

恶性肿瘤组织 CD8⁺ / CD28⁺ 细胞表达与细胞凋亡的相关性

夏欣一¹, 吴永明¹, 潘连军¹, 黄宇烽¹, 周振英²

Correlation between CD8⁺ / CD28⁺ Cell Expression and Apoptosis in Malignant Tumor Tissue of Patients with Malignant Tumor

XIA Xin-yi¹, WU Yong-ming¹, PAN Lian-jun¹, HUANG Yu-feng¹, ZHOU Zhen-ying²

1. Institute of Clinical Laboratory Medicine, PLA, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002, China; 2. Molecular Biology Laboratory, Jiangsu Institute of Cancer Research

Abstract: **Objective** To study the correlation between CD8⁺ / CD28⁺ cell and APO expression level in malignant tumor tissue on patients with malignant tumor. **Methods** CD8⁺ / CD28⁺ cells and APO cells percentage were measured in malignant tumor tissue from 190 patients with malignant tumor by flow cytometry. The correlation was analyzed between CD8⁺ / CD28⁺ cells and APO percentage. **Results** CD8⁺ / CD28⁺ cells and APO cells percentage of malignant tumor tissue were lower than those of normal control tissue (6.86 ± 4.19) %, (1.49 ± 1.24) % and (11.85 ± 3.80) %, (4.34 ± 3.28) %, respectively, ($P < 0.01$). There was a significant positive correlation between CD8⁺ / CD28⁺ cells and APO cells percentage in malignant tumor tissue ($r = 0.5995$, $P < 0.01$). **Conclusion** Malignant tumor may induce significant decreasing of CD8⁺ / CD28⁺ cells expression and APO level in tumor tissue. The percentage of both showed a significant positive correlation. CD8⁺ / CD28⁺ cells could reduce the apoptosis of tumor cells, which may contribute to explore the mechanism of CD8⁺ / CD28⁺ cells killing malignant tumor cells.

Key words: Flow cytometry; Malignant tumor; T lymphocyte; Cell apoptosis

摘要: **目的** 探讨恶性肿瘤组织中 CD8⁺ / CD28⁺ 细胞杀伤肿瘤细胞的机制。 **方法** 用流式细胞术检测恶性肿瘤组织中 CD8⁺ / CD28⁺ 细胞表达率及细胞凋亡 (APO) 水平, 并分析两者之间的关系。 **结果** 恶性肿瘤组织的 CD8⁺ / CD28⁺ 细胞检出率为 (6.86 ± 4.19) %, 显著低于正常对照组织 (11.85 ± 3.80) % ($P < 0.01$)。恶性肿瘤组织 APO 检出率为 (1.49 ± 1.24) %, 显著低于正常对照组织 (4.34 ± 3.28) % ($P < 0.01$)。在恶性肿瘤组织中, CD8⁺ / CD28⁺ 细胞检出率和 APO 表达水平呈显著正相关 ($r = 0.5995$, $P < 0.01$)。 **结论** 恶性肿瘤能引起组织中 CD8⁺ / CD28⁺ 细胞表达率和 APO 检出率显著下降, 且二者检出率呈显著正相关。恶性肿瘤组织中 CD8⁺ / CD28⁺ 细胞杀伤肿瘤细胞的机制可能与诱导肿瘤细胞凋亡密切相关。

关键词: 流式细胞术; 恶性肿瘤; T 细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R73-3 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2006)09-0656-03

0 引言

尽管机体有着多种抗肿瘤的免疫效应, 肿瘤仍可以在体内发生、发展, 而且随着肿瘤的进展, 反过来抑制了机体的免疫功能。这提示免疫功能和肿瘤发生间的作用是相互的, 一方面免疫功能能影响肿瘤的发展, 另一方面肿瘤也能改变机体或组织的免疫功能状态, 机体的免疫功能状态与肿瘤的发生、发展过程密切相关^[1]。研究恶性肿瘤局部组织的免疫状态, 探讨

局部组织免疫细胞杀伤肿瘤细胞的机制, 不仅可以全面了解肿瘤的生物学特性, 而且也有助于在临床上选用适当的生物疗法防治肿瘤, 为肿瘤的免疫治疗提供理论依据。为此, 我们应用流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 检测了 190 例恶性肿瘤患者局部肿瘤组织中 CD8⁺ / CD28⁺ 细胞检出率和细胞凋亡 (APO) 水平, 并分析其相关性, 结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例选择 选择本院 2004 年 5 月 ~ 2005 年 6 月住院手术并经病理证实的恶性肿瘤患者 190 例, 包括乳腺癌 115 例、卵巢恶性肿瘤 39 例、宫颈癌 23 例、肝细胞癌 13 例。男性 12 例, 女性 178 例; 年龄 27 ~ 76 岁, 中位年龄 51.2 岁。均为初诊患者, 在手

收稿日期: 2005-08-01; 修回日期: 2005-09-30

作者单位: 1. 210002 南京军区南京总医院解放军临床检验医学研究所; 2. 江苏省肿瘤防治研究所分子生物学研究室

作者简介: 夏欣一 (1978-), 男, 博士, 主要从事实验诊断学的研究

术前未进行化疗、放疗或生物治疗。选择手术后新鲜肿瘤组织作为检测样品;另外在乳腺癌患者中选择临床 期患者 14 例,在其肿瘤手术切缘外 10cm 左右处取 1 小块乳腺组织作为正常对照。

1.2 方法

1.2.1 仪器、分析软件与试剂 流式细胞仪为 FACSCalibur,美国 BD 公司产品,氩离子激光器功率为 15 mW,激发光波长为 488 nm。利用 BD 公司提供的 CellQuest 软件程序,每份样品均获取 2×10^4 个细胞,并用该软件程序分析 $CD8^+/CD28^+$ 细胞的表达率;另用 Modifit3.0 软件程序分析样品的 DNA 含量,进而分析 APO 水平。 $CD8$ -FITC/ $CD28$ -PE 双标记单克隆抗体试剂购自苏州苏医生物基因技术有限公司。溶红细胞液为本实验室自行配制。

1.2.2 样品制备与染色方法 取新鲜组织 1 小块,用筛网法制成单细胞悬液,使细胞浓度调整为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,取 100 μl 细胞悬液,加 10 μl $CD8$ -FITC/ $CD28$ -PE 双标记单克隆抗体试剂,在室温暗处反应 20min,然后加入溶红细胞液 1.5 ml,溶解红细胞 10min 后,用 pH 7.4,0.01mol/L 的 PBS 缓冲液洗涤 1 次,再加 0.5ml PBS 液稀释混匀。然后上流式细胞仪检测分析 $CD8^+/CD28^+$ 细胞的检出率。恶性肿瘤组织细胞的 DNA 含量检测,采用 FCM-DNA 检测分析常规方法^[2]。在 DNA 直方图上,在二倍体细胞 G 期细胞峰前的亚二倍体细胞峰为 APO 峰,以其细胞数占分析细胞的百分比作为 APO 水平。

1.3 统计学分析

计量资料采用 t 检验,恶性肿瘤组织 $CD8^+/CD28^+$ 细胞检出率与 APO 水平行直线相关回归分析。 $P<0.05$ 为差异有显著性。所有数据分析均采用 SPSS 11.0统计软件完成。

2 结果

2.1 恶性肿瘤组织的 $CD8^+/CD28^+$ 细胞检出率和 APO 水平

恶性肿瘤组织的 $CD8^+/CD28^+$ 细胞检出率和 APO 水平均显著低于正常对照组织 ($P<0.01$),见表 1。

表 1 恶性肿瘤组织 $CD8^+/CD28^+$ 细胞检出率和 APO 水平(%)

组别	n	$CD8^+/CD28^+$		APO	
		$\bar{x} \pm s$	P	$\bar{x} \pm s$	P
恶性肿瘤	190	6.09 \pm 4.19		1.49 \pm 1.24	
			< 0.01		< 0.01
正常对照	14	11.85 \pm 3.80		4.34 \pm 3.28	

2.2 恶性肿瘤组织 $CD8^+/CD28^+$ 细胞和 APO 水平的相关性分析

对 190 例恶性肿瘤患者的 $CD8^+/CD28^+$ 细胞检出率和 APO 表达水平进行相关和回归分析,其相关系数为 $r = 0.5995$, $a = 0.4908$, $b = 0.2329$,拟合的回归方程式为 $Y = 0.4909 + 0.2329X$ 。结果显示,恶性肿瘤组织 $CD8^+/CD28^+$ 细胞检出率和 APO 表达水平呈显著正相关 ($P<0.01$)。

3 讨论

3.1 恶性肿瘤组织 $CD8^+/CD28^+$ 细胞表达和 APO 水平的特征

$CD8$ 抗原是双硫键二聚体,每个单体的相对分子质量约为 32 000 ~ 34 000。 $CD8$ 分子表达于细胞毒或抑制性 T 细胞,是该 T 细胞亚群细胞表面的特异性标记。 $CD28$ 抗原是含 2 条肽链的双硫键同构二聚体,每条肽链的相对分子质量为 44 000。根据 $CD28$ 抗原在 $CD8^+$ 细胞中表达的不同,把 $CD8^+$ 细胞分为两个细胞亚群— $CD8^+/CD28^+$ 细胞和 $CD8^+/CD28^-$ 细胞,即细胞毒 T 细胞(CTL)和抑制性 T 细胞。早在 1863 年 Virchow 等就发现肿瘤局部有炎性细胞浸润,以后逐渐认识到肿瘤局部的炎性细胞主要是淋巴细胞,这些淋巴细胞浸润可能表明了体内抗肿瘤的免疫反应;在 1986 年美国学者 Rosenberg 等就从肿瘤组织内分离到了肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltration lymphocyte, TIL);进一步研究证实, TIL 细胞中主要是 T 细胞,而在这些 T 细胞中又以细胞毒 T 细胞(CTL)为主。因此,肿瘤局部组织 CTL 的检测比外周血 T 细胞分析更能直接反映肿瘤-宿主的免疫应答状态^[3]。本研究显示,恶性肿瘤组织中 $CD8^+/CD28^+$ 细胞检出率显著低于正常对照组织。这表明肿瘤组织的免疫能力均有所下降,即其免疫应答反应可能受到肿瘤因素的抑制。

CTL 被激活后是机体重要的抗肿瘤效应细胞,可直接杀伤带有致敏抗原肽-MHC 分子的肿瘤细胞,它们对肿瘤细胞的识别和杀伤受 MHC 抗原的限制,杀伤带有相同等位型 MHC 类抗原的肿瘤细胞。CTL 杀伤肿瘤细胞机制主要是 CTL 与肿瘤靶细胞结合形成效靶结合物,通过 TCR 与抗原肽-MHC 复合物及粘附分子介导的信号传导过程,使 CTL 细胞脱颗粒。在 Ca^{2+} 存在的条件下,CTL 分泌的细胞毒颗粒--穿孔素和颗粒酶进入效靶细胞之间的微环境中,穿孔素聚合形成多聚穿孔素,插入靶细胞膜形成穿膜的管样结构,一方面使细胞膜通透性变化, Na^+ 、水进入细胞内, K^+ 及大分子(如蛋

白质)从靶细胞内流出,改变靶细胞的渗透压,最终导致靶细胞溶解,另一方面是颗粒酶的协同作用,引起典型肿瘤靶细胞溶解^[4]。这些都是 CTL 以使肿瘤细胞溶解坏死的方式杀伤肿瘤细胞。但目前有关 CTL 以诱导肿瘤细胞凋亡的方式杀伤肿瘤细胞的报道还不多,尤其是得到临床资料证实的报告更少^[4]。本文对 190 例恶性肿瘤患者肿瘤组织 APO 检测发现肿瘤组织 APO 表达水平显著低于正常对照组织,而且 APO 水平下降与 CD8⁺/CD28⁺ 细胞检出率下降呈明显的正相关关系。这表明诱导肿瘤细胞凋亡可能是细胞毒 T 细胞杀伤肿瘤细胞的重要方式之一。有文献报道,CTL 细胞膜上的 Fas 配体(Fas ligand, FasL)与肿瘤细胞上的 Fas 相互作用,是诱导靶细胞凋亡的主要途径之一。Fas 具有传导细胞凋亡信号的作用,是一种细胞凋亡诱导受体。FasL 是激活的 T 细胞所表达的一种跨膜糖蛋白,属于肿瘤坏死因子家族,相对分子质量为 40 000。FasL-Fas 相互作用,使 Fas 的细胞内死亡功能区交联,启动信号传导过程,最终导致肿瘤靶细胞凋亡^[5]。

3.2 恶性肿瘤组织 CD8⁺/CD28⁺ 细胞和 APO 水平检测的临床意义

恶性肿瘤组织中 CD8⁺/CD28⁺ 细胞和 APO 表达水平都是恶性肿瘤的生物学指标。近半个世纪以来,关于实体瘤中 TIL(以 CTL 为主)的大量报道都一致认为 TIL 的浸润程度与肿瘤的预后呈正相关。如 Lipponen 等^[6]认为,肿瘤组织内 TIL 含量多少,可作为评价肿瘤预后的独立指标。这提示 TIL 是具有一定免疫学意义的浸润,而不是简单地从血流中的渗出。还有文献报道,细胞凋亡不仅是反映肿瘤治疗效果的指标,而且也是判断肿瘤恶性度及预

后的生物学指标^[7,8]。本文结果显示,恶性肿瘤组织中 CD8⁺/CD28⁺ 细胞检出率与 APO 水平均显著降低,并有良好的正相关关系。如果用这两项生物学指标同时判断肿瘤的恶性程度和估计患者的预后,这将提高对肿瘤恶性程度判断及患者预后估计的准确性。另外,如果应用 FCM 把 CTL 从恶性肿瘤组织中分离出来,经 IL-2 体外培养激活后用于恶性肿瘤的治疗,CTL 的抗肿瘤效果比 LAK 细胞要增强 50~100 倍。因此,CTL 用于恶性肿瘤治疗,可以把肿瘤的免疫治疗研究推向更高的阶段^[4,9]。

参考文献:

- [1] 陈腾,施靖华,赵荣华,等. 大肠癌患者手术前后淋巴细胞表型 CD49b、CD49d 的测定及其临床意义[J]. 肿瘤防治研究, 2003, 30(6): 511-512.
- [2] 周振英,王书奎,朱月清,等. 几种肿瘤转移促进基因在肿瘤组织中表达的检测[J]. 肿瘤防治研究, 2003, 30(6): 466-467.
- [3] 谭敏,王吉甫. 大肠癌患者癌周组织免疫细胞的分布及其意义[J]. 癌症, 1996, 15(4): 287-289.
- [4] 杨镇. 肿瘤免疫学[M]. 武汉:湖北科学技术出版社, 1998. 31-64.
- [5] 彭黎明,王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000. 38-68, 245-285.
- [6] Lipponen PK, Eekdinen MJ, Jauhainen K, et al. Tumor infiltrating lymphocytes as an independent prognosis factor in transitional cell bladder cancer[J]. Eur J Cancer, 1992, 29: 69.
- [7] 尹岚岚,王友群. 抗癌药物的作用途径及其新靶点[J]. 中华男科学, 2002, 8(3): 221-223.
- [8] Wiest I, Seliger C, Walzel H, et al. Induction of apoptosis in human breast cancer and trophoblast tumor cells by galectin-1[J]. Anticancer Res, 2005, 25(3A): 1575-1580.
- [9] Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy[J]. Cancer Immunol Immunother, 2005, 54(8): 721-728.

[编辑:贺文]