

DOI: 10.3969/j.issn.1005- 8982.2017.09.018

文章编号: 1005- 8982 (2017) 09- 0087- 04

## 结肠癌患者肿瘤微环境中 T 细胞亚群 与肿瘤细胞转移的关系\*

李宝龙<sup>1</sup>, 刘轲<sup>1</sup>, 计鹏飞<sup>1</sup>, 万晓晨<sup>2</sup>

(1.浙江省宁波明州医院 普通外科,浙江 宁波 315100;2.浙江医院 检验科,浙江 杭州 310030)

**摘要:目的** 探讨结肠癌患者肿瘤微环境中 T 细胞亚群与肿瘤细胞转移的关系。**方法** 前瞻性收集该院收治的结肠癌患者 89 例,所有患者行结肠癌切除术,收集术中肿瘤标本,检测肿瘤组织中 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞和调节性 T 细胞。分析 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞及调节性 T 细胞与患者临床特征关系。**结果** 随着 TNM 分期的增加,CD4<sup>+</sup> T 细胞和调节性 T 细胞增加,CD8<sup>+</sup> T 细胞降低 ( $P < 0.05$ )。高分化、中分化及低分化患者调节性 T 细胞分别为  $6.59 \pm 1.87$  % ( $7.27 \pm 1.81$  %)和  $8.12 \pm 1.92$  %,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。合并淋巴结转移患者 CD4<sup>+</sup> T 细胞增高,CD8<sup>+</sup> T 细胞降低,调节性 T 细胞升高 ( $P < 0.05$ )。腺癌、黏液癌期未分化癌调节性 T 细胞分别为  $6.82 \pm 1.88$  % ( $7.28 \pm 1.82$  %)和  $8.22 \pm 1.91$  %,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** 肿瘤微环境中 T 细胞亚群失衡与肿瘤细胞的转移相关,调节微环境中 T 细胞水平或可改善患者临床预后。

**关键词:** 结肠癌;肿瘤微环境;T 细胞;转移

**中图分类号:** R735.35

**文献标识码:** A

## Correlations between T cell subsets in tumor microenvironment and tumor cell metastasis in patients with colon cancer\*

Bao-long Li<sup>1</sup>, Ke Liu<sup>1</sup>, Peng-fei Ji<sup>1</sup>, Xiao-chen Wan<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery, Mingzhou Hospital of Ningbo, Ningbo, Zhejiang 315100, China; 2. Clinical Laboratory, Zhejiang Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310030, China)

**Abstract: Objective** To investigate the relationships between T cell subsets in tumor microenvironment and tumor cell metastasis in patients with colon cancer. **Methods** A total of 89 patients with colon cancer in our hospital were enrolled. All patients underwent resection of colon cancer. The tumor specimens were collected. CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells and regulatory T cells in the tumor tissues were detected, and their correlations with clinical features of colon cancer patients were studied. **Results** With the increase of TNM staging, CD4<sup>+</sup> T cells and regulatory T cells increased, and CD8<sup>+</sup> T cells decreased ( $P < 0.05$ ). The regulatory T cells of the patients with well-differentiated, moderately-differentiated and poorly-differentiated colon cancers were  $(6.59 \pm 1.87)$  %,  $(7.27 \pm 1.81)$  % and  $(8.12 \pm 1.92)$  % respectively, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). CD4<sup>+</sup> T cells and regulatory T cells were increased, while CD8<sup>+</sup> T cells were decreased in the patients with lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). The regulatory T cells of adenocarcinoma, mucinous carcinoma and undifferentiated carcinoma were  $(6.82 \pm 1.88)$  %,  $(7.28 \pm 1.82)$  % and  $(8.22 \pm 1.91)$  % respectively, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The imbalance of T cell subsets in tumor microenvironment is related to the metastasis of tumor cells, therefore regulation of the T cells in the microenvironment could improve the prognosis.

**Keywords:** colon cancer; tumor microenvironment; T cell; metastasis

收稿日期:2016-02-10

\* 基金项目:2014 年浙江省医药卫生一般研究计划(No.2014KYA003)

结肠癌是中老年人最常见的恶性肿瘤之一,可发生于结肠的任何部位,早期常无明显症状或仅有便血、贫血等非特异性表现,是导致患者死亡的重要原因<sup>[1]</sup>。导致结肠癌患者预后不良的最主要危险因素是肿瘤细胞的转移,由于结肠癌早期不易被发现,因此确诊时部分患者已伴有局部淋巴结甚至远处转移<sup>[2-4]</sup>。近年来研究发现,肿瘤的转移与免疫系统相关,T细胞免疫功能失衡的患者更容易发生转移。2016年 SUNDSTROM 等<sup>[5]</sup>研究发现,调节性 T 细胞可以通过影响腺苷的活性,抑制细胞毒性 T 细胞进入肿瘤微环境,进而抑制机体免疫系统对肿瘤细胞的杀伤作用。SON 等<sup>[6]</sup>动物实验显示,调节性 T 细胞敲除后的肺癌和结肠癌小鼠,放疗对肿瘤细胞的杀伤作用得到加强。免疫在肿瘤发生、发展中的作用为肿瘤治疗提供一个新方向。然而,目前关于结肠癌患者肿瘤微环境中 T 细胞亚群与肿瘤细胞转移的关系尚无相关报道。另外 CARETHERS 等<sup>[7]</sup>研究显示,不同种族的结肠癌肿瘤微环境中 CD8<sup>+</sup> T 细胞浸润情况不同。因此探讨我国结肠癌人群中肿瘤微环境中 T 细胞浸润情况及其临床意义,具有重要的临床意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

前瞻性选取 2015 年 1 月 - 2016 年 1 月浙江省宁波明州医院收治的结肠癌患者。纳入标准:① 结肠癌;② 在本院确诊并接受手术治疗;③ 年龄 18~65 岁;④ 同意参与本研究。排除标准:① 肝肾等脏器功能不全;② 合并急性或慢性感染性疾病;③ 6 个月内曾发生心肌梗死、脑梗塞等重大心血管疾病;④ 合并其他肿瘤;⑤ 系统性红斑狼疮等免疫性疾病;⑥ 甲状腺功能不全;⑦ 12 个月内曾接受分子生物治疗、化疗或放疗等特殊治疗;⑧ 6 个月内曾接受免疫调节剂治疗;⑨ 合并创伤等其他重大疾病。研究期间,根据纳入标准和排除标准,共纳入结肠癌患者 89 例,其中男性 51 例,女性 38 例。TNM 分期:II 期 34 例,III 期 39 例,IV 期 16 例;肿瘤细胞分化程度:高分化 21 例,中分化 45 例,低分化 23 例。肿瘤直径 2.6~9.8 cm,平均肿瘤直径  $5.48 \pm 1.87$  cm。55 例合并淋巴结转移,腺癌 55 例,黏液癌 18 例,未分化癌 16 例。本研究中所有患者知情同意并签署知情同意书,本研究通过医院伦理委员会批准。

### 1.2 观察指标

收集患者术中肿瘤标本,检测肿瘤标本中 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞和调节性 T 细胞。术中留取肿瘤组织,取距肿瘤边缘 >1 cm 的组织制作成细胞悬液,加入相关单克隆抗体后使用 Epics XL 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)检测 T 细胞亚群。同时收集患者年龄、性别、TNM 分期、肿瘤分化程度、肿瘤直径、肿瘤组织类型及淋巴结转移等临床特征。分析不同临床特征患者 T 细胞亚群差异。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 t 检验或方差分析,两两比较用 LSD-t 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同性别肿瘤微环境中 T 细胞亚群相对水平比较

男性和女性肿瘤微环境中 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞及调节性 T 细胞水平比较,经 t 检验,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 不同年龄肿瘤微环境中 T 细胞亚群相对水平比较

年龄≥50 岁与 <50 岁人群肿瘤微环境中 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞及调节性 T 细胞水平比较,经 t 检验,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2。

### 2.3 不同 TNM 分期肿瘤微环境中 T 细胞相对水平比较

不同 TNM 分期肿瘤微环境中 CD4<sup>+</sup> T 细胞、

表 1 不同性别肿瘤微环境中 T 细胞亚群相对水平比较  
(%, $\bar{x} \pm s$ )

性别	CD4 <sup>+</sup> T 细胞	CD8 <sup>+</sup> T 细胞	调节性 T 细胞
男性 (n=51)	20.58± 2.48	29.58± 3.27	7.12± 1.88
女性 (n=38)	20.48± 2.33	29.78± 3.36	7.22± 1.91
t 值	0.193	0.282	0.247
P 值	0.847	0.779	0.806

表 2 不同年龄肿瘤微环境中 T 细胞亚群相对水平比较  
(%, $\bar{x} \pm s$ )

年龄	CD4 <sup>+</sup> T 细胞	CD8 <sup>+</sup> T 细胞	调节性 T 细胞
≥ 50 岁 (n=48)	20.62± 2.55	29.92± 3.41	7.27± 1.89
<50 岁 (n=41)	20.44± 2.39	29.37± 3.38	7.04± 1.90
t 值	0.342	0.762	0.571
P 值	0.733	0.448	0.570

CD8<sup>+</sup>T细胞及调节性T细胞水平比较,经方差分析,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),随着TNM分期增加,CD4<sup>+</sup>T细胞和调节性T细胞水平升高,CD8<sup>+</sup>T细胞水平降低。见表3。

#### 2.4 不同肿瘤细胞分化程度肿瘤微环境中T细胞亚群相对水平比较

高分化、中分化和低分化患者调节性T细胞水平比较,经方差分析,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。肿瘤细胞分化程度与肿瘤微环境中T细胞亚群无关( $P>0.05$ )。见表4。

#### 2.5 不同肿瘤直径肿瘤微环境中T细胞亚群相对水平比较

直径 $\geq 5$  cm与 $<5$  cm患者的CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞及调节性T细胞水平比较,经t检验,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表5。

#### 2.6 不同淋巴结转移肿瘤微环境中T细胞亚群相对水平比较

有无淋巴结转移患者的CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞及调节性T细胞水平比较,经t检验,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),合并淋巴结转移的患者CD4<sup>+</sup>T细胞增高,CD8<sup>+</sup>T细胞降低,调节性T细胞升高。见表6。

#### 2.7 不同肿瘤细胞病理类型肿瘤微环境中T细胞亚群相对水平比较

腺癌、黏液癌和未分化癌调节性T细胞水平比较,经方差分析,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。不同肿

表3 不同TNM分期肿瘤微环境中T细胞相对水平比较  
(%, $\bar{x}\pm s$ )

TNM分期	CD4 <sup>+</sup> T细胞	CD8 <sup>+</sup> T细胞	调节性T细胞
II期 (n=34)	19.66± 2.46	30.69± 3.31	6.09± 1.73
III期 (n=39)	20.49± 2.52	29.48± 3.28	7.12± 1.88
IV期 (n=16)	22.51± 2.39	27.95± 3.46	8.23± 1.94
F值	3.284	2.874	3.569
P值	0.002	0.035	0.000

表4 不同肿瘤细胞分化程度肿瘤微环境中T细胞亚群相对水平比较 (%, $\bar{x}\pm s$ )

分化程度	CD4 <sup>+</sup> T细胞	CD8 <sup>+</sup> T细胞	调节性T细胞
高分化 (n=21)	20.46± 2.41	31.40± 3.54	6.59± 1.87
中分化 (n=45)	20.12± 2.46	29.41± 3.51	7.27± 1.81
低分化 (n=23)	21.42± 2.49	28.58± 3.41	8.12± 1.92
F值	1.643	1.983	2.943
P值	0.147	0.105	0.021

瘤细胞病理类型的患者CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞水平比较,经方差分析,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表7。

表5 不同肿瘤直径肿瘤微环境中T细胞亚群相对水平比较 (%, $\bar{x}\pm s$ )

直径	CD4 <sup>+</sup> T细胞	CD8 <sup>+</sup> T细胞	调节性T细胞
$\geq 5$ cm (n=50)	20.82± 2.61	29.88± 3.48	7.31± 1.92
$<5$ cm (n=39)	20.17± 2.39	29.39± 3.55	6.97± 1.82
t值	1.209	0.653	0.848
P值	0.230	0.515	0.399

表6 不同淋巴结转移肿瘤微环境中T细胞亚群相对水平比较 (%, $\bar{x}\pm s$ )

淋巴结转移	CD4 <sup>+</sup> T细胞	CD8 <sup>+</sup> T细胞	调节性T细胞
有 (n=55)	21.08± 2.59	29.03± 3.41	7.83± 2.07
无 (n=34)	19.66± 2.46	30.69± 3.31	6.09± 1.73
t值	2.561	2.256	4.094
P值	0.012	0.027	0.000

表7 不同肿瘤细胞病理类型肿瘤微环境中T细胞亚群相对水平比较 (%, $\bar{x}\pm s$ )

病理类型	CD4 <sup>+</sup> T细胞	CD8 <sup>+</sup> T细胞	调节性T细胞
腺癌 (n=55)	20.19± 2.44	30.12± 3.62	6.82± 1.88
黏液癌 (n=18)	20.52± 2.38	29.46± 3.51	7.28± 1.82
未分化癌 (n=16)	21.74± 2.48	28.34± 3.33	8.22± 1.91
F值	1.673	1.824	3.274
P值	0.172	0.129	0.000

### 3 讨论

结肠癌好发于中老年人,可发生肝、肺转移,是威胁中老年人的一个重大疾病之一<sup>[8-9]</sup>。随着研究的发展,免疫系统在肿瘤发生、发展中的作用越来越受到重视,同时也为肿瘤的治疗提供新的方向。T细胞免疫在介导机体对肿瘤细胞的杀伤作用中起到关键作用。2017年SHARP等<sup>[10]</sup>研究显示,转移的结肠癌患者体内Th17细胞增加,Th17细胞可以促进肿瘤细胞对免疫系统的耐受。CARETHERS等<sup>[7]</sup>研究显示,不同种族的结肠癌肿瘤微环境中CD8<sup>+</sup>T细胞浸润情况不同。因此,很有必要探讨我国人群中结肠癌肿瘤微环境中T细胞亚群的表达水平及临床意义。CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞及调节性T细胞是T细胞亚群中的重要细胞。CD4<sup>+</sup>T细胞在抑炎因子的作用下,分化为调节性T细胞,主要介导肿瘤细胞对免疫

系统的耐受。CD8<sup>+</sup> T 细胞可以在促炎因子的作用下分化为细胞毒性 T 细胞,可以加强机体对肿瘤细胞的杀伤作用<sup>[11-12]</sup>。本研究结果显示,随着 TNM 分期的增加,CD4<sup>+</sup> T 细胞和调节性 T 细胞增加,而 CD8<sup>+</sup> T 细胞水平降低 ( $P < 0.05$ )。表明 TNM 分期越高的患者,机体对肿瘤细胞的杀伤作用更弱。高分化、中分化及低分化患者调节性 T 细胞分别为  $6.59 \pm 1.87$  % ( $7.27 \pm 1.81$  %) 和  $8.12 \pm 1.92$  %, 差异有统计学意义,表明肿瘤细胞分化程度为低分化的患者对肿瘤细胞的杀伤作用较差。本研究结果还显示,合并淋巴结转移的患者 CD4<sup>+</sup> T 细胞和调节性 T 细胞水平升高,而 CD8<sup>+</sup> T 细胞水平降低,表明合并淋巴结转移的患者对肿瘤细胞的杀伤作用较差。未分化癌其恶性程度较腺癌和黏液癌高,临床预后较差<sup>[13]</sup>。本研究同样显示,未分化癌患者调节性 T 细胞水平较高。TNM 分期高、肿瘤分化程度为低分化、淋巴结转移和未分化癌均是肿瘤细胞转移和预后不良的征象,说明结肠癌患者肿瘤微环境中 T 细胞亚群与肿瘤细胞的转移有关。SUNDSTROM 等<sup>[9]</sup>研究也证实,结肠癌患者调节性 T 细胞水平升高,进而抑制效应性 T 细胞进入肿瘤微环境中,从而促进肿瘤的生长。2014 年我国学者张利利等<sup>[17]</sup>研究同样表明,结肠癌患者外周血中调节性 T 细胞水平异常增高,且与患者临床分期有关。但该实验是研究患者外周血中免疫力,而本研究是探讨肿瘤微环境中 T 细胞免疫、肿瘤微环境中 T 细胞数量和功能对肿瘤的发生、发展的意义。

综上所述,肿瘤微环境中 T 细胞亚群失衡与肿瘤细胞的转移相关,调节微环境中 T 细胞水平或可改善患者临床预后。

#### 参 考 文 献:

- [1] GARCIA-LOPEZ S. Inflammatory bowel disease in Digestive disease week 2016: advances in epidemiology, follow-up, treatment monitoring, optimisation and individual tailoring, and colon cancer prevention[J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2016, 39 Suppl 1: 29-35.
- [2] OMAR HA, MOHIUDDIN M, SHARIF A. Colon cancer presenting as a testicular metastasis[J]. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 2016, 1: 89.
- [3] BAE SU, HAN Y D, CHO M S, et al. Oncologic outcomes of colon cancer patients with extraregional lymph node metastasis: comparison of isolated paraaortic lymph node metastasis with resectable liver metastasis[J]. *Ann Surg Oncol*, 2016, 23(5): 1562-1568.
- [4] KIM GE, LEE JS, PARK MH, et al. Metastasis associated in colon cancer 1 predicts poor outcomes in patients with breast cancer[J]. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*, 2015, 37(2): 96-104.
- [5] SUNDSTROM P, STENSTAD H, LANGENES V, et al. Regulatory T cells from colon cancer patients inhibit effector T-cell migration through an adenosine-dependent mechanism[J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(3): 183-193.
- [6] SON C H, BAE J H, SHIN D Y, et al. Combination effect of regulatory T-cell depletion and ionizing radiation in mouse models of lung and colon cancer[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2015, 92(2): 390-398.
- [7] CARETHERS J M, MURALI B, YANG B, et al. Influence of race on microsatellite instability and CD8<sup>+</sup> T cell infiltration in colon cancer[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6), DOI: 10.1371/journal.pone.0100461.
- [8] OLIVEIRA A G, CURADO M P, KOEHLIN A, et al. Incidence and mortality from colon and rectal cancer in midwestern brazil[J]. *Rev Bras Epidemiol*, 2016, 19(4): 779-790.
- [9] UKEGJINI K, ZADNIKAR M, WARSCHKOW R, et al. Baseline mortality-adjusted survival in colon cancer patients[J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2016, 401(5): 633-641.
- [10] SHARP SP, AVRAM D, STAIN SC, et al. Local and systemic Th17 immune response associated with advanced stage colon cancer[J]. *J Surg Res*, 2017, 208: 180-186.
- [11] OSINSKA I, STELMASZCZYK-EMMEL A, POLUBIEC-KOWNACKA M, et al. CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/FoxP3<sup>+</sup>/CD127<sup>-</sup> regulatory T cells in bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients[J]. *Hum Immunol*, 2016, DOI: 10.1371/journal.pone.27474372.
- [12] 李姝君, 吴艳霞, 陈华林, 等. 非小细胞肺癌患者 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞含量与复发及生存期的关系 [J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(9): 1215-1220.
- [13] FOK K L, CHUNG C M, YI S Q, et al. STK31 maintains the undifferentiated state of colon cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(11): 2044-2053.
- [14] MORRISON D S, PARR C L, LAM T H, et al. Behavioural and metabolic risk factors for mortality from colon and rectum cancer: analysis of data from the asia-pacific cohort studies collaboration[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(2): 1083-1087.
- [15] HUANG B, FENG Y, ZHU L, et al. Smaller tumor size is associated with poor survival in stage II colon cancer: an analysis of 7719 patients in the SEER database[J]. *Int J Surg*, 2016, 33(Pt A): 157-163.
- [16] BAKKER I S, SNIJDERS H S, GROSSMANN I, et al. High mortality rates after nonelective colon cancer resection: results of a national audit[J]. *Colorectal Dis*, 2016, 18(6): 612-621.
- [17] 张利利, 赵英政, 张彩凤, 等. Th17 及 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞在结肠癌患者外周血中的表达[J]. *中国现代医学杂志*, 2014, 24(11): 59-62.

(童颖丹 编辑)