

# 放射治疗对 NSCLC 患者外周血 Treg 细胞水平的影响

陈英, 张芬, 孙义玲, 时勇, 张敏, 王洪建

滕州市中心人民医院, 山东 滕州 277599

**摘要:** **目的** 研究放射治疗对 NSCLC 患者外周血 Treg 细胞水平的影响。**方法** 分析 50 例 NSCLC 患者放射治疗前后外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg/CD4<sup>+</sup> 比值的变化, 及其与临床特征的关系。**结果** NSCLC 患者放射治疗后 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞占 CD4<sup>+</sup>T 细胞的比例显著降低, 与肿瘤直径、肿瘤分期及分化程度有关。**结论** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞水平在 NSCLC 放射治疗过程中变化显著, 可能成为 NSCLC 预后的重要预测指标。

**关键词:** 放射治疗; NSCLC; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞

中图分类号: Q691 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2018)04-0421-03

## Effect of radiation therapy on Treg cells in peripheral blood of NSCLC patients

CHEN Ying, ZHANG Fen, SUN Yiling, SHI Yong, ZHANG Min, WANG Hongjian

Tengzhou Central People's Hospital, Tengzhou 277599 China

**Abstract:** **Objective** To study the effect of radiation therapy on peripheral blood Treg cells in NSCLC patients. **Methods** To analyze the changes of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg/CD4<sup>+</sup> cells ratio in peripheral blood of 50 NSCLC patients before and after radiation therapy, and their relationship with clinical characteristics. **Results** The proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg cells in CD4<sup>+</sup>T cells was significantly decreased after radiotherapy in NSCLC patients, which was related to tumor diameter, tumor stage and differentiation. **Conclusion** The level of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg cells significantly changed during NSCLC radiation therapy, which may be an important prognostic indicator of NSCLC.

**Key words:** Radiation Therapy; NSCLC; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg cells

放射治疗(Radiation Therapy, RT)已广泛应用于多种实体肿瘤的治疗,并取得一定疗效。机体免疫状态与肿瘤的发生和转归有关<sup>[1]</sup>,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>调节性T细胞(即Treg细胞)是具有免疫调节功能的T细胞亚群,可发挥抗肿瘤抑制作用<sup>[2]</sup>。研究表明癌症患者外周血和肿瘤组织中Treg细胞比例增加,且比例越高,预后越差<sup>[3]</sup>。本文观察了NSCLC患者RT治疗前后CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg/CD4<sup>+</sup>比值的变化,并探讨其水平与临床特点的关系。

### 1 材料与方法

**1.1 病例** 选择2017年7月-2017年12月期间在我科接受RT治疗的50例NSCLC患者,其中男33例,女17例;年龄46~80岁,中位年龄63岁。治疗前全部经纤维支气管镜或CT引导下经皮肺穿刺活检获取病理学诊断,其中鳞癌18例,腺癌28例,腺鳞癌2例,大细胞癌2例;中央型肺癌6例,周围型肺癌44例。

肿瘤直径≤3cm 10例,>3cm 40例。I期5例,II期12例,IIIa期11例,IIIb期15例,IV期7例,I~IIIb期患者因自身原因或其他原因拒绝手术(均签署告知书)而接受RT治疗。高分化7例,中分化癌11例,低分化癌32例。选择同时期我院健康体检中心常规体检者40例为对照,其中男26例,女14例;年龄50~78岁,中位年龄65岁。肺癌组和健康对照组患者在性别和年龄差异无统计学意义,具有可比性。所有对象均无自身免疫性疾病、免疫缺陷疾病或器官移植;且近3月未使用过免疫增强和(或)抑制剂。

**1.2 治疗方法** 50例患者均行IMRT放疗,采用体膜固定,德国SIEMENS制造的Sensation16 CT扫描,层厚5mm。计划系统为Pinnacle,治疗机为直线加速器Varian Clinac IX-4844,放疗剂量:95%PTV=60Gy,5次/周,共30次。

**1.3 检测方法** 空腹抽取肺癌组(RT前和RT后1

月)以及健康对照组外周血 2 ml 送检,采用流式细胞计数仪(Beckman Coulter Cytomics FC500)检测 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg/CD4<sup>+</sup> 比值。

1.4 统计学方法 SPSS 17.0 用于统计学分析,测量数据用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间比较采用 *t* 检验,放射治疗前后采用配对 *t* 检验进行两组患者比较,  $P < 0.05$  被认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 外周血 T 细胞亚群的变化 由表 1 可见:肺癌组患者较健康对照组 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); NSCLC 患者放射治疗前后 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值升高,与治疗前比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。肺癌组患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg/CD4<sup>+</sup> 比值明显高于健康对照组( $P < 0.01$ ); NSCLC 患者 RT 治疗后 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg/CD4<sup>+</sup> 比值较治疗前明显下降( $P < 0.01$ ),但仍明显高

于健康对照组( $P < 0.01$ )。

表 1 三组人群外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg/CD4<sup>+</sup> 比值(%)

组别	<i>n</i>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> Treg/CD4 <sup>+</sup>
健康对照组	40	1.73 ± 0.54	1.46 ± 0.49
肺癌 RT 治疗前	50	2.41 ± 0.13 <sup>1)</sup>	3.36 ± 0.37 <sup>2)</sup>
肺癌 RT 治疗后	50	2.28 ± 0.45	2.45 ± 0.42 <sup>3)</sup>

注:CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值:与健康对照组比较;1)  $P < 0.05$ , RT 治疗前后无差异  $P > 0.05$ 。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg/CD4<sup>+</sup> 比值:与健康对照组比较;2)  $P = 0.0001$ ;与健康对照组比较;3)  $P = 0.0019$ ; RT 治疗前后差异明显  $P = 0.0082$ 。

2.2 RT 治疗后患者外周血 Treg 表达与临床特征的相关性 分析发现:CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg/CD4<sup>+</sup> 比值与肿瘤直径、肿瘤分期及分化程度有关,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而与性别、年龄、病理类型无关。见表 2。

表 2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg/CD4<sup>+</sup> 比值与临床特征的相关性(%)

组别	例数	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> Treg/CD4 <sup>+</sup>	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
性别				
男	33	2.35 ± 0.47	1.580	0.117
女	17	2.53 ± 0.23		
年龄(岁)				
≤60	22	2.55 ± 0.65	1.352	0.179
>60	28	2.40 ± 0.31		
病理类型				
鳞癌	18	2.41 ± 0.78	0.481	0.690
腺癌	28	2.39 ± 0.66		
腺鳞癌	2	2.55 ± 0.45		
大细胞癌	2	2.48 ± 0.35		
肿瘤直径				
≤3 cm	10	2.41 ± 0.11	2.017	0.046
>3 cm	40	2.48 ± 0.19		
肿瘤分期				
I、II 期	17	2.52 ± 0.51	15.130	0
III、IV 期	33	3.15 ± 0.32		
分化程度				
高、中	18	2.41 ± 0.19	2.304	0.023
低分化	32	2.50 ± 0.21		

## 3 讨论

肺癌是导致人类死亡的常见恶性肿瘤,约 80% 为非小细胞肺癌(NSCLC)<sup>[4]</sup>,其发病人群多为中老年人,往往合并内科基础疾病,且大部分确诊时已为中晚期<sup>[5]</sup>。肺癌的死亡率逐年呈上升趋势,防控形势严峻<sup>[6-8]</sup>。放射治疗为无法手术或拒绝手术的患者提供了另一种治疗途径。有文献报道放射治疗具有改善细胞免疫功能的作用。

身体的免疫状态在对肿瘤的免疫应答中起着极

其重要的作用,近年来,癌症患者的免疫功能与预后相关性已经成为科研研究的重点之一<sup>[2]</sup>。T 淋巴细胞在抗肿瘤的免疫系统中起主要作用, T 细胞检测是观察癌症患者免疫功能最重要方法之一<sup>[9]</sup>。CD4<sup>+</sup>T 细胞为辅助性 T 细胞并在抗肿瘤中发挥积极作用。CD8<sup>+</sup>T 细胞功能是抑制免疫反应激活并具有负调节作用。早期的研究显示一类 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群能抑制 T 淋巴细胞活化,即 Treg 细胞<sup>[10]</sup>。多种恶性肿瘤患者外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞水平显著低于健康人,

CD8<sup>+</sup>T 细胞水平高于健康人, Treg 细胞显著增多<sup>[11-12]</sup>, 提示肿瘤患者的免疫状态为低。殷红梅等<sup>[13]</sup>研究发现 NSCLC 患者外周血 Treg 细胞比例显著高于健康人群。然而, 文献中也有不同的报道, 袁嘉敏等<sup>[14]</sup>发现胃癌患者外周血 CD8<sup>+</sup>T 细胞显著减少, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值增高; 罗君等<sup>[15]</sup>揭示了 211 例肺癌患者外周血淋巴细胞亚群的状态, 发现 CD8<sup>+</sup> 细胞减少并且 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比率增加。本研究通过流式细胞仪技术, 测量了 50 位 NSCLC 患者和 40 位健康志愿者的外周血 T 淋巴细胞亚种。结果显示, NSCLC 患者外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值也较健康人明显升高<sup>[1]</sup>。造成这种不一致的原因, 这可能与 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞亚型中不同功能亚型的存在有关, 研究发现 T 细胞 (CD4<sup>+</sup>) 不仅包括阳性调节性淋巴细胞, 还包括 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 淋巴细胞, 例如抑制型调节性淋巴细胞, 而 T 淋巴细胞 (CD8<sup>+</sup>) 除了免疫抑制性淋巴细胞, 还包括细胞毒性 T 效应细胞<sup>[1]</sup>。因此用 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值评估机体的免疫状态不太合理。本文中 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值在 RT 治疗后短期内未见明显变化, 因此亦无法作为即时反映免疫功能变化的参考指标。

Treg 细胞即 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞, 可下调免疫应答, 使免疫逃逸发生。其数目增加容易导致免疫耐受, 进而降低免疫系统对 NSCLC 的免疫监控, 发生免疫逃逸, 最终促进 NSCLC 的发生<sup>[16]</sup>。Marshall 等<sup>[4]</sup>研究显示, Treg 细胞在促进肺癌早发转移同时还能进一步加快转移性病灶的发展。NSCLC 患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞水平较健康人群显著升高, 且接受手术治疗的患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞的比例明显下降。体外 NSCLC 肺癌细胞中 Treg 细胞的表达亦显著增强<sup>[17]</sup>。

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞被 Sakaguchi 等首次定义后, 其作为真正具有免疫作用的调节性 T 细胞越来越受到关注。本研究结果显示, NSCLC 患者外周血 Treg 细胞的比例为 (3.36 ± 0.37)%, 显著高于健康人群 ( $P < 0.01$ ), 与付白清等<sup>[18]</sup>报道的食管癌外周血的数据 (3.72 ± 1.39)% 相近, 提示肿瘤患者免疫处于抑制状态。于荣等<sup>[19]</sup>的研究显示有效治疗后 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 可显著降低, 本文亦发现放射治疗后外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞出现明显下降 ( $P < 0.01$ ), 提示 RT 可通过免疫途径对机体产生积极影响。有研究表明: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg

是目前唯一严格意义上的 Treg 细胞标记<sup>[20]</sup>。本试验结果显示: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg/CD4<sup>+</sup> 比例与肿瘤直径、肿瘤分期及分化程度相关, 肿瘤越大、肿瘤分期越晚及分化程度越低者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg/CD4<sup>+</sup> 比例越高, 提示 Treg 细胞数目与肿瘤负荷有关, 肿瘤因素可以使 Treg 细胞增加。

非小细胞肺癌微环境中存在 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞介导的免疫抑制网络, 对其深入研究将有助于进一步了解 NSCLC 免疫调节机制, 为 NSCLC 病情及预后判断提供一定依据。在非小细胞肺癌的发生、发展过程中, 患者外周血中 Treg 细胞比例增加是确定的, 因此深入研究 Treg 细胞的免疫调节机制, 有助于了解非小细胞肺癌的免疫耐受及免疫逃逸, 为临床疗效评价提供新的方向。在这项研究中, NSCLC 患者外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞的检测水平, 不仅有助于评估患者的免疫应答状态, 还有可能有助于预测 NSCLC 的预后<sup>[3]</sup>。因本组病例较少, 仍需今后进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 宋丽. NSCLC 患者 T 淋巴细胞亚群的分布及临床意义 [D]. 苏州: 苏州大学, 2012: 1-18.
- [2] 张瑞萍, 徐冰心, 郑成中, 等. 非小细胞肺癌外周血淋巴细胞亚群及 Treg 细胞水平变化观察 [J]. 人民军医, 2013, 56(7): 808-810.
- [3] 崇杨, 江涛, 张冬华, 等. 射频消融术对原发性肝癌患者甲胎蛋白和外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞的影响 [J]. 江苏大学学报: 医学版, 2013, 23(2): 177-179.
- [4] Marshall EA, NG KW, Kung SH, et al. Emerging roles of T helper 17 and T cells in lung cancer progression and metastasis [J]. Mol Cancer, 2016, 15(1): 67-69.
- [5] Akhtari M, Bernicker EH, Teh BS. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: opportunities for advancement [J]. Chin J Cancer, 2016, 35(1): 56.
- [6] 彭艳梅, 崔慧娟, 徐央波, 等. 2005-2014 年中日友好医院肺癌发病情况研究 [J]. 中国全科医学, 2016, 5: 565-569.
- [7] 涂庆, 王宇, 黄莉. PM2.5 与肺癌相关关系及防治策略研究 [J]. 重庆医学, 2016, 45(8): 1118-1121.
- [8] 刘韞宁, 齐金蕾, 刘江美, 等. 1990 年与 2013 年中国人群肺癌疾病负担分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2016, 37(6): 752-757.
- [9] Banat GA, Tretyn A, Pullamsetti SS, et al. Immune and inflammatory cell composition of human lung cancer stroma [J]. Plos One, 2015, 10(9): 9013-9073.
- [10] Kurose K, Ohue Y, Wada H, et al. Phase in study of FoxP3 + CD4

- Treg depletion by infusion of a humanized Anti - CCR4 antibody, KW - 0761, in cancer patients [J]. Clin Cancer Res, 2015, 21 (19):4327 - 4336.
- [11] Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy [J]. Curr Opin Immunol, 2014, 27 (1):1 - 7.
- [12] Peguillet I, Milder M, Louis D, et al. High numbers of differentiated effector CD4 T cells are found in patients with cancer and correlate with clinical response after neoadjuvant therapy of breast cancer [J]. Cancer Res, 2014, 74 (8):2204 - 2216.
- [13] 殷红梅, 王磊, 胡晓波, 等. 非小细胞肺癌患者外周血 CD4 + T 淋巴细胞亚群的变化及临床意义 [J]. 检验医学与临床, 2017, 14 (6):759 - 761.
- [14] 袁嘉敏, 余齐鸣, 凌志强. 胃癌外周血淋巴细胞亚群表达水平对患者生存率的影响 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2011, 14 (10):796 - 798.
- [15] 罗君, 凌志强, 毛伟敏. 肺癌患者淋巴细胞亚群在外周血中的表达及其与预后的关系 [J]. 中国肺癌杂志, 2011, 14 (8):699 - 673.
- [16] Maruyama T, Konkd JE, Zamatron BF, et al. the molecular mechanisms of Foxp3 gene regulation [J]. Semin Immunol, 2011, 23 (6):418 - 423.
- [17] Li Q, Bao JM, Zhang T, et al. Inhibiting effect of astragalus polysaccharides on the functions of CD4 + CD25 + high Treg cells in the tumor microenvironment of human hepatocellular carcinoma [J]. Clin Med (Engl), 2012, 125 (5):786 - 793.
- [18] 付白清, 吴朝阳, 许亚平, 等. 食管癌患者外周血 CD4 + CD25 + Foxp3 + 调节性 T 细胞检测及其临床意义 [J]. 江苏大学学报: 医学版, 2008, 18 (6):532 - 534.
- [19] 于荣, 侯建青. 紫杉醇联合铂类化疗对晚期卵巢上皮细胞癌患者 CD4 + CD25 + Foxp3 + 细胞的影响及意义 [J]. 滨州医学院学报, 2012, 35 (4):248 - 250.
- [20] 焦志军, 尤海燕, 陈蕾, 等. 流式细胞术检测表达 Foxp3 的 CD4 + CD25 + 调节性 T 细胞 [J]. 临床检验杂志, 2008, 126 (13):161 - 163.

收稿日期: 2018 - 02 - 20

## 作者设计表格须知

作者在设计表格时,要合理安排主谓语,注意主谓语的位置不要颠倒。表中主谓语是通过纵横标目来体现的,标目设置合理的主谓分明,符合语言逻辑,从左至右连贯起来可读成一句通顺的话,例如:

主谓正置

表 1 乐果染毒小鼠的体重肝体比

组别	剂量 (mg/kg)	体重 ( $\bar{x} \pm s$ , g)	肝体比
染毒组	2	20 $\pm$ 2	0.10
	4	16 $\pm$ 2	0.08
	6	12 $\pm$ 3	0.04
对照组		22 $\pm$ 2	0.12

主谓倒置

表 1 乐果染毒小鼠的体重肝体比

指标	染毒组			对照组
	2 mg/kg	4 mg/kg	6 mg/kg	
体重 ( $\bar{x} \pm s$ , g)	20 $\pm$ 2	16 $\pm$ 2	12 $\pm$ 3	22 $\pm$ 2
肝体比	0.10	0.08	0.04	0.12

主谓正置的表 1 中第 1 行可读为“乐果染毒剂量为 2 mg/kg, 小鼠体重为 (20  $\pm$  2) g, 肝体比为 0.10”。而主谓倒置的则不能读出依据符合逻辑的话。请作者设计表格时注意主谓语不要倒置。

作者在设计表格时,要注意标目层合理、清楚。纵横标目都可以分层,但一般不超过 2 层,个别的可用 3 层。在谓语纵标目分层的情况下,应注意一级谓语纵标目仍然是对该纵栏内容的说明,而不是对其下一层标目的说明;一级谓语纵标目后如附计量单位,必须是该栏目参数的共用计量单位,而不是分层栏目的计量单位。

表中尽量不用非公知公用的缩写,如果必须用时,要在表下注明其中文含义。数据后面一定要用法定计量单位。例如现在有的作者的文章中,血铅还用  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , 尿铅还用  $\text{mg}/\text{L}$  表示,这是已经废除的法定单位,现在血铅和尿铅都用  $\mu\text{mol}/\text{L}$  表示;还有放射性活度单位不能用居里 (Ci),而应该用 (贝克勒尔) (Bq);表示面积的亩应该为公顷;离心机的转数 rpm 应该为  $\text{r}/\text{min}$ ;能量 (功、热) 不能再卡 (cal),而应该用焦耳 (J) 等。作者如不清楚法定单位,可参考《法定计量单位在医学上的应用》一书。

本刊编辑部