

## 乳腺肿瘤患者外周血中 T 淋巴细胞表面活化分子和 Tregs 的表达研究\*

林帝金, 刘纯岳, 方俊粤, 黄洁珊, 林向华 (中山大学孙逸仙纪念医院检验科, 广州 510120)

**摘要:**目的 探讨 T 淋巴细胞表面活化分子和调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)在乳腺肿瘤患者中的表达及其临床意义。方法 选取 2016~2017 年在中山大学孙逸仙纪念医院进行诊治的 245 例乳腺肿瘤患者(包括恶性乳腺肿瘤 139 例和良性乳腺肿瘤 106 例)为研究对象,采用流式细胞术检测 T 淋巴细胞表面活化分子 CD25, CD69, HLA-DR 以及 Tregs 的表达。结果 与健康对照组比较,乳腺肿瘤患者的 CD3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 淋巴细胞, CD3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> T 淋巴细胞和 CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> T 淋巴细胞均明显上升,且恶性肿瘤患者较良性肿瘤患者升高更显著。此外, Tregs 在恶性肿瘤患者的百分比较良性肿瘤患者以及健康对照组均升高,恶性肿瘤患者的 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞百分比较良性肿瘤患者升高显著,以上差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。T 淋巴细胞表面活化分子的表达在肿瘤分期及淋巴结是否转移中差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 乳腺肿瘤患者外周血 T 淋巴细胞表面活化分子 CD25 和 HLA-DR 表达明显升高,密切监测可辅助临床对乳腺肿瘤患者的病情和疗效进行判断。

**关键词:**乳腺肿瘤; CD25; CD69; HLA-DR; 调节性 T 细胞

**中图分类号:** R737.9; R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2018)05-031-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.05.009

## Expression of T Lymphocyte Surface Activating Molecules and Tregs in Peripheral Blood of Patients with Breast Neoplasia

LIN Di-jin, LIU Chun-yue, FANG Jun-yue, HUANG Jie-shan, LIN Xiang-hua

(Department of Clinical Laboratory,

Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression and clinical significance of T lymphocyte surface activator and Tregs in breast neoplasms patients. **Methods** 245 patients (including 139 cases of malignant tumors and 106 cases of benign tumors) with breast neoplasms were selected as the research object to investigate the expression of T lymphocyte activating molecules CD25, CD69, HLA-DR and regulatory T cell (Tregs) by flow cytometry. **Results** Compared with healthy controls, CD3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T lymphocytes, CD3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> T lymphocytes and CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> T lymphocytes increased significantly in breast neoplasms patients, and those in malignant tumors increased more significantly than those in benign tumors. In addition, the expression level of Tregs in malignant tumor patients was higher than that in benign tumor patients and healthy controls. The CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in malignant tumor patients were significantly higher than those in benign tumor patients ( $P < 0.05$ ). The expression level of T lymphocyte activation molecules were influenced neither by the tumor staging nor by lymph node metastasis ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The expression levels of CD25 and HLA-DR on the surface of T lymphocytes in breast neoplasms patients were significantly increased. Close monitoring T lymphocytes surface activator could help breast neoplasms patients in clinical diagnosis, judging the condition and efficacy monitoring.

**Keywords:** breast neoplasia; CD25; CD69; HLA-DR; regulatory T cells

乳腺癌是严重危害女性健康甚至危及生命的恶性肿瘤之一,近年来其发病率有上升趋势,且发病年龄年轻化<sup>[1]</sup>。在恶性肿瘤患者中,其自身的细胞免疫和 T 淋巴细胞的活化与肿瘤的发生、发展及治疗密切相关<sup>[2]</sup>。而在免疫抑制机制和维持自身耐受中,调节性 T 细胞(Tregs)作为一组具有免疫调节功能的 T 淋巴细胞亚群,发挥着极其重要的作用<sup>[3]</sup>。目前对于 T 淋巴细胞活化分子 CD25, CD69 和人类白细胞抗原-DR(HLA-DR)在不同肿

瘤表达情况的研究不够详尽。本研究拟通过流式细胞术检测乳腺肿瘤患者外周血中 T 淋巴细胞表面活化分子和 Tregs 的表达,探讨其在乳腺肿瘤患者病情判断及疗效监测中的临床意义。

### 1 材料与方法

1.1 研究对象 选取了 2016 年 7 月~2017 年 12 月在中山大学孙逸仙纪念医院进行诊治的 245 例乳腺肿瘤患者为研究对象,年龄 17~83 岁,平均年龄 43.66( $s=1.18$ )岁。其中恶性乳腺肿瘤组(ma-

\* 作者简介:林帝金(1986—),男,学士,技师,研究方向:细胞免疫学, Tel:18312016321, E-mail:282411099@qq.com。

通讯作者:林向华, E-mail:13826068632@139.com。

lignant tumors, MT) 139 例,按 TNM 分期:Ⅰ期 32 例,Ⅱ期 70 例,Ⅲ期 23 例,Ⅳ期 14 例;按淋巴结是否转移分:65 例无淋巴结转移,74 例有淋巴结转移。良性乳腺肿瘤组(benign tumors, BT) 106 例:包括良性叶状肿瘤 2 例,巨大积乳囊肿 1 例,纤维腺瘤 85 例,错构瘤 3 例,脂肪瘤 2 例,导管内乳头状瘤 13 例。所有病例均排除肝炎<sup>[4~6]</sup>、自身免疫性疾病及其他肿瘤,按照国际抗癌协会标准进行 TNM 临床分期<sup>[7]</sup>。另选取健康对照组(healthy controls, HC) 50 例,年龄 23~46 岁,平均年龄 35.13( $s=8.26$ )岁。

1.2 试剂与仪器 美国 Beckman Coulter Navios 流式细胞仪;单克隆抗体:CD45 PE-Cy7(批号:198),CD8 FITC(批号:44),CD4 PE(批号:41),CD3 ECD(批号:112),HLA-DR PE-Cy5(批号:35),CD25 PE(批号:36),CD69 PE-Cy5(批号:42),CD4 FITC(批号:43),CD25 PE-Cy5(批号:52),CD127 PE(批号:42);OptiLyseC(批号:48);鞘液(批号:2711126A);清洗液(批号:2607125A);所有试剂均购自美国贝克曼库尔特公司。

### 1.3 方法

1.3.1 标本采集:用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K<sub>2</sub>)抗凝管采集研究对象的空腹外周静脉血 2 ml,在采集后 6 h 内处理。

1.3.2 实验步骤:将单克隆抗体按标准用量加入到 50  $\mu$ l 全血中与 T 淋巴细胞表面上相应抗原结合,经过溶血、洗涤等步骤后上机检测,获取淋巴细胞数为 1 万个。

1.3.3 结果分析:通过 CD45/SSC 散点图来圈取淋巴细胞并设门分析门内 T 淋巴细胞群:T 淋巴细胞(CD3<sup>+</sup>)、辅助 T 淋巴细胞(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>)、抑制 T 淋巴细胞(CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)各占淋巴细胞百分比;辅助 T 淋巴细胞/抑制 T 淋巴细胞(Th/Ts);CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 淋巴细胞、CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 淋巴细胞、CD3 + HLA-DR<sup>+</sup>T 淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>T 淋巴细胞各占 T 淋巴细胞百分比;Tregs(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127low/-T 淋巴细胞)占 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞百分比。

1.4 统计学分析 所有数据均用 SPSS23.0 软件进行统计学处理,计量资料采用均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组均数的比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),当满足方差齐性时组间两两比较采用 LSD 检验,不满足方差齐性时组间两两比较采用 Dunnett's T3 检验。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 健康对照组、良性肿瘤组和恶性肿瘤组的结果比较 见表 1,图 1。与健康对照组比较,乳腺肿瘤患者外周血的 CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 淋巴细胞、CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>T 淋巴细胞和 CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>T 淋巴细胞均明显上升,且恶性肿瘤患者较良性肿瘤患者升高更显著。此外,恶性肿瘤患者外周血中 Tregs 较良性肿瘤患者以及健康对照组均升高,恶性肿瘤患者的 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞较良性肿瘤患者升高显著,以上差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1

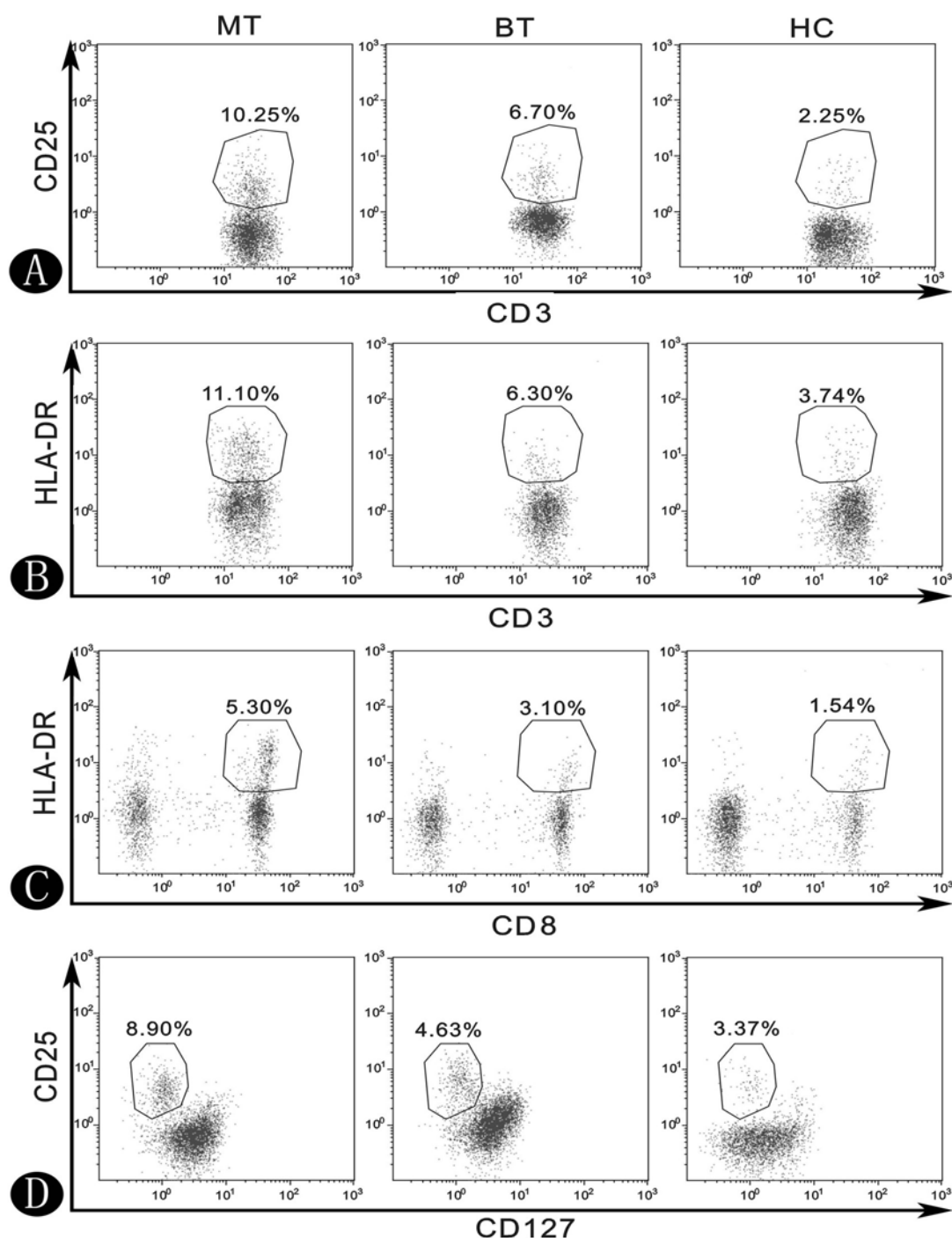
健康对照组、良性肿瘤组和恶性肿瘤组的结果比较( $\bar{x} \pm s, \%$ )

项 目	NC( $n=50$ )	BT( $n=106$ )	MT( $n=139$ )	F	P
年龄(岁)	35.13 $\pm$ 8.26	38.08 $\pm$ 1.14	47.93 $\pm$ 1.02	2.151	0.075
T 淋巴细胞	69.04 $\pm$ 1.13	69.55 $\pm$ 7.40	68.02 $\pm$ 1.02	2.981	0.152
CD4 <sup>+</sup> T 淋巴细胞	36.57 $\pm$ 5.43	37.93 $\pm$ 7.04	39.99 $\pm$ 8.23 <sup>Δ</sup>	0.837	0.434
CD8 <sup>+</sup> T 淋巴细胞	26.62 $\pm$ 8.20	25.62 $\pm$ 7.00	24.42 $\pm$ 7.80	1.982	0.251
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	1.50 $\pm$ 0.49	1.62 $\pm$ 0.61	1.85 $\pm$ 0.81	0.102	0.352
CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T 淋巴细胞	2.28 $\pm$ 0.67	7.22 $\pm$ 6.04 <sup>#</sup>	8.63 $\pm$ 6.09 <sup>*Δ</sup>	8.367	0.000
CD3 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> T 淋巴细胞	2.05 $\pm$ 0.74	2.34 $\pm$ 1.82	2.15 $\pm$ 1.57	0.500	0.607
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> T 淋巴细胞	3.71 $\pm$ 1.48	6.02 $\pm$ 4.32 <sup>#</sup>	7.66 $\pm$ 5.43 <sup>*Δ</sup>	6.557	0.002
CD8 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> T 淋巴细胞	1.67 $\pm$ 0.94	3.34 $\pm$ 3.09 <sup>#</sup>	4.14 $\pm$ 3.14 <sup>*Δ</sup>	5.530	0.004
Tregs	3.65 $\pm$ 1.54	4.54 $\pm$ 1.93	5.16 $\pm$ 2.07 <sup>*Δ</sup>	5.705	0.004

注:HC:健康对照组;BT:良性乳腺肿瘤组;MT:恶性乳腺肿瘤组。<sup>#</sup>:健康对照组与良性乳腺肿瘤组, $P < 0.05$ ;\*:健康对照组和恶性乳腺肿瘤组, $P < 0.05$ ;<sup>Δ</sup>:良性乳腺肿瘤组与恶性乳腺肿瘤组, $P < 0.05$ 。

2.2 恶性乳腺肿瘤 TNM 分期 T 细胞活化分子结果 恶性乳腺肿瘤 TNM 分期之间的 T 淋巴细胞活化分子结果差异无统计学意义( $F=0.359 \sim 1.242, P > 0.05$ )。

2.3 恶性乳腺肿瘤淋巴结有无转移之间 T 淋巴细胞活化分子结果比较 淋巴结无转移组和淋巴结转移组之间的 T 淋巴细胞活化分子结果差异无统计学意义( $F=0.143 \sim 2.561, P > 0.05$ )。



(A). CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 淋巴细胞%; (B). CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> T 淋巴细胞%; (C). CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> T 淋巴细胞%; (D). Tregs。

图1 HC组、BT组和MT组CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T淋巴细胞百分率比较

3 讨论 近年来的研究表明<sup>[8]</sup>肿瘤的发生、发展、转移与机体免疫监视有关,活化后的T淋巴细胞发挥重要的免疫监视作用。T淋巴细胞在不同活化阶段会表达不同的活化分子,CD69分子是T淋巴细胞被激活后通过T淋巴细胞受体(TCR)信号通路活化的一个最早表达于T淋巴细胞表面的活化标记,而在T淋巴细胞静息状态时呈低表达。CD25分子是白细胞介素2受体的 $\alpha$ 链,是T淋巴细胞中期活化的表面标记<sup>[9]</sup>。HLA-DR抗原是

MHC-II类抗原中表达最频繁的一种,是重要的免疫反应参与者,在抗原递呈和胸腺选择中起作用,属于晚期激活抗原<sup>[10]</sup>。

本研究结果显示,与健康对照组比较,乳腺肿瘤患者的CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>T淋巴细胞和CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>T淋巴细胞表达量均明显上升,而CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T淋巴细胞表达量无明显变化。有研究发现早期阶段的乳腺癌患者中CD69会有明显表达<sup>[11]</sup>,不同肿瘤患者外周

血 T 淋巴细胞的 CD25 表达水平均较高<sup>[2,10]</sup>,本文结果与文献报道一致,且恶性肿瘤患者较良性肿瘤患者升高更显著,表明恶性肿瘤患者机体正处于正性免疫状态,此时的 T 淋巴细胞处于活化状态中后期,因而早期活化标记 CD69 表达量无明显变化。CD25 的表达有利于肿瘤逃避免疫监视,形成免疫耐受,CD69 和 HLA-DR 则在对抗肿瘤的发展和转移中起到协调作用。推测可能是由于乳腺癌对机体的免疫状态起到正性刺激作用,但肿瘤负荷和机体免疫状态之间是否具有可检测的比例关系,且这种正性免疫状态可持续多长时间,发生机制及临床意义值得进一步研究。

调节性 T 细胞是一群可通过抑制其它免疫效应细胞的激活和增殖的免疫负调控 T 细胞亚群,Tregs 形成的免疫无能和免疫抑制两大功能使肿瘤逃离机体的抗肿瘤免疫<sup>[3,10]</sup>。明亚芳等<sup>[12]</sup>人研究发现,Tregs 可以作为区分良恶性肿瘤生物学行为有参考价值的标志。本研究结果表明,恶性肿瘤患者较健康对照者和良性肿瘤患者 Tregs 显著升高,与文献报道<sup>[3,9,10]</sup>结果相符。随着肿瘤的恶化程度,机体的免疫功能逐渐紊乱,Tregs 也相应升高。但有文献报道<sup>[13]</sup>,在肿瘤患者中Ⅲ~Ⅳ期比Ⅰ~Ⅱ期,病理低分化比病理高分化,淋巴结有转移比淋巴结无转移均有 Tregs 表达升高的情况。本研究中恶性肿瘤组的分期及淋巴结是否转移对 Tregs 均无统计学差异,可能与本研究仅以乳腺肿瘤为研究对象,而上述文献报道则以多种恶性肿瘤为研究对象有关。

综上所述,检测乳腺肿瘤患者外周血 T 淋巴细胞表面分子 CD25,HLA-DR,CD69 和 Tregs 的表达可以辅助临床病情判断和动态监测肿瘤发生发展,也可以更好地评估和分析机体免疫调节作用。

#### 参考文献:

- [1] Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis[J]. Lancet, 2011, 378(9801): 1461-1484.
- [2] Starska K, Glowacka E, Kulig A, et al. Prognostic value of the immunological phenomena and relationship with clinicopathological characteristics of the tumor-the expression of the early CD69<sup>+</sup>, CD71<sup>+</sup> and the late CD25<sup>+</sup>, CD26<sup>+</sup>, HLA/DR<sup>+</sup> activation markers on T CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes in squamous cell laryngeal carcinoma Part II [J]. Folia Histochemica et Cytopathologica, 2011, 49(4): 593-603.
- [3] Ostapchuk YO, Perfilyeva YV, Kustova EA, et al. Functional heterogeneity of circulating T regulatory cell subsets in breast cancer patients [J]. Breast Cancer, 2018(4): 1-11.
- [4] 张丹, 李明慧, 屈晓晶, 等. HBV 不同感染状态患者 CD4<sup>+</sup> T 细胞功能的差异研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2016, 30(2): 185-188.  
Zhang D, Li MH, Qu XJ, et al. CD4<sup>+</sup> T cell function of the patients in different states of HBV infection[J]. Chinese J Exp Clin Virol, 2016, 30(2): 185-188.
- [5] 梁艳, 王皓, 仲人前. T 淋巴细胞和 NK 细胞在慢性乙型肝炎病毒感染中的作用[J]. 检验医学, 2014, 29(1): 4-9.  
Liang Y, Wang H, Zhong RQ. The roles of T lymphocytes and natural killer cells in chronic infection of hepatitis B virus [J]. Laboratory Medicine, 2014, 29(1): 4-9.
- [6] 陈霖, 刘佳, 卞成蓉, 等. 慢性丙型肝炎患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞与病毒载量和肝功能损害的相关性研究[J]. 军事医学, 2015, 39(8): 649-651.  
Chen L, Liu J, Bian CR, et al. Relationship between peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and viral load and liver function impairment in patients with chronic hepatitis [J]. Mil Med Sci, 2015, 39(8): 649-651.
- [7] Amin MB, Edge S, Greene F, et al. AJCC cancer staging manual [M]. American: Springer International Publishing, 2017: 852-867.
- [8] Poschke I, De Boniface J, Mao Y, et al. Tumor-induced changes in the phenotype of blood-derived and tumor-associated T cells of early stage breast cancer patients [J]. Int J Cancer, 2012, 131(7): 1611-1620.
- [9] Starska K, Glowacka E, Kulig A, et al. The role of tumor cells in the modification of T lymphocytes activity-the expression of the early CD69<sup>+</sup>, CD71<sup>+</sup> and the late CD25<sup>+</sup>, CD26<sup>+</sup>, HLA/DR<sup>+</sup> activation markers on T CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in squamous cell laryngeal carcinoma. Part I [J]. Folia Histochemica Et Cytopathologica, 2011, 49(4): 579-592.
- [10] 王祥安. 结直肠癌围手术期患者外周血中 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞表面 CD25, CD69, HLA-DR 的表达及意义 [D]. 南昌: 南昌大学, 2016.  
Wang XA. Expression and significance of CD25, CD69 and HLA-DR on the CD4<sup>+</sup> T lymphocytes surface in peripheral circulation during perioperative period of colorectal cancer [D]. Nanchang: Nanchang University, 2016.
- [11] Mandó P, Rizzo M, Roberti MP, et al. High neutrophil to lymphocyte ratio and decreased CD69<sup>+</sup> NK cells represent a phenotype of high risk in early-stage breast cancer patients [J]. Onco Targets Ther, 2018(11): 2901-2910.

(上接 34 页)

- [12] 明亚芳,杨伟明,姚新生,等.  $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{dim/-}$  Tregs 细胞在乳腺癌患者外周血中表达及意义[J]. 中国妇幼保健,2015,30(33):5882-5885.  
Ming YF, Yang WM, Yao XS, et al. Expression and significance of  $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{dim/-}$  Treg cells in peripheral blood of breast cancer patients[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2015, 30(33): 5882-5885.
- [13] 姜艳丽,刘磊,王雪野,等. 外周血  $CD4^{+}CD25^{+}$

$CD127^{low}$  调节性 T 细胞在恶性肿瘤患者免疫功能评估中的作用[J]. 中国实验诊断学,2015,19(7): 1117-1120.

Jiang YL, Liu L, Wang XY, et al. Expression levels of  $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{low}$  regulatory T-cell characterize different populations in human peripheral blood with Cancer[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2015, 19(7): 1117-1120.

收稿日期:2018-07-14

修回日期:2018-08-16