

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.021

· 短篇论著 ·

非小细胞肺癌患者外周血 PD-1 表达水平及淋巴细胞亚群分析

Analysis of expression PD-1 and lymphocyte subsets in peripheral blood of the patients with non-small lung cancer

周莉,张冠男,王琳,吕喜英(承德医学院附属医院 放化疗科,河北 承德 067000)

[摘要] **目的:** 探讨非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者外周血细胞程序性死亡蛋白 1(programmed cell death protein 1-ligand 1, PD-L1)的表达水平和淋巴细胞亚群比例与 NSCLC 临床分期的关系及其临床意义。**方法:** 收集 2014 年 3 月至 12 月承德医学院附属医院肿瘤科收治的 38 例肺腺癌、35 例肺鳞癌患者为实验组,以 30 例健康体检者作为对照组。采集受试者晨起外周血 5 ml,用 ELISA 法检测血清 PD-1 的表达水平;流式细胞术检测 CD4⁺、CD8⁺、CD19⁺、NK 细胞比例。**结果:** 实验组血中 PD-1 表达水平高于对照组[(104.98 ± 20.76)、(109.13 ± 24.65) vs (50.80 ± 14.38) pg/ml, $P < 0.01$];实验组外周血中 CD4⁺、NK 细胞比例低于对照组($P < 0.001$),CD8⁺ 细胞比例高于对照组($P < 0.01$);Ⅲ、Ⅳ期肺癌 CD4⁺ 细胞比例和 NK 细胞比例均低于 I、II 期($P < 0.01$),PD-1 表达水平 CD8⁺ 细胞比例均高于 I、II 期($P < 0.01$);CD19⁺ 比例差异无统计学意义($P > 0.05$);PD-1 的表达水平与 NK 细胞比例呈负相关($P < 0.01$),与 CD8⁺ 细胞比例呈正相关($P < 0.01$),与 CD4⁺、CD19⁺ 无相关性($P > 0.05$)。**结论:** NSCLC 患者外周血 PD-1 的表达水平较健康体检者明显上调,检测外周血 PD-1 表达水平和淋巴细胞亚群比例对 NSCLC 患者病情监测及预后判断有重要意义。

[关键词] 非小细胞肺癌;程序性死亡蛋白 1(PD-1);淋巴细胞亚群

[中图分类号] R734.2; R730.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)03-0413-03

在我国肺癌死亡率已居癌症死亡首位^[1],其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占肺癌总数的 85%,且 5 年生存率低至 15%^[2]。手术、放疗和化疗是治疗癌症的三大重要手段,但在改善患者预后方面,依然不令人满意。肺癌患者长期生存率较低,淋巴细胞亚群作为人体免疫系统的主要功能细胞,可以反映患者的免疫功能状态^[3]。细胞程序性死亡蛋白 1/程序性死亡因子配体 1(programmed cell death protein 1-ligand 1, PD-L1)作为 B7/CD28 协同刺激分子超家族的重要成员,在许多肿瘤组织中存在表达,已被证实能有效抑制 T、B 细胞功能,使肿瘤细胞发生免疫逃逸^[4]。PD-1 与肿瘤免疫逃逸的关系已成为研究热点,了解 NSCLC 患者外周血 PD-1 表达水平与淋巴细胞亚群的关系有重要的免疫学意义。本文通过对 NSCLC 患者外周血 PD-1 表达水平和淋巴细胞亚群比例的研究,旨在探讨两者相关性及其在 NSCLC 诊断及治疗中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2014 年 3 月至 12 月承德医学院附属医院肿瘤科收治的 73 例肺癌患者,其中(1)肺腺癌 38 例:平均年龄(56.9 ± 7.6)岁,男 21 例、女 17 例,根据美国癌症联合委员会(AJCC)肺癌 TNM 分期标

准:Ⅰb 4 例、Ⅱ 6 例、Ⅲ 13 例、Ⅳ 15 例;(2)肺鳞癌 35 例:平均年龄(58.5 ± 7.4)岁,男 23 例、女 12 例,Ⅰb 3 例、Ⅱ 5 例、Ⅲ 13 例、Ⅳ 14 例。所有患者均经病理学证实并排除转移性癌,均为初诊病例,未接受手术、放化疗及其他常规治疗。(3)对照组 30 例健康体检者:平均年龄(57.4 ± 8.0)岁,男 18 例、女 12 例。两组肺癌患者一般情况比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。所有入组对象均签署知情同意书,研究方案经过医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂与仪器

CYTOMICS FC 500 型流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 有限公司。Multitest 四色分析试剂盒:CD45 FIFC/CD4 RD1/CD8 ECD/CD3 FC5、CD45 FIFC/CD56 RD1/CD19 ECD/CD3 FC5, FACS 溶血素(1 ×),购自美国 Becton Dickinson 公司。人 PD-1 ELISA 试剂盒购自美国 R&D Systems 公司。酶标检测仪和激光共聚焦显微镜购自美国 BioRad 公司。

1.3 ELISA 法检测肺癌患者血清 PD-1 表达水平

采集实验组及对照组晨起静脉血 5 ml, EDTA

[作者简介] 周莉(1989 -),女,河北省衡水市人,硕士生,主要从事非小细胞肺癌免疫治疗研究, E-mail:184744626@qq.com

[通信作者] 吕喜英(LYU Xiying, corresponding author), E-mail:xiyinglv@sina.com

抗凝,3 000 × g 离心 10 min,毛细吸管吸取上清液于 1 ml EP 管中备用。采用 ELISA 方法检测各样本上清液中 PD-1 表达水平,操作严格按照 PD-1 ELISA 试剂盒实验步骤进行,PD-1 标准品稀释浓度依次为 0、15、30、60、120、240 pg/ml,以空白孔调零,用酶标仪测定 D_{450} 。利用绘制的标准曲线计算待测血清中 PD-1 浓度。

1.4 流式细胞术检测 CD4⁺、CD8⁺、CD19⁺ 及 NK 细胞表达比例

采集实验组及对照组晨起静脉血 5 ml,EDTA 抗凝,应用荧光直接标记法及流式细胞仪检测外周血淋巴细胞亚群比例。先将标本与试剂轻轻摇匀,所有 TruCOUNT 绝对计数管中准确加入 20 μl Multi TEST 四色试剂和 50 μl 全血,充分混匀。在室温下避光反应 20 min 后,加入 FACS 溶血素(10 ×),充分混合后避光放置 10 min,应用流式细胞术检测外周血 T 淋巴细胞亚群 CD4⁺、CD8⁺、CD19⁺ 及 NK 杀伤细胞表达比例。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析、LSD-*t* 检验、两样本 *t* 检验、Pearson 相关分析进行统计分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌患者血清 PD-1 高表达

ELISA 法检测结果发现,肺腺癌、肺鳞癌血清 PD-1 表达水平明显高于对照组[(104.98 ± 20.76)、(109.13 ± 24.65) vs (50.80 ± 14.38) pg/ml, $F = 78.58, P < 0.01$];肺腺癌、肺鳞癌组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 肺癌患者血清淋巴细胞亚群比例的变化

流式细胞术检测结果(表 1)表明,实验组外周血中 CD4⁺、NK 细胞表达水平明显低于对照组,CD8⁺ 细胞表达水平明显高于对照组(均 $P < 0.01$);CD19⁺ 细胞与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);肺腺癌、肺鳞癌组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 肺癌患者外周血淋巴细胞亚群比例的变化(%)

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD19 ⁺	NK
肺腺癌	38	23.6 ± 7.2**	44.5 ± 4.4**	12.6 ± 3.1*	8.4 ± 2.2**
肺鳞癌	35	24.1 ± 6.2**	46.2 ± 3.6**	12.6 ± 3.3*	9.1 ± 2.3**
对照组	30	42.5 ± 8.5	30.0 ± 4.7	12.0 ± 3.5	32.1 ± 14.3
<i>F</i> 值		69.366	140.197	0.374	92.260

* $P > 0.05$, ** $P < 0.01$ 与对照组比较

2.3 临床分期与 CD4⁺、CD8⁺、NK、PD-1 表达关系

结果表明:Ⅲ、Ⅳ期肺癌患者外周血中 CD4⁺ 细胞比例低于 I、II 期($t_A = 7.329, t_B = 5.376, P < 0.01$),NK 细胞比例显著低于 I、II 期($t_A = 3.772, t_B = 5.169, P < 0.01$),PD-1 表达水平高于 I、II 期($t_A = -6.151, t_B = -6.601, P < 0.01$),CD8⁺ 细胞比例高于 I、II 期($t_A = -0.592, t_B = -6.416, P < 0.01$);CD19⁺ 比例差异无统计学意义($t_A = -0.981, t_B = -0.224, P > 0.05$)。

2.4 PD-1 与 CD4⁺、CD8⁺、NK、CD19⁺ 细胞比例的相关性

Pearson 相关性分析表明:PD-1 表达与 NK 细胞比例呈负相关($r_A = -0.568, r_B = -0.631, P < 0.01$),与 CD8⁺ 细胞比例呈正相关($r_A = 0.643, r_B = 0.648, P < 0.01$),与 CD4⁺ 细胞比例无相关性($r_A = 0.176, r_B = 0.141, P > 0.05$),与 CD19⁺ 细胞比

例无相关性($r_A = 0.307, r_B = 0.109, P > 0.05$)。

3 讨论

众所周知^[5],抗肿瘤免疫的主力军是细胞免疫,而 T 淋巴细胞亚群是细胞免疫的主要效应细胞。研究^[6-7]表明,肺癌患者免疫功能低下,主要表现为外周血免疫球蛋白降低及 T 淋巴细胞亚群分布异常。本实验即从这一角度入手,采用流式细胞术检测 73 例 NSCLC 患者及 30 例健康体检者 T 淋巴细胞亚群的分布情况,结果表明 NSCLC 患者与正常体检者相比,外周血中 CD4⁺ T、NK 细胞比例明显降低,CD8⁺ T 细胞比例明显升高,CD19⁺ 细胞比例无统计学意义,此结果与上述报道的结果一致。采用两独立样本 *t* 检验进一步分析了 T 淋巴细胞亚群与 TNM 分期的关系,结果表明Ⅲ、Ⅳ期与 I、II 期 NSCLC 患者相比,外周血中 CD4⁺ 细胞比例、NK 细胞比例显著偏低,CD8⁺ 细胞比例显著偏高,CD19⁺ 比例差异无统计学意义。因此对

NSCLC 患者外周血 T 淋巴细胞亚群进行检测和分析,有利于帮助医师评估患者的免疫状态及制定更加科学有效的治疗方案。

研究^[8]表明,肿瘤的免疫逃逸依赖于 PD-1/PD-L1 信号途径,PD-1 与许多肿瘤的发生、发展及预后有关。本文选用 ELISA 方法检测 NSCLC 患者外周血 PD-1 的表达水平,结果显示 NSCLC 患者血清中 PD-1 表达水平较正常体检者明显升高,且其表达水平与 NSCLC 患者的临床分期呈正相关。临床有可能通过检测 PD-1 的表达水平,一定范围内估计 NSCLC 患者的病情及严重程度。类似结论在胃癌^[9]、结直肠癌^[10]等肿瘤中都有报道。因此使用 PD-1 抑制剂下调 PD-1 将有助于提高机体抗肿瘤免疫力、减轻肿瘤负荷,为 NSCLC 患者的治疗带来了曙光。

PD-1 可以在各种肿瘤组织中表达,从功能上讲,PD-L1 可以交联 PD-1 受体,PD-1 及 PD-L 阻断性抗体的应用可以增强 T 细胞免疫应答^[11],且 PD-1/PD-L 信号能有效抑制 T、B 细胞功能,使 T 细胞增殖受抑制,其抑制途径在免疫调节中发挥着重要的作用,并在肿瘤免疫的研究中意义重大^[12]。研究^[13]也表明,T 细胞受体或 B 细胞受体信号可诱导 PD-1 的表达,PD-1 与其受体结合后能有效抑制 T、B 细胞功能,导致 T 细胞凋亡和衰竭。本实验应用 Pearson 相关分析对 PD-1 和 T 淋巴细胞亚群进行相关性分析,结果表明 PD-1 与 NK 细胞比例呈负相关,与 CD8⁺ 细胞比例呈正相关,与 CD4⁺、CD19⁺ 无相关性。本研究结果与 Hamanishi 等^[14]的研究结果一致。因此,有理由相信,如果 NSCLC 患者外周血中 PD-1 高表达,其 T 淋巴细胞亚群中 CD8⁺ 细胞比例会增高,NK 细胞比例会相应下降,甚至存在一定的系数关系。故检测外周血淋巴细胞亚群情况可能一定程度上即可反映 PD-1 的表达水平,对 NSCLC 患者病情监测及预后判断具有重要作用,也可作为 NSCLC 患者 PD-1 抗体治疗筛查的方法之一。

综上,免疫细胞比例检测结合 PD-1 表达水平检测可能是一个较好的反映机体细胞免疫功能的参考指标,有望在临床上用于肿瘤患者免疫功能的监测。NSCLC 患者检测 PD-1 的表达水平及外周血淋巴细胞亚群情况,将有助于提示 NSCLC 患者的病情演变、判断肿瘤的预后及转归。下调 PD-1 将有助于提高机体抗肿瘤免疫、减轻肿瘤负荷,为 NSCLC 的治疗提供新的思路。

[参 考 文 献]

[1] 陈万青,张思维,邹小农. 中国肺癌发病死亡的估计和流行趋势研究 [J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13(5): 488-493. DOI: 10.3779/j. issn. 1009-3419. 2010. 05. 20.

- [2] MOLINA J R, YANG P, CASSIVI S D, et al. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship [J]. *Mayo Clin Proc*, 2008, 83(5): 584-594. DOI: 10.4065/83.5.584.
- [3] 孔晓霞,曲义庆,王旭,等. 肺癌患者外周血及胸腔积液调节性 T 细胞的表达及其临床意义 [J]. *肿瘤研究与临床*, 2011, 23(7): 463-466. DOI: 10.3760/cma. j. issn. 1006-9801. 2011. 07. 009.
- [4] BARBER D L, MAYER-BARBER K D, FENG C G, et al. CD4 T cells promote rather than control tuberculosis in the absence of PD-1-mediated inhibition [J]. *J Immunol*, 2011, 186(3): 1598-1607. DOI: 10.4049/jimmunol.1003304.
- [5] 童明宏,邵俊,陈燕红,等. CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 细胞水平在胃癌患者外周血中的变化 [J]. *检验医学*, 2012, 27(6): 445-447. DOI: 10.3969/j. issn. 1673-8640. 2012. 06. 004.
- [6] 杨国旺,王皓,韩磊,等. 中医辨证论治方案联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌 91 例临床观察 [J]. *中医杂志*, 2014, 55(3): 209-213. DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.03.009.
- [7] 曹驰,李彩霞. 原发性肝癌的免疫状态与预后的相关性分析 [J]. *肿瘤防治杂志*, 2004, 11(2): 127-130. DOI: 10.3969/j. issn. 1673-5269. 2004. 02. 005.
- [8] BADOUAL C, HANS S, MMERLLON N, et al. PD-1-expressing tumor-infiltrating T Cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(1): 128-138. DOI: 10.1158/0008-5472. can-12-2606.
- [9] GAO Q, WANG X Y, QIU S J, et al. Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(3): 971-979. DOI: 10.1158/1078-0432. ccr-08-1608.
- [10] SONG M, CHEN D, LU B, et al. PTEN loss increases PD-L1 protein expression and affects the correlation between PD-L1 expression and clinical parameters in colorectal cancer [J/OL]. *PLoS ONE*, 2013, 9(1): 59-69 [2015-10-05]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0065821>. DOI: 10.1371/journal.pone.0065821.
- [11] KAISER A D, SCHUSTER K, GADIOT J, et al. Reduced tumor-antigen density leads to PD1/PDL1-mediated impairment of partially exhausted CD8⁺ T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(3): 662-671. DOI: 10.1002/eji.201141931.
- [12] OKAZAKI T, HONJO T. PD-1 and PD-L1 ligands: from discovery to clinical application [J]. *J Immunol*, 2007, 19(7): 813-824. DOI: 10.1093/intimm/dxm057.
- [13] LATCHMAN Y, WOOD C R, CHERNOVA T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(3): 261-268. DOI: 10.1038/85330.
- [14] HAMANISHI J, MANDAI M, IWASAKAI M, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(9): 3360-3365. DOI: 10.1073/pnas.0611533104.

[收稿日期] 2015 - 12 - 10

[修回日期] 2016 - 03 - 30

[本文编辑] 党瑞山