

热化疗对晚期恶性肿瘤患者外周血 CD8⁺ CD28⁺ T 细胞表达的影响及临床意义

王 仲,周新伏,唐铁钢,罗自勉,尹亚飞,贺泽文

Influence and Clinical Significance of Thermochemotherapy on Expression of CD8⁺ CD28⁺ T Subtype Cells in Peripheral Blood of Patients with Advanced Malignant Tumors

WANG Zhong, ZHOU Xin-fu, TANG Tie-gang, LUO Zi-mian, YIN Ya-fei, HE Ze-wen

Department of Hematology and Oncology, Xiangtan Central Hospital, Xiangtan 411100, China

Abstract: Objective To explore the influence and clinical significance of thermochemotherapy on the expression of CD8⁺ CD28⁺ T (CTL), subtype cells in peripheral blood of patients with advanced lung cancer, colorectal cancer or breast cancer. **Methods** Advanced patients with lung cancer, colorectal cancer or breast cancer (20 cases, respectively) were divided into two groups with thermochemotherapy and chemotherapy randomly. There were 10 cases of lung cancer, colorectal cancer or breast cancer patients were in each group. Thermochemotherapy group was given whole body thermotherapy concurrently with each cycle chemotherapy. Two cycles treatment were given to them, 20 healthy volunteers were used as control. The T subtype cells of CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ in peripheral blood were analyzed by flow cytometry. **Results** T subtype cells of CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ of the malignant group showed no significance compared with the normal group ($P>0.05$), CD8⁺ CD28⁺ expressed lower and could be upregulated significantly after thermochemotherapy ($P<0.05$). There were no significance prior and after chemotherapy ($P>0.05$). The response rate and quality of life of thermochemotherapy group were better than those of chemotherapy group ($P<0.05$), 3 to 4 grade bone marrow suppression and response of digestive tract showed no significance after treatment in the two groups ($P>0.05$). T subtype cells of CD8⁺ CD28⁺ showed no correlation with tumor pathological type. **Conclusion** The costimulatory molecule of CD28 of T cells expressed lower and existing tumor cells immune escape in advanced malignant patients, thermochemotherapy can upregulate expression of CD8⁺ CD28⁺ on peripheral T cells, enhance immune surveillance function, showing advantage on curative effect and prognostic compare with chemotherapy.

Key words: Thermochemotherapy; Chemotherapy; Advanced cancer; CTL

摘 要:目的 探讨热化疗对晚期肺癌、大肠癌、乳腺癌患者外周血 CD8⁺ CD28⁺ T 细胞亚群(CTL)表达的影响及临床意义。**方法** 晚期肺癌、乳腺癌、大肠癌患者各 20 例,随机分为热化疗与化疗两组,每组肺癌、乳腺癌、大肠癌患者各 10 例,热化疗组每周化疗予以同步全身热疗,至少完成两个周期治疗,正常健康志愿者 20 例作为健康对照,用流式细胞仪检测外周血 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ T 细胞亚群。**结果** 与健康对照组相比,肿瘤患者外周血 T 细胞 CD4⁺、CD8⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 的表达差异无统计学意义 ($P>0.05$), CD8⁺ CD28⁺ 的表达显著降低 ($P<0.05$), 热化疗组患者治疗后 T 细胞 CD8⁺ CD28⁺ 表达上调,与治疗前比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 化疗组患者治疗前后 T 细胞 CD8⁺ CD28⁺ 的表达差异无统计学意义 ($P>0.05$), 热化疗组患者的有效率、生存质量优于化疗组患者 ($P<0.05$), 两组治疗的 III~IV 度骨髓抑制及消化道反应比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), T 细胞 CD8⁺ CD28⁺ 的表达与肿瘤病理类型无关。**结论** 晚期肿瘤患者 T 细胞存在共刺激分子 CD28 表达的低下及肿瘤细胞的免疫逃逸,热化疗能上调 T 细胞 CD8⁺ CD28⁺ 的表达,增强肿瘤患者的免疫监视功能,在疗效与预后上较化疗有优势。

关键词: 热化疗;化疗;晚期肿瘤;CTL

中图分类号:R730.58 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2011)12-1405-04

收稿日期:2011-04-21;修回日期:2011-07-11

作者单位:411100 湖南湘潭,湖南省湘潭市中心医院血液肿瘤科

作者简介:王仲(1972-),男,硕士,主治医师,主要从事肿瘤内科临床工作

0 引言

肿瘤的发生、发展过程与机体的免疫状态密切相关。细胞免疫是机体抗肿瘤免疫的主要方式。T 淋巴细胞是细胞免疫中的主要效应细胞。细胞免疫应

答的中心环节是 T 细胞对抗原的识别和激活,进而导致免疫表型的改变。人类肿瘤特异性 T 细胞大多为 CD8⁺ T 细胞,分为抑制性 T 细胞(CD8⁺ CD28⁻ T 细胞, Ts)和细胞毒性 T 细胞(CD8⁺ CD28⁺ T 细胞, CTL), CTL 是直接杀伤肿瘤细胞的免疫效应细胞^[1]。我们采用流式细胞仪检测了晚期肺癌、大肠癌、乳腺癌患者外周血 CD8⁺ CD28⁺ T 细胞亚群的表达,并探讨热化疗对其表达的影响及临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2010 年 3 月—2011 年 3 月在我科住院的晚期肺癌、乳腺癌、大肠癌患者各 20 例,均经临床、影像学资料检查、病理确诊。其中肺鳞癌 12 例,肺腺癌 8 例,乳腺癌均为浸润性导管癌,大肠癌中结、直肠癌各 10 例;肺癌初治 12 例,复治 8 例,乳腺癌初治 5 例,复治 15 例,结肠癌初治 3 例,复治 7 例,直肠癌初治 4 例,复治 6 例,随机分为化疗与热化疗两组,每组肺癌、乳腺癌、大肠癌患者各 10 例,两组患者的病理类型、性别、年龄、初复治病例数等一般资料均具有可比性,年龄 41~75 岁(中位年龄 63 岁)。20 例健康志愿者作为健康对照组,年龄 40~70 岁(中位年龄 58 岁),均无自身免疫性疾病,未使用免疫抑制药物。

1.2 外周血标本

抽取患者空腹外周静脉血 2 ml,标本用肝素抗凝,抽取后 4 h 内处理完毕。

1.3 试剂

单荧光标记抗体 anti-hCD3-FITC、anti-hCD4-APC、anti-hCD8-PE、anti-hCD28-PerCP 和红细胞裂解液均购自美国 BD 公司。

1.4 四色荧光染色方法及数据分析

每份血标本,取试管 1 支,分别加入单抗 anti-hCD3-FITC、anti-hCD8-PE、anti-hCD28-PerCP 各 10 μ l, anti-hCD4-APC 5 μ l, 然后加入抗凝血 100 μ l, 混匀,室温避光 20 min, 每管加入 2 ml 红细胞裂解液,振荡混匀,避光 10 min,离心弃上清液, PBS 洗涤 2 次,2 h 内上流式细胞仪分析。所有样品均以美国 BD 公司的流式细胞仪和配套的 Cell Quest 软件进行四色荧光参数获取及分析。

1.5 化疗方案及其实施

所有入选病例均无化疗禁忌证,治疗前血常规、肝肾功能、心电图正常, Karnofsky 评分 ≥ 70 分。肺癌选用 TP(多西他赛+顺铂)、GP(吉西他滨+顺铂)、NP(长春瑞滨+顺铂)、EP(依托泊苷+顺铂)等方案,乳腺癌选用 TAC(多西他赛+吡柔吡星+环磷酰胺)、GP(吉西他滨+顺铂)、NP(长春瑞滨+顺铂)等方案,大肠癌选用 FLP(亚叶酸钙+氟尿嘧

啉+奥沙利铂)、FOLFOX4、XELOX 等方案。中量以上胸腹水的患者通过胸腔置管给药。根据患者既往治疗情况确定化疗方案,参考患者年龄、重要脏器功能及 KPS 评分等确定药物剂量。至少完成两个周期的化疗。

1.6 热疗及其实施

采用上海华源 WB-I 型微波聚束高功率全身热疗机加热,对躯干部位进行移动加温,重点加热肿瘤病灶部位,移动区域:上界第 4 前肋,下界耻骨联合,左右为锁骨中线,输出功率 500~800 W,设置加热温度为 40℃~42℃,热疗时间共计 90 min,一般每周两次,两次间隔时间 ≥ 48 h,冰枕头降温,亚冬眠疗法增强热耐受。用热电偶测温,测温点:(1)外耳道深部,距外耳门约 2 cm;(2)食管腔内距门齿约 30 cm;(3)直肠内距齿状线约 10 cm。根据治疗时的监测温度,自动控制调节主机输出功率。热疗时间为 90 min,一般每周两次,两次间隔时间 ≥ 48 h,冰枕头降温,亚冬眠疗法增强热耐受。热疗与化疗同步进行,患者在化疗药物输注的同时进行热疗。

1.7 疗效与不良反应评价

(1)治疗前后行 CT、MRI 扫描以判断疗效,按 RECIST^[2]标准评价。(2)胸腹水控制以胸腹水 B 型超声探查结果,参照 WHO 规定的标准分为:完全缓解(CR):胸腹水消失,症状缓解并持续 1 月以上;部分缓解(PR):胸腹水显著减少(50%以上),症状缓解并持续 1 月以上;稳定(SD):胸腹水减少(不足 50%),无增加趋势,症状部分缓解;无效(PD):腹水无减少或增加,症状加重。CR+PR 为有效。采用 KPS 评分评价生存质量,总生存期(OS)评价生存期。不良反应按 WHO 标准分为 0~IV 度^[3]。

1.8 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件包进行统计学分析, *t* 检验或 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤患者与健康对照组 T 细胞亚群的表达情况

与健康对照组相比,肿瘤患者外周血 T 细胞 CD4⁺、CD8⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$), CD8⁺ CD28⁺ T 细胞显著降低($P < 0.05$), CD8⁺ CD28⁺ T 细胞的表达与肿瘤病理类型无关,见表 1。

2.2 热化疗与化疗对肿瘤患者 T 细胞 CD8⁺ CD28⁺ 表达的影响

热化疗组患者治疗后 T 细胞 CD8⁺ CD28⁺ 表达上调,与治疗前比较差异有统计学意义($P < 0.05$),化疗组患者治疗前后 T 细胞 CD8⁺ CD28⁺ 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 1 晚期恶性肿瘤患者与对照组 T 细胞亚群的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 1 Comparison of T subtype cells between advanced cancer and control group($\bar{x} \pm s, \%$)				
Groups	Cases	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD28 ⁺
Control	20	54.30 ± 4.31	43.32 ± 4.12	30.43 ± 3.80 ^a
Tumor	60	52.23 ± 8.36	42.23 ± 6.51	22.58 ± 5.37 ^b
Lung cancer	20	53.61 ± 5.16	43.33 ± 5.30	23.12 ± 7.11
Breast cancer	20	51.26 ± 6.07	44.41 ± 7.02	21.25 ± 3.83
Colorectal cancer	20	52.10 ± 6.76	40.14 ± 5.65	24.32 ± 4.36

Note: a vs. b, $P < 0.05$

表 2 晚期恶性肿瘤患者治疗前后 T 淋巴细胞亚群的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 2 T subtype cells piror and after treatment in advanced cancer patients($\bar{x} \pm s, \%$)				
Groups	Cases	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD28 ⁺
Piror chemo-therapy	30	53.24 ± 6.18	43.24 ± 4.45	22.81 ± 9.33
After chemo-therapy	30	52.14 ± 8.20	44.61 ± 6.46	22.53 ± 7.35
Piror thermo-chemotherapy	30	51.62 ± 9.26	41.76 ± 7.25	23.11 ± 4.52 ^c
After thermo-chemotherapy	30	53.43 ± 5.61	42.42 ± 3.34	28.52 ± 2.68 ^d

Note: c vs. d, $P < 0.05$

2.3 两治疗组疗效与不良反应的比较

按 RECIST 标准评价,热化疗组 18 例有效,12 例无效,有效率为 60.0%,化疗组 10 例有效,20 例无效,有效率为 33.3%,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。热化疗组胸腹水控制率为 75.0% (12/16),化疗组胸腹水控制率为 37.5% (6/16),两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组治疗的Ⅲ~Ⅳ度骨髓抑制及消化道反应比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

表 3 热化疗组与化疗组的有效率、Ⅲ~Ⅳ度骨髓抑制及消化道反应的比较

Table 3 Comparison of response rate, 3 to 4 grade bone marrow suppression and response of digestive tract between thermochemotherapy and chemotherapy groups				
Groups	Effective cases	Ineffective cases	Bone marrow suppression cases (3~4 grade)	Gastrointestinal side effect cases (3~4 grade)
Thermochemo-therapy group	18(12)	12(4)	6	5
Chemotherapy group	10(6)	20(10)	7	6

Note: malignant effusion cases in parenthesis, solid tumors chi-square = 4.29, malignant effusion chi-square = 4.57, both $P < 0.05$

3 讨论

CD8⁺ CD28⁺ T 细胞又称细胞毒性 T 细胞 (CTL, Tc),对肿瘤细胞具有特异性杀伤作用,T 细胞 TCR 识别抗原提呈细胞 (APC) 提呈的抗原肽-MHC 分子复合物,导致 T 细胞 CD3 和辅助受体 CD4/CD8 分子胞质段尾部聚集,并促使它们胞质区免疫受体酪氨酸活化基序 (ITAM) 磷酸化,进而启动信号转导途径,为 T 细胞活化的第一刺激信号^[4],为了保持 TCR 的激活信号需要 T 细胞协同刺激分子的共同参与,其中 CD28 和 B7 激活途径在抗肿瘤免疫中起重要作用^[5-6]。T 细胞的 CD28/瘤细胞 B7 这对协同刺激分子表达的缺失往往导致肿瘤免疫的无能和肿瘤细胞的免疫逃逸^[7]。CTL 杀伤肿瘤细胞的机制有两方面:一是通过其抗原受体识别肿瘤细胞上的特异性抗原,并在 Th 细胞的辅助下活化后直接杀伤肿瘤细胞;二是活化的 CTL 通过释放穿孔素、颗粒酶,分泌 IFN- γ 、TNF- α 、TNF- β 及高表达 FasL 致靶细胞溶解或凋亡等间接地杀伤肿瘤细胞^[8-9]。

实验研究表明加热前列腺癌细胞能增加 Th1 类细胞因子及减少 Th2 类细胞因子释放^[10],热疗能够增强肿瘤患者的免疫功能,能逆转 Th1 向 Th2 细胞的漂移,使细胞因子 IFN- γ 的表达增加^[11]。Monsuez 等^[12]发现 IFN- γ 能上调 CD4⁺ CD28⁺ 细胞表达,热疗能够增强肿瘤细胞的免疫原性及树突状细胞等抗原提呈细胞的活性,增加热休克蛋白及共刺激分子的表达,使迁徙募集进入肿瘤区域的淋巴细胞增多^[13],Guo 等^[14]用瘤内注射树突状细胞联合局部热疗治疗黑色素瘤,黑色素瘤特异性的 IFN- γ 的表达显著增加,增加活化的 CTL (CD8⁺ CD28⁺) 的肿瘤浸润,能延长晚期恶性黑色素瘤患者的无进展生存时间。这些说明了热疗可通过增加细胞因子 IFN- γ 的表达进而上调 T 细胞 CD8⁺ CD28⁺ 的表达,增强肿瘤细胞的免疫原性及抗原提呈细胞的活性,增加共刺激分子的表达,提高了机体的肿瘤免疫功能进而发挥抗肿瘤疗效。亚致死热剂量即具有放疗增敏作用,热疗能通过放疗增敏控制肿瘤,热疗与放疗联合治疗有显著的生存获益^[15-16],也说明了热化疗等综合治疗具有协同治疗作用。

本研究发现,晚期肿瘤患者外周血 T 细胞 CD8⁺ CD28⁺ 的表达显著降低($P < 0.05$),热化疗后显著上调($P < 0.05$),而化疗前后 T 细胞 CD8⁺ CD28⁺ 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$),热化疗组的有效率高于化疗组 (60% vs. 33.3%, $P < 0.05$),提示肿瘤患者存在 T 细胞 CD8⁺ CD28⁺ 表达的低下及肿瘤免疫监视功能的缺失,热化疗能纠正这

种状态,并在疗效上得到体现。热疗对癌性胸腹水的控制有独特的疗效已成共识,Chen 等^[17]发现胸水中 CTL 功能的衰退可以通过双刺激信号逆转;化疗联合 CTL 免疫治疗能增加腹水中 IFN- γ 与 IL-12 的分泌,而对 TGF- β 1 的分泌无影响,对于腹腔内复发的胃癌是一种可供选择而无严重不良反应的治疗方法^[18]。本文热化疗组胸腹水控制率较化疗组高出 1 倍(75% vs. 37.5%, $P < 0.05$),也认为热化疗可能通过增强 CTL 的肿瘤免疫监视作用来更好地控制胸腹水,同时带来了患者生存质量的提高。随访两组患者,热化疗组中位 OS 7 月,化疗组中位 OS 5 月,热化疗的临床获益更大。

总之,本研究结果表明热化疗能上调晚期肿瘤患者外周血 T 细胞 CD8⁺ CD28⁺ 的表达,增强了肿瘤患者的免疫功能,从肿瘤免疫学角度探讨了热化疗作用的新机制。

参考文献:

- [1] Mami-Chouaib F, Echchakir H, Dorothée G, et al. Antitumor cytotoxic T-lymphocyte response in human lung carcinoma: identification of a tumor-associated antigen[J]. Immunol Rev, 2002, 188: 114-121.
- [2] Tsuchida Y, Therasse P. Response evaluation criteria in solid tumors(RECIST): New guide lines [J]. Med Pediatr Oncol, 2001, 37(1): 1.
- [3] 周际昌. 实用肿瘤内科学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 29-30.
- [4] Guy CS, Vignali DA. Organization of proximal signal initiation at the TCR/CD3 complex[J]. Immunol Rev, 2009, 232(1): 7-21.
- [5] Tuosto L, Acuto O. CD28 affects the earliest signaling events generated by TCR engagement[J]. Eur J Immunol, 1998, 28(7): 2131-2142.
- [6] Melero I, Bach N, Chen L. Costimulation, tolerance and ignorance of cytolytic T lymphocytes in immune responses to tumor antigens[J]. Life Sci, 1997, 60(23): 2035-2041.
- [7] Gross G, Margalit A. Targeting tumor-associated antigens to the MHC class I presentation pathway[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2007, 7(2): 99-109.
- [8] Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy[J]. Cancer Immunol Immunother, 2005, 54(8): 721-728.
- [9] Li Q, Kawada T. The mechanism of organophosphorus pesticide-induced inhibition of cytolytic activity of killer cells[J]. Cell Mol Immunol, 2006, 3(3): 171-178.
- [10] Kramer G, Steiner GE, Gröbl M, et al. Response to sublethal heat treatment of prostatic tumor cells and of prostatic tumor infiltrating T-cells[J]. Prostate, 2004, 58(2): 109-120.
- [11] 康明强, 曹颖平, 邓帆, 等. 胸腔热灌注治疗对肺癌胸水患者 Th1/Th2 免疫反应状态的影响[J]. 癌症, 2008, 27(2): 210-213.
- [12] Monsuez JJ, Carcelain G, Charniot JC, et al. T cells subtypes in a patient with interferon-alpha induced sarcoidosis[J]. Am J Med Sci, 2009, 337(1): 60-62.
- [13] Baronzio G, Gramaglia A, Fiorentini G. Hyperthermia and immunity. A brief overview[J]. In Vivo, 2006, 20(6A): 689-695.
- [14] Guo J, Zhu J, Sheng X, et al. Intratumoral injection of dendritic cells in combination with local hyperthermia induces systemic antitumor effect in patients with advanced melanoma[J]. Int J Cancer, 2007, 120(11): 2418-2425.
- [15] Peer AJ, Grimm MJ, Zynda ER, et al. Diverse immune mechanisms may contribute to the survival benefit seen in cancer patients receiving hyperthermia[J]. Immunol Res, 2010, 46(1-3): 137-154.
- [16] DeNardo GL, DeNardo SJ. Update: Turning the heat on cancer[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2008, 23(6): 671-680.
- [17] Chen YM, Tsai CM, Whang-Peng J, et al. Double signal stimulation was required for full recovery of the autologous tumor-killing effect of effusion-associated lymphocytes[J]. Chest, 2002, 122(4): 1421-1427.
- [18] Toh U, Fujii T, Mishima M, et al. Conventional chemotherapy combined with the repetitive immune cell transfer for patients with refractory advanced gastric cancer[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2007, 34(12): 1931-1933.

[编辑校对: 黄园玲]