

# T 细胞亚群和自然杀伤性细胞活性在脑胶质瘤患者中表达的意义

陈贤斌 涂 明 王成德 王旭阳 朱丹化 李浩旭

**摘 要** 目的 检测脑胶质瘤患者外周血 T 淋巴细胞亚群、自然杀伤(NK)细胞活性的水平,探讨其与良、恶性脑胶质瘤的关系,并探讨与神经功能状态 KRS 计分有无相关。**方法** 44 例脑胶质瘤患者根据相应判定标准分为良性组和恶性组,设立健康对照组 44 例,采用流式细胞仪检测所有实验者的血清 T 淋巴细胞亚群、NK 细胞活性水平。**结果** 脑胶质瘤患者  $CD4^+$  细胞值显著降低、 $CD8^+$  细胞值则显著升高。 $CD4^+/CD8^+$  比值及 NK 细胞活性均显著降低。恶性组与良性组相比, $CD4^+$  细胞值、 $CD4^+/CD8^+$  比值及 NK 细胞活性(NKA)也均显著降低。 $CD4^+/CD8^+$  比值和 NK 细胞活性与 KRS 计分有相关性。**结论** 脑胶质瘤患者免疫功能低下及 NK 活性降低与肿瘤的恶性程度有关。T 细胞亚群及 NK 细胞活性与神经功能状态 KRS 计分呈正相关。

**关键词** 脑胶质瘤 T 淋巴细胞亚群 NK 细胞活性 流式细胞术

**Determination of T Cell Subgroups and NK Cells in Peripheral Blood of Glioma Patients and Its Clinical Significance.** Chen Xianbin, Tu Ming, Wang Chengde, Wang Xuyang, Zhu Danhua, Li Haoxu. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

**Abstract Objective** To detect lymphocyte T subgroups and NK cells in peripheral blood of patients with glioma, and to investigate the relation between the immune function and the malignant and benign disease. **Methods** Lymphocyte T subgroups and NK cells in peripheral blood of 44 glioma patients and 44 healthy people were detected with flow cytometry. **Results** The amounts of T cell  $CD4^+$ , the ratios of  $CD4^+/CD8^+$ , and NK cytotoxicity were significantly higher, and the amounts of T cell  $CD8^+$  were significantly lower in glioma patients than those in control group. These changes became more obvious in the malignant disease. It was highly correlative between  $CD4^+/CD8^+$ , NK cells and KRS. **Conclusion** Cell immune function disorder occurs in glioma patients, and becomes more severe along with the development of disease. These changes might provide important information for the diagnosis of glioma in clinic.

**Key words** Glioma; Lymphocyte T subgroups; NK cell activity; Flow cytometry

人体免疫系统正常的免疫监视功能,对肿瘤的发生、发展起着重要作用。此作用主要由细胞介导,而构成其主要成分的是各 T 淋巴细胞亚群<sup>[1]</sup>。自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)一般认为是直接源自于骨髓、发育成熟依赖骨髓微环境的与抗肿瘤、抗病毒感染和免疫调节有关的免疫细胞<sup>[2]</sup>。流式细胞术分析 T 细胞亚群具有测量速度快、参数多、可定量、可成批量上样等特点。脑胶质瘤是一类常见的肿瘤,具有在整个中枢神经系统内弥漫性浸润的特点,手术治疗难度大,放疗和化疗易复发<sup>[3]</sup>。评价患者免疫学功能对脑胶质瘤的预后和治疗有一定的意义。国内已有文献报道脑胶质瘤患者的机体免疫状态尤其

是细胞免疫状态的研究,但所用研究方法多为传统的免疫细胞学方法,未见流式细胞术检测 T 细胞亚群在脑胶质瘤的应用。本文对 44 例脑胶质瘤患者的外周血 T 淋巴细胞亚群、NK 细胞活性用流式细胞仪进行测定,以探讨其在脑胶质瘤中的应用价值。

## 对象与方法

1. 研究对象:44 例脑胶质瘤患者,其中男性 29 例,女性 15 例,平均年龄 47.4 岁,选自 2011 年 1~7 月在笔者医院就诊脑胶质瘤患者。所有脑胶质瘤均经病理确诊。对照组 44 例,其中男性 25 例,女性 19 例,平均年龄 46.1 岁,为笔者医院健康体检者。44 例患者按照以下标准分组:按病理诊断分组:良性组 22 例,包括星形细胞瘤 I~II 级 18 例,室管膜瘤 2 例,脉络丛乳头状瘤 2 例;恶性组 22 例,包括间变性星形细胞瘤 15 例,多形性星形细胞瘤 5 例,髓母细胞瘤 2 例。

2. 方法:(1)试剂和仪器:美国 Beckman Coulter 公司四色数字化流式细胞仪及其相应配套试剂。(2)标记和检测:取标记抗体各 20  $\mu$ l 分别加入 TruCOUNT 试管管底,然后加入 EDTA 钾盐抗凝新鲜全血 100  $\mu$ l,充分混匀,室温避光染色 15min,

基金项目:陕西省卫生厅基金资助项目(06E05)

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院神经外科(陈贤斌、涂明、王成德、王旭阳、朱丹化);710021 西安医学院解剖学教研室(李浩旭)

再加入 FACS 溶血素 450 $\mu$ l,充分混匀,室温避光 15min 后用流式细胞仪分析。

3. 统计学方法:计量资料应用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 进行统计描述,组间差异比较采用方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

1. 良、恶性脑胶质瘤与 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞活性关系:与正常对照组相比,脑胶质瘤患者 CD4<sup>+</sup> 细胞值显著降低 ( $P < 0.05$ )、CD8<sup>+</sup> 细胞值则显著升高 ( $P < 0.05$ ),CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值及 NK 细胞活性均显著降低 ( $P < 0.05$ )。恶性组与良性组相比,CD4<sup>+</sup> 细胞值、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值及 NK 细胞活性 (NKA) 均显著降低,CD8<sup>+</sup> 细胞值则显著升高 ( $P < 0.05$ ,图 1)。

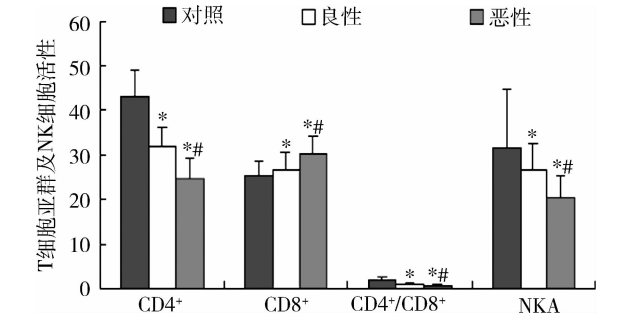


图 1 脑胶质瘤与 T 细胞亚群及 NK 细胞活性的关系  
与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与良性组比较,\* $P < 0.05$

2. 脑胶质瘤患者 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞活性与神经功能状态 KRS 关系:CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞值和脑胶质瘤 KRS 计分之间没有关系 ( $P > 0.05$ )。但 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值随 KRS 积分增高而增加 (表 1)。同时,相关性研究结果表明 NK 细胞活性与 KRS 计分呈正相关 ( $r = 0.62, P < 0.05$ ,见图 2)。

表 1 脑胶质瘤患者 T 淋巴细胞亚群与 KRS 积分的关系

| KRS 计分   | CD4 <sup>+</sup> | CD8 <sup>+</sup> | CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> |
|----------|------------------|------------------|------------------------------------|
| 10~20 分组 | 30.26 $\pm$ 5.06 | 26.09 $\pm$ 4.26 | 1.16 $\pm$ 0.23                    |
| 30~50 分组 | 29.89 $\pm$ 4.12 | 24.10 $\pm$ 4.68 | 1.24 $\pm$ 0.16*                   |
| 60~70 分组 | 30.45 $\pm$ 3.59 | 23.24 $\pm$ 5.12 | 1.31 $\pm$ 0.29*#                  |

与 10~20 分组相比,\* $P < 0.05$ ;与 30~50 分组相比,\* $P < 0.05$

讨 论

本研究得出结论:①脑胶质瘤患者免疫功能低下,NK 细胞活性下降,且二者与肿瘤的恶性程度有关;②T 细胞亚群及 NK 细胞活性与神经功能状态 KRS 计分呈正相关。脑胶质瘤是目前常见的颅内肿瘤之一,约占颅内肿瘤的 40%~50%。脑胶质瘤生

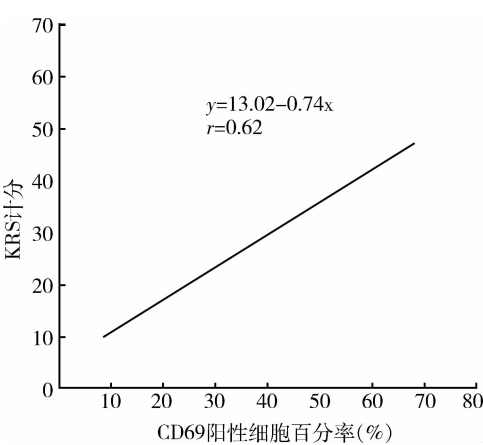


图 2 NK 细胞活性与 KRS 计分的相关性研究

长呈浸润性,手术难切除,肿瘤易复发。变异的异柠檬酸脱氢酶-1 (DH1) 目前被认为是诊断脑胶质瘤最好的生物学标志物<sup>[4,5]</sup>。但 DH1 试剂盒在国内开发和使用还有待进一步推广。单纯了解脑胶质瘤患者的免疫功能,从免疫学角度评估病情严重程度,对判断脑胶质瘤的恶性程度和预后有一定帮助。

本实验结果表明,良、恶性脑胶质瘤患者 CD4<sup>+</sup> 亚群明显低于对照组,而 CD8<sup>+</sup> 亚群在良性组虽增高,但无统计学差异。恶性组患者显著高于良性组和对照组,同时 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比例下降显著。提示 T 细胞减少主要是由 CD4<sup>+</sup> 亚群减少所致,CD4<sup>+</sup> 亚群和 CD8<sup>+</sup> 亚群失去平衡,免疫反应被抑制,干扰了机体对肿瘤的正常杀伤作用,导致肿瘤难以治愈。敲除表达 CD4<sup>+</sup> 细胞的基因后,实验动物不能产生 CD8<sup>+</sup> 细胞,提示 CD4<sup>+</sup> 细胞在产生 CD8<sup>+</sup> 细胞方面具有重要作用<sup>[6]</sup>。不同的 T 淋巴细胞亚群数量和功能发生异常即可导致机体免疫功能紊乱甚至有肿瘤的发生发展,进一步提示不同亚群的淋巴细胞保持合适的比例对于机体免疫功能有重要意义<sup>[7]</sup>。消化道恶性肿瘤患者 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值下降,手术治疗后 CD4<sup>+</sup> 细胞增加,CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比例逐渐增加,KRS 计分升高,因此 KRS 计分也可以判断脑胶质瘤患者神经功能状态。

本研究结果显示,脑胶质瘤患者 NK 细胞活性明显降低,特别是恶性脑胶质瘤患者 NK 细胞活性下降更明显。由于 NK 细胞具有抗肿瘤、抗病毒感染和免疫调节等多种免疫学功能,是机体抗肿瘤免疫的第一道防线<sup>[8]</sup>。因此我们推测脑胶质瘤患者的发生和发展过程可能与 NK 细胞数量减少和活性降低有关。NK 细胞活性与 KRS 计分呈正相关进一步证实了这个观点。

(下转第 124 页)

## 讨 论

根据全基因组序列的差异 > 8%, 或 S 基因组序列的差异 > 4%, 将乙肝病毒可分为 A ~ J10 种基因型。目前已基本明确, HBV 存在地理分布差异<sup>[5]</sup>。其中 B 型和 C 型主要分布在亚洲东部及南部, 也是我国最为常见的两种基因型。本研究中 B 基因型占 35.6%, C 基因型占 64.4%, 其他基因型少见, 提示本地区 HBV 感染者基因型以 C 型为主。

阿德福韦酯属于反转录酶抑制剂, 目前已经证实阿德福韦酯耐药相关变异主要包括 rtA181V/T 和 rtN236T 及两者的联合变异<sup>[6]</sup>。本研究在阿德福韦酯耐药株感染者中发现 HBV 多聚酶基因区基因突变位点主要为 rtA181V/T (39.8%) 和 rtN236T (31.5%)。目前认为人类感染 HBV 病毒的基因型别可能与感染途径、疾病的进展有一定的相关性<sup>[7]</sup>。国内有报道 BCP 区双突变随着 HBV 感染后的病情进展而增多。研究发现 BCP 区双突变在 C 基因型中明显比 B 基因型中多见, 认为 BCP 区双突变与基因型 C、严重的进展性肝病有关<sup>[8]</sup>。但是目前关于病毒基因型和多聚酶区基因突变的关系报道少, 本研究结果显示阿德福韦酯耐药株感染者 HBV C 基因型易发生 rtA181V/T 变异, B 基因型多出现 rtN236T 变异。因此, 初步认为阿德福韦酯耐药株感染者病毒基因型与多聚酶基因区基因突变存在有一定的相关性。本研究还显示, C 基因型比 B 基因型更易出现 rtA181V/T + rtN236T 双突变, 故推测阿德福韦酯耐药株感染者 rtA181V/T + rtN236T 双突变可能是造成 C 型患者比 B 型存在更严重肝损害的原因之一。

Westland 等报道了乙肝基因型与阿德福韦酯疗效关系的结果, 48 周阿德福韦酯治疗后血清 HBV - DNA 下降和 HBeAg 血清转换率在各基因型中均没有统计学差异, 该研究显示, HBV 基因型不影响阿德福

韦酯的疗效。Kao 等研究发现, C 基因型患者的 HBV DNA 水平明显高于 B 型患者。本研究结果显示阿德福韦酯耐株感染者 B、C 两种基因型与病毒载量没有统计学意义, 与 HBV 多聚酶基因区突变位点亦无相关性, 说明 HBV 基因型不影响阿德福韦酯的疗效。

乙型肝炎病毒基因型与多聚酶区基因突变相关性的研究有助于探索乙型肝炎的发病机制, 为临床提供有益的启示。但 HBV 基因型存在有地域性差异及人种差异, 乙型肝炎病毒基因型与多聚酶区基因突变两者之间的关系, 仍需进一步研究证实。

## 参考文献

- 1 Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, *et al.* A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype [J]. *J Viral*, 2009, 83 (10): 538 - 547
  - 2 刘峰, 王磊, 王丽娜, 等. 阿德福韦酯治疗慢性乙型肝炎过程中发生病毒突破患者的 (HBV) P 基因变异分析 [J]. *山东大学学报: 医学版*, 2008, 46 (4): 407 - 501
  - 3 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13 (12): 881 - 891
  - 4 Rozanov M, Plikat U, Chappey C, *et al.* A web - based genotyping resource for viral sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32 (7): 654 - 659
  - 5 刘爱平, 徐洪涛, 邢同京, 等. 乙肝病毒基因分型与慢性乙型肝炎患者临床和病理的相关性研究 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2010, 20 (3): 175 - 177
  - 6 Borroto Esoda K, Miller MD, Arterburn S. Pooled analysis of amino acid changes in the HBV polymerase in patients from four major adefovir dipivoxil clinical trials [J]. *J Hepatol*, 2007, 47 (4): 492 - 498
  - 7 钟崇芳, 郝娃, 李卓, 等. 乙肝病毒基因型与肝脏病理改变的关系 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15 (16): 1859 - 1864
  - 8 孙正伟, 李桂琴, 蔺安鸿, 等. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子基因变异与免疫学标志及 DNA 含量的临床研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2001, 15 (2): 166 - 168
- (收稿日期: 2012 - 05 - 11)  
(修回日期: 2012 - 06 - 11)
- 
- (上接第 91 页)
- 参考文献
- 1 徐小华, 浦佩玉, 刘春祥, 等. 脑胶质瘤患者的全身和局部免疫功能观察 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 1995, 21 (6): 323 - 325, 378
  - 2 金伯泉. 细胞和分子免疫学 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 1 - 766
  - 3 Kong DS, Kim ST, Lee JI, *et al.* Impact of adjuvant chemotherapy for gliomatosis cerebri [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 424
  - 4 Kwon MJ, Kim ST, Kong DS, *et al.* Mutated IDH1 is a favorable prognostic factor for type 2 gliomatosis cerebri [J]. *Brain Pathol*, 2012, 22 (3): 307 - 317
  - 5 Desestret V, Ciccarino P, Ducray F, *et al.* Prognostic stratification of gliomatosis cerebri by IDH1 (R132H) and INA expression [J]. *J Neu-*
- rooncol, 2011, 105 (2): 219 - 224
- 6 Goedegebuure PS, Eberlein TJ. The role of CD4<sup>+</sup> tumor - infiltrating lymphocytes in human solid tumors [J]. *Immunol Res*, 1995, 14 (2): 119 - 131
  - 7 齐红, 石虹, 刘玉侠, 等. 253 例恶性肿瘤患者外周血 T 细胞亚群的检测及其临床意义分析 [J]. *中国实验诊断学*, 2009, 13 (11): 1589 - 1590
  - 8 Degli - Esposti MA, Smyth MJ. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5 (2): 112 - 124
- (收稿日期: 2011 - 11 - 25)  
(修回日期: 2011 - 12 - 01)