

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.21.006

网络首发 [https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20200608.1422.010.html\(2020-06-08\)](https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20200608.1422.010.html(2020-06-08))胃癌患者外周血 CD8⁺PD-1⁺T 细胞的表型、功能及临床意义*沈洋^{1,2}, 彭六生¹, 邹全明¹, 赵永亮³, 马代远^{2△}

(1. 陆军军医大学药学与检验医学系微生物与生化药学教研室, 重庆 400038;

2. 川北医学院附属医院肿瘤科, 四川南充 637000; 3. 陆军军医大学第一附属医院普外科, 重庆 400038)

[摘要] **目的** 探讨 CD8⁺程序性细胞死亡受体 1(PD-1)⁺T 细胞在胃癌患者外周血中的表型、功能及其与临床分期的相关性。**方法** 收集 2019 年 7 月至 2020 年 1 月陆军军医大学第一附属医院普外科 31 例胃癌患者的外周血, 采用流式细胞术检测 CD8⁺PD-1⁺T 细胞的比例及其免疫学表型和功能, 分析 CD8⁺PD-1⁺T 细胞的比例与胃癌患者临床分期的相关性, 另选 31 例体检健康者外周血作为对照组。**结果** 与对照组比较, 胃癌患者外周血中 CD8⁺PD-1⁺T 细胞的比例明显增加, 差异有统计学意义(7.39% vs. 14.67%, $P < 0.01$); 与胃癌患者自身外周血中 CD8⁺PD-1⁻T 细胞比较, CD8⁺PD-1⁺T 细胞主要属于中心/效应记忆型细胞(CD45RA⁻CD27^{+/-}), 且低表达效应性细胞因子干扰素- γ (INF- γ)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 二者比较差异有统计学意义(42.24% vs. 35.64% 和 28.92% vs. 22.45%, $P < 0.01$); 与早期胃癌患者比较, 晚期胃癌患者外周血中的 CD8⁺PD-1⁺T 细胞比例明显增加(11.77% vs. 17.05%, $P < 0.01$)。**结论** 外周血中 CD8⁺PD-1⁺T 细胞应答与胃癌分期密切相关。

[关键词] 胃肿瘤; 程序性细胞死亡受体 1; CD8⁺T 细胞; 疾病进展; 肿瘤床分期**[中图分类号]** R735.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)21-3531-05Phenotype, function and clinical significance of peripheral blood CD8⁺PD-1⁺T cells in patients with gastric cancer*SHEN Yang^{1,2}, PENG Liusheng¹, ZOU Quanming¹, ZHAO Yongliang³, MA Daiyuan^{2△}

(1. Teaching and Researching Section of Microbiology and Biochemical Pharmacy, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Military Medical University, Chongqing 400038, China;

2. Department of Oncology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical

College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 3. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Army Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To explore the phenotype, function of peripheral blood CD8⁺PD-1⁺T cells in the patients with gastric cancer (GC) and their correlation with the clinical stage. **Methods** The peripheral blood of 31 patients with GC in the general surgery department of the First Affiliated Hospital of Army Military Medical University from July 2019 to January 2020 was collected. The proportion, immunological phenotype and function of CD8⁺PD-1⁺T cells were analyzed by adopting the flow cytometry. The correlation between the proportion of CD8⁺PD-1⁺T cells and the clinical stage in the patients with GC was analyzed. The peripheral blood from 31 subjects undergoing physical examination was selected as the control group. **Results** Compared with the control group, the proportion of peripheral blood CD8⁺PD-1⁺T cells in the patients with GC was significantly increased, and the difference was statistically significant (7.39% vs. 14.67%, $P < 0.01$); compared with peripheral blood CD8⁺PD-1⁺T cells in the patients with GC, the CD8⁺PD-1⁺T cells mainly belonged to central/effector memory cells (CD45RA⁻CD27^{+/-}), but showed the low expression of effector cytokine INF- γ and TNF- α (42.24% vs. 35.64% and 28.92% vs. 22.45%, $P < 0.01$); compared with the early gastric cancer patients, the proportion of CD8⁺PD-1⁺T cells in the patients with advanced stage of gastric cancer was significantly increased (11.77% vs. 17.05%, $P < 0.01$). **Conclusion** The response of peripheral

* 基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81502457)。

作者简介: 沈洋(1988—), 硕士生, 主要从事消化系统肿瘤的研究。△ 通信

作者, E-mail: mdylx@163.com。

blood CD8⁺PD-1⁺ T cells is closely related to GC stage.

[Key words] stomach neoplasms; programmed cell death 1 receptor; CD8⁺ T cells; disease progression; neoplasm staging

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率均位居前列,严重威胁着我国人民的健康^[1-2]。胃癌的病因复杂,具体的发病机制尚未完全阐明。有研究显示,基因、环境、免疫等多种因素共同参与胃癌的进程^[3],其中免疫因素,特别是 CD8⁺ T 细胞介导的抗肿瘤功能失调是导致胃癌发生、发展的关键^[4]。近年来,研究发现 CD8⁺ T 细胞抗肿瘤功能的失调与程序性细胞死亡受体 1(PD-1)过表达密切相关^[5]。目前,PD-1 已被公认为是 CD8⁺ T 细胞抗肿瘤功能失调的标志物,临床已有多个靶向 PD-1 的单克隆抗体用于肿瘤患者的治疗并取得了良好的疗效^[6]。在胃癌中,已有文献报道 CD8⁺PD-1⁺ T 细胞在肿瘤组织中的浸润明显增加,且其增加的水平与患者的疾病进展成正相关^[7]。然而,这群细胞在胃癌患者外周血中介导的系统性免疫应答及其功能调控仍不清楚。因此,为了阐明 CD8⁺PD-1⁺ T 细胞在胃癌患者外周血中的应答特征及其临床意义,本研究拟通过收集胃癌患者的外周血,分析 CD8⁺PD-1⁺ T 细胞的应答水平、免疫表型及功能,并评价其与患者疾病进展的关系。

1 资料和方法

1.1 一般资料

收集陆军军医大学第一附属医院普外科 2019 年 7 月到 2020 年 1 月经病理组织学确认、临床资料保存完整的 31 例术前未经药物或其他方法治疗的胃癌患者外周血(胃癌组),入组的患者根据国际抗癌联盟第 8 版恶性肿瘤 TNM 分期标准进行分组,其中 I~II 期 14 例,III~IV 期 17 例;男 21 例,女 10 例;年龄 28~71 岁,平均 54.30 岁;同时收集 31 例体检健康者的外周血作为对照组,男 20 例,女 11 例;年龄 25~70 岁,平均 52.10 岁。两组受试者均对研究方案知情同意,且性别、年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$),本研究遵循的程序符合伦理学标准并经陆军军医大学伦理委员会审批批准。根据肿瘤的 TNM 分期,将胃癌患者分为早期(I+II 期)和晚期(III+IV 期)两组,并比较早、晚期及不同性别、年龄(<55、>55 岁)胃癌患者 CD8⁺PD-1⁺ T 细胞的水平。

1.2 方法

1.2.1 检测试剂及仪器

(1)试剂:抗原递呈细胞(APC)-Cy7 标记的抗人 CD3 抗体、高尔基体蛋白转运抑制剂(Golgistop)和细胞固定通透剂购自美国 BD 公司,PerCP/Cy5.5 标记的抗人 CD8 抗体、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗人 CD45RA 抗体、APC 标记的抗人 PD-1 抗体、藻红蛋白(PE)-E-Cy7 标记的抗人 CD27 抗体、PE 标记的抗人肿瘤坏死因子 α(TNF-α)抗体、FITC 标记的抗人干扰素-γ(IFN-γ)抗体均购自美国 Biologend 公司,0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)、RPMI 1640 培养

基和胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,淋巴细胞刺激剂氟波醇乙酯(PMA)和离子霉素购自美国 Abcam 公司。(2)仪器:FACS Canto II 流式细胞仪购自美国 BD 公司、HF240 恒温培养箱、生物安全柜均购自力康生物。

1.2.2 细胞刺激

采集两组对象的外周血 2 mL 到肝素抗凝管中并尽快运回实验室,其中,1 mL 全血细胞直接用于流式细胞染色分析;1 mL 全血细胞进行体外刺激,细胞稀释与刺激参照 GODOY-RAMIREZ 等^[8]的方法进行:外周血按照 1:9 的体积比稀释至含 10%胎牛血清的 1640 培养基中,然后以每孔 1 mL 的体积加入至 24 孔细胞培养板,同时向培养孔中加入 PMA 300 ng、离子霉素 1 μg 和 Golgistop 0.7 μL 进行刺激活化,5 h 后,收集细胞进行流式细胞染色分析。

1.2.3 流式细胞术染色及检测

未刺激的全血细胞直接加入 APC-Cy7 标记的抗人 CD3 抗体、PerCP/Cy5.5 标记的抗人 CD8 抗体、FITC 标记的抗人 CD45RA 抗体、APC 标记的抗人 PD-1 抗体、PE-Cy7 标记的抗人 CD27 抗体避光染色 30 min, PBS 洗涤后利用 BD 流式细胞仪进行检测,然后分析每个个体 CD8⁺PD-1⁺ T 细胞占 CD3⁺CD8⁺ T 细胞的比例,同时将 CD8⁺ T 细胞被分为 PD-1⁺ 和 PD-1⁻ 两个细胞群,并进一步分析这两群细胞表达 CD45RA 和 CD27 的情况;刺激的全血细胞加入 APC-Cy7 标记的抗人 CD3 抗体、PerCP/Cy5.5 标记的抗人 CD8 抗体和 APC 标记的抗人 PD-1 抗体避光染色 30 min,经 PBS 清洗 2 次后加入固定通透剂孵育 20 min,离心后加入 PE 标记的抗人 TNF-α 抗体和 FITC 标记的抗人 IFN-γ 抗体继续染色 30 min,经 PBS 洗涤后,利用 BD 流式细胞仪进行检测,然后用 Flowjo 分析软件对数据进行分析。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 5 软件进行数据处理和统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组对象外周血中 CD8⁺PD-1⁺ T 细胞比较

流式细胞染色检测结果显示,胃癌患者外周血中 CD8⁺PD-1⁺ T 细胞的比例明显高于对照组,两组比较差异有统计学意义(14.67% vs. 7.39%, $P<0.01$),见图 1。

2.2 胃癌患者外周血 CD8⁺PD-1⁺ 与 CD8⁺PD-1⁻ T 细胞的表型分析

CD8⁺PD-1⁺ T 细胞主要属于中心/效应记忆型细胞(CD45RA⁻CD27^{+/-}),与 CD8⁺PD-1⁻ T 细胞比较,CD8⁺PD-1⁺ T 细胞中 CD45RA⁺CD27⁺亚群及 CD45RA⁺CD27⁻亚群的比例明显下降(6.92% vs.

2.82%、35.16 vs. 9.15%, $P < 0.05$), $CD45RA^-CD27^+$ 亚群的比例明显增加(8.81% vs. 34.16%, $P < 0.05$), 但 $CD8^+PD-1^-$ T 细胞与 $CD8^+PD-1^+$ T 细胞中 $CD45RA^-CD27^+$ 亚群的比例比较, 差异无统计学意义(51.45% vs. 55.28%, $P > 0.05$), 见图 2。

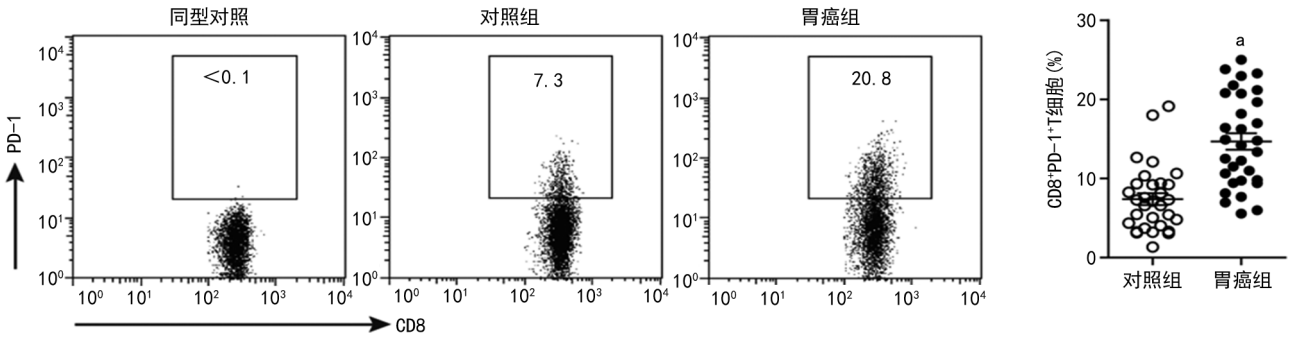
2.3 胃癌患者外周血 $CD8^+PD-1^+$ T 细胞中 IFN- γ 及 TNF- α 表达水平

流式细胞染色检测结果显示, $CD8^+PD-1^+$ T 细胞表达的 IFN- γ 水平明显低于 $CD8^+PD-1^-$ T 细胞(35.64% vs. 42.24%, $P < 0.01$); 与 $CD8^+PD-1^-$ T

细胞比较, 表达 TNF- α 的 $CD8^+PD-1^+$ T 细胞比例也明显下降, 二者比较差异有统计学意义(28.92% vs. 22.45%, $P < 0.01$), 见图 3。

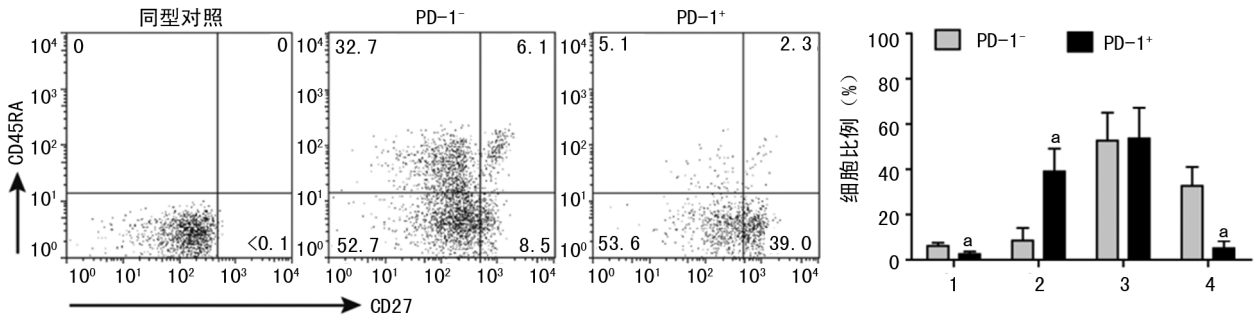
2.4 胃癌患者外周血 $CD8^+PD-1^+$ T 细胞与疾病进展的相关性分析

晚期胃癌患者外周血中 $CD8^+PD-1^+$ T 细胞比例明显高于早期患者(17.05% vs. 11.77%, $P < 0.01$); $CD8^+PD-1^+$ T 细胞水平在不同性别、年龄间比较, 差异无统计学意义(13.62% vs. 15.17%、13.86% vs. 15.42%, $P > 0.05$), 见图 4。



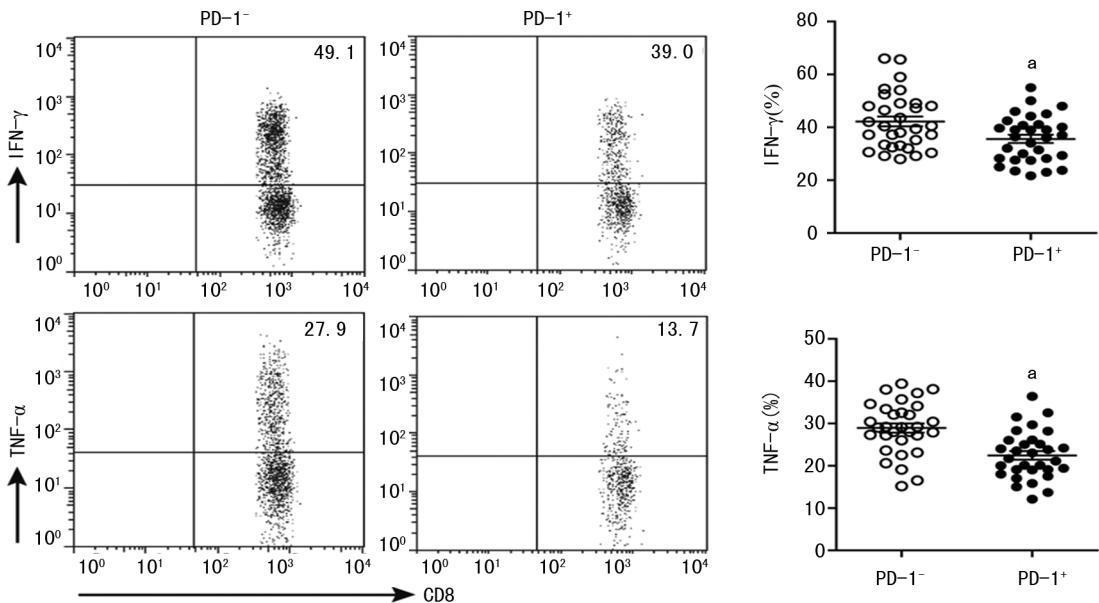
a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 1 两组对象外周血中 $CD8^+PD-1^+$ T 细胞水平比较



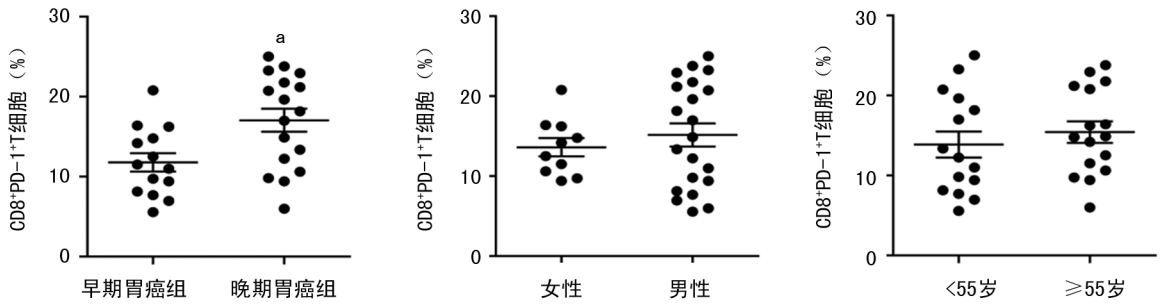
1: $CD45RA^+CD27^+$; 2: $CD45RA^-CD27^+$; 3: $CD45RA^-CD27^-$; 4: $CD45RA^+CD27^-$; a: $P < 0.05$, 与 $PD-1^-$ 细胞亚群比较。

图 2 胃癌患者外周血中 $CD8^+PD-1$ T 细胞表型分析



a: $P < 0.01$, 与 $PD-1^-$ 细胞亚群比较。

图 3 胃癌患者外周血 $CD8^+PD-1^+$ T 细胞中 IFN- γ 及 TNF- α 表达水平



^a: $P < 0.01$, 与早期胃癌组比较。

图 4 胃癌患者不同临床分期、性别及年龄间 $CD8^+PD-1^+$ T 细胞水平比较

3 讨论

胃癌是危害我国人民健康的重要杀手。据我国最新发布的《2019 年癌症报告》显示,胃癌的发病率和病死率均位居全国恶性肿瘤的第二位,并仍具有上升的趋势。尽管手术切除及放、化疗具有一定的疗效,但胃癌患者的整体生存率仍未得到有效改善。近年来随着对肿瘤患者免疫应答的深入研究,使得免疫疗法成为了继手术、放疗和化疗后的第四大抗肿瘤治疗方式^[9]。因此,深入探讨免疫细胞在胃癌发生、发展中的功能变化可为其临床免疫防治提供理论基础。

$CD8^+$ T 细胞是机体介导抵抗肿瘤发生、发展的一类关键免疫细胞,其在肿瘤微环境的浸润增加常预示患者对治疗具有良好的应答,同时存活时间也明显延长^[10-11]。然而,研究发现肿瘤浸润的 $CD8^+$ T 细胞抗肿瘤功能明显下降,而其表面免疫抑制性分子如 PD-1 等的表达却明显增加。目前,PD-1 已被公认为是 $CD8^+$ T 细胞功能衰竭的标志^[12-13]。近年来,文献报道 PD-1 在肿瘤患者的外周血 $CD8^+$ T 细胞表面过表达,并与患者的病理变化及临床疗效密切相关^[14-16]。本研究发现, $CD8^+PD-1^+$ T 细胞在胃癌患者外周中的比例明显增加,且晚期患者的 $CD8^+PD-1^+$ T 细胞水平高于早期胃癌患者,由此提示 PD-1 分子在胃癌患者外周血 $CD8^+$ T 细胞中的应答水平发生改变,并与患者疾病的进展密切相关。

T 细胞根据是否表达 CD45RA 和 CD27,可被分为 4 个免疫细胞亚群:初始型($CD45RA^+CD27^+$)、中心记忆型($CD45RA^-CD27^+$)、效应记忆型($CD45RA^-CD27^-$)和终末分化效应记忆型($CD45RA^+CD27^-$)^[17]。不同的细胞亚型代表的免疫学特征不同, $CD45RA^+CD27^+$ 对抗原刺激的敏感性较弱,而 $CD45RA^-CD27^-$ 和 $CD45RA^+CD27^-$ 则比 $CD45RA^-CD27^+$ 具有更快的产生效应因子的能力,但 $CD45RA^-CD27^+$ 比 $CD45RA^-CD27^-$ 具有更高的增殖能力^[18]。本研究发现,与 $CD8^+PD-1^-$ T 细胞相比, $CD8^+PD-1^+$ T 细胞中具有更多比例的 $CD45RA^-CD27^+$,而 $CD45RA^+CD27^+$ 和 $CD45RA^+CD27^-$ 的比例则相对较低,提示胃癌患者外周血中 $CD8^+PD-1^+$ T 细胞的增殖能力较强,但其产生效应因子的能

力较弱。最新文献报道胃肠道肿瘤患者的外周血 $CD8^+PD-1^+$ T 细胞可特异性识别肿瘤新生抗原,从而介导杀肿瘤功能^[19];LU 等^[20]在胃癌的研究中发现,阻断 PD-1 信号可明显增强外周血 $CD8^+$ T 的抗肿瘤效果,表明胃癌患者外周血 $CD8^+$ T 细胞的功能仍然受到 PD-1 信号的抑制。本研究的功能学分析已显示, $CD8^+PD-1^+$ T 细胞表达的 IFN- γ 和 TNF- α 水平明显低于 $CD8^+PD-1^-$ T 细胞,进一步证实胃癌患者外周血中 $CD8^+PD-1^+$ T 细胞产生效应因子的能力明显下降。

PD-1 作为免疫细胞功能负向调控的分子,已被证实与其相应的配体 PD-L1 结合后,可通过下游的免疫级联信号传递,抑制 $CD8^+$ T 细胞产生抗肿瘤功能因子 IFN- γ 和 TNF- α ^[21]。但 PD-1 在 $CD8^+$ T 细胞中的过表达机制尚未完全阐明。有研究报道,在体外培养的 $CD8^+$ T 细胞,经 T 细胞受体和共刺激分子活化后可上调 PD-1 的表达,而白细胞介素 2(IL-2)则可进一步诱导 PD-1 的增加^[22];而在肿瘤微环境或外周血中, $CD8^+$ T 细胞对 T 细胞受体的刺激常处于耐受状态,且 IL-2 的水平十分低下,提示在胃癌患者外周血中,很可能存在其他信号介导 PD-1 在 $CD8^+$ T 细胞中的表达,相关的调控机制还有待进一步研究探讨。

综上所述, $CD8^+PD-1^+$ T 细胞在胃癌患者外周血中的表型和功能发生明显改变,并与疾病的进展密切相关,进一步阐明外周调控 $CD8^+$ T 细胞过表达 PD-1 的信号及其介导胃癌患者抗肿瘤免疫抑制的应答机制,将为临床设计胃癌的免疫治疗方案提供新的实验证据。

参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] VAN CUTSEM E, SAGAERT X, TOPAL B, et

- al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2016, 388 (10060):2654-2664.
- [3] LYONS K, LE L C, PHAM Y T, et al. Gastric cancer: epidemiology, biology, and prevention: a mini review [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2019, 28 (5):397-412.
- [4] HE W, ZHANG H, HAN F, et al. CD155T/TIGIT Signaling regulates CD8⁺ T-cell metabolism and promotes tumor progression in human gastric cancer[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(22):6375-6388.
- [5] KURACHI M. CD8⁺ T cell exhaustion[J]. *Semin Immunopathol*, 2019, 41(3):327-337.
- [6] ZHANG H, CHEN J. Current status and future directions of cancer immunotherapy[J]. *J Cancer*, 2018, 9(10):1773-1781.
- [7] SAITO H, KURODA H, MATSUNAGA T, et al. Increased PD-1 expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells is involved in immune evasion in gastric cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2013, 107(5):517-522.
- [8] GODOY-RAMIREZ K, FRANCK K, MAHDAVI-FAR S, et al. Optimum culture conditions for specific and nonspecific activation of whole blood and PBMC for intracellular cytokine assessment by flow cytometry[J]. *J Immunol Methods*, 2004, 292 (1/2):1-15.
- [9] DE MIGUEL-LUKEN M J, MANSINHO A, BONI V, CALVO E. Immunotherapy-based combinations: current status and perspectives[J]. *Curr Opin Oncol*, 2017, 29(5):382-394.
- [10] HAMMERL D, MASSINK M P G, SMID M, et al. Clonality, antigen recognition and suppression of CD8⁺ T cells differentially affect prognosis of breast cancer subtypes[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(2):505-517.
- [11] LU J, XU Y, WU Y, et al. Tumor-infiltrating CD8⁺ T cells combined with tumor-associated CD68⁺ macrophages predict postoperative prognosis and adjuvant chemotherapy benefit in resected gastric cancer[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):920.
- [12] HE X, XU C. PD-1: A Driver or Passenger of T Cell Exhaustion[J]. *Mol Cell*, 2020, 77(5):930-931.
- [13] FARHOOD B, NAJAFI M, MORTEZAEI K. CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: a review[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6):8509-8521.
- [14] NOVÁK M, PROCHÁZKA V, TURCSÁNYI P, et al. Numbers of CD8⁺ PD-1⁺ and CD4⁺ PD-1⁺ cells in peripheral blood of patients with chronic lymphocytic leukemia are independent of binet stage and are significantly higher compared to healthy volunteers[J]. *Acta Haematol*, 2015, 134(4):208-214.
- [15] KIM J H, KIM S Y, SHIN E Y, et al. Expression patterns of programmed death-1 and programmed death-1 ligand-1 on T cells in gastric cancer[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(3):2661-2669.
- [16] KOTSAKIS A, KALLERGI G, AGGOURAKI D, et al. CD8⁺ PD-1⁺ T-cells and PD-L1⁺ circulating tumor cells in chemotherapy-naïve non-small cell lung cancer: towards their clinical relevance[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2019, 11:1758835919853193.
- [17] CALLENDER L A, CARROLL E C, BEAL R W J, et al. Human CD8⁺ EMRA T cells display a senescence-associated secretory phenotype regulated by p38 MAPK[J]. *Aging Cell*, 2018, 17(1):e12675.
- [18] HENSON S M, RIDDELL N E, AKBAR A N. Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression[J]. *Curr Opin Immunol*, 2012, 24(4):476-481.
- [19] GROS A, TRAN E, PARKHURST M R, et al. Recognition of human gastrointestinal cancer neoantigens by circulating PD-1⁺ lymphocytes [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(11):4992-5004.
- [20] LU X, YANG L, YAO D, et al. Tumor antigen-specific CD8⁺ T cells are negatively regulated by PD-1 and Tim-3 in human gastric cancer [J]. *Cell Immunol*, 2017, 313:43-51.
- [21] ANDREWS LP, YANO H, VIGNALI DAA. Inhibitory receptors and ligands beyond PD-1, PD-L1 and CTLA-4: breakthroughs or backups[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(11):1425-1434.
- [22] HASHIMOTO M, IM SJ, ARAKI K, et al. Cytokine-mediated regulation of CD8 T-cell responses during acute and chronic viral infection [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11 (1):a028464.