

食管癌患者放疗前免疫状态与临床预后的相关性分析

何 健,王杰军*,钱建新,甘 露,张 霞,焦晓栋,柳 珂

第二军医大学长征医院肿瘤科,上海 200003

[摘要] **目的** 观察放疗前食管癌患者的免疫应激状态,探讨其与食管癌患者临床病理特征及预后的关系。**方法** 91例经病理组织学确诊的食管癌患者均行放射治疗,使用流式细胞仪测定其治疗前外周血 T 淋巴细胞亚群及自然杀伤(NK)细胞比例,以健康体检人群为对照观察其变化。分析放疗前免疫应激状态与食管癌患者临床病理参数之间的关系;采用单因素分析(Kaplan-Meier)法和多因素分析(Cox 比例风险模型)法研究食管癌患者预后的影响因素。**结果** 食管癌患者放疗前外周血 CD3⁺CD4⁺(Th)T 细胞、CD8⁺CD28⁺T 细胞及 NK 细胞的比例较正常对照组明显下降($P < 0.05$)。与临床病理特征的相关性分析提示:CD3⁺CD8⁺(T_s)T 淋巴细胞亚群比例则与淋巴结转移相关,而 NK 细胞与 TNM 分期相关($P < 0.05$)。单因素生存分析显示:Th 细胞比例或 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞比例高的食管癌患者其总体生存率要好于低比例患者($P < 0.05$);Cox 模型多元回归分析结果显示:外周血 Th 细胞比例是预测食管癌患者生存的独立预后因素。**结论** 放疗前外周血 Th 细胞比例可能有助于判断食管癌患者临床预后。

[关键词] 食管肿瘤;T 淋巴细胞亚群;自然杀伤细胞;放射疗法;预后

[中图分类号] R 735.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)11-1223-04

Pre-radiotherapy immunological state in patients with esophageal carcinoma and prognosis: a correlation analysis

HE Jian, WANG Jie-jun*, QIAN Jian-xin, GAN Lu, ZHANG Xia, JIAO Xiao-dong, LIU Ke

Department of Oncology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To observe the pre-radiotherapy immunological state in patients with esophageal carcinoma, and to explore its association with the clinical pathological characters and prognosis. **Methods** Totally 91 patients with pathologically confirmed esophageal cancer received radiotherapy. The proportions of T-lymphocyte subsets and natural killer (NK) cells in the peripheral blood were detected by the flow cytometry before radiotherapy; healthy population was taken as control. The correlation of immunological stress state and clinical pathological parameters were further evaluated in the patients. Univariate analysis (Kaplan-Meier) and multivariable analysis (Cox proportional hazards regression analysis) were used for survival analysis. **Results** The proportions of CD3⁺CD4⁺(Th) T cells, CD8⁺CD28⁺T cells and NK cells in pre-radiotherapy esophageal carcinoma patients were significantly lower than those in the healthy population ($P < 0.05$). We also found that the proportion of CD3⁺CD8⁺(T_s) T-lymphocytes was positively correlated with lymph node metastasis ($P < 0.05$) and the proportion of NK cells was positively correlated with TNM stage ($P < 0.05$). Univariate analysis showed that the patients with high proportions of Th or CD8⁺CD28⁺T cells had a better survival ($P < 0.05$). The multivariate analysis revealed that the proportion of Th cells before radiotherapy was an independent prognostic factor for patients with esophageal carcinoma. **Conclusion** The pre-radiotherapy proportion of Th cells in the peripheral blood is an independent prognostic factor for patients with esophageal carcinoma.

[Key words] esophageal neoplasms; T-lymphocyte subsets; natural killer cells; radiotherapy; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(11):1223-1226]

食管癌是我国的常见肿瘤之一,临床预后不佳,同步放化疗 5 年生存率 25%~27%^[1]。相关研究^[2-4]表明,肿瘤的发生、发展与宿主免疫状态关系密切,其中 T 淋巴细胞和自然杀伤(NK)细胞的变化与肿瘤的发生、发展更存在着明显的相关性。目前,在食管癌中,机体免疫状态与患者预后的相关研究

鲜有报道。本研究通过检测 91 例食管癌患者放疗前免疫状态,以探讨免疫状态与食管癌患者临床病理特征及预后的关系。

1 材料和方法

1.1 一般资料 采集 2009 年 6 月至 2011 年 6 月

[收稿日期] 2012-08-01 **[接受日期]** 2012-09-20

[作者简介] 何 健,博士生. E-mail: hejian62@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-66540109-7045, E-mail: jiejunw@cscso.org.cn

于我院收治的 91 例食管癌患者外周血,所有患者均由内镜下取活检并经病理组织学证实为食管鳞癌,其中男 63 例,女 28 例,年龄 31~88 岁,中位年龄 62 岁。所有患者均具有完整的随访资料,随访 1~35 个月,中位随访时间 16 个月。临床病理参数包括年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤长度、组织学类型、浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期等。采用常规分割方式放射治疗:每天 1 次,每次 2 Gy,每周 5 次,放疗剂量为 39.0~70.4 Gy,中位放疗剂量为 61.2 Gy。从职工健康体检者中随机选取 66 例作为对照,男 50 例,女 16 例;年龄 24~63 岁,中位年龄 43 岁。受检者体检健康,未发现身体肿瘤。按我院实验室检查参考值范围,血细胞计数及肝肾功能均正常,近 6 个月未接触放射线,近 1 个月来无服药史。

1.2 实验方法 采用流式细胞仪测定食管癌患者放疗前外周血 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞比例。从健康体检人群抽取 66 例血样为对照(正常组)。具体方法如下:各组均抽取静脉血 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,加入抗凝血 100 μ l,阴性对照抗体 20 μ l,混匀,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 40 min;加入 2 ml 溶血素,室温

避光孵育 10 min;2 000 r/min(半径 10 cm),离心 6 min,弃上清;各管加 1 ml PBS,2 000 r/min(半径 10 cm),离心 6 min;最后每管 0.5 ml PBS 重悬;同型对照确定荧光阴性范围后,依次上机测定 T 淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD3⁺ CD4⁺、CD3⁺ CD8⁺、CD8⁺ CD28⁺)和 NK 细胞水平。荧光素标记的三标抗体、溶血素均购自美国 Becton Dickinson (BD)公司。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件包进行分析处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;两组间均值的比较采用独立样本的 *t* 检验;率的比较采用 χ^2 检验;生存资料用 Log-rank 时序检验和 Kaplan-Meier 生存曲线表示,多因素分析采用 Cox 比例风险模型。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 免疫指标的比较 结果(表 1)表明:食管癌患者外周血 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺CD4⁺(Th)、CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞与 NK 细胞较正常对照组下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);CD3⁺T(总 T)淋巴细胞及 Th/Ts 比值较正常组略降低,但差异无统计学意义;CD3⁺CD8⁺T(Ts)淋巴细胞则较正常组稍微升高,但组间差异无统计学意义。

表 1 食管癌患者与正常对照组 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞比例比较
Tab 1 Comparison of T-lymphocyte subsets and natural killer (NK) cells between esophageal cancer patients and healthy population

Group	N	Total T (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ CD28 ⁺	NK cells
Healthy	66	63.05 \pm 10.58	38.60 \pm 8.88	24.34 \pm 7.99	1.79 \pm 0.90	14.29 \pm 3.91	29.60 \pm 9.70
Esophageal cancer	91	62.24 \pm 12.73	34.86 \pm 11.09*	25.68 \pm 10.01	1.60 \pm 0.88	11.01 \pm 4.28*	25.99 \pm 11.64*

* $P < 0.05$ vs healthy group

2.2 食管癌患者免疫状态与临床病理参数的相关性 以正常对照组即健康人群外周血 T 淋巴细胞亚群与 NK 细胞比例的均数为阈值[Th 淋巴细胞(38.60 \pm 8.88)%, Ts 淋巴细胞(24.34 \pm 7.99)%, CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞(14.29 \pm 3.91)%;NK 细胞(25.99 \pm 11.64)%],将食管癌患者 T 淋巴细胞亚群与 NK 细胞分为高表达及低表达两组,采用 χ^2 检验进行分析。

结果(表 2)表明:Ts 淋巴细胞高表达者 42 例,NK 细胞高表达者 26 例;食管癌患者外周血 Ts 淋巴细胞亚群低表达则与肿瘤淋巴结转移相关($P = 0.041$),而 NK 细胞低表达与 TNM 分期 III~IV 期相关($P = 0.025$)。T 总淋巴细胞、Th 淋巴细胞及 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞比例则未发现与年龄、性

别、肿瘤部位、肿瘤长度、组织学类型、浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期相关。

2.3 免疫应激状态与食管癌患者预后的关系 Th 细胞高表达的食管癌患者平均生存时间 17.0 个月,中位生存时间 15.8 个月;CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞高表达的食管癌患者平均生存时间 20.5 个月,中位生存时间 19.0 个月。单因素生存分析结果(图 1)显示:食管癌患者外周血 T 淋巴细胞亚群中 Th 细胞高表达组预后好于低表达组($P = 0.031$);CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞高表达组预后也好于低表达组($P = 0.049$)。多因素分析结果(表 3)进一步表明 Th 细胞高表达为食管癌预后的独立因素($P = 0.019$)。Cox 模型多元回归分析还发现:食管肿瘤长度是食管癌患者的独立预后因素($P = 0.000$)。

表 2 食管癌患者 CD3⁺CD8⁺ (Ts) 淋巴细胞、NK 细胞与临床病理特征之间的关系

Tab 2 Relationship of pathological parameters with CD3⁺CD8⁺ (Ts) and natural killer (NK) cells in patients with esophageal cancer

Parameter	N	Ts cells		P	NK cells		P
		(+)	(-)		(+)	(-)	
Gender				0.344			1.000
Male	63	27(42.9)	36(57.1)		18(28.6)	45(71.4)	
Female	28	15(53.6)	13(46.4)		8(28.6)	20(71.4)	
Age (year)				0.845			0.504
≤60	40	18(45.0)	22(55.0)		10(25.0)	30(75.0)	
>60	51	27(52.9)	24(47.1)		16(31.4)	35(68.6)	
Length l/cm				0.380			0.739
<5	50	21(42.0)	29(58.0)		15(30.0)	35(70.0)	
≥5	41	21(51.72)	20(48.8)		11(26.8)	30(73.2)	
Tumor location				0.848			0.972
Upper	31	14(45.2)	17(54.8)		9(29.0)	22(71.0)	
Middle	52	25(48.1)	27(51.9)		15(28.8)	37(71.2)	
Lower	8	3(37.5)	5(62.5)		2(25.0)	6(75.0)	
Invasion depth				0.744			0.330
T1	11	5(45.5)	6(45.5)		4(36.4)	7(63.6)	
T2	33	13(39.4)	20(60.6)		12(36.4)	21(63.6)	
T3	32	17(53.1)	15(46.9)		8(25.0)	24(75.0)	
T4	15	7(46.7)	8(53.3)		2(13.3)	13(86.7)	
Lymph node metastasis				0.041			0.115
N0	34	23(67.6)	11(32.4)		13(38.2)	21(61.8)	
N1	57	26(45.6)	31(54.4)		13(22.8)	44(77.2)	
TNM				0.120			0.025
I - II	36	13(36.1)	23(63.9)		15(41.7)	21(58.3)	
III - IV	55	29(52.7)	26(47.3)		11(20.0)	44(80.0)	

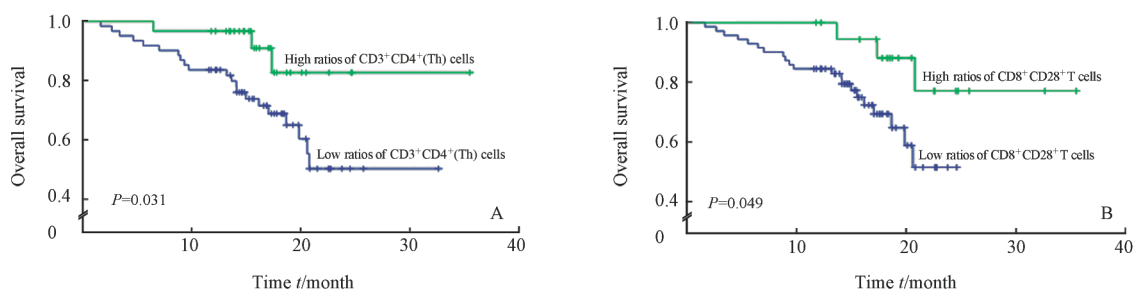


图 1 食管癌患者 CD3⁺CD4⁺ (A) 和 CD8⁺CD28⁺ T(B) 淋巴细胞表达状态与预后关系的生存分析图

Fig 1 Association of CD3⁺CD4⁺ (A) and CD8⁺CD28⁺ T(B) cells with overall survival of esophageal cancer patients by Kaplan-Meier survival curves

3 讨论

机体免疫功能正常与否直接关系到肿瘤发生、发展及患者预后。外周血中成熟的 T 细胞根据表面分化抗原不同分为辅助性 T 细胞(Th)与抑制性 T 细胞(Ts),其表面 CD 分子标志分别为 CD3⁺CD4⁺与 CD3⁺CD8⁺。Th 细胞为辅助、诱导性 T 细胞,具有协助体液免疫及细胞免疫的功能;Ts 细胞为抑制性 T 淋巴细胞,可抑制抗体的合成、分泌及 T 淋巴细胞的增殖^[5]。恶性肿瘤患者机体抵抗力低

下,且肿瘤释放可溶性物质促进 Ts 细胞产生从而抑制 Th 细胞的发育成熟,故患者 T 淋巴细胞各亚群在数量和功能上常表现为异常^[2]。大量相关文献^[3,6-9]报道:肿瘤细胞产生大量的免疫抑制因子(TDSF),使 Ts 细胞含量增加,总 T 细胞、Th 细胞减少,Th/Ts 细胞比值降低,为肿瘤生长、转移创造条件。本研究结果显示:相对于正常对照组,食管癌患者 Th 细胞数明显减少(P<0.05),而总 T 细胞及 Th/Ts 细胞比值虽然有降低,Ts 细胞数也有升高,但差异无统计学意义。此外,本研究还发现

CD8⁺CD28⁺T淋巴细胞数明显减少($P < 0.05$),与许振宗等^[6]对胃肿瘤的研究结果基本一致。

表 3 食管癌预后的多因素分析(Cox 模型多元回归分析)

Tab 3 Association of immunological stress states with overall survival by Cox proportional hazards model analysis

Variable	B	SE	Wald χ^2	df	P	Exp(B)	95.0% CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (Th)T cell	1.506	0.642	5.508	1	0.019	4.508	1.282	15.853
CD8 ⁺ CD28 ⁺ T cell	-0.481	0.640	0.564	1	0.453	0.618	0.176	2.169
Tumor length	2.017	0.533	14.331	1	0.000	7.516	2.645	21.357
TNM stage	0.892	0.506	3.105	1	0.078	2.440	0.905	6.578

B: Regression coefficient; SE: Standard error; df: Degrees of freedom; CI: Confidence interval

NK 细胞其表型标志为 CD16⁺CD56⁺,是机体抵抗肿瘤生长的第一道防线。肿瘤细胞因为组织相容性复合体(MHC) I 类基因表达减弱或丢失,无法传递抑制信号,而 NK 细胞是肿瘤早期发挥作用的效应细胞,不需要预先接触抗原,无 MHC 限制性,不依赖抗体或补体即可直接杀伤 MHC I 类基因表达低下或缺如的肿瘤细胞。有研究^[7-8]表明肿瘤患者免疫功能低下,NK 细胞降低。这可能是因为 NK 细胞被激活后,寿命很短,只有 2~3 周;同时,与 T 细胞和 B 细胞都有很长时间的免疫记忆功能不同,NK 细胞不具有类似记忆功能。所以即使肿瘤早期可能出现 NK 细胞增多,也多为一过性,后期多表现为 NK 细胞降低。本研究结果与其相一致:食管癌患者 NK 细胞比例较正常对照组低,差异具有统计学意义($P=0.04$)。

T 总淋巴细胞、Th 淋巴细胞及 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞则未发现与年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤长度、组织学类型、浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期有明显相关,与以往文献^[4,10]报道相符。本研究发现食管癌患者外周血 T_s 淋巴细胞亚群与淋巴结转移相关,NK 细胞与 TNM 分期相关($P < 0.05$)。这表明 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞在反映机体免疫功能状态的同时,还有可能作为食管癌患者分期诊断的指标。

在食管癌患者分期诊断指标中 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞的分布差异提示了免疫应激状态的差别对预后有影响。本研究发现:食管癌患者外周血 T 淋巴细胞亚群中 Th 细胞或 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞高表达组其总生存率及预后好于低表达患者($P < 0.05$),同时 Cox 模型多元回归分析结果显示 Th 细胞高表达是食管癌患者预后的独立因素。因此,可以推测:放疗前,提高食管癌患者的免疫功能对改善其预后有着积极的影响。

总之,食管癌的发生、发展、治疗反应性和转归与患者免疫状态密切相关。本研究发现:放疗前外

周血 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞与食管癌患者疾病分期显著相关,良好的免疫应激状态与食管癌患者的良性预后相关。然而,免疫应激状态与食管癌的相关性研究方面仍有许多问题需要回答,仍有必要设计严格的大样本甚至是前瞻性的临床试验和相应的动物实验来进一步探讨。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Han J,Zhu W,Yu C,Zhou X,Li T,Zhang X. Clinical study of concurrent chemoradiotherapy or radiotherapy alone for esophageal cancer patients with positive lymph node metastasis[J]. Tumori,2012,98:60-65.
- [2] Wang R F. CD8⁺ regulatory T cells,their suppressive mechanisms,and regulation in cancer [J]. Human Immunol,2008,69: 811-814.
- [3] 江虹,李菊湘. T 淋巴细胞亚群在恶性肿瘤患者外周血中的变化[J]. 检验医学与临床,2010,7:24-27.
- [4] 张力为,伊力亚尔·夏合丁,吴明拜,张铸,李德生. 食管癌患者外周血 Th1/Th2 及细胞因子表达的变化[J]. 中华实验外科杂志,2008,11:1463-1465.
- [5] Kennedy R,Celis E. Multiple roles for CD4⁺ T cells in anti-tumor immune responses [J]. Immunol Rev,2008,222: 129-144.
- [6] 许振宗,高伟,王丕明. 胃癌患者手术前后外周血 CD28 及 T 细胞亚群检测的临床意义[J]. 山东医药,2011,51:17-20.
- [7] 邹露丹,徐伟峰,熊逸群. 恶性肿瘤患者淋巴细胞亚群的测定及与癌胚抗原的关系[J]. 实验与检验医学,2008,26:57-58,66.
- [8] 宁军,龚浩. 中晚期肿瘤患者 T 淋巴细胞和 NK 细胞检测的临床意义[J]. 实用全科医学,2007,5:587-588.
- [9] 齐红,石虹,刘玉侠,王英丽. 253 例恶性肿瘤患者外周血 T 细胞亚群的检测及其临床意义分析[J]. 中国实验诊断学,2009,13:1589-1590.
- [10] 隋雪梅,邓之奎,曹维克,李元媛,宣恒报. 114 例癌症患者外周血 T 淋巴细胞亚群水平及其临床意义[J]. 现代医学,2011,39: 35-37.

[本文编辑] 贾泽军