

下咽鳞状细胞癌患者外周血T淋巴细胞亚群和NK细胞活性研究

姜元芹^① 陈爱民^① 黄煦格^② 骆献阳^① 张炳煌^① 蔡成福^① 周焱^① 刘存山^①

【摘要】目的: 分析下咽鳞状细胞癌患者外周血 T 淋巴细胞亚群和 NK 细胞活性情况, 旨在为相关研究工作提供参考资料。**方法:** 择取 2011 年 6 月-2016 年 5 月本院收治的 95 例下咽鳞状细胞癌患者为病例组, 另取此期间内来本院接受健康检查的 72 例志愿者为正常组。使用流式细胞仪对病患开展相关检查, 分析病例组与正常组的淋巴细胞亚群、NK 活性情况以及不同临床分期的下咽癌病患外周血 T 淋巴细胞亚群以及 NK 细胞活性之间的关系。**结果:** 与正常组相比, 病例组的 NK 细胞、总 B 淋巴细胞、总 T 淋巴细胞、辅助/抑制 T 细胞、辅助 T 细胞偏低 ($P < 0.05$), 活化 T 细胞以及抑制 T 细胞偏高 ($P < 0.05$)。I~II 期病患外周血总 T 淋巴细胞比 III~IV 期者稍低 ($P > 0.05$)。I~II 期病患辅助 T 淋巴细胞比 III~IV 期者略高 ($P > 0.05$)。I~II 期病患抑制 T 淋巴细胞值比 III~IV 期者低 ($P < 0.01$)。I~II 期病患辅助/抑制 T 淋巴细胞值比 III~IV 期者高 ($P < 0.01$)。I~II 期病患外周血总 B 淋巴细胞值比 III~IV 期者高 ($P < 0.05$)。I~II 期病患的活化 T 细胞和 III~IV 期者相近 ($P > 0.05$)。I~II 期病患外周血 NK 细胞数比 III~IV 期者略高 ($P > 0.05$)。**结论:** 下咽鳞状细胞癌病患的免疫功能异常, 且随着疾病的进展, 细胞免疫和体液免疫均有所降低, 证实免疫功能紊乱在疾病进展中发挥了一定作用。经流式细胞设备对外周静脉血淋巴细胞亚群以及 NK 细胞活性情况检测, 可实现动态化检测癌症病患某阶段细胞免疫功能变化详情, 此法方便简单, 在指导治疗方案制定以及监测疾病预后方面, 均体现出了一定效果, 值得进一步推广。

【关键词】 下咽鳞状细胞癌; 外周血; T 淋巴细胞亚群; NK 细胞

Research on T Lymphocyte Subsets and NK Cells Activity in Peripheral Blood of Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma/JIANG Yuanqin, CHEN Aimin, HUANG Xuge, et al./Medical Innovation of China, 2017, 14 (35): 063-066

【Abstract】Objective: To analyze the peripheral blood T lymphocyte subsets and NK cell activity in patients with hypopharyngeal squamous cell carcinoma, and to provide reference for related research work.**Method:** From June 2011 to May 2016 in our hospital 95 cases of hypopharyngeal squamous cell cancer were selected the case group, the other from this period came to our hospital for health examination of 72 volunteers were selected as the normal group. Using the relevant examination by flow cytometry, the relationship between the case group and the normal group of lymphocyte subsets and the activity of NK and different clinical staging of hypopharyngeal cancer patients peripheral blood T lymphocyte subsets and NK cell activity were analyzed.**Result:** Compared with the normal group, NK cells, total B lymphocyte, total T lymphocytes, helper/suppressor T cells, and helper T cells were lower in the case group ($P < 0.05$). The activation of T cells and inhibition of T cells were higher ($P < 0.05$). Peripheral blood total T lymphocyte of I-II stage was similarity to III-IV stage ($P > 0.05$). Helper T lymphocytes of I-II stage was slightly higher than that of III-IV stage ($P > 0.05$). The value of T lymphocyte suppression of I-II stage was lower than that of III-IV stage ($P < 0.01$). T lymphocyte count of I-II stage was higher than that of III-IV stage ($P < 0.01$). The total B lymphocyte count in peripheral blood of I-II stage was higher than that of III-IV stage ($P < 0.05$). The activated T cells of I-II stage was similar to III-IV stage ($P > 0.05$). The number of NK cells in peripheral blood of patients of I-II stage was slightly higher than that of III-IV stage ($P > 0.05$).**Conclusion:** The immune function of hypopharyngeal squamous cell cancer is abnormal, and with the progress of the disease, cellular immunity and humoral immunity are decreased, confirmed that the disorder of immune function play a certain role in the progression of the disease. The flow cytometry equipment of

①厦门大学附属第一医院 福建 厦门 361003

②广州中医药大学第一临床医学院

通信作者: 骆献阳

peripheral blood lymphocyte subsets and NK cell activity are detected, can realize the dynamic detection of cancer cell immune function in a phase change information, this method is simple and easy, in guiding the treatment plan and monitoring the prognosis of the disease, are reflected in a certain effect, it is worthy of further promotion.

【Key words】 Hypopharyngeal squamous cell carcinoma; Peripheral blood; T lymphocyte subsets; NK cells

First-author's address: The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China

doi: 10.3969/j.issn.1674-4985.2017.35.017

在整个肿瘤细胞免疫中,相对于体液免疫,细胞免疫起到了更为明显的作用^[1]。T淋巴细胞在整个免疫中起到了相当重要的作用,其在抗肿瘤免疫和机体免疫监视下均处于核心地位。与正常人相比,肿瘤病患会体现出程度不一的免疫功能异常现象,这一点主要体现在晚期肿瘤病患中^[2]。在此阶段内,患者免疫功能可能会完全丧失,这在一定程度上说明病患自身免疫能力和肿瘤的发生以及发展存在相当密切的关系。对病患开展免疫检测,有助于评价其实时免疫功能情况,这一点对于指导临床药物使用和预测肿瘤预后等均有一定的现实意义^[3]。此次研究拟使用流式细胞仪,对本院收治的95例下咽鳞状细胞癌病患为研究对象,并择选正常体检者为对照组,开展T淋巴细胞免疫表型和NK细胞活性检查工作,目的在于分析下咽癌病患自身免疫功能情况,对其开展个体化评估,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 择取2011年6月-2016年5月本院收治的95例下咽鳞状细胞癌病患为研究对象,经病理以及相关检查确诊,符合卫生部最新颁布的下咽鳞状细胞癌临床诊断标准。纳入标准:经病理证实得到确切诊断结果者,肝肾功能正常,同意参与实验调查。排除对象:自身免疫功能缺陷者,凝血功能异常者,严重心脑血管疾病者,精神疾患,其他器官器质性病变者。其中男89例,女6例。年龄26.36~72.58岁,平均(59.63±2.28)岁。疾病类型:梨状窝癌65例,环后癌12例,咽后壁癌18例。依照最新国际抗癌联盟标准^[4],对患者进行疾病分期,具体为:T₁4例、T₂20例、T₃42例、T₄29例。N₀9例、N₁14例,N₂61例,N₃11例。I期3例,II期8例,III期47例,IV期37例。受试者知晓研究过程,自愿参加实验调查,同时签署了《知情同意书》。另择取此期间内来本院接受健康检查的72例志愿者为对照组,男48例,女24例。年龄31.25~71.52岁,平均(51.25±1.25)岁。

1.2 方法 使用美国GE公司生产的流式细胞仪对病患开展相关检查,试剂为美国Becton-Dick-inson公司生产的配套试剂盒。抽取肝素抗凝血1~2 mL混合均匀,将其置放在规格为75 mm×12 mm的试管内,在试剂盒内加入相应试剂20 μL,后加入100 μL混合抗凝血。以避光条件下反应10 min。离心处理,速度为1000 r/min,离心时长5 min。去上清,加入2 mL的PBS液完成漂洗后,弃上清,加入到300 μL PBS内混合均匀,使用流式细胞设备获得数据。

1.3 观察指标 (1)分析病例组与正常组的淋巴细胞亚群以及NK细胞活性情况。(2)分析不同临床分期的下咽癌病患外周血淋巴细胞亚群以及NK细胞活性之间的关系。

1.4 统计学处理 采用SPSS 20.0软件对所得数据进行统计分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用t检验;计数资料以率(%)表示,比较采用 χ^2 检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组T淋巴细胞亚群以及NK细胞活性情况 与正常组相比,病例组的NK细胞、总B淋巴细胞、总T淋巴细胞、辅助/抑制T细胞、辅助T细胞偏低(P<0.05),活化T细胞以及抑制T细胞偏高(P<0.05),见表1。

2.2 不同临床分期的下咽癌病患外周血T淋巴细胞亚群以及NK活性之间的关系 I~II期病患外周血总T淋巴细胞比III~IV期者稍低(P>0.05)。I~II期病患辅助T淋巴细胞比III~IV期者略高(P>0.05)。I~II期病患抑制T淋巴细胞值比III~IV期者低(P<0.01)。I~II期病患辅助/抑制T淋巴细胞值比III~IV期者高(P<0.01)。I~II期病患外周血总B淋巴细胞值比III~IV期者高(P<0.05)。I~II期病患的活化T细胞和III~IV期者相近(P>0.05)。I~II期病患外周血NK细胞数比III~IV期者略高(P>0.05)。见表2。

表1 两组淋巴细胞亚群以及NK细胞活性情况($\bar{x} \pm s$)

组别	NK细胞	活化T细胞	总B淋巴细胞	辅助/抑制T细胞	抑制T细胞	辅助T细胞	总T淋巴细胞
病例组(n=95)	18.693 ± 9.737	18.376 ± 8.888	9.879 ± 3.775	0.908 ± 0.189	38.139 ± 4.850	34.063 ± 4.072	65.619 ± 10.447
正常组(n=72)	21.117 ± 5.269	16.857 ± 6.458	10.484 ± 3.460	1.174 ± 0.600	34.648 ± 8.438	36.723 ± 9.218	68.129 ± 8.865

表2 不同临床分期下咽癌病患外周血T淋巴细胞亚群以及NK活性之间的比较($\bar{x} \pm s$)

临床分期	NK细胞	活化T细胞	总B淋巴细胞	辅助/抑制T细胞	抑制T细胞	辅助T细胞	总T淋巴细胞
I~II期(n=11)	19.029 ± 12.011	18.216 ± 9.208	11.655 ± 5.359	1.462 ± 0.864	31.245 ± 8.612	39.349 ± 9.981	65.708 ± 12.069
III~IV期(n=84)	16.929 ± 8.585	18.284 ± 7.777	9.385 ± 5.881 [*]	1.164 ± 0.515 ^{**}	35.101 ± 7.215 ^{**}	37.654 ± 9.614	67.521 ± 10.112

与I~II期病患相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

下咽鳞状细胞癌为临床常见病、多发病,该疾病病死率较高,在一定程度上对病患的生命安全造成威胁^[5-6]。癌瘤的发生与遗传因素及环境因素有关。在外界环境因素中,机体免疫力降低为肿瘤发生以及发展的关键性因素,这一点已经得到证实。研究指出,肿瘤为机体免疫功能失衡而产生的有害反应和结果,而免疫力降低为引起肿瘤发生发展的关键性因素^[7-9]。

在常规情况下,人体中的辅助T细胞、机体总T细胞、B细胞、抑制T细胞比值、NK细胞和活化T细胞均处于平衡状态^[10]。下咽鳞状细胞癌病患的免疫功能相对紊乱,手术耐受性不佳,治疗效果不尽如人意^[11]。基于这种情况,临床相继研制出多种免疫功能药物,且得以广泛使用。但值得说明的是,并非所有肿瘤病患都会发生免疫功能低下或者免疫紊乱现象,即便存在免疫功能紊乱,各个病患之间的情况也存在一定差异^[12-13]。

流式细胞设备以及单克隆技术的不断进展,令淋巴细胞亚群检测成为了可能,且令免疫功能评估工作也得到了实质性进展^[14-15]。该项设备能够在短时间内对数以万计细胞的侧向角散射、荧光信号、前向角散射等参数加以分析,经测定外周血淋巴细胞亚群的变化情况,进而动态性评估机体免疫能力,反映出细胞侵袭活性情况,属于一种方便快捷测定癌症病患机体免疫的方式。其有着敏感性强、出具结果迅速、准确性高等特征,在评价临床治疗效果以及判定预后方面,有着相当重要的临床价值^[16]。

文献[17]报道,肿瘤发展成癌以及进展过程中,免疫反应突显了相当重要的作用,且变化极为复杂。免疫功能会受到甲状腺激素的调节,且分化型甲状腺癌病患外周血辅助T细胞较正常组低。本研究结果显示:与正常组相比,病例组的NK细胞、总B淋巴细胞、总T淋巴细胞、辅助/抑制T细胞、

辅助T细胞偏低($P < 0.05$),活化T细胞以及抑制T细胞偏高($P < 0.05$)。在一定程度上提示,下咽癌病患细胞免疫功能比健康者低,免疫力低下/功能紊乱在疾病发生和发展中起到了一定的作用^[18]。

有学者指出,对下咽鳞状细胞癌病患开展研究证实:与正常组相比,病例组的CD4/CD8值、CD4淋巴亚群降低,CD8淋巴亚群上升,NK细胞活性降低;与T₃~T₄组相比,T₁~T₂组,N₊组比N₀组均存在CD4淋巴亚群和CD4/CD8值降低,与此同时,NK细胞活性降低。中低分化组的CD4淋巴亚群、CD4/CD8值降低^[19]。这在一定程度上说明该疾病患者的CD4 T淋巴细胞亚群和NK细胞活性度降低,细胞免疫能力下降。对外周血T淋巴细胞亚群和NK细胞活性功能检查,可帮助检测肿瘤病患细胞免疫能力。

本研究结果证实:下咽鳞状细胞癌患者与健康人相比,辅助T细胞偏低,出现这种情况的原因与NK细胞活性下降、抑制T细胞上升存在相关性。本研究对下咽鳞癌病患的分期情况开展分析,证实:I~II期病患外周血总T淋巴细胞比III~IV期者稍低($P > 0.05$),I~II期病患辅助T淋巴细胞比III~IV期者略高($P > 0.05$),I~II期病患抑制T淋巴细胞值比III~IV期者低($P < 0.01$),I~II期病患辅助/抑制T淋巴细胞值比III~IV期者高($P < 0.01$),I~II期病患外周血总B淋巴细胞值比III~IV期者高($P < 0.05$),I~II期病患的活化T细胞和III~IV期者相近($P > 0.05$),I~II期病患外周血NK细胞数比III~IV期者略高($P > 0.05$)。该项结果指出,随着疾病的进展,不但细胞免疫功能逐渐下降,体液免疫也在减弱。有一项对环后癌的研究证实,该疾病患者中,外周血T淋巴细胞亚群存在免疫异常现象,外周血辅助T细胞水平显著降低,抑制T细胞水平提升,进而引发较为严重的比值倒置^[20]。

NK细胞有着抗肿瘤、抗感染以及抗器官移植

的效果,其参与到B淋巴细胞以及T淋巴细胞免疫调节中。NK细胞经受体作用,保持平衡,进而发挥出杀伤效用。

人体外周血NK细胞可被分成二群,高达80.00%~90.00%的NK细胞呈现出低表达,CD56呈现为高表达。这种细胞能够全面发挥细胞毒性作用,接近10.00%~20.00%的NK细胞表型为CD56brighCD16brigh,就功能而言,主要为分泌细胞,参加到机体免疫调节中。对95例下咽鳞癌病患调查指出,癌症组比非癌症组NK细胞活性低($P<0.05$)。局部晚期病患和区域性淋巴结转移病患的NK细胞活性同样下降。手术后,可显著提升T细胞亚群以及NK细胞的免疫能力。患者年龄越小,NK细胞免疫活性就越低。

综上所述,下咽鳞状细胞癌病患的免疫功能异常,且随着疾病的进展,细胞免疫和体液免疫均有所降低,证实免疫功能紊乱在疾病进展中发挥了一定作用。经流式细胞设备对外周静脉血淋巴细胞亚群以及NK细胞活性情况,可实现动态化检测肿瘤病患某阶段细胞免疫功能变化详情,此法方便简单,在指导治疗方案制定以及监测疾病预后方面,均体现出了一定效果,值得进一步推广。

参考文献

[1] 洪超群,陈炯玉,杨卫平,等.食管鳞癌患者手术前后外周血T细胞亚群与NK、NK T细胞检测的临床意义[J].现代肿瘤医学,2010,18(6):1113-1115.

[2] 高力英,田晓刚,冉俊涛,等.头颈部鳞癌同步放化疗患者外周血淋巴细胞亚群变化的研究[J].现代肿瘤医学,2011,19(4):666-668.

[3] 胡挺,张顺,徐焕龙.鼻咽癌患者外周血T淋巴细胞亚群和NK细胞检测[J].中国肿瘤,2006,15(3):195-196.

[4] 段秀梅,谭岩,方艳秋,等.CIK治疗后肿瘤患者外周血T淋巴细胞亚群和NK细胞变化研究[J].中国肿瘤临床,2003,30(7):491-493.

[5] 黄宏君,周燕玲,吴白平.肺癌患者手术前后外周血T淋巴细胞亚群及NK细胞活性分析及临床意义[J].实用预防医学,2010,17(1):151-152.

[6] 江金华,严汀华,卢穗万,等.外周血T淋巴细胞亚群与NK细胞检测在肺癌诊断及治疗中的意义[J].肿瘤研究与临床,2013,25(2):90-93.

[7] 许昕,李庆山,许艳丽,等.不同临床分期弥漫大B细胞淋巴瘤患者外周血T淋巴细胞亚群及NK细胞含量的差异及意义[J].中国医药导报,2012,9(16):37-39.

[8] 沙莎,于波,舒钟琴,等.放疗对食管鳞癌患者血清SCC、CEA、CRFRA21-1、TAG72、CA199、T淋巴细胞亚群的影响[J].海南医学院学报,2016,22(17):2003-2006.

[9] 门倩倩,欧阳电,丁卫泉,等.喉鳞癌患者外周血T淋巴细胞AgNORs表达与临床相关因素的分析[J].中国癌症杂志,2013,23(5):334-340.

[10] 陈恒琦,赫捷.术前外周血中性粒细胞与淋巴细胞比值在食管鳞状细胞癌预后评估中的价值[J].中华肿瘤杂志,2014,36(4):294-297.

[11] 吴峰,吴立连,朱立新.外周血中性粒细胞与淋巴细胞比值与头颈部鳞状细胞癌预后的关系[J].中华肿瘤杂志,2017,39(1):29-32.

[12] 寇凤生,戚树校.喉癌患者外周血NK细胞杀伤活性及T淋巴细胞亚群的变化[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2001,15(11):505-506.

[13] 李进东,王文光,许金良,等.食管鳞癌患者外周血T淋巴细胞亚群的变化[J].中国医师进修杂志,2007,30(32):25-27.

[14] Takahashi H, Sakakura K, Mito I, et al. Dynamic changes in immune cell profile in head and neck squamous cell carcinoma: Immunomodulatory effects of chemotherapy[J]. Cancer Science, 2016, 107(8):1065-1071.

[15] Lechner A, Schlöber H, Rothschild S I, et al. Characterization of tumor-associated T-lymphocyte subsets and immune checkpoint molecules in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 8(27):44418-44433.

[16] Liu H Z, Deng W, Li J L, et al. Peripheral blood lymphocyte subset levels differ in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(47):77558.

[17] Kotfis K, Biernawska J, Ąukowski M. Peripheral Blood Lymphocyte Subsets (CD4⁺, CD8⁺T Cells, NK Cells) in Patients with Cardiovascular and Neurological Complications after Carotid Endarterectomy[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(5):10077.

[18] Lübbbers J, Beerstas M H V, Vosslander S, et al. Changes in peripheral blood lymphocyte subsets during arthritis development in arthralgia patients[J]. Arthritis Research & Therapy, 2016, 18(1):205.

[19] Zhou J F, Chen Z Y, Yang S M, et al. Clinical Features and Peripheral Blood T Lymphocyte Subsets in Hand, Foot, and Mouth Disease According to Different Pathogens[J]. Indian Journal of Pediatrics, 2017, 84(2):1-4.

[20] Tada N, Kawai K, Tsuno N H, et al. Prediction of the preoperative chemoradiotherapy response for rectal cancer by peripheral blood lymphocyte subsets[J]. World Journal of Surgical Oncology, 2015, 13(1):1-10.

(收稿日期:2017-11-03)(本文编辑:程旭然)