例互相协调,则保持免疫应答平衡状态,若比例失调则导致机体免疫功能调节紊乱或失衡及免疫病理改变。

T 细胞活化后才能发挥出其相关抗肿瘤功能,促使 T 细胞增殖及分泌多种细胞因子,形成免疫应答。而激活 T 细胞需要两个来自细胞外的信号,第一信号是特异性刺激信号 MHC-抗原肽复合物,第二信号是由抗原递呈细胞表达的共刺激分子传递给 T 细胞。CD28:B7 这对共刺激分子所介导的信号在 T 细胞激活和效应过程中均起重要作用^[4],共刺激分子 CD28 是分子质量为 44 000 的二聚体糖蛋白,主要表达于 CD3⁺、CD8⁺ 淋巴细胞表面,其配体 B7 存在于树突状细胞、NK 细胞等抗原递呈细胞表面^[5]。CD8⁺ 根据 CD28 的表达与否再分为细胞毒 T 细胞(CD8⁺CD28⁺)和抑制性 T 细胞(CD8⁺CD28⁻)。CD8⁺CD28⁺ 是细胞毒 T 淋巴细胞亚群,是机体抗病毒感染和抗肿瘤的主要效应细胞,承担免疫防御和免疫监视功能^[6]。

大量的临床研究证实,恶性肿瘤患者机体免疫力低下,主要表现为免疫性 T 淋巴细胞数量的改变和各亚群比例失调^[7],本研究同时检测了 63 例肺肿瘤患者术前外周血 T 淋巴细胞 CD3、CD4、CD8

的表达水平,肺肿瘤患者术前外周血中 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值均低于健康对照组和肺良性肿瘤组,而 CD8⁺ 的表达水平明显高于对照组。这一现象说明,肺肿瘤患者的细胞免疫功能处于抑制状态,机体杀伤肿瘤细胞的能力低下。这是由于当机体形成恶性肿瘤时,肿瘤细胞会产生大量免疫抑制因子,使辅助性 T 细胞功能下降,抑制性 T 细胞数量及活性提高,表现为 CD4⁺/CD8⁺ 比值下降。为了进一步研究其机制,本研究对共刺激分子 CD28 进行了检测,肺肿瘤患者抑制性 T 细胞 CD8⁺ 显著升高,而 CD8⁺CD28⁺ 表达明显下降,结果提示在肺肿瘤的发生、发展过程中,机体的免疫系统发生了共刺激分子表达的改变,使机体处于免疫抑制状态,影响 T 细胞的激活进而影响其抗肿瘤功能。而且肺肿瘤临床分期越晚,外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 和 CD8⁺CD28⁺ 水平也越低,CD8⁺ 的水平越高,而且有淋巴结转移组 CD8⁺ 表达水平高于无淋巴结转移组,有淋巴结转移组 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 和 CD8⁺CD28⁺ 表达水平低于无淋巴结转移组,差异均有统计学意义,表明 T 细胞的免疫抑制状态与肺肿瘤的分期密切相关,结果提示肺肿瘤患者免疫功能失调与患者外周血 CD8⁺CD28⁺ 水平降低有关,可能随着肺肿瘤进一步进展,肿瘤细胞逐渐增多,肿瘤细胞通过直接接触或通过分泌调节性细胞因子,加剧了机体的免疫抑制状态,其具体作用机制尚有待于进一步研究来证实。但是在不同病理类型的肺肿瘤患者其外周血相关检测细胞水平没有统计学差异,提示肿瘤患者 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 和 CD8⁺CD28⁺ 细胞水平变化与病理分型无关。同时本研究发现,肺肿瘤患者术后与术前相比 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 和 CD8⁺CD28⁺ 表达显著升高($P<0.01$),CD8⁺ 的表达明显降低($P<0.01$),提示机体减轻瘤负后,抗肿瘤免疫功能有所改善,这与肿瘤细胞分泌免疫抑

(下转 463 页)

表 1 2012 年上半年与下半年不合格标本各因素对比

不合格因素	上半年 份数	百分率 /%	下半年 份数	百分率 /%	同比下 降率/%
申请单信息有误	45	34.35	8	6.10	28.25
血型填写错误	15	11.45	3	2.29	8.16
主治医生未签字	8	6.10	2	1.52	4.58
血标签信息有误	22	16.79	3	2.29	14.50
血量不足	5	3.81	2	1.52	2.29
样本溶血	8	6.10	5	3.81	2.29
样本无标签	4	3.05	1	0.76	4.01
总计	107	81.67	24	18.33	63.34

临床输血不合格的标本主要涉及到两大部分,一是以申请单信息有误及不全居多,多由临床医师疏忽大意,责任心不强造成;二是护士血液标本采集方面的因素。输血科、医务科在 2012 年开展了对临床医护人员的输血知识方面培训及考核,医院加强对医务人员的责任感教育,并将样本合格率纳入临床输血质量考核体系。要求医师开具输血申请单时,必须完整规范填写患者姓名、科室、床号、住院号、医生签字等信息并字迹清晰,血型未查时可

空缺,不可随意填写。护士在采集血标本前,必须事先将试管贴上条形码或配血申请单上的联号,抽血时床边二次核查患者信息,准确无误地采集血标本,按一人一次一管的顺序逐个完成。经过一系列的培训和科室之间的沟通协作,下半年指标与上半年同比下降 63.34%。

临床输血过程复杂,涉及环节和部门较多,需要临床医师、护士和输血科技术人员共同参与^[3]。因此,提高医务人员安全质量管理意识,获得正确合格的血液标本,是保证临床输血安全的关键环节^[4]。

参考文献

[1] 颜天明. 输血科不合格标本产生的原因分析及对策[J]. 实用医技杂志, 2013, 5(3): 450-453.

[2] 雷建红, 秀措吉, 黄青平. 输血科血液标本的质量控制[J]. 青海医学医药, 2010, 40(2): 27-27.

[3] 关艳丽. 建立临床输血质量管理体系探讨[J]. 中国医学创新, 2012, 9(3): 147-149.

[4] 李晓雪, 赵素香, 赵青. 患者输血前试验血液标本拒收原因分析[J]. 中国输血杂志, 2012, 24(s1): 203-204.

(收稿日期: 2013-10-25)

(上接第 461 页)

制因子有关^[8],但与健康对照组相比仍有差异,提示肿瘤患者的免疫功能失调的状况即使在肿瘤切除后仍无法恢复至健康对照水平。

综上所述,研究结果表明肺肿瘤患者术前外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 和 CD8⁺CD28⁺ 水平降低,CD8⁺ 的表达水平升高,且与肺肿瘤病程的进展相关,与病理分型无关,提示肺肿瘤患者免疫系统处于相对抑制状态。肿瘤切除后,CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 及 CD8⁺CD28⁺ 表达升高,CD8⁺ 的表达明显降低,提示机体减轻瘤负后,抗肿瘤免疫功能有所改善。外周血 T 细胞亚群和 CD28 的检测可以用于检测患者免疫功能,可作为肺肿瘤发展的辅助诊断及预后判断的良好实验室指标。

参考文献

[1] KENNEDY R, CELIS E. Multiple roles for CD4⁺ T cells in anti-tumor immune responses[J]. Rev, 2008, 222: 129-144.

[2] LEFRANCOIS L. Development, trafficking, and function of memory T-cell subsets [J]. Immunol Rev, 2006, 211: 93-103.

[3] KENNEDY R, CELIS E. Multiple roles for CD4⁺ T

cells in anti-tumor immune responses[J]. Rev, 2008, 222: 129-144.

[4] ZHENG X, GAO J X, CHANG X, et al. B7-CD28 interaction promotes proliferation and survival but suppresses differentiation of CD4-CD8-T cells in the thymus[J]. J Immunol, 2004, 173: 2253-2261.

[5] RUDD C E, TAYLOR A, SCHNEIDER H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction [J]. Immunol Rev, 2009, 229: 12-26.

[6] RAITAKARI M, BROWN RD, SZE D, et al. T-cell expansions in patients with multiple myeloma have a phenotype of cytotoxic T cells [J]. Br J Haematol, 2000, 110: 203-209.

[7] VAN DER VLIET H J, KOON H B, ATKINS M B, et al. Exploiting regulatory T-cell populations for the immunotherapy of cancer. [J] Immunother, 2007, 30: 591-595.

[8] SANDEL M H, SPEETJENS F M, MENON A G, et al. Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression[J]. Mol Immunol, 2005, 42: 541-546.

(收稿日期: 2013-09-06)