

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.05.017

· 短篇论著 ·

## 手术后大肠癌患者 NKT 及 NK 细胞的变化

### NKT and NK cells in peripheral blood of colorectal cancer patients after surgery

张德祥<sup>1</sup>,袁苏徐<sup>2a</sup>,管洪庚<sup>2b</sup>,徐红<sup>2a</sup>,戴月娣<sup>3</sup>(1. 复旦大学附属金山医院 普外科, 200540 上海; 2. 苏州大学附属第一医院 a. 肿瘤科; b. 普外科, 江苏 苏州 215006; 3. 复旦大学附属肿瘤医院 闵行分院 肿瘤科, 上海 200240)

[摘要] 目的:探讨手术后大肠癌患者外周血 NKT 细胞及 NK 细胞的变化及其影响因素。方法:采集 32 例大肠癌患者手术前后和 13 例健康对照外周静脉血,流式细胞术检测外周血 NKT 及 NK 细胞的变化,研究其与大肠癌患者临床病理特征的关系。结果:大肠癌患者 NKT 细胞较健康人升高( $P < 0.05$ ),T 细胞与健康人无差异,NK 细胞较健康人减少( $P < 0.05$ )。健康人群中 NKT 细胞占外周血 T 淋巴细胞的 6.6%,低于大肠癌患者的 18.9%( $P < 0.05$ )。术后 1 周,大肠癌患者 NKT 细胞较术前明显升高、NK 细胞明显降低( $P < 0.05$ )。年龄  $> 60$  岁较年龄  $\leq 60$  的大肠癌患者的 T 细胞低( $P < 0.05$ );有淋巴结转移患者的 T 细胞有降低趋势,NK 细胞有增高趋势;肿瘤浸润至浆膜和浆膜外大肠癌患者 T 细胞有降低趋势;Duke's C、D 期较 Duke's A、B 期大肠癌患者 T 细胞低( $P < 0.05$ )。T、NKT 及 NK 细胞三者间无相关关系。结论:手术后大肠癌患者 NKT 细胞介导的抗肿瘤免疫反应处于活化状态,NK 细胞处于抑制状态。

[关键词] 大肠癌;NKT 细胞;NK 细胞

[中图分类号] R735.3<sup>+</sup>4; R392.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)05-0565-03

免疫原性强的肿瘤细胞特异性免疫应答较强,而免疫原性弱的肿瘤细胞,其非特异性免疫应答作用可能更重要。目前认为,能对肿瘤细胞产生免疫应答的效应细胞主要有 B 细胞、T 细胞、NK 细胞、NKT 细胞等,它们在肿瘤免疫监视中的作用已相继阐明<sup>[1]</sup>。近年来,我国大肠癌发病率呈明显上升趋势。大肠癌患者抗肿瘤免疫反应处于抑制状态,为明确 NKT 及 NK 细胞在大肠癌患者中抗肿瘤免疫反应状态,本研究对 32 例大肠癌患者外周血 NKT 和 NK 细胞的动态变化作了观察。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

32 例大肠癌患者为苏州大学附属第一医院 2006 年 11 月至 2008 年 7 月普外科住院手术患者,全部经手术病理检查明确诊断。其中男性 22 例,女性 10 例,中位年龄 60 岁(33 ~ 79 岁),其中直肠癌 23 例,结肠癌 9 例;淋巴结转移 13 例;肿块直径  $\leq 3$  cm 13 例,3 ~ 5 cm 10 例, $> 5$  cm 9 例;高分化癌 3 例,中等分化癌 24 例,低分化癌 5 例;局部肿块浸润至黏膜及黏膜下层 2 例、肌层 9 例、浆膜层 11 例、浆膜外 10 例;Dukes 分期 A 期 11 例,B 期 7 例,C 期 12 例,D 期 2 例。对照组为 13 例健康者,均为苏州大学附属第一医院门诊健康体检者。全部患者和健康者均签署知情同意书,并报院伦理委员会批准。

### 1.2 主要材料及试剂

鼠抗人 IgG1-PE、IgG1-FITC、CD3-FITC、CD56-PE 及裂解液为法国 Immunotech 公司产品。流式细胞仪(EPICS ALTRA 型)购自美国 Beckman 公司。

### 1.3 流式细胞术检测 NK 和 NKT 细胞

采集大肠癌患者术前 1 周和术后 1 周的晨起空腹外周静脉血 3 ml,放入肝素抗凝管内;取 100  $\mu$ l 血分别加入流式管底部,再加相应抗体 10  $\mu$ l,室温避光孵育 15 min;加入 100  $\mu$ l 裂解液,室温避光孵育 10 min;加入 2 ml 去离子水,待红细胞完全溶解,1 800  $\times g$  离心,弃去上清液;加入 0.5 ml pH 7.4 的 PBS 液,流式细胞仪分析 NKT 及 NK 细胞比例。

### 1.4 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,成组资料两样本均数比较用  $t$  检验,手术前后指标比较采用配对  $t$  检验,实验组内各因素的影响采用方差分析,统计由 SAS6.12 软件完成。

[基金项目] 上海市闵行区卫生局科研课题资助(No. 2008MW17)。Project supported by the Scientific Foundation from Health Bureau of Minhang District Shanghai (No. 2008MW17)

[作者简介] 张德祥(1971 - ),男,江苏省镇江市人,硕士,主治医师,主要从事胃肠道肿瘤外科研究。E-mail: dexiangzh@126.com

[通信作者] 袁苏徐(YUAN Su-xu, corresponding author), E-mail: zyuansuxu@sina.com

## 2 结果

### 2.1 大肠癌患者与健康人外周血 NKT 细胞及 NK 细胞的比较

大肠癌患者和健康人外周静脉血淋巴细胞比较如表 1 和图 1,结果显示大肠癌患者 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>T 细胞(NKT)较健康人显著升高( $t = -4.01, P = 0.0003$ ),CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>T 细胞(NK 细胞)较健康人减少( $t = 4.70, P = 0.0002$ ),CD3<sup>+</sup>T 细胞(T 细胞)与健康人比较无差异( $t = 0.43, P = 0.6700$ )。健康人群中 NKT 细胞占外周血总 T 淋巴细胞的 6.6%(4.2/63.5),大肠癌患者 NKT 细胞占外周血总 T 细胞的 18.9%(11.8/62.4),与健康人比较显著升高( $U = 2.07, P = 0.0383$ )。

### 2.2 大肠癌患者外周血 NKT 细胞及 NK 细胞的影响因素分析

对手术前 1 周与手术后 1 周患者外周血 T 细胞、NKT 细胞及 NK 细胞进行比较(表 2),术后 1 周大肠癌患者 T 细胞比例无明显变化( $P > 0.05$ )、

NKT 细胞明显升高( $t = -4.62, P = 0.0001$ )、NK 细胞明显降低( $t = 5.76, P = 0.0001$ )。

对变化的影响因素进行分析,年龄 >60 岁患者较年龄 ≤60 岁的大肠癌患者的 T 细胞比例低( $F = 4.93, P = 0.0341$ );有淋巴结转移患者 T 细胞较无淋巴结转移患者有降低趋势( $F = 9.64, P = 0.0659$ ),NK 细胞有增高趋势( $F = 3.11, P = 0.0880$ );肿瘤浸润至浆膜和浆膜外患者 T 细胞有降低趋势( $F = 3.07, P = 0.0897$ );Duke's C、D 期较 Duke's A、B 期患者 T 细胞比例低( $F = 15.12, P = 0.0005$ )。性别、肿瘤部位、肿瘤大小、分化程度对这 3 类细胞无影响( $P > 0.05$ )。

### 2.3 大肠癌患者外周血 NKT 细胞及 NK 细胞相关性的分析

分析 T、NK、NKT 细胞三者间是否存在相关性,结果显示,T 与 NKT 细胞相关系数  $r$  为  $-0.1723$  ( $P = 0.3457$ ),NKT 与 NK 相关系数  $r$  为  $-0.1513$  ( $P = 0.4084$ ),T 与 NK 细胞相关系数  $r$  为  $0.2065$  ( $P = 0.2568$ ),均无明显相关性。

表 1 大肠癌患者与健康人外周血 NKT 细胞及 NK 细胞的比较(%)

组别	T 细胞	NKT 细胞	NK 细胞
健康人( $n = 13$ )	63.5 ± 6.2	4.2 ± 2.0	47.0 ± 19.5
大肠癌患者( $n = 32$ )	62.4 ± 11.5	11.8 ± 10.3	19.7 ± 12.4
$t$	0.43	-4.01	4.70
$P$	0.6700	0.0003	0.0002

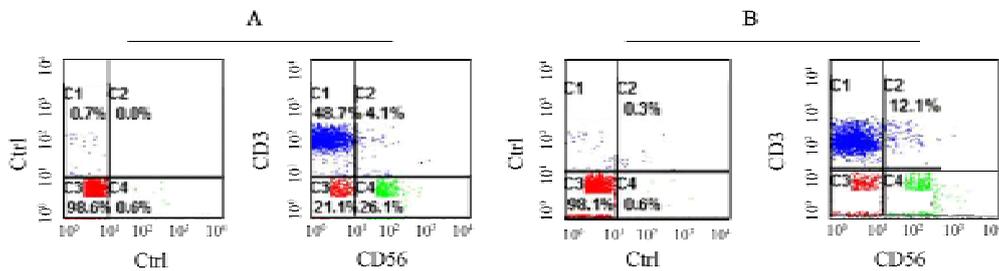


图 1 大肠癌患者与健康人外周血 NKT 细胞及 NK 细胞的比较

A: 健康人; B: 大肠癌患者。NKT 细胞为 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 表达亚群, NK 细胞为 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 表达亚群

## 3 讨论

NK 细胞为非特异性免疫细胞,无需抗原预先致敏即可直接杀伤肿瘤细胞和病毒感染的靶细胞。进行 NK 细胞治疗时,由于 NK 细胞生存时间有限,必须通过持续输入的方法维持其功能<sup>[2]</sup>。NKT 细胞能组成性表达 CD56 分子和 TCR-CD3 复合受体

分子,同 NK 细胞一样介导非 MHC 限制的细胞毒性。活化的 NKT 细胞能分泌大量效应分子如穿孔素、FasL、TRAIL 等,诱导其他细胞如 NK 细胞、CD8CTLs 凋亡<sup>[3]</sup>。NKT 细胞增殖活化后其细胞毒受体 NKG2D 和 Nkp46 功能增强,溶解细胞能力增强,同时分泌 IL-12 增多,增强 NKT 细胞功能;NKG2D 是 MICA 的受体,为 NK 细胞和 CTLs 发挥活

化效应的关键受体位点,在 CD4<sup>+</sup> T 细胞不表达<sup>[4]</sup>。CD1d 限制性 NKT 细胞至少存在: I 型 NKT 细胞能对  $\alpha$  半乳糖酰基鞘氨醇 ( $\alpha$ -GalCer)-CD1d 表达的糖脂抗原发生发应,具有定量的 V $\alpha$ 14 受体,由小鼠的 V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 281 基因片段编码和人 V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q 基因片段编码<sup>[5]</sup>。II 型 NKT 细胞则具有不均匀的非 V $\alpha$ 14 受体,其 TCR 不变,能通过抑制 CD8CTLs 介导的抗肿瘤免疫反应而调节免疫反应。

表 2 大肠癌患者术前及术后 1 周 NKT 及 NK 细胞比较(%)

细胞类型	例数	术前	术后	<i>t</i>	<i>P</i>
T 细胞	32	61.9 ± 12.0	66.3 ± 13.2	-1.58	0.127 0
NKT 细胞	32	11.6 ± 9.9	14.3 ± 11.2	-4.62	0.000 1
NK 细胞	32	20.5 ± 12.3	14.9 ± 7.4	5.76	0.000 1

本研究大肠癌患者 NKT 细胞比例较健康人增多,NKT 细胞介导的抗肿瘤免疫反应处于活化状态;而 NK 细胞比例减少,该类细胞处于抑制状态。Gulubova 等<sup>[6]</sup>认为大肠癌患者 NK 细胞和 NKT 细胞比例变化可能直接参与大肠癌的产生及发展。NK 细胞减少可能与 NKT 细胞增殖有关,NKT 细胞活化后分泌大量效应分子如穿孔素、FasL、TRAIL 等诱导 NK 细胞凋亡<sup>[3]</sup>,抑制 NK 细胞功能。大肠癌患者 T 细胞与健康人比较无变化,手术后 1 周 NKT 细胞较术前明显升高,处于活化状态,而 NK 细胞明显降低。有淋巴结转移患者的 T 细胞比例有降低趋势,NK 细胞有增高趋势,肿瘤浸润至浆膜和浆膜外及 Duke's 分期为 C、D 期的患者 T 细胞比例降低。老年患者有淋巴结转移,肿瘤浸润深度深及 Duke's 分期晚的患者 T 细胞介导的抗肿瘤免疫反应处于抑制状态,这与 Okazaki 等<sup>[7]</sup>的报道相符。老年患者 T 细胞比例低,免疫反应处于抑制状态,与 Mackall 等<sup>[8]</sup>报道相符,该研究认为成人的免疫系统 CD4<sup>+</sup> T 细胞增生能力随年龄增长而下降。这可能与老年人 T 淋巴细胞端粒酶缩短有关。随着年龄的增长,CD8<sup>+</sup> T 细胞能抵制细胞凋亡,bcl-2 表达增加和 caspase-3 水平降低、弹性蛋白和 HSP-70 表达上调<sup>[9]</sup>。

大肠癌患者体内存在 NKT、NK 和 T 细胞抗肿瘤免疫失衡。宿主免疫功能低下或受抑制时,发病率增高;肿瘤发生后肿瘤细胞又能分泌可溶性因子,失去 MHC I 类和 MHC II 类抗原限制性,使免疫原性发生变异而逃避免疫攻击<sup>[10]</sup>,宿主的免疫抑制能促进肿瘤

进展和转移。大肠癌患者 T 细胞功能低下,与机体的荷瘤状态密切相关<sup>[7]</sup>,且肿瘤浸润处 T 细胞密度与恶性肿瘤的预后有关,T 细胞增多能提示预后良好<sup>[11]</sup>。但本组大肠癌患者外周血 T 细胞比例与健康人相比无差异,有待深入研究。细胞免疫治疗是否能成为大肠癌治疗的有效靶点有待更深入的研究。

## [参考文献]

- [1] Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KC, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, et al. A critical function for type I interferons in cancer immunoeediting [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(7): 722-729.
- [2] Yokoyama WM, Kim S, French AR. The dynamic life of natural killer cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22(4): 405-429.
- [3] Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Sato H, et al. Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(10): 5690-5693.
- [4] McGilvray RW, Eagle RA, Watson NF, Al-Attar A, Ball G, Jafferji I, et al. NKG2D ligand expression in human colorectal cancer reveals associations with prognosis and evidence for immunoeediting [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(22): 6993-7002.
- [5] Taniguchi M, Harada M, Kojo S, Nakayama T, Wakao H. The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response [J]. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21(4): 483-513.
- [6] Gulubova M, Manolova I, Kyurkchiev D, Julianov A, Altunkova I. Decrease in intrahepatic CD56<sup>+</sup> lymphocytes in gastric and colorectal cancer patients with liver metastases [J]. *APMIS*, 2009, 117(12): 870-879.
- [7] Okazaki K, Nakayama Y, Shibao K, Hirata K, Nagata N, Itoh H. Enhancement of metastatic activity of colon cancer as influenced by expression of cell surface antigens [J]. *Surg Res*, 1998, 78(1): 78-84.
- [8] Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, et al. Distinctions between CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy [J]. *Blood*, 1997, 89(10): 3700-3707.
- [9] Effros RB, Dagarag M, Spaulding C, Man J. The role of CD8<sup>+</sup> T-cell replicative senescence in human aging [J]. *Immunol Rev*, 2005, 205(6): 147-157.
- [10] Ryungsa K, Manabu E, Kazuaki T. Cancer immunoeediting from immune surveillance to immune escape [J]. *Immunology*, 2007, 121(1): 1-14.
- [11] Strater J, Hinz U, Hasel C, Bhanot U, Mechtersheimer G, Lehner T, et al. Impaired CD95 expression predisposes for recurrence in curatively resected colon carcinoma. Clinical evidence for immunoelection and CD95L mediated control of minimal residual disease [J]. *Gut*, 2005, 54(5): 661-665.

[收稿日期] 2010-06-15

[修回日期] 2010-08-08

[本文编辑] 韩丹