

乳腺癌患者手术前后外周血 CD8⁺/CD28⁻ 表达及意义

李晓勇¹⁾, 李建¹⁾, 樊华¹⁾, 张筱东²⁾, 刘宇宏²⁾

(1) 延安大学附属医院普外科; 2) 延安大学附属医院血液科, 陕西延安 716000)

[摘要] **目的** 探讨乳腺癌患者手术前后外周血淋巴细胞表型 CD8、CD28 变化及临床意义。 **方法** 应用 CD8、CD28 单克隆抗体, 采用流式细胞术, 对 40 例乳腺癌和 25 例对照组手术前后 CD8, CD8⁺CD28⁺ 和 CD8⁺CD28⁻ 进行测定。 **结果** 乳腺癌 CD8 的表达 (32.8 ± 4.5) % 高于对照组 (30.4 ± 3.3) %, $P < 0.05$, 而 CD8⁺CD28⁺ 细胞表达 (10.4 ± 1.7) % 则低于对照组 (14.3 ± 2.6) %, CD8⁺CD28⁻ 细胞表达 (25.1 ± 2.8) % 高于对照组 (19.6 ± 2.3) %, $P < 0.01$ 。切除肿瘤后, 外周血 CD8、CD8⁺CD28⁻ 细胞、CD8⁺CD28⁺ 测定值 (31.9 ± 4.3) % (15.4 ± 2.7) % (20.4 ± 2.8) % 与正常对照组相比无明显变化, $P > 0.05$ 。手术前后 CD8、CD8⁺CD28⁻ 细胞、CD8⁺CD28⁺ 细胞测定值均有差异 $P < 0.05$ 。 **结论** 乳腺癌手术切除后, 细胞毒性 T 淋巴细胞免疫防御和免疫监视增强, 免疫抑制减弱, 减少肿瘤免疫逃逸, 对乳腺癌免疫治疗和预后判断具有一定的指导意义。

[关键词] 乳腺癌, T 细胞亚群, 淋巴细胞表型 CD28, 流式细胞术

[中图分类号] R737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 08 - 0092 - 04

Clinical Significance and Expression of CD8⁺CD28⁻ T Cells in the Peripheral Blood of Patients with Breast Cancer before and after Operation

LI Xiao - yong¹⁾, LI Jian¹⁾, FAN Hua¹⁾, ZHANG Xiao - dong²⁾, LIU Yu - hong²⁾

(1) Dept. of General Surgery; 2) Dept. of Hematology, The Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an Shaanxi 716000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of CD8 and CD28 lymphocytes in peripheral blood of patients with breast cancer before and after operation and explore its clinical significance. **Method** Flow cytometry was applied to test the expression of CD8, CD8⁺CD28⁺ and CD8⁺CD28⁻ in the peripheral blood of both 40 patients with breast cancer and 25 healthy controls. **Results** The expression levels of CD8 in patients with breast cancer were significantly higher than those in healthy controls [(30.4 ± 3.3) % VS. 30.4 ± 3.3) %, $P < 0.05$]. The expression levels of CD8⁺CD28⁺ in patients with breast cancer were significantly lower than those in healthy controls [(10.4 ± 1.7) % VS. (14.3 ± 2.6) %, $P < 0.05$]. The expression levels of CD8⁺CD28⁻ in patients with breast cancer were significantly higher than those in healthy controls [(25.1 ± 2.8) % VS. (19.6 ± 2.3) %, $P < 0.05$]. After operation, the expression levels of CD8, CD8⁺CD28⁺ and CD8⁺CD28⁻ [(31.9 ± 4.3) %, (15.4 ± 2.7) % and (20.4 ± 2.8) %, respectively] in peripheral blood of patients with breast cancer had no significant change compared with the healthy controls. The expression levels of CD8, CD8⁺CD28⁺ and CD8⁺CD28⁻ in peripheral blood of patients with breast cancer had significant difference between before and after operation. **Conclusions** After surgical operation, the immune defence and immune surveillance of cytotoxic T lymphocytes can be enhanced, immune suppression and tumor escape can be reduced. The assays of cell phenotypes CD8 and CD28 might be useful for evaluating the immunal state and prognosis of patients with breast cancer.

[Key words] Breast cancer; T-lymphocytes; CD28; Flow cytometry

[基金项目] 陕西省卫生厅科研基金资助项目 (2012D19)

[作者简介] 李晓勇 (1975 ~), 男, 陕西陵县人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事普外科工作。

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一, 其发病率在全球呈逐渐上升趋势, 发病日趋年轻化. 目前临床上乳腺癌的治疗方法还是手术、放疗、化疗为主, 但由于存在种种弊端, 生物免疫治疗成为第四种肿瘤模式. T 细胞是介导肿瘤免疫应答的重要细胞, 通过对 40 例乳腺癌患者手术前后外周血 T 细胞 CD8⁺CD28⁺ 及 CD8⁺CD28⁻ 亚群水平测定, 以探讨乳腺癌患者免疫功能的改变, 为生物免疫治疗奠定基础.

1 资料与方法

1.1 一般资料

所有患者均为女性, 选取 2011 年 2 月至 2012 年 2 月期间 40 例乳腺癌住院患者. 年龄 30 ~ 75 岁, 平均 49.8 岁. 上述肿瘤标本 38 例病理类型为浸润性导管癌, 1 例为小叶癌, 1 例为乳腺粘液癌, 术前未接受放化疗, 经临床和实验室检查排除肝肾功能疾患、糖尿病、免疫缺陷病、复发乳腺癌患者. 对照组: 乳腺良性病变 10 例, 病理类型为乳房纤维腺瘤或乳腺囊性增生症, 年龄 23 ~ 74 岁, 平均 45.6 岁, 另取正常健康志愿者外周血 15 份, 年龄 32 ~ 70 岁, 平均 50.2 岁. 乳腺癌患者和对照组患者年龄无统计学差异.

1.2 试剂及检测方法

采用鼠抗人 CD3-PerCP、CD4-FITC、PE - CD8、FITC - CD19 抗体, FITC 标记的鼠抗人 CD28 抗体. 同型对照分别为 PE 标记的鼠抗人 IgG 免疫球蛋白. FITC 标记的鼠抗人 IgG 免疫球蛋白 (均为美国 BD 公司产品). 流式细胞仪为美国 BD 公司. 所有标本采集在受检者清晨空腹、术前 3 d, 术后 7 ~ 10 d 进行, 静脉血 2 mL, 肝素抗凝, 将 100 μ L 抗凝全血放入试管中, 每管加入荧光素抗体 10 μ L, 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育 40 min, 样本加入 500 μ L FACS 溶血素, 室温溶血 30 min, 流式细胞仪检测 CD3、CD4、CD8、CD19、CD28.

1.3 统计学方法

实验数据应用 SPSS 统计软件包进行, *t* 检验或配对 *t* 检验, 检验水准设为 $\alpha = 0.05$.

2 结果

乳腺癌患者外周血中 CD3、CD4、CD8、CD19 数量的变化 (表 1).

术前乳腺癌患者外周血中 CD8⁺CD28⁺、CD8⁺CD28⁻ 细胞的改变 (表 2), 结果表明术前外周血 CD8⁺ 测定值较对照组高, CD8⁺CD28⁻ 测定值较对照组显著升高, CD8⁺CD28⁺ 测定值与正常对照组相比明显下降, 差异有统计学意义, $P < 0.01$.

术后乳腺癌患者外周血中 CD8⁺CD28⁺、CD8⁺CD28⁻ 细胞的改变 (表 3), 结果表明术后外周血 CD8⁺ 测定值, CD8⁺CD28⁻ 测定值 CD8⁺CD28⁺ 测定值与正常对照组相比无明显变化, 统计学差异无显著性, $P > 0.05$. 提示乳腺癌肿瘤负荷对机体的免疫功能有抑制作用.

乳腺癌患者手术前后 CD8, CD8⁺CD28⁺、CD8⁺CD28⁻ 细胞的改变 (表 4), 结果表明手术后 CD8、CD8⁺CD28⁻ 较手术前下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$). 手术后 CD8⁺CD28⁺ 较手术前上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$).

3 讨论

淋巴细胞的免疫功能在肿瘤的发生、发展中起重要作用, 是构成机体免疫防御功能的重要因素^[1]. CD8⁺T 细胞根据 CD28 的表达与否分为细胞毒 T 细胞 (CD8⁺CD28⁺) 和抑制性 T (CD8⁺CD28⁻) 细胞. CD8⁺CD28⁺T 细胞具有识别抗原的特异性, 能直接针对病毒和病毒感染的细胞发挥杀伤效应, 并与肿瘤直接接触, 通过释放穿孔素和颗粒酶等细胞毒性物质, 溶解靶细胞, 还通过释放一些细胞因子诱导靶细胞凋亡^[2]. CD8⁺CD28⁺ 细胞数下降导致免疫监视受损, 肿瘤细胞扩散^[3]. CD8⁺CD28⁻T 细胞是调节 T 细胞独有的细胞亚群, 是一群终末分化的细胞毒 T 细胞, 具有抑制 T、B 淋巴细胞激活和浆细胞产生抗体, 起到抑制细胞、体液免疫和细胞毒活性, 抑制 T 淋巴细胞克隆扩增等作用^[4]. 且表达越高, 预后越差^[4]. 有研究表明^[3], APC 表

表 1 乳腺癌患者与对照组外周血中免疫细胞数量的变化 [$(\bar{x} \pm s)$, %]

Tab. 1 The changes of immune cells in peripheral blood of patients with breast cancer and healthy controls [$(\bar{x} \pm s)$, %]

组别	n	CD3	CD4	CD8	CD19
对照组	25	70.8 \pm 5.2	50.3 \pm 4.4	30.4 \pm 3.3	9.8 \pm 2.5
乳腺癌组	40	72.9 \pm 4.2	47.7 \pm 5.9	32.8 \pm 4.5*	8.8 \pm 2.5

与对照组比较, * $P < 0.05$.

表 2 术前乳腺癌患者外周血中 CD8⁺CD28⁺, CD8⁺CD28⁻ 与对照组比较 $[(\bar{x} \pm s), (\%)]$ Tap . 2 Comparison of CD8⁺CD28⁺ and CD8⁺CD28⁻ in peripheral blood between patients with breast cancer and healthy controls before operation $[(\bar{x} \pm s), (\%)]$

组 别	n	CD8	CD8 ⁺ CD28 ⁺	CD8 ⁺ CD28 ⁻
对照组	25	30.4 ± 3.3	14.3 ± 2.6	19.6 ± 2.3
乳腺癌组	40	32.8 ± 4.5*	10.4 ± 1.7**	25.1 ± 2.8**

与对照组比较, *P<0.05, **P<0.01.

表 3 术后乳腺癌患者外周血中 CD8⁺CD28⁺, CD8⁺CD28⁻ 与对照组比较 $[(\bar{x} \pm s), (\%)]$ Tap . 3 Comparison of CD8⁺CD28⁺ and CD8⁺CD28⁻ in peripheral blood between patients with breast cancer and healthy controls after operation $[(\bar{x} \pm s), (\%)]$

组 别	n	CD8	CD8 ⁺ CD28 ⁺	CD8 ⁺ CD28 ⁻
对照组	25	30.4 ± 3.3	14.3 ± 2.6	19.6 ± 2.3
乳腺癌组	40	31.9 ± 4.3	15.4 ± 2.7	20.4 ± 2.8

表 4 乳腺癌手术前后外周血 CD8、CD8⁺CD28⁺, CD8⁺CD28⁻ 比较 $[(\bar{x} \pm s), (\%)]$ Tap . 4 Comparison of CD8, CD8⁺CD28⁺ and CD8⁺CD28⁻ in peripheral blood of patients with breast cancer between before and after operation $[(\bar{x} \pm s), (\%)]$

组 别	n	CD8	CD8 ⁺ CD28 ⁺	CD8 ⁺ CD28 ⁻
术 前	40	32.8 ± 4.5	10.4 ± 1.7	25.1 ± 2.8
术 后	40	31.9 ± 4.3*	15.4 ± 2.7**	20.4 ± 2.8**

与术前比较, *P<0.05, **P<0.01.

面的 MHC 多肽结合 TCR/CD3, 使得细胞近端 TCR- ζ 链磷酸化, 最终刺激 T 细胞活化. 而 TCR- ζ 链减少, T 细胞缺乏活性, T 细胞凋亡, CD8⁺CD28⁺ 下降. 另有研究说明^[5,6], CD8⁺CD28⁻ 细胞是通过识别抗原提呈细胞 (APC) 表面的 MHC 多肽, 下调抑制受体和共刺激分子 (B7 发挥作用, 使得 APC 细胞免疫耐受.

Banks 等^[7]研究发现在肿瘤患者体内 T, B 细胞、单核细胞、自然杀伤细胞等细胞亚群无明显改变. 实验得出: 乳腺癌患者 CD3、CD4、CD19 T 细胞亚群无改变, 但 T 细胞亚群中 CD8⁺ 数量较对照组升高, 说明患者乳腺癌存在免疫调控的异常. 乳腺癌患者手术前外周血中 CD8⁺CD28⁻T 细胞和 CD8⁺T 细胞比例高于正常对照组, 而手术后降低趋于正常, CD8⁺CD28⁻T 细胞测定值较对照组下降, 手术后上升, 提示细胞免疫参与了乳腺癌的发病, 使肿瘤患者免疫功能紊乱且处于抑制状态, 且外周血细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 数量下降, 机体缺乏有效的第二信号刺激, 导致抗肿瘤免疫能力下降, 对识别肿瘤细胞的能力减弱, 逃避了 CTL 的杀伤作用, 使肿瘤细胞得以增殖、扩散. 可见外周血中 CD8⁺CD28⁻T 细胞和 CD8⁺CD28⁺T 细胞与乳腺癌发病机理 (如机体的免疫监视能力的改变等) 有相关性, 同时也显示乳腺癌病人存在着严重细胞免疫受抑. 这与肝癌、大肠癌、肺癌报道相一致

^[8-10] 随着手术切除瘤组织, 降低了肿瘤负荷, 患者外周血的 CD8⁺CD28⁻ 细胞、CD8⁺T 细胞比例均明显降低, 趋于正常无显著性差异. 说明肿瘤微环境存在多样性的细胞因子网络^[11], 肿瘤切除后分泌的抑制因子减少, 宿主的抗肿瘤活性增强. 也提示外周血 CD8⁺CD28⁻T 细胞和 CD8⁺T 细胞表达水平的变化, 可能对乳腺癌的治疗疗效及判断预后等方面有一定临床指导价值.

[参考文献]

- [1] GONG M C, LATOUCHE J B, KRAUSE A, et al. Cancer patient T cell genetically targeted to prostate-specific membrane antigen specifically lyse prostate cancer cells and release cytokines in response to prostate-specific membrane antigen[J]. Neoplasia, 1999, 1(2):123 - 127.
- [2] MAIM H, PAHLMAN C, VERESS B, et al. Combined costimulation blockade prevents rejection of allogeneic islets in mice[J]. Scand.Immunol, 2006, 64(4):398 - 403.
- [3] GRUBER I V, EI YOUSFI S, DURR-STORZER, et al. D - own-regulation of CD28, TCR-zeta (zeta) and Up-regulation of FAS in Peripheral Cytotoxic T-cells of Primary Breast Cancer Patients [J]. Anticancer, 2008, 28 (2A): 779 - 784.
- [4] FILACI G, FENOGLIO D, FRAVEGA M, et al. CD8⁺CD28⁻ T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and

(下转第 97 页)