

[文章编号] 1007-385X(2006)04-0253-04

## 肺癌患者化疗前后免疫细胞格局的改变及其临床意义

储以微<sup>1</sup>,刘荣军<sup>1</sup>,张 镭<sup>1</sup>,金美玲<sup>2</sup>,郑秀娟<sup>1</sup>,郑惠如<sup>2</sup>,熊思东<sup>1</sup>(1. 复旦大学上海医学院免疫学系,分子医学国家教育部重点实验室,上海 200032; 2. 复旦大学附属中山医院呼吸内科,上海 200032)

**[摘要]** **目的:**研究肺癌患者化疗前后免疫细胞数量、亚群比例、细胞表型及功能的改变,并探讨其临床意义。**方法:**对23例次肺癌患者化疗前后的白细胞、淋巴细胞和中性粒细胞计数,以流式细胞术对CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>及CD8<sup>+</sup>T细胞亚群比例以及记忆样表型T细胞进行检测和分析;体外以PHA刺激外周血淋巴细胞,培养48h后检测对K562靶细胞的杀伤效应。**结果:**化疗后外周淋巴细胞数量迅速减少,1周左右达最低水平,此后逐渐恢复至化疗前水平;淋巴细胞恢复过程中,CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T细胞亚群比例升高,记忆样表型T细胞(CD44<sup>high</sup>,CD62L<sup>low</sup>)比例增加;增生期淋巴细胞在体外以PHA刺激后对K562细胞的杀伤能力没有下降,个别患者的杀伤能力还有所增强。**结论:**肺癌患者化疗后不仅没有降低免疫功能,反而可增强其免疫效应,该结果为临床肿瘤患者化疗后开展免疫生物治疗提供了实验依据。

**[关键词]** 淋巴细胞减少症;化学药物治疗;免疫重建;记忆样表型;肺癌

**[中图分类号]** R392.11 **[文献标识码]** A

## Changes of immune pattern in lung cancer patients before and after chemotherapy

CHU Yi-wei<sup>1</sup>, LIU Rong-jun<sup>1</sup>, ZHANG Lei<sup>1</sup>, JIN Mei-ling<sup>2</sup>, ZHENG Xiu-juan<sup>1</sup>, ZHENG Hui-ru<sup>2</sup>, XIONG Si-dong<sup>1</sup>(1. Department of Immunology/Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Department of Respiratory Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the changes of lymphocytes number, proportions of lymphocyte subsets, phenotypes and the cytotoxic function of lymphocytes in lung cancer patients before and after chemotherapy and to assess its clinical relevance. **Methods:** White blood cells (WBC), lymphocytes and neutrophils were counted before and after chemotherapy in 23 patients with lung cancer. Flow cytometry technique was used to determine and analyze the proportions and phenotypes of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocyte subsets. Memory-like phenotype and cytotoxic function of lymphocytes against K562 cells were detected after peripheral lymphocytes were simulated with PHA for 48 h. **Results:** Lymphopenia setting (decreased and ensuing recovered cell numbers of WBC, neutrophils and lymphocytes) was observed after chemotherapy. The proportion of CD3<sup>+</sup>T cells and the ratio of CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> were slightly increased and the memory-like phenotype, CD44<sup>high</sup> and CD62L<sup>low</sup>, were exhibited after chemotherapy. The cytotoxicity of lymphocytes against K562 target cells was not decreased, but increased in some patients. **Conclusion:** Chemotherapy does not hamper, but improve the immune environment in lung cancer patients, which provides a reference for clinical immunotherapy after chemotherapy.

**[Key words]** lymphopenia; chemotherapy; immune reconstitution; memory-like phenotype; lung cancer

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(4): 253-256]

放、化疗是常用的肿瘤治疗手段,由于其不仅对肿瘤细胞具有杀伤作用,而且对正常淋巴细胞亦杀伤,导致淋巴细胞减少,所以,以往的观念认为放、化疗后的主动免疫可能不能刺激机体产生免疫正应答,反而容易产生免疫负应答,造成对肿瘤的免疫耐受。因此,临床上很少在淋巴细胞减少状态下开展主动免疫生物治

疗。然而,近年来的临床试验发现,肿瘤患者放、化疗

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(30571713);上海医学院基础临床医学交叉基金2006资助

**[作者简介]** 储以微(1964-),女,上海市人,副教授,主要从事肿瘤免疫学研究

**[通讯作者]** 熊思东, E-mail: immfd@126.com

后进行免疫生物治疗不仅没有诱导产生免疫耐受,反而获得了很好的抗肿瘤免疫效果,其具体机制尚未明了<sup>[1-2]</sup>。由此推测可能与放、化疗后改变了机体的免疫微环境有关。本研究以临床肺癌患者为对象,检测化疗前、后免疫细胞数、淋巴细胞亚群、表型以及免疫功能的变化,为临床开展放、化疗后的免疫生物治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床资料

病例选自 2005 年 10 月至 2006 年 3 月间在中山医院呼吸内科住院的确诊肺癌患者,共 10 例,包括腺癌 5 例,鳞癌 2 例,其他 3 例;其中男 7 例,女 3 例,年龄 43~70 岁,平均 59.3 岁。全部患者均无免疫系统疾病,经筛选除外高血压、糖尿病及肝肾疾病患者。所有患者均以“泰素帝(taxotere)+顺铂”方案进行化疗,具体方案:第 1 天泰素帝 210 mg 静脉注射,第 2 天顺铂 400~450 mg 静脉注射。化疗期间无急性感染发生。肺癌化疗患者中,某些病人进行 1 次化疗;某些病人在 1 次化疗结束后,间隔 1 个月,再次进行化疗,最多化疗次数达 5 次。因此,收集化疗样本共 23 例次。

### 1.2 标本采集

所有实验对象于化疗前后定期抽取空腹静脉血标本作血常规检查。部分血样经肝素抗凝后作他用。

### 1.3 细胞株

人红白血病细胞株 K562 为本室保存,10% 小牛血清 RPMI 1640 培养,在体外杀伤实验中作为靶细胞。

### 1.4 试剂

淋巴细胞分离液(密度 1.077,购自国药集团化学试剂有限公司,上海)。小鼠抗人 CD4(Percp 标记)、CD8(PE 标记)、CD44(FITC 标记)、CD62L(FITC 标记)、CD3(FITC 标记)单克隆抗体(BD pharminge, CA, USA);CFSE 为特异性结合于细胞膜的染料(Molecular Probes, OR, USA)。用 DMSO 调 CFSE 浓度至 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ,配成储存液,-20 $^{\circ}\text{C}$  避光保存。PHA(植物血凝素, Sigma 公司, USA),细胞核染料 7-AAD(eBioscience 公司, CA, USA)。

### 1.5 人外周血单核淋巴细胞的分离

于中号试管中加入 5 ml 淋巴细胞分离液,取患者 5 ml 肝素抗凝静脉血与等量 Hank 液或 RPMI 1640 充分混匀,用滴管沿管壁缓慢滴加于分层液面上,水平离心 2 000 r/min 20 min。离心后管内分为 3 层,用毛细管插至中间云雾层,吸取单个核细胞。置入另一 50 ml 刻度离心管中,加入 5 倍以上体积的 Hank 液或 RPMI 1640,1 500 r/min 10 min,洗涤细胞 2 次。末次离心后

弃上清,加入含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640,重悬细胞,计数。

### 1.6 淋巴细胞亚群检测

分离的人外周血单核细胞悬液 100  $\mu\text{l}$  ( $1 \times 10^7/\text{ml}$ ),根据检测目的,加入相应的荧光标记抗体,4 $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min, PBS 洗 2 遍,用含 1% 多聚甲醛的 PBS 固定后,流式细胞仪(FACS Calibur, BD 公司, NJ, USA)检测。

### 1.7 淋巴细胞杀伤实验

密度梯度离心分离化疗前、化疗后 10 d 左右人外周血单核淋巴细胞,用含 2  $\mu\text{g/ml}$  PHA 的完全 1640 调整细胞密度至  $2 \times 10^6/\text{ml}$ ,加入 24 孔培养板,置 37 $^{\circ}\text{C}$  CO<sub>2</sub> 孵箱培养 48 h 后,收获细胞, PBS 洗 2 遍,根据文献[3]加入 CFSE(终浓度 5  $\mu\text{mol/L}$ ),37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min, 20:1、10:1 的比例与  $2.5 \times 10^4$  的 K-562 靶细胞混合后加入 96 孔圆底板,终体积 200  $\mu\text{l}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$  作用 6 h 后收集细胞, PBS 洗 2 遍,加入 2  $\mu\text{l}$  7-AAD(20  $\mu\text{g/ml}$ )4 $^{\circ}\text{C}$  作用 15 min,加 1640 完全培养液终止反应, PBS 洗 2 遍后,流式细胞仪检测靶细胞凋亡情况。

### 1.8 统计学处理

本实验数据采用 SPSS11.5 软件处理,应用 ANOVA one-way 进行检验,以  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 肺癌患者化疗前、后白细胞数目的动态变化

收集化疗患者在化疗前、化疗后早期(4~7 d, stage 1, S1)、化疗后晚期(9~11 d, stage 2, S2)三个不同阶段的临床血样检验数据,对白细胞、中性粒细胞以及淋巴细胞的绝对数进行计数、分析。如图 1 所示,所有样本的白细胞、中性粒细胞及淋巴细胞数目在用药后的不同阶段均呈现出先下降后逐渐恢复至正常的变化规律,其中所有样本淋巴细胞数目降低的最低点均小于 1 000/ $\mu\text{l}$ ,符合淋巴细胞减少症的标准。提示肿瘤患者化疗后均不同程度地存在淋巴细胞减少症,随后出现淋巴细胞减少驱动的淋巴细胞增生。

### 2.2 肺癌患者化疗前、后外周血 T 淋巴细胞亚群比例变化

肺癌患者化疗前后,以流式细胞仪检测并分析了外周血 PBMC 中 T 淋巴细胞亚群的比例变化。化疗前患者外周血 PBMC 中 CD3<sup>+</sup> 细胞比例平均为(41.68  $\pm$  2.38)%;化疗后(S2)为(47.97  $\pm$  5.96)%。结果显示,化疗没有降低 T 细胞亚群的比例,化疗后淋巴细胞恢复过程中 T 细胞相对比例增加。进一步分析 T 细胞中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞比值,结果发现,化疗后 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值下降(化疗前为 2.70  $\pm$  0.68,化疗后为

1.90 ± 0.64), 表明化疗后淋巴细胞恢复过程中, CD8<sup>+</sup> T 细胞增生较 CD4<sup>+</sup> T 细胞相对明显。

### 2.3 肺癌患者化疗后能够诱生记忆样表型的 T 细胞

肺癌患者化疗后, 流式细胞术检测外周血 T 细胞表达 CD44 及 CD62L 的情况。结果如图 2 所示, CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞 CD44 分子表达明显较未化疗前升高(化疗前后 CD4<sup>+</sup> T 细胞 CD44 平均荧光强度分别为 295.37 和 445.89; CD8<sup>+</sup> T 细胞 CD44 平均荧光强度为 303.29 和 449.34)。为了进一步证实化疗后 PBMC 中记忆样 T 细胞比例上调, 我们以 CD62L 为标记检测了

化疗前、后 PBMC 中 CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>low</sup>、CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>low</sup> T 细胞比例。结果显示(图 2、3), 化疗后淋巴细胞恢复过程中, 上述 T 细胞亚群比例上调[化疗前为(20.13 ± 2.36)% 和(24.46 ± 1.37)%; 化疗后为(45.44 ± 3.89)% 和(45.68 ± 4.13)%], 统计学处理具有非常显著性差异( $P < 0.01$ )。图 3C 为一样本的流式细胞分析图。由于 CD44 和 CD62L<sup>low</sup> T 细胞可以反映 T 细胞的活化或记忆样表型, 因此, 上述结果表明, 肺癌患者化疗后, 淋巴细胞自稳增生过程能够诱生记忆样表型 T 淋巴细胞。

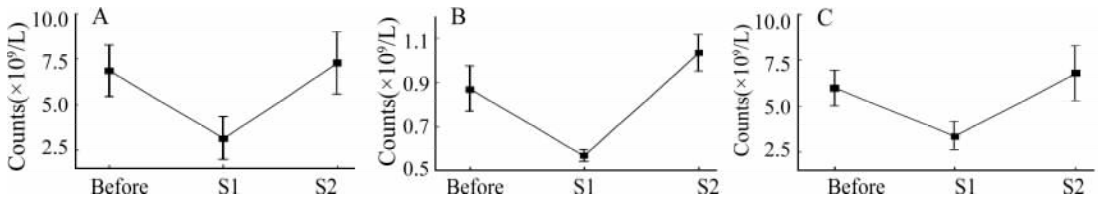


图 1 肺癌患者化疗后白细胞数目的动态变化

Fig. 1 Dynamic changes of leukocytes in lung cancer patients after chemotherapy

A: White blood cells; B: Neutrophils; C: Lymphocytes; Before: Before chemotherapy;

S1: 4-7 d after chemotherapy, stage1; S2: 9-11 d after chemotherapy, stage 2

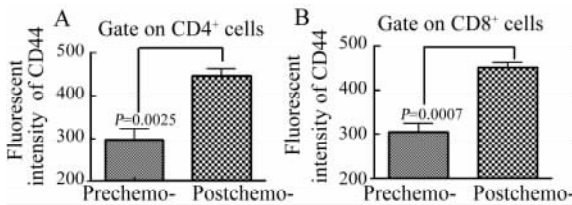


图 2 化疗后 T 细胞表面 CD44 表达的上调

Fig. 2 Upregulation of CD44 expression on T cells after chemotherapy

A: Fluorescent intensity of CD44 on CD4<sup>+</sup> T cells;

B: Fluorescent intensity of CD44 on CD8<sup>+</sup> T cells

### 2.4 肺癌患者化疗后淋巴细胞杀伤功能的变化

通常认为肿瘤患者化疗后免疫功能将受到损伤, 但是淋巴细胞在自稳增生过程中获得了记忆样表型, 它们对靶细胞的杀伤功能如何? 为此, 本研究分离肺癌患者化疗前、化疗后 10 d 左右的外周淋巴细胞, 用 PHA 培养 48 h 后, 以 K562 为靶细胞观察淋巴细胞的杀伤效应。结果显示, PBMC 体外 PHA 活化后增生明显; 与化疗前相比, 杀伤功能并未受到抑制, 有 3 例样本化疗后淋巴细胞杀伤功能有所上调[化疗前为(7 ± 0.68)%, 化疗后为(13 ± 1.96)%]。以上表明, 化疗后期增生的记忆样 T 细胞对抗原刺激敏感, 活化阈值降低, 具有一定的免疫杀伤功能。

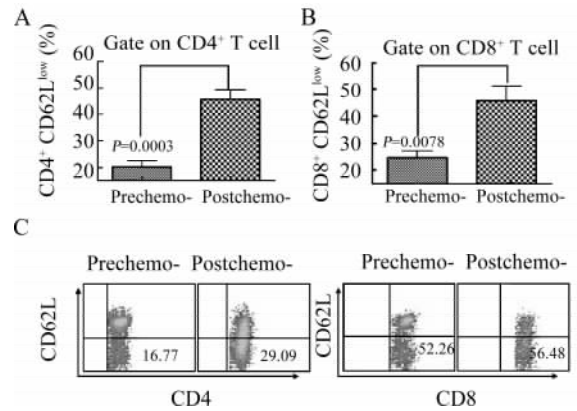


图 3 化疗后 CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>low</sup>、CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>low</sup> T 细胞比例变化

Fig. 3 Changes in proportion of CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>low</sup>, CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>low</sup> T cells after chemotherapy

A: CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>low</sup> T cells;

B: CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>low</sup> T cells; C: FACS picture

## 3 讨论

淋巴细胞减少症(lymphopenia)是肿瘤患者放、化疗后的常见并发症, 主要表现为外周免疫器官中免疫细胞数减少(成人外周血中淋巴细胞总数 < 1 000/μl, 2 岁以下儿童 < 3 000/μl)及由此继发的免疫功能改

变。通常认为淋巴细胞减少症时机体免疫功能相对低下,在这种状态下进行主动免疫,很难诱导机体产生免疫正应答效应。然而,近年的研究发现,各种非遗传因素导致的淋巴细胞减少状态具有驱动淋巴细胞自稳性增生的潜能,主要表现在外源输注的初始 T 细胞能在淋巴细胞减少的受者体内快速、活跃地分裂增殖,称为“淋巴细胞减少驱动的细胞增殖”(lymphopenia-driven proliferation, LDP)<sup>[4]</sup>;在此期间,增生的淋巴细胞表面分子表达发生改变,获得了活化或记忆样表型,对抗原的免疫应答增强,可能有利于免疫正应答的进行<sup>[5-6]</sup>。为了确证化疗后机体免疫微环境的改变,本课题以临床肺癌化疗患者为研究对象,检测了化疗前、后的免疫细胞数量、亚群比例和功能的改变。结果显示,肺癌患者化疗后,机体免疫系统经历了“淋巴细胞减少-淋巴细胞自稳增生”的过程;化疗后具有记忆样表型的 T 细胞比例上调;化疗后淋巴细胞杀伤功能有一定程度的上调。上述结果表明,化疗对机体免疫微环境具有一定的优化作用,化疗后新生的淋巴细胞对抗原刺激敏感,此时若给予肿瘤疫苗进行主动免疫,有可能诱导出增强的抗肿瘤免疫应答。

对于在化疗后机体为何能诱生有利于免疫应答的微环境,目前尚未完全明了。以往研究对此的解释是:由于淋巴细胞的减少,使机体外周免疫器官具有更大的细胞增殖空间,残存的淋巴细胞可以在“广阔”的空间内活跃地分裂增殖,称为“土壤学说”<sup>[7-10]</sup>;另一种解释是:淋巴细胞的减少,使得某些促细胞分裂增殖的细胞因子如 IL-7、IL-15 资源丰富了,T 细胞获取了这些资源,更为有效地分裂增殖,称为“细胞因子池”<sup>[11-13]</sup>。另外,我们的初步研究结果亦证实,化疗可以选择性地下调调节性 T 细胞的比例,解除 Treg 对 T 效应细胞的免疫抑制作用,使得效应细胞更为有效地发挥免疫应答,即下调的调节性 T 细胞(Treg)比例在化疗诱生的优化的免疫微环境中发挥了重要作用,这一方面的研究工作还有待于深入探讨。

本研究从化疗前、后免疫细胞格局的改变为切入点,证实在化疗后,机体免疫系统不仅在免疫细胞数目,而且在各淋巴细胞亚群比例、表型以及免疫功能方面均发生了改变,并且这些改变重建了一个有利于免疫正向应答的免疫微环境。本研究为临床放、化疗后开展免疫生物治疗提供了研究基础,使肿瘤患者化疗后联合肿瘤疫苗主动免疫生物治疗成为可能。

## [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Soiffer R, Hodi FS, Haluska F, *et al.* Vaccination with irradiated,

autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma[ J ]. *J Clin Oncol*, 2003, 21 ( 17 ): 3343-3350.

- [ 2 ] Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, *et al.* Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes[ J ]. *Science*, 2002, 298 ( 5594 ): 850-854.
- [ 3 ] Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, *et al.* Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells[ J ]. *Blood*, 2004, 104 ( 9 ): 2840-2848.
- [ 4 ] Min B, Paul WE. Endogenous proliferation: Burst-like CD4 T cell proliferation in lymphopenic settings[ J ]. *Semin Immunol*, 2005, 17 ( 3 ): 201-207.
- [ 5 ] Tanchot C, Le Campion A, Leautaud S, *et al.* Naive CD4( + ) lymphocytes convert to anergic or memory-like cells in T cell-deprived recipients[ J ]. *Eur J Immunol*, 2001, 31 ( 8 ): 2256-2265.
- [ 6 ] Ge Q, Hu H, Eisen HN, *et al.* Different contributions of thymopoiesis and homeostasis-driven proliferation to the reconstitution of naive and memory T cell compartments[ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 ( 5 ): 2989-2994.
- [ 7 ] Goldrath AW, Bogatzki LY, Bevan MJ. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation[ J ]. *J Exp Med*, 2000, 192 ( 4 ): 557-564.
- [ 8 ] Maine GN, Mule JJ. Making room for T cells[ J ]. *J Clin Invest*, 2002, 110 ( 2 ): 157-159.
- [ 9 ] Cho BK, Rao VP, Ge Q, *et al.* Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells [ J ]. *J Exp Med*, 2000, 192 ( 4 ): 549-556.
- [ 10 ] Bacci A, Montagnoli C, Perruccio K, *et al.* Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation[ J ]. *J Immunol*, 2002, 168 ( 6 ): 2904-2913.
- [ 11 ] Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, *et al.* Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells[ J ]. *J Exp Med*, 2005, 202 ( 7 ): 907-912.
- [ 12 ] Zhang Y, Louboutin JP, Zhu J, *et al.* Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8<sup>+</sup> T cell-mediated acute graft-versus-host disease[ J ]. *J Clin Invest*, 2002, 109 ( 10 ): 1335-1344.
- [ 13 ] Wang LX, Li R, Yang G, *et al.* Interleukin-7-dependent expansion and persistence of melanoma-specific T cells in lymphodepleted mice lead to tumor regression and editing[ J ]. *Cancer Res*, 2005, 65 ( 22 ): 10569-10577.

[ 收稿日期 ] 2006 - 05 - 10

[ 修回日期 ] 2006 - 07 - 06

[ 本文编辑 ] 王莹