



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.11.012
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.11.012
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(11):1559-1564.

· 乳腺肿瘤专题研究 ·

乳腺癌患者外周血中 T 细胞亚群与淋巴结转移和组织学分级的关系

曾繁余¹, 彭德珍², 张珊¹, 唐巍¹, 张秋瑾³, 刘文慧³, 骆耐香³

(桂林医学院附属医院 1. 普外二科 2. 检验科, 广西 桂林 541001; 3. 桂林医学院 免疫学教研室, 广西 桂林 541004)

摘要

目的: 探讨乳腺癌患者外周血中 T 细胞亚群的变化及其与淋巴结转移和组织学分级的关系。

方法: 用流式细胞术检测 86 例乳腺癌患者以及 20 例乳腺腺病患者外周血 T 细胞亚群的百分率。

结果: 乳腺癌患者外周血总 T 细胞与 CD4⁺T 细胞百分数与腺病患者无统计学差异 (均 $P>0.05$), 但 CD8⁺T 细胞百分数低于腺病患者 ($P<0.05$)。乳腺癌患者中, 淋巴结转移者 CD4⁺T 细胞百分数高于无淋巴结转移者 ($P<0.05$); CD8⁺T 细胞百分数随组织学分级增加而升高 ($P<0.05$)。

结论: 乳腺癌患者存在细胞免疫功能紊乱, 外周血中 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞比例的变化分别与淋巴结转移、组织学分级密切相关。监测外周血 T 细胞亚群的变化, 有助于病情及预后的判断。

关键词

乳腺肿瘤; T 淋巴细胞亚群; 淋巴转移; 肿瘤分级

中图分类号: R737.9

Relations of peripheral blood T cell subsets with lymph node metastasis and histological grade in breast cancer patients

ZENG Fanyu¹, PENG Dezhen², ZHANG Shan¹, TANG Wei¹, ZHANG Qiuji³, LIU Wenhui³, LUO Naixiang³

(1. The Second Department of General Surgery 2. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China; 3. Department of Immunology, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541004, China)

Abstract

Objective: To investigate the alterations of peripheral blood T cell subsets and their relations with lymph node metastasis and histological grade in breast cancer patients.

Methods: The percentages of T cell subsets in peripheral blood in 86 patients with breast cancer and 20 patients with mammary adenosis were determined by flow cytometry.

Results: There was no significant difference in percentages of peripheral blood total T cells and CD4⁺T cells between breast cancer patients and mammary adenosis patients (both $P>0.05$), but the percentage of peripheral blood CD8⁺T cells in breast cancer patients was lower than that of mammary adenosis patients ($P<0.05$). In breast cancer patients, the percentage of CD4⁺T cells in cases with lymph node metastasis was higher than that of cases without lymph node metastasis ($P<0.05$); the percentage of CD8⁺T cells was increased with histological

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81260317); 广西壮族自治区卫生厅基金资助项目 (Z2013469); 桂林市科学技术局科技攻关基金资助项目 (20140120-1-10)。

收稿日期: 2015-07-06; **修订日期:** 2015-10-12。

作者简介: 曾繁余, 桂林医学院附属医院主任医师, 主要从事乳腺甲状腺外科临床诊疗及科研方面的研究。

通信作者: 骆耐香, Email: luonaixiang@163.com

grade increase ($P < 0.05$).

Conclusion: There are cell-mediated immune disorders in breast cancer patients, and the alteration in proportion of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells in peripheral blood is closely related to lymph node metastasis and tumor histological grade, respectively. Monitoring of the alterations in peripheral blood T cell subsets may be helpful for estimation of the disease status and prognosis.

Key words Breast Neoplasms; T-Lymphocyte Subsets; Lymphatic Metastasis; Neoplasm Grading

CLC number: R737.9

在全球范围内,乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤^[1-3]。即使在我国西部地区,发病率也较高^[4]。乳腺癌的发生、发展与多种因素有关,除了与内分泌、经济发展水平、生活习惯等关系密切外,还与机体的免疫状态密切相关。机体免疫监视功能低下及免疫调节功能紊乱,促进乳腺癌等恶性肿瘤的发生和发展。其中,微环境中免疫细胞特别是T细胞的数量和功能,在恶性肿瘤的发生、发展中发挥着重要作用。本研究采用流式细胞术检测86例乳腺癌患者外周血T细胞及其亚群,并对结果进行统计学计算,分析其与乳腺癌组织学分级及淋巴结转移的关系,为乳腺癌的免疫治疗及预后判断提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2013年7月—2014年10月在我院就诊的浸润性乳腺癌患者86例,均为女性;年龄30~79岁,平均52岁;均经病理学明确诊断,其中组织学I级22例,II级52例,III级12例。86例乳腺癌患者中,有淋巴结转移25例,无淋巴结转移61例。另选20例女性乳腺腺病患者为对照,年龄34~62岁,平均年龄49岁。采血前未接受任何治疗,所有患者无自身免疫病。

1.2 流式细胞术检测

所有观察对象均在治疗前空腹取静脉血2 mL于EDTA-K2真空抗凝采血管内,混匀。取100 μ L抗凝外周血,加入不同荧光标记抗体(美国贝克曼公司EPICS XL流式细胞仪相配套的四色淋巴细胞亚群试剂,CD45-FITC/CD4-PE/CD8-ECD/CD3-PC5)各20 μ L,震荡混匀后,室温避光孵育20 min。加入Optilyse 500 μ L震荡混匀后,室温避光孵育15 min,加入PBS 500 μ L震荡混匀

后,室温避光孵育10 min,即可上机检测,记录CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺阳性细胞占淋巴细胞百分率。

1.3 统计学处理

采用GraphPad Prism软件处理,数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两个样本均数比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总T细胞与T细胞亚群在乳腺癌外周血中的分布情况

CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺淋巴细胞分别代表总T细胞、辅助性T细胞(Th, CD4⁺T细胞)和细胞毒性T细胞(CTL, CD8⁺T细胞)。乳腺癌与腺病比较,CD3⁺、CD4⁺T细胞差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),但CD8⁺T细胞比例明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图1)(表1)。

2.2 乳腺癌患者外周血T细胞亚群与淋巴结转移关系

淋巴结转移患者CD4⁺T细胞比例高于无淋巴结转移患者,两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$);淋巴结转移患者与无淋巴结转移患者CD8⁺T细胞比例无统计学差异($P > 0.05$)(图2)(表2)。

2.3 乳腺癌患者外周血T细胞亚群与组织学分级的关系

乳腺癌组织学I、II级与III级患者,任意两者间CD4⁺T细胞比例均无统计学意义(均 $P > 0.05$),而CD8⁺T细胞比例随组织学分级增加而升高,组织学I级低于III级,差异有统计学意义($P < 0.01$);II级低于III级,差异有统计学意义($P < 0.05$);组织学I级低于与组织学II级,但差异无统计学意义($P > 0.05$)(图3)(表3)。

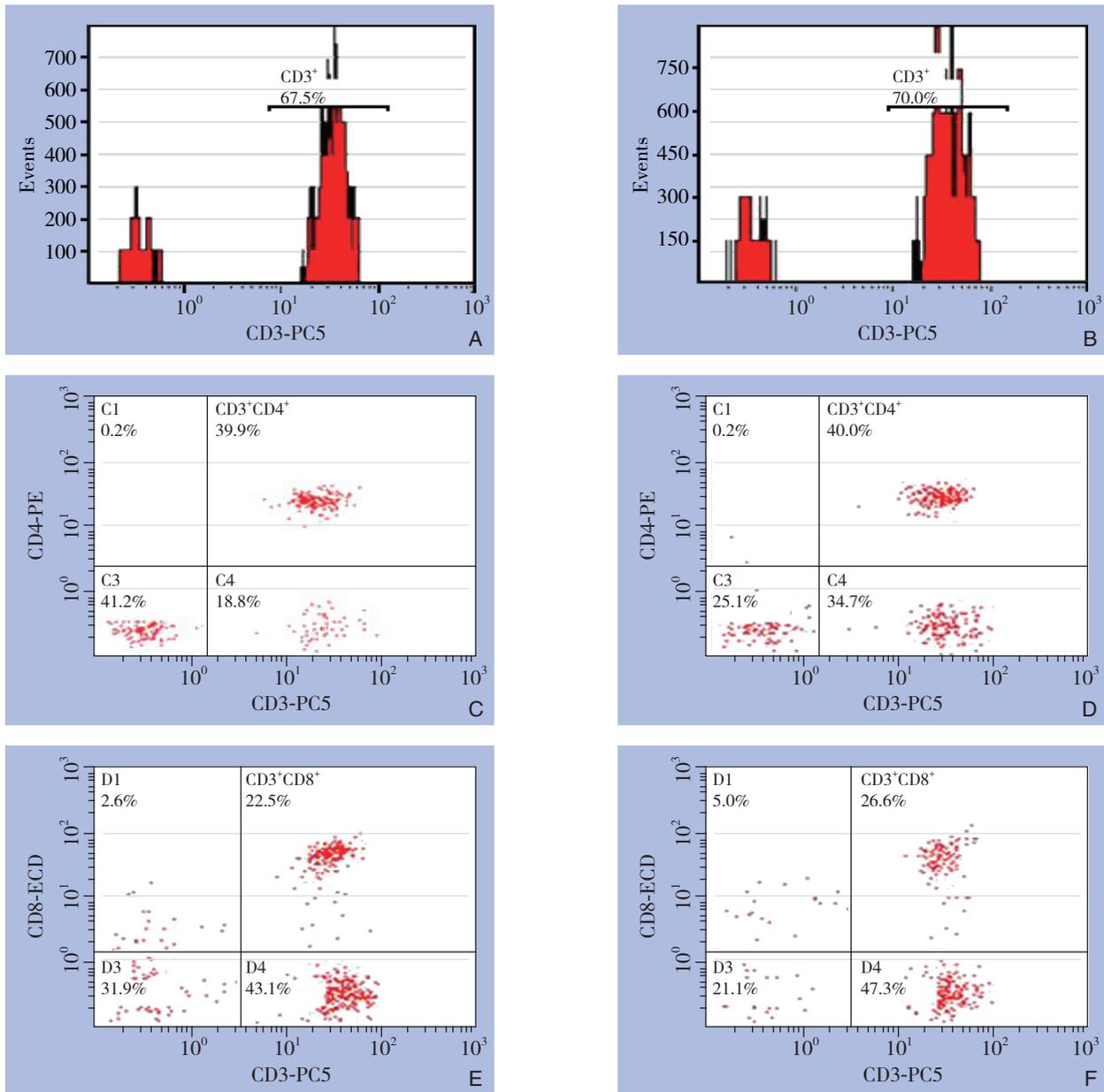


图 1 流式细胞仪检测外周血 T 细胞及其亚群比例 A: 乳腺癌患者 CD3⁺T 细胞; B: 乳腺腺病患者 CD3⁺T 细胞; C: 乳腺癌患者 CD4⁺T 细胞; D: 乳腺腺病患者 CD4⁺T 细胞; E: 乳腺癌患者 CD8⁺T 细胞; F: 乳腺腺病患者 CD8⁺T 细胞

Figure 1 Percentages of peripheral blood T cells and the subsets detected by flow cytometry A: CD3⁺T cells in breast cancer patients; B: CD3⁺T cells in mammary adenosis patients; C: CD4⁺T cells in breast cancer patients; D: CD4⁺T cells in mammary adenosis patients; E: CD8⁺T cells in breast cancer patients; F: CD8⁺T cells in mammary adenosis patients

表 1 乳腺癌与腺病患者外周血 T 细胞及其亚群比较 (%)

Table 1 Comparison of peripheral blood T cells and the subsets between breast cancer and mammary adenosis patients (%)

组别	n	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺
乳腺癌组	86	67.60 ± 7.73	39.50 ± 6.41	22.05 ± 7.51 ¹⁾
乳腺腺病组	20	70.46 ± 10.30	39.43 ± 10.05	25.88 ± 5.77

注: 1) 与腺病组比较, P<0.05

Note: 1) P<0.05 vs. mammary adenosis group

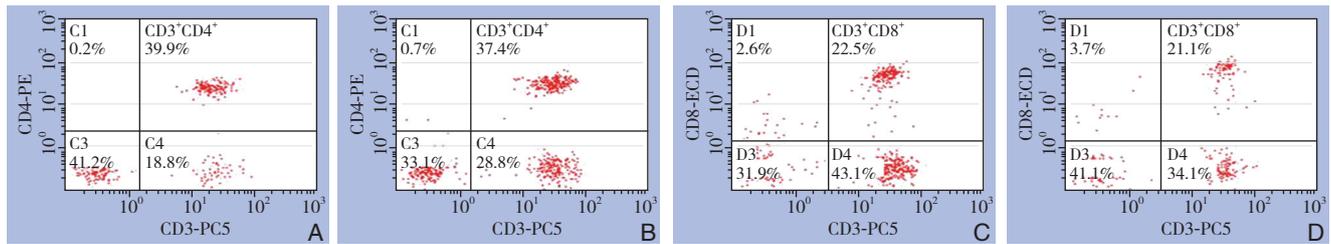


图 2 流式细胞仪检测不同淋巴结状态乳腺癌患者外周血 T 细胞亚群 A: 淋巴结转移患者的 CD4⁺T 细胞; B: 淋巴结无转移患者的 CD4⁺T 细胞; C: 淋巴结转移患者的 CD8⁺T 细胞; D: 淋巴结无转移患者 CD8⁺T 细胞

Figure 2 Peripheral blood T cell subsets in breast cancer patients with different lymph node statuses A: CD4⁺T cells in patients with lymph node metastasis; B: CD4⁺T cells in patients without lymph node metastasis; C: CD8⁺T cells in patients with lymph node metastasis; D: CD8⁺T cells in patients without lymph node metastasis

表 2 不同淋巴结状态乳腺癌患者外周血 T 细胞亚群比较 (%)

Table 2 Comparison of peripheral blood T cell subsets in breast cancer patients with different lymph node statuses (%)

组别	n	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺
淋巴结转移组	25	42.72 ± 7.72 ¹⁾	22.88 ± 5.07
淋巴结无转移组	61	38.17 ± 5.32	21.70 ± 8.32

注: 1) 与淋巴结无转移组比较, P<0.05

Note: 1) P<0.05 vs. non-lymph node metastasis group

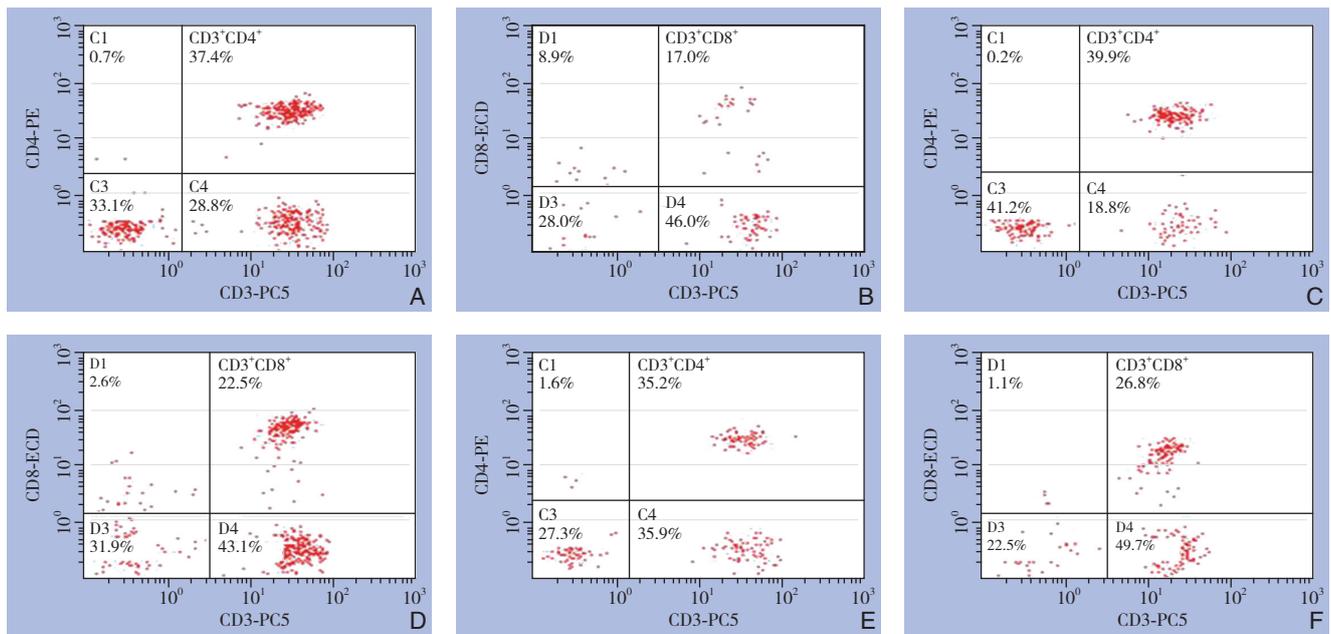


图 3 流式细胞仪检测不同组织学分级乳腺癌患者外周血 T 细胞亚群 A: 组织学 I 级患者的 CD4⁺ 细胞; B: 组织学 I 级患者 CD8⁺T 细胞; C: 组织学 II 级患者的 CD4⁺T 细胞; D: 组织学 II 级患者 CD8⁺T 细胞; E: 组织学 III 级患者的 CD4⁺T 细胞; F: 组织学 III 级患者 CD8⁺T 细胞

Figure 3 Peripheral blood T cell subsets in breast cancer patients with different histological grades A: CD4⁺T cells in patients with histological grade I; B: CD8⁺T cells in patients with histological grade I; C: CD4⁺T cells in patients with histological grade II; D: CD8⁺T cells in patients with histological grade II; E: CD4⁺T cells in patients with histological grade III; F: CD8⁺T cells in patients with histological grade III

表 3 不同组织学分级乳腺癌患者外周血 T 细胞亚群比较 (%)

Table 3 Comparison of peripheral blood T cell subsets in breast cancer patients with different histological grades (%)

组织学分级	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺
I 级	39.24 ± 6.79	19.13 ± 4.25
II 级	40.73 ± 5.46	22.46 ± 8.88
III 级	34.63 ± 7.61	25.59 ± 2.11 ^{1),2)}

注: 1) 与 I 级比较, P<0.05; 2) 与 II 级比较, P<0.05

Note: 1) P<0.05 vs. histological grade I; 2) P<0.05 vs. histological grade II

3 讨论

机体的免疫系统在正常情况下具有防御病原微生物的侵袭(免疫防御),消除体内损伤或衰老、死亡的自身细胞(免疫稳定),以及清除体内出现的极少量异常细胞(免疫监视)的功能。当人体的免疫监视功能低下时,可导致肿瘤细胞的免疫逃逸,常可引起肿瘤的形成和发展^[5-6]。一旦机体发生肿瘤,体内存在的抗肿瘤免疫,包括细胞免疫和体液免疫,就会发挥相应效应。其中T细胞是一类极其重要的免疫细胞,其介导的细胞免疫在控制肿瘤生长、杀伤肿瘤细胞以及防止肿瘤扩散和转移等方面发挥着主导作用。正常情况下,T细胞及其各亚群数目及比例在周围组织中相对稳定,其中T细胞占外周血淋巴细胞的60%~80%,CD4⁺T细胞占T细胞60%~65%,CD8⁺T细胞占30~35%。CD4⁺T细胞也称为辅助性T细胞(helper T lymphocyte, Th),迄今已陆续发现多个CD4⁺T细胞功能亚群,包括Th1细胞、Th2细胞、Th17细胞、Th9细胞、Tfh细胞、Th22细胞以及发挥免疫负调节作用的调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)等^[7-11],它们通过分泌不同类型的细胞因子而发挥不同的生物学效应。CD8⁺T细胞也称为细胞毒性T细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL),其通过自身TCR识别靶细胞表面的抗原肽-MHCI类分子复合物而发挥特异性杀伤效应。机体内各功能亚群之间存在密切联系,相互促进、相互制约。T细胞总数和比例发生变化,或其亚群的绝对数和比例发生改变,通常均可视为免疫异常,并与某些疾病发生和发展相关。

已有研究^[12-13]表明,恶性肿瘤患者体内存在T细胞亚群的状态异常以及比例失调,乳腺癌患者肿瘤组织中存在T细胞亚群的浸润^[14-15],且浸润的T细胞亚群与临床预后具有密切关系。本研究结果显示,乳腺癌患者外周血总T细胞占淋巴细胞例比为(67.60±7.73)%,乳腺癌腺病病者为(70.46±10.30)%,两者比较差异无统计学意义($P>0.05$);乳腺癌患者外周血CD4⁺T细胞百分数与腺病病者比较,差异无统计学意义($P>0.05$),与Riazi等^[16]的结果类似。虽然两组数据无差异,但由于CD4⁺T细胞存在多种亚群,特别是Treg,因此,有可能癌患者的Treg数量和比

例远高于腺病病者,使机体处于免疫抑制状态。CD8⁺T细胞比例乳腺癌患者低于腺病病者,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。虽然乳腺癌患者外周血总T细胞比例正常,但CD8⁺T细胞比例明显低于腺病病者,提示乳腺癌患者体内CD4⁺T细胞数量相对升高,机体存在免疫异常,细胞免疫受到抑制,肿瘤细胞不能被CTL特异性杀伤,从而导致肿瘤形成以及进展。但具体升高的是哪个Th亚群,有待于进一步研究。

乳腺癌患者体内存在免疫异常,其是否与淋巴结转移和/或组织学分级相关呢?对结果进行进一步分析后发现,外周血中CD4⁺T细胞比例,淋巴结转移乳腺癌患者高于无淋巴结转移患者,两者相比具有显著性差异,而与乳腺癌患者组织学分级中3组资料相比均无统计学意义,表明CD4⁺T细胞比例升高与淋巴结转移密切相关,但与组织学分级无关,提示外周血CD4⁺T细胞比例升高可能增加淋巴结转移的可能性,与肿瘤进展及预后不良有关。而淋巴结转移是判断乳腺癌患者预后的重要指标。据文献^[17]报道,我国乳腺癌患者5年内死亡的危险性,淋巴结转移者为无转移者的11.67倍,其5年生存率随淋巴结转移数量增多而下降,而淋巴结转移率能更好的评价乳腺癌患者术后的复发风险和总生存时间^[18-19]。另外,对CD8⁺T细胞的结果分析显示,CD8⁺T细胞比例,组织学I级<II级<III级,I级低于III级,II级低于III级,差异有统计学意义($P<0.05$),表明随着CD8⁺T细胞比例的升高,组织学分级则越高,两者呈正相关,提示随着CD8⁺T细胞比例的升高,预后越差。可能的解释是,增加的CD8⁺T细胞是CD8⁺CD28⁻T细胞,这类细胞不表达CD28分子,不易被激活,因而通常发挥免疫抑制作用。而CD8⁺T细胞的另外一群是CD8⁺CD28⁺T细胞,它们表达的CD28分子可结合靶细胞表达的CD80或CD86,从而发挥细胞毒作用。组织学分级与生存率密切相关,分级越高,5年和10年存活率则越低^[20]。

以上研究表明,乳腺癌患者存在有不同程度的细胞免疫功能的抑制,其免疫抑制的程度与淋巴结转移以及组织学分级都有着明显的相关性。单因素分析表明,乳腺癌患者外周血中CD4⁺T细胞比例越高越容易发生淋巴结转移,而CD8⁺T细胞比例越高组织学分级就越高,两者均与预后差密切

相关。因此,检测外周血T细胞及其亚群的数量、比例,对评估乳腺癌患者的细胞免疫功能状况、判断预后均具有重要的临床参考意义。

参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1):11-30.
- [2] Advani P, Moreno-Aspitia A. Current strategies for the prevention of breast cancer[J]. Breast Cancer (Dove Med Press), 2014, 6:59-71. doi: 10.2147/BCTT.S39114.
- [3] 郑荣寿, 张思维, 吴良有, 等. 中国肿瘤登记地区2008年恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2012, 21(1):1-12.
- [4] 曾繁余, 张珊, 唐桂荣, 等. 桂林市11167名妇女乳腺癌筛查结果分析[J]. 中国普通外科杂志, 2012, 21(5):508-510.
- [5] Manjili MH, Egilmez N, Knutson KL, et al. Tumor escape and progression under immune pressure[J]. Clin Dev Immunol, 2012, 2012:641079. doi: 10.1155/2012/641079.
- [6] Höchst B, Diehl L. Antigen shedding into the circulation contributes to tumor immune escape[J]. Oncoimmunology, 2012, 1(9):1620-1622.
- [7] Russ BE, Prier JE, Rao S, et al. T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation[J]. Front Genet, 2013, 4:218. doi: 10.3389/fgene.2013.00218.
- [8] Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, et al. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases[J]. Cytokine, 2015, 74(1):5-17.
- [9] Huang YH, Cao YF, Jiang ZY, et al. Th22 cell accumulation is associated with colorectal cancer development[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(14):4216-4224.
- [10] Végran F, Apetoh L, Ghiringhelli F. Th9 cells: a novel CD4 T-cell subset in the immune war against cancer[J]. Cancer Res, 2015, 75(3): 475-479.
- [11] 吴志懂, 覃俊仕, 罗汉传, 等. 乳腺癌患者CD4+CD25+Foxp3+调节性T细胞的变化及意义[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(5):701-706.
- [12] 迟林, 李昊森. 恶性肿瘤患者外周血淋巴细胞亚群及Treg细胞检测的临床应用[J]. 山东医药, 2010, 50(32):59-60.
- [13] Engin H, Bilir C, Tekin IO. Prognostic significance of peripheral blood flow cytometry parameters in patients with non-metastatic breast cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(12):7645-7649.
- [14] 于海明, 焦顺昌, 杨俊兰, 等. 乳腺癌原发灶T淋巴细胞浸润与预后的关系[J]. 中国医学科学院学报, 2013, 35(2):199-206.
- [15] 蒋正华, 邢旭. 肿瘤浸润T淋巴细胞在乳腺癌原发灶中的表达与预后的关系[J]. 中国现代医生, 2015, 53(6):13-16.
- [16] Riazi Rad F, Ajdary S, Omranipour R, et al. Comparative analysis of CD4+ and CD8+ T cells in tumor tissues, lymph nodes and the peripheral blood from patients with breast cancer[J]. Iran Biomed J, 2015, 19(1):35-44.
- [17] 林本耀. 乳腺癌[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2007:30-41.
- [18] 邢鹏, 李继光, 金锋. 淋巴结转移率与乳腺癌预后关系的研究[J]. 中国医科大学学报, 2015, 44(4):357-361.
- [19] 李永峰, 吴云飞, 张慧. 淋巴结转移比率在预测淋巴结转移乳腺癌患者预后中的价值[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2011, 18(7):750-754.
- [20] 李树玲. 乳腺肿瘤学[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2007:106-107.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 曾繁余, 彭德珍, 张珊, 等. 乳腺癌患者外周血中T细胞亚群与淋巴结转移和组织学分级的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(11):1559-1564. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.11.012
Cite this article as: ZENG FY, PENG DZ, ZHANG S, et al. Relations of peripheral blood T cell subsets with lymph node metastasis and histological grade in breast cancer patients[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(11):1559-1564. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.11.012