

## 免疫细胞治疗对晚期胃癌患者外周血记忆 T 细胞的影响

李则学, 张 兰, 李沛雨

解放军总医院 普通外科研究所, 北京 100853

**摘要:** **目的** 初步研究免疫细胞治疗对胃癌患者免疫记忆状态的影响。**方法** 2013年10月-2015年2月在我院普通外科行胃癌根治术的253例患者按照是否经过树突细胞、细胞毒性T淋巴细胞免疫细胞治疗分组,其中免疫治疗组72例,对照组181例,运用流式细胞术检测患者外周血CD4<sup>+</sup>T<sub>CM</sub>(CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>)、CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub>(CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>)、CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>(CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>)及CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>(CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>)比例,分析晚期胃癌患者免疫记忆状态,并进一步分析免疫细胞治疗对免疫记忆形成的影响。**结果** 胃癌患者中,CD4<sup>+</sup>T细胞中以T<sub>CM</sub>为主,为54.52%±12.76%;而CD8<sup>+</sup>T细胞中以T<sub>EM</sub>为主,为24.49%±11.39%。相比对照组,免疫治疗组外周血中CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub>比例显著降低(对照组31.59%±9.29%,免疫治疗组24.26%±7.71%, $P=0.025$ ),CD4<sup>+</sup>T<sub>CM</sub>比例显著降低(免疫治疗组47.86%±11.77%,对照组60.00%±11.05%, $P=0.006$ ),CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>显著升高(对照组20.00%±8.43%;免疫治疗组29.93%±12.40%, $P=0.013$ )。**结论** 记忆T细胞可以有效评价胃癌患者抗肿瘤特异性免疫状态,且免疫细胞治疗可以有效重建胃癌患者抗肿瘤免疫记忆。

**关键词:** 胃癌; T淋巴细胞亚群; 记忆T细胞; 免疫细胞治疗

**中图分类号:** R 392.9; R 730.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-5227(2015)12-1169-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-5227.2015.12.002

**网络出版时间:** 2015-10-20 10:29:18

**网络出版地址:** http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20151020.1029.004.html

## Effects of postoperative immunocytes therapy for memory T cell subsets in patients with advanced gastric cancer

LI Zexue, ZHANG Lan, LI Peiyu

General Surgery Institute, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: LI Peiyu. Email: lipeiyu6301@163.com

**Abstract: Objective** To explore the effects of immunotherapy on immunological memory in patients with advanced gastric cancer. **Methods** Two hundred and fifty-three patients with advanced gastric cancer who underwent radical surgery in our hospital from October 2013 to February 2015 were enrolled in this study, and they were randomly divided into immunotherapy group (n=72) and control group (n=181) according to whether they had undergone immunotherapy, including dendritic cells (DC) and cytotoxic T cell (CTL). Percentage of CD4<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>), CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> (CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) and CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> (CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) in peripheral blood was evaluated to analyze immune memory characteristics of advanced gastric cancer patients, furthermore, influence of immunotherapy to immune memory was also analyzed. **Results** T<sub>CM</sub> accounted for most of the CD4<sup>+</sup>T cells (54.52%±12.76%) while T<sub>EM</sub> in CD8<sup>+</sup>T cells accounted for (24.49%±11.39%). Compared with control group, percentage of CD4<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> and CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> in patients treated with immunotherapy decreased significantly (CD4<sup>+</sup>T<sub>CM</sub>: immunotherapy, 47.86%±11.77%, control, 60.00%±11.05%, $P=0.006$ ; CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub>: immunotherapy, 24.26±7.71%, control, 31.59±9.29%, $P=0.025$ ), however, CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> increased significantly (control, 20.00±8.43%, immunotherapy, 29.93±12.40%, $P=0.013$ ). **Conclusion** Memory T cells can effectively evaluate the immune status of advanced gastric cancer, and immunotherapy can be effective in restoring immune depletion status of patients with advanced gastric cancer.

**Keywords:** gastric cancer; T-lymphocyte subset; memory T cells; immunotherapy

胃癌是消化道常见肿瘤,诊断时常为晚期,发病率和死亡率较高<sup>[1-4]</sup>。机体免疫紊乱是肿瘤发生发展的重要基础,评估肿瘤患者免疫状态是免疫治疗肿瘤的前提,但免疫的复杂性导致评估困难,进而成为肿瘤免疫治疗及疗效监测的障碍。

研究证实,记忆T细胞在晚期肿瘤发生发展中具有重要作用<sup>[5-6]</sup>,可以介导持久的抗肿瘤特异性免疫,其在肿瘤患者体内的维持水平与肿瘤患者免疫治疗效果密切相关<sup>[6-7]</sup>。因此,本研究对胃癌患者外周血记忆T细胞特征进行分析,研究免疫细胞治疗对胃癌患者外周血记忆T细胞的影响,探索免疫细胞治疗恢复抗肿瘤免疫内在机制。

### 对象和方法

**1 研究对象** 2013年10月-2015年2月在本院普通外科行胃癌根治术的253例患者,均经术后

收稿日期:2015-08-04

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81172891)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81172891)

作者简介:李则学,女,学士,主管技师。研究方向:晚期肿瘤的免疫治疗。Email: lizx301@sina.com

通信作者:李沛雨,男,主任医师,硕士生导师。Email: lipeiyu6301@163.com

病理检查确诊, 其中男 165 例, 女 88 例, 年龄 23 ~ 84 岁, 平均 52 岁。接受手术联合树突细胞 (dendritic cells, DC) + 细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T-lymphocytes, CTL)(CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> 比例 > 60%) 治疗的患者作为免疫治疗组, 共 72 例, 仅接受手术治疗的作为对照组, 共 181 例, 两组患者年龄、性别、病理类型及分期、临床分期及手术方式差异无统计学意义。见表 1。

表 1 两组胃癌患者临床资料比较

Tab. 1 Clinical characteristics of immunotherapy group and control group (n, %)

	Control (n=181)	Immunotherapy (n=72)	P
Age (yrs, $\bar{x} \pm s$ )	54.0 $\pm$ 12.3	53.0 $\pm$ 10.5	0.544
Gender			0.237
Male	114(62.9)	51(70.8)	
Female	67(37.1)	21(29.2)	
Differentiation			0.859
Well	8(4.4)	4(5.6)	
Moderate	114(63.0)	42(58.3)	
Poor	46(25.4)	19(26.4)	
Mucinous	13(7.2)	7(9.7)	
T stage			0.184
1	3(1.7)	0(0)	
2	12(6.6)	4(5.6)	
3	125(69.1)	43(59.7)	
4	41(22.7)	25(34.7)	
N stage			0.871
0	60(33.1)	26(36.1)	
1	66(36.5)	24(33.3)	
2	55(30.4)	22(33.6)	
Clinic stage			0.956
III	107(59.1)	44(61.1)	
IV	19(10.5)	7(9.7)	
Operation type			0.613
Laparoscopic	52(28.7)	23(31.9)	
Open	129(71.3)	49(68.1)	

2 免疫治疗 术前采集外周血 50 ml, 分离培养扩增淋巴细胞, 分别在术后 9 d、12 d 和 14 d 回输 DC 细胞、CTL 细胞。

3 外周血 T 细胞检测 分别于术前 1 d 和术后 1 个月门诊复查时采外周血 5 ml 用于检测免疫记忆细胞。人淋巴细胞分离液购自中国医学科学院生物所。PerCP 标记抗人 CD4 单克隆抗体、FITC 标记抗人 CD8 单克隆抗体、APC 标记抗 CD45RO 单克隆抗体、PE 标记抗人 CD62L 单克隆抗体均购自美国 BD 公司, 胎牛血清 (FBS) 购自北京元亨金马生物技术公司。取外周血 20 ml, 与等体积 0.9% 氯化钠注射液混匀, 铺在等体积的分离液上, 以 2 300 r/min 离心 22 min; 收集白膜层, 用 0.9% 氯

化钠注射液洗涤 1 ~ 2 次, 2 300 r/min 离心 10 min, 弃上清后收获细胞。取  $1 \times 10^6$  个细胞, 加入 CD8<sup>-</sup> FITC/CD62L<sup>-</sup> PE/CD4<sup>-</sup> PerCP/CD45RO<sup>-</sup> APC 抗体, 混匀后常温避光反应 30 min, 洗涤 2 次 (1 200 r/min, 离心 5 min), 悬浮于 500  $\mu$ l PBS 中, 4 $^{\circ}$ C 保存。荧光抗体染色完成后, 应用流式细胞仪检测细胞, 并用 CellQuest 软件分析。

4 统计学分析 采用 SPSS20.0 软件进行统计学分析, 定量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两个独立样本均数比较采用 *t* 检验, 定性资料采用  $\chi^2$  检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结果

1 胃癌患者术前免疫记忆状态 根据 T 细胞表面分子 CD45RO 及 CD62L 的表达与否将 T 细胞分为两种类型: CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> 中央型记忆 T 细胞 (T<sub>CM</sub>) 和 CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> 效应型记忆 T 细胞 (T<sub>EM</sub>)。对 253 例胃癌患者外周血中 CD4<sup>+</sup> T 及 CD8<sup>+</sup> T 细胞分群分析后, CD4<sup>+</sup> 中央型记忆 T 细胞占 54.52%  $\pm$  12.76%, CD4<sup>+</sup> 效应型记忆 T 细胞占 15.60%  $\pm$  10.17%, 可见 CD4<sup>+</sup> T 细胞中以中央型记忆 T 细胞为主, 占总数约 60%。CD8<sup>+</sup> 中央型记忆 T 细胞占 28.28%  $\pm$  9.25%, CD8<sup>+</sup> 效应型记忆 T 细胞占 24.49%  $\pm$  11.39%。

2 免疫细胞治疗对胃癌患者记忆 T 细胞的影响 术后 1 个月时, 两组患者的外周血中 CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> 比例差异有统计学意义, 免疫治疗组 47.86%  $\pm$  11.77%, 对照组 60.00%  $\pm$  11.05% (P=0.006)。免疫治疗组 CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> 比例较对照组显著降低, 对照组 31.59%  $\pm$  9.29%, 免疫治疗组 24.26%  $\pm$  7.71% (P=0.025) (图 1)。而免疫治疗组 CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> 比例较对照组显著升高, 对照组 20.00%  $\pm$  8.43%, 免疫治疗组 29.93%  $\pm$  12.40% (P=0.013)。见图 2。

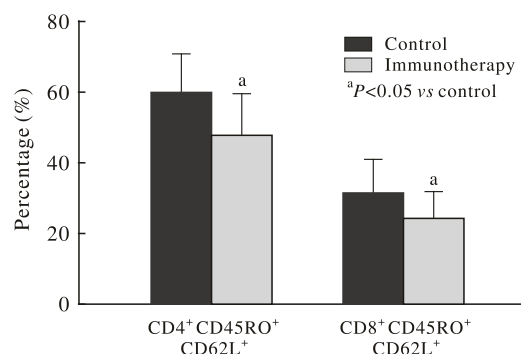


图 1 两组胃癌患者 CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> (CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) 和 CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> (CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) 比较

Fig.1 Percentage of CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> and CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> in gastric cancer patients with or without treatment

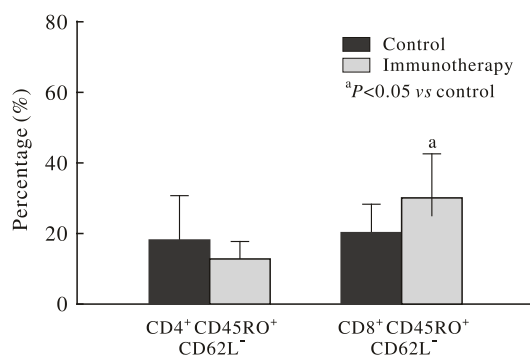


图2 两组胃癌患者CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>(CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>)和CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>(CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>)比较

Fig.2 Percentage of CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> and CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> in gastric cancer patients with or without treatment

## 讨论

新兴的免疫治疗已经成为抗肿瘤的第四大手段。免疫细胞是抗肿瘤免疫的重要组成部分,其中记忆性T细胞是体内持久存在的抗肿瘤组分,按照其不同的功能分为中央型记忆细胞T<sub>CM</sub>和效应型记忆细胞T<sub>EM</sub><sup>[8]</sup>。T<sub>CM</sub>维持免疫记忆,在机体荷瘤或肿瘤转移状态下发挥免疫保护作用<sup>[9-10]</sup>,高表达CD45RO和CD62L,主要分布于淋巴结等次级淋巴器官等,而T<sub>EM</sub>低表达或不表达CCR7和CD62L,可以表达黏附分子和趋化因子受体,执行快速的效应功能,主要分布在免疫反应局部<sup>[11-12]</sup>,二者在抗肿瘤免疫都有重要的作用,但T<sub>CM</sub>相比T<sub>EM</sub>更有优势<sup>[13-15]</sup>。

本研究分析了晚期胃癌患者外周血记忆性T细胞的分布,发现胃癌患者外周血中中央型记忆性T细胞相对较少,而效应型记忆性T细胞比例增加,呈现典型的T细胞耗竭状态<sup>[16]</sup>,即中央型记忆细胞向效应型记忆细胞转化,缺乏功能性T细胞。虽然效应型记忆性T细胞比例增加,但是缺乏辅助性T细胞,无法发挥有效的抗肿瘤作用<sup>[17]</sup>。T<sub>CM</sub>和T<sub>EM</sub>可以作为评估胃癌患者免疫状态的有效指标,用于解释肿瘤治疗效果不佳的内在免疫机制,也可以评估各种治疗方式,进而指导肿瘤治疗方案的制订,实现肿瘤的个性化治疗。

基于T细胞的过继免疫治疗是肿瘤生物治疗的重要手段,本研究中采用的DC和T细胞多细胞联合免疫治疗,将大量优质的肿瘤抗原致敏的T细胞(T<sub>CM</sub> > 60%)回输体内,及时补充肿瘤患者体内T<sub>CM</sub>细胞,有效纠正胃癌患者术后免疫损伤状态及T细胞耗竭状态。

胃癌患者免疫状态呈动态变化,以T<sub>CM</sub>和T<sub>EM</sub>为观察指标,动态监测抗肿瘤特异性免疫状态的变化,分析各种治疗手段对免疫状态的影响,探索建立优化、高效、个性化的抗肿瘤联合治疗方案,值得进一步研究。

## 参考文献

- Lee JH, Kim KM, Cheong JH, et al. Current management and future strategies of gastric cancer [J]. *Yonsei Med J*, 2012, 53 (2): 248-257.
- Iwachi T, Tanaka H, Yamazoe S, et al. Identification of HLA-A\*2402-restricted epitope peptide derived from ERas oncogene expressed in human scirrhous gastric cancer [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102 (4): 683-689.
- 陈杨, 王艳荣, 张权, 等. 晚期胃癌患者其肿瘤相关性贫血与预后的关系 [J]. *解放军医学院学报*, 2015, 36 (4): 351-354.
- 刘利利, 韩颖, 路长宇, 等. 胃癌术后患者预后相关因素分析 [J]. *军医进修学院学报*, 2011, 32 (6): 584-587.
- Perret R, Ronchese F. Memory T cells in cancer immunotherapy: which CD8 T-cell population provides the best protection against tumours? [J]. *Tissue Antigens*, 2008, 72 (3): 187-194.
- Sallusto F, Lenig D, Förster R, et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions [J]. *Nature*, 1999, 401 (6754): 708-712.
- Klebanoff CA, Acquavella N, Yu Z, et al. Therapeutic cancer vaccines: are we there yet? [J]. *Immunol Rev*, 2011, 239 (1): 27-44.
- Ludewig B, Oehen S, Barchiesi F, et al. Protective antiviral cytotoxic T cell memory is most efficiently maintained by restimulation via dendritic cells [J]. *J Immunol*, 1999, 163 (4): 1839-1844.
- Wherry EJ, Teichgräber V, Becker TC, et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4 (3): 225-234.
- Van Panhuys N, Perret R, Prout M, et al. Effector lymphoid tissue and its crucial role in protective immunity [J]. *Trends Immunol*, 2005, 26 (5): 242-247.
- Weninger W, Crowley MA, Manjunath N, et al. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8 (+) T cells [J]. *J Exp Med*, 2001, 194 (7): 953-966.
- Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, et al. Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 (27): 9571-9576.
- Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. CD8 (+) T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy [J]. *Immunol Rev*, 2006, 211: 214-224.
- Lee HE, Chae SW, Lee YJ, et al. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer [J]. *Br J Cancer*, 2008, 99 (10): 1704-1711.
- Enomoto K, Sho M, Wakatsuki K, et al. Prognostic importance of tumour-infiltrating memory T cells in oesophageal squamous cell carcinoma [J]. *Clin Exp Immunol*, 2012, 168 (2): 186-191.
- Chen IH, Lai YL, Wu CL, et al. Immune impairment in patients with terminal cancers: influence of cancer treatments and cytomegalovirus infection [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59 (2): 323-334.
- Devita VT, Rosenberg SA. Two hundred years of cancer research [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366 (23): 2207-2214.