

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.34.015

新疆Ⅱ、Ⅲ期宫颈癌患者外周血 T 细胞亚群、B 细胞、NK 细胞分析*

姜鹏^{1,3}, 胡云辉^{1,3}, 古丽娜·库尔班², 王若峥^{1,3△}

(新疆医科大学附属肿瘤医院:1. 放疗中心;2. 妇瘤放疗科, 新疆乌鲁木齐 830011;

3. 新疆肿瘤学重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的 探讨 T 细胞亚群、B 细胞、NK 细胞的比例在新疆地区宫颈癌患者中的特点。方法 随机抽取临床Ⅱ、Ⅲ期宫颈癌患者 140 例, 健康人群 159 例作为对照, 运用流式细胞术检测外周血中 T 细胞亚群、B 细胞、NK 细胞的比例。结果 宫颈癌 CD3⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、NK 细胞的比例均低于健康人群; CD4⁺T 细胞、CD4⁺/CD8⁺T 细胞比例高于健康人群, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。两组间 B 细胞比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。维吾尔族宫颈癌 CD3⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、NK 细胞比例显著低于健康人群, CD4⁺T 细胞、CD4⁺/CD8⁺T 细胞比例显著高于健康人群; 汉族宫颈癌仅 CD3⁺T 细胞比例显著低于健康人群; 所有细胞比例在维、汉之间均无显著差异。HPV16⁺组与 HPV16⁻组之间, CD4⁺T 细胞、NK 细胞比例比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。T 细胞亚群、B 细胞、NK 细胞在不同年龄、不同临床分期期间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 新疆维吾尔族Ⅱ、Ⅲ期宫颈癌患者外周血 T 细胞亚群、NK 细胞与健康人群存在差异, 且可能与 HPV 表达有关。

[关键词] 宫颈肿瘤; 免疫细胞; T 淋巴细胞亚群; NK 细胞**[中图分类号]** R730.3; R737.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)34-4796-03

Analysis of T cell subsets, B cells and NK cells on peripheral blood in patients with Ⅱ and Ⅲ stage cervical cancer in Xinjiang District*

Jiang Peng^{1,3}, Hu Yunhui^{1,3}, Gulinao · Kurban², Wang Ruozheng^{1,3△}

(Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University: 1. The Radiotherapy Center;

2. Department of Gynecological Tumor Radiotherapy, Urumqi 830011, China;

3. Key Laboratory of Oncology of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the ratio characteristic of T cell subsets, B cells and NK cells in patients with cervical cancer in Xinjiang Uygur Autonomous Region. **Methods** Randomly selected 140 patients with Ⅱ and Ⅲ cervical cancer as experimental group and 159 healthy people as control group. The proportion of T cell subsets, B cells and NK cells in peripheral blood were detected by means of flow cytometry. **Results** The CD3⁺T cells, CD8⁺T cells and NK cells of patients with Ⅱ, Ⅲ cervical cancer were lower than healthy controls, while the proportions of CD4⁺T cells and CD4⁺/CD8⁺T cells were higher than healthy controls, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference between the two groups about B cells ($P > 0.05$). The percentage of CD3⁺T cells, CD8⁺T cells and NK cells in Uighur patients with cervical cancer significantly lower than those of healthy people, while CD4⁺T cells ratio and CD4⁺/CD8⁺T cell ratio were significantly higher than healthy people. The ratio of CD3⁺T cells in Han patients with cervical cancer was significantly lower than those of health people, but there were no difference between Han and Uygur. There were significant differences between HPV16 positive and HPV16 negative, as well as in CD4⁺T cells and NK cells ($P < 0.05$). There were no statistical differences among T cell subsets, B cells and NK cells in different ages and stages. **Conclusion** There exists differences between patients with Ⅱ and Ⅲ stage cervical cancer in Xinjiang and healthy people about T cell subsets and NK cells of peripheral lymphocytes, which may be related to HPV expression.

[Key words] aterine cervical neoplasms; immune cells; T lymphocyte subsets; NK cells

宫颈癌是女性高发恶性肿瘤之一, 也是新疆特高发恶性肿瘤之一。肿瘤患者外周血 T 淋巴细胞存在数量和功能的变化, 并且与肿瘤的进展和预后相关^[1]。从宫颈上皮内瘤变向宫颈癌进展的过程中, 机体免疫细胞比例发生了变化, 如 T 细胞亚群的上调或下调。已有文献报道宫颈癌组织及外周血 T 细胞免疫功能状态, 但全面分析国际妇产科协会(the international federation of gynecology and obstetrics, FIGO)Ⅱ、Ⅲ期宫颈癌外周血 T 细胞亚群、B 细胞、NK 细胞的文献相对较少, 且研究结果存在差异。本文分析新疆地区Ⅱ、Ⅲ期宫颈癌患者外周血免疫细胞比例变化, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 5 月 1 日至 2014 年 6 月 30 日在新疆医科大学附属肿瘤医院首次确诊的宫颈癌患者 140 例(宫颈癌组), 其中, 维吾尔族 107 例, 汉族 33 例; 肿瘤分期均按 FIGO(2009 年)的分期标准, 其中, Ⅱ期 65 例, Ⅲ期 75 例; 年龄 28~81 岁, 平均(54.43±10.35)岁。健康对照组 159 例来源为该院体检中心, 年龄 28~78 岁, 平均(54.05±11.23)岁。病例纳入标准: (1)病理明确诊断为宫颈浸润癌; (2)由 1 名主治医师及 1 名高级职称医师行妇科检查明确为 FIGO Ⅱ、Ⅲ期; (3)初次诊断患者, 未行任何治疗。排除标准: (1)曾接受过放

表 1 宫颈癌组与健康对照组之间 T 细胞亚群、B 细胞、NK 细胞比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	B	NK
健康对照组	159	72.00±7.00	37.50±3.50	30.00±9.00	1.42±0.89	11.56±2.54	14.91±4.87
宫颈癌组	140	70.35±8.47	40.77±9.66	26.85±7.97	1.69±0.68	11.81±4.89	10.95±7.38
P		0.040	0.000	0.000	0.000	0.595	0.000

表 2 不同民族及健康对照组之间 T 细胞亚群、B 细胞、NK 细胞比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	B	NK
健康对照组	159	72.00±7.00	37.50±3.50	30.00±9.00	1.42±0.89	11.56±2.54	14.91±4.87
维吾尔族宫颈癌组	107	71.37±8.55	41.22±10.56*	27.37±7.58*	1.65±0.63*	11.61±4.60	10.33±6.93*
汉族宫颈癌组	33	67.75±9.01 [△]	38.90±7.55	26.55±9.65	1.71±0.83	12.68±5.57	12.62±8.86

*: P<0.05,与健康对照组比较;[△]: P<0.05,与维吾尔族宫颈癌组比较。

表 3 宫颈癌患者不同年龄分组之间 T 细胞亚群、B 细胞、NK 细胞比较($\bar{x} \pm s$)

年龄(岁)	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	B	NK
≤40	12	74.55±7.65	45.66±6.54	26.67±6.42	1.82±0.55	13.35±5.72	7.65±7.63
>40	128	69.86±8.63	40.88±8.80	27.04±8.11	1.67±0.69	11.64±4.79	11.31±7.30
P		0.601	0.283	0.279	0.267	0.255	0.898

表 4 宫颈癌患者不同临床分期之间 T 细胞亚群、B 细胞、NK 细胞比较($\bar{x} \pm s$)

分期	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	B	NK
Ⅱ期	65	71.08±7.76	40.96±10.01	26.10±7.93	1.78±0.74	11.32±4.58	10.56±6.19
Ⅲ期	75	69.93±9.28	40.85±9.12	27.62±7.67	1.60±0.57	12.18±5.03	11.08±8.30
P		0.129	0.464	0.876	0.095	0.722	0.221

表 5 HPV16⁺与 HPV16⁻之间 T 细胞亚群、B 细胞、NK 细胞比较($\bar{x} \pm s$)

HPV	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	B	NK
HPV16 ⁺	108	71.61±8.10	41.51±7.20	27.76±8.02	1.65±0.66	11.75±5.16	10.12±6.04
HPV16 ⁻	32	68.90±8.46	38.99±12.38	26.38±7.87	1.63±0.66	11.36±4.25	12.32±8.53
P		0.771	0.040	0.864	0.784	0.154	0.036

化疗及免疫治疗;(2)合并免疫系统疾病;(3)合并慢性消耗性疾病及传染病;(4)合并其他类型恶性肿瘤。所有研究对象均知情同意,并签署知情同意书。

1.2 方法 采集研究对象外周静脉血 4 mL,乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)抗凝,使用美国 Beckman 公司生产的 FC500 流式细胞仪进行检测。CD3、CD4 及 CD8 标记 T 淋巴细胞、CD19 标记 B 细胞、CD56 标记 NK 细胞。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 宫颈癌组与健康对照组间 T 细胞亚群、B 细胞、NK 细胞的比较 宫颈癌组 CD3⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、NK 细胞比例低于健康对照组,而 CD4⁺ T 细胞、CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比例高于健康对照组,差异均有统计学意义(P<0.05)。两组间 B 细胞比较差异无统计学意义(P>0.05),见表 1。

2.2 T 细胞亚群、B 细胞、NK 细胞与临床特征的相关性分析 分析不同民族、不同年龄、不同分期患者间是否存在差异。

结果发现,维吾尔族宫颈癌组 CD4⁺ T 细胞、CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比例高于健康对照组;CD8⁺ T 细胞、NK 细胞比例低于健康对照组,差异均有统计学意义(P<0.05)。而汉族宫颈癌组 CD3⁺ T 细胞低于健康对照组,差异有统计学意义(P<0.05)。维吾尔族与汉族宫颈癌比较,差异均无统计学意义(P>0.05),见表 2。宫颈癌患者年龄小于或等于 40 岁与年龄大于 40 岁之间、FIGO 临床Ⅱ期与Ⅲ期之间各免疫细胞亚群比例比较差异均无统计学意义(P>0.05),见表 3~4。

2.3 HPV16⁺组与 HPV16⁻组之间 T 细胞亚群、B 细胞、NK 细胞相关性分析 HPV16⁺组的 CD4⁺ T 细胞的比例高于 HPV16⁻组,而 NK 细胞的比例低于 HPV16⁻组,差异均有统计学意义(P<0.05),见表 5。其余免疫细胞在两组之间比较,差异无统计学意义(P>0.05)。

3 讨论

T 细胞和 NK 细胞在抗肿瘤免疫应答中发挥着重要作用^[2]。T 细胞亚群中 CD8⁺ T 细胞是抗肿瘤的主要效应细胞^[3],CD4⁺ T 细胞分泌细胞因子如 IL-2、IFN- γ 辅助诱导和激活 CD8⁺ T 细胞,二者在肿瘤免疫中处于动态平衡。固有免疫

中的 NK 细胞也参与了机体的抗肿瘤。

关于 T 细胞亚群比例变化的研究结论不尽相同。陈琬玲等^[4]发现宫颈浸润癌患者外周血中 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞数量及 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比例显著低于正常宫颈组 ($P < 0.05$)。关弘等^[5]发现胃癌患者外周血 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD4⁺/CD8⁺T 细胞比例明显低于健康对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而两组间 CD8⁺T 细胞的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。孙林等^[6]发现宫颈癌患者外周血 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD4⁺/CD8⁺T 细胞比例均明显低于健康人群, 而 CD8⁺T 细胞则明显高于健康人群。也有研究表明在宫颈癌与健康人群比较外周血 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、CD4⁺/CD8⁺T 细胞比例无明显差异^[7-8]。

另有, 研究表明宫颈癌外周血 CD4⁺T 细胞比例高于子宫肌瘤及癌前病变 ($P < 0.05$)^[9]。何春年等^[3]发现宫颈癌组织以 CD8⁺T 细胞浸润为主, CD4⁺T 细胞在宫颈浸润癌组织中的比例高于早期宫颈癌; 宫颈浸润癌与早期宫颈癌比较癌组织 B 细胞、NK 细胞阳性率下降 ($P < 0.05$)。本研究关于宫颈癌外周血 CD4⁺T 细胞、NK 细胞结论与之相似。但 CD8⁺T 细胞与之存在差异。考虑外周血与宫颈癌组织可能存在免疫功能的差异。

总之, 新疆地区 FIGO II、III 期宫颈癌 CD4⁺T 细胞、CD4⁺/CD8⁺T 细胞比例高于健康人群, CD3⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞低于健康人群, NK 细胞比例下降, 差异主要来源于维吾尔族宫颈癌患者。

排除实验本身的误差, 造成关于 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞研究结论不同的原因可以考虑以下几个方面: (1) CD4⁺T 细胞包括 Th1、Th2、Th17 和 Treg, 健康人 Treg 占外周血 CD4⁺T 细胞的 5%~10%。吴婧文等^[10]发现宫颈癌患者外周血中 Treg 细胞比例增高, Treg 被认为是下调免疫反应的重要细胞^[11]。故有必要对 CD4⁺T 细胞亚群进一步分析, 明确是否为调节性 CD4⁺T 细胞增多所致。(2) 免疫细胞功能在宫颈癌发展的每个阶段可能并不是固定不变的, 不同的人群、不同的阶段免疫细胞比例可能会有所不同。国内外相关文献报道显示宫颈癌由 FIGO I 期向 IV 期进展的同时 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、NK 细胞比例逐渐下降、CD8⁺T 细胞比例逐渐升高, CD4⁺/CD8⁺T 细胞比例逐渐下降。本研究虽然只研究了宫颈癌 FIGO II、III 期, 但其变化趋势符合上述结论。(3) 肿瘤细胞免疫主要由 CD4⁺T 细胞与 CD8⁺T 细胞完成, CD4⁺T 细胞协助 B 细胞分化产生抗体, CD8⁺T 细胞则抑制抗体的合成、抗体的分泌及 T 细胞增殖。CD4⁺T 细胞与 CD8⁺T 细胞在宫颈癌早期处于相对平衡, 而晚期平衡被打破, 免疫抑制明显。免疫细胞亚群之间的相互影响不容忽视。

虽然 B 细胞对宫颈肿瘤的抗原特异性和功能的重要性是未知的, 但已检测出 IgG1、IgG2 和 IgA 的存在。调节性 B 细胞 (Bregs) 属于 B 细胞亚群, 在肿瘤患者中 Bregs 可通过抑制自身反应性 T 细胞抑制自身免疫, 也可以通过抑制细胞毒 T 淋巴细胞活性减弱抗肿瘤免疫^[12]。有文献报道 B 细胞在宫颈癌患者中高于健康人群, 本研究未得到相似结论, 提示可能在调节性 B 细胞亚群相对数量的升高。

临床特征方面, 本研究在 FIGO II、III 期宫颈癌之间、年龄大于或等于 40 岁患者与年龄小于 40 岁患者之间未发现免疫

细胞比例存在显著差异, 今后可进一步扩大样本量进行研究。

一个涉及 22 个国家近 1 000 例宫颈癌患者的研究表明, 用 PCR 方法在 99.7% 的组织样本中检测到了 HPV 感染^[13], HPV16 是宫颈癌 HPV 感染的主要亚型, 文献表明 HPV16⁺与 HPV16⁻宫颈癌患者免疫功能存在差异。黎华文等^[14]发现高危型 HPV 感染的宫颈上皮内瘤变患者宫颈组织 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞表达下调。本研究结果显示 HPV16⁺宫颈癌 CD4⁺T 细胞比例升高, 而 NK 细胞比例下调, 提示 HPV16 感染状态与宫颈癌特异和非特异性免疫功能均存在关联。

参考文献

- [1] 田晓刚, 高力英. 外周血 T 细胞亚群检测在恶性肿瘤中的价值[J]. 甘肃医药, 2010, 29(1): 32-33.
- [2] Waldmann TA. Effective cancer therapy through immunomodulation[J]. Annu Rev Med, 2006, 57(1): 65-81.
- [3] 何春年, 刘贵香, 翟金萍, 等. 子宫颈鳞癌组织中 T、B、NK 淋巴细胞浸润与肿瘤免疫[J]. 免疫学杂志, 2005, 21(3): S115-S118.
- [4] 陈琬玲, 杨承刚, 杨宏英, 等. 宫颈癌患者外周血中 T 细胞亚群数量变化及临床意义[J]. 武警医学院学报, 2011, 20(9): 694-696.
- [5] 关弘, 温文, 黄忠华, 等. 胃癌患者外周血中 T 细胞亚群变化及临床意义[J]. 深圳中西医结合杂志, 2009, 19(3): 138-141.
- [6] 孙林, 温江涛, 周彦. 宫颈癌患者外周血 T 淋巴细胞及 NK 细胞的检测及其临床意义[J]. 标记免疫分析与临床, 2009, 16(4): 224-226.
- [7] 侯友翔, 张园, 钟薇, 等. 宫颈癌人乳头瘤病毒感染与 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞的相关性研究[J]. 新疆医科大学学报, 2013, 36(12): 1749-1752.
- [8] 陈志芳, 杜蓉, 韩英, 等. 维吾尔族宫颈癌人乳头瘤病毒感染与 CD4⁺CD25⁺CD127⁻调节性 T 细胞的相关性研究[J]. 实用妇产科杂志, 2011, 27(6): 439-443.
- [9] 付爱丽, 曹奇志, 梅延辉, 等. 白细胞相关免疫球蛋白样受体-1 在宫颈癌和子宫内膜癌患者外周血 T 细胞的表达及意义[J]. 国际免疫学杂志, 2012, 35(6): 466-469.
- [10] 吴婧文, 平波, 杨文韬, 等. 宫颈癌及其前期病变患者外周血调节 T 细胞的差异分析[J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(3): 167-172.
- [11] Thio CL, Mosbrugger TL, Kaslow RA, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene and recovery from hepatitis B virus infection[J]. J Virol, 2004, 78(20): 11258-11262.
- [12] Inoue S, Leitner WW, Golding B, et al. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity[J]. Cancer Res, 2006, 66(15): 7741-7747.
- [13] Cmieckshank ME. The role of human papillomavirus in risk management[J]. Gynecol Practice, 2003, 4(3): 229-233.
- [14] 黎华文, 张丽帆, 冯家成. 宫颈上皮内瘤变患者 CD4⁺、CD8⁺T 细胞表达与高危型 HPV 感染的关系[J]. 中国妇产科临床杂志, 2012, 13(4): 288-290.