

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.10.022

腹腔镜结直肠癌根治患者手术前后外周血免疫细胞表达变化及其与短期预后的关系

余 强, 张大洪, 吕 权, 向 征[△]

重庆医科大学附属第一医院胃肠外科, 重庆 400016

摘要:目的 探讨结直肠癌患者腹腔镜根治性结直肠癌切除手术前后外周血中免疫细胞的变化,并进一步分析其与短期预后的关系。方法 选择 2021 年 3 月至 2022 年 3 月该院收治的 418 例结直肠癌患者纳入结直肠癌组,136 例门诊体检的健康志愿者纳入对照组,所有结直肠癌患者均接受腹腔镜根治性结直肠癌切除手术,术前和术后 1、3、5 d 采集患者外周静脉血,采用流式细胞仪检测外周血中 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞,并计算 CD4⁺/CD8⁺ 比值。术后随访至 2023 年 3 月 31 日,收集患者术后复发、转移和生存情况,将复发、转移定义为预后不良,无复发、转移定义为预后良好,分析预后不良组与预后良好组外周血免疫细胞的差异。结果 结直肠癌组术前外周血 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值明显低于对照组,CD8⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结直肠癌患者术后外周血 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值先降低再升高,CD8⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞先升高后降低,且术后 5 d 外周血 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值高于术后 1 d,差异有统计学意义($P < 0.05$),术后 5 d CD8⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞低于术后 1 d,差异有统计学意义($P < 0.05$)。所有患者随访 19(12~24)个月,随访期间复发 17 例,转移 65 例,预后不良组术后 5 d CD4⁺/CD8⁺ 比值低于预后良好组,CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞高于预后良好组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后 5 d 低 CD4⁺/CD8⁺ 比值、高 CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、高 CD19⁺ B 淋巴细胞结直肠癌患者无疾病进展生存率低于高 CD4⁺/CD8⁺ 比值、低 CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、低 CD19⁺ B 淋巴细胞结直肠癌患者($P < 0.05$)。Cox 回归分析结果显示 TNM 分期Ⅲ期、淋巴结转移、术后放疗、术后 5 d CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞升高、术后 5 d CD19⁺ B 淋巴细胞升高是结直肠癌患者预后不良的危险因素($P < 0.05$),术后 5 d CD4⁺/CD8⁺ 比值升高是结直肠癌患者预后不良保护因素($P < 0.05$)。结论 结直肠癌患者术后低 CD4⁺/CD8⁺ 比值、高 CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、高 CD19⁺ B 淋巴细胞与术后短期内不良预后有关,可作为结直肠癌术后预后评估的指标。

关键词:结直肠癌; 免疫细胞; 短期预后; T 淋巴细胞; B 淋巴细胞

中图法分类号:R735.3+5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)10-1455-07

Study on the relationship between changes of peripheral blood immune cell expression before and after operation and short-term prognosis in patients with laparoscopic radical resection for colorectal cancer

YU Qiang, ZHANG Dahong, LYU Quan, XIANG Zheng[△]

Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of immune cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer before and after laparoscopic radical resection of colorectal cancer and its relationship with short-term prognosis. **Methods** A total of 418 patients with colorectal cancer admitted to the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University from March 2021 to March 2022 were included in the colorectal cancer group, and 136 healthy volunteers in the outpatient department were included in the control group. All patients with colorectal cancer received laparoscopic radical resection of colorectal cancer. Venous blood was collected on preoperative, postoperative 1, 3, 5 d, and flow cytometry was used to detect CD3⁺ T lymphocytes, CD4⁺ T lymphocytes, CD8⁺ T lymphocytes, CD4⁺CD8⁺ double positive T lymphocytes and CD19⁺ B lymphocytes in peripheral blood, and CD4⁺/CD8⁺ ratio was calculated. The patients were followed up until March 31, 2023, and their status of postoperative recurrence, metastasis and survival were collected. The recurrence

and metastasis were defined as poor prognosis, no recurrence and metastasis were defined as good prognosis. The differences in peripheral blood immune cells between the poor prognosis group and the good prognosis group were analyzed. **Results** The ratios of CD3⁺ T lymphocytes, CD4⁺ T lymphocytes and CD4⁺/CD8⁺ pre-operative in peripheral blood of colorectal cancer group were lower than those of control group, CD8⁺ T lymphocytes, CD4⁺ CD8⁺ double positive T lymphocytes and CD19⁺ B lymphocytes were higher than those of control group, the differences were significant ($P<0.05$). The ratio of CD3⁺ T lymphocytes, CD4⁺ T lymphocytes and CD4⁺/CD8⁺ in peripheral blood of patients with colorectal cancer after surgery decreased first and then increased, while CD8⁺ T lymphocytes, CD4⁺ CD8⁺ double positive T lymphocytes and CD19⁺ B lymphocytes increased first then decreased. The CD3⁺ T lymphocytes, CD4⁺ T lymphocytes and CD4⁺/CD8⁺ ratio in peripheral blood 5 days after operation were higher than those 1 day after operation, the differences were statistically significant ($P<0.05$). CD8⁺ T lymphocytes, CD4⁺ CD8⁺ double positive T lymphocytes and CD19⁺ B lymphocytes on the 5 days after operation were lower than those on 1 d after operation ($P<0.05$). The duration follow-up was 19 (12—24) months, during which there were 17 cases of relapse, 65 cases of metastasis. The CD4⁺/CD8⁺ ratio at 5 days after operation in the poor prognosis group was lower than that in the good prognosis group ($P<0.05$), CD4⁺ CD8⁺ double positive T lymphocytes and CD19⁺ B lymphocytes were higher than those in the good prognosis group ($P<0.05$). The rates of progression-free survival in colorectal cancer patients with low CD4⁺/CD8⁺ ratio, high CD4⁺ CD8⁺ double-positive T lymphocytes and high CD19⁺ B lymphocytes at 5 days after operation were lower than those in colorectal cancer patients with high CD4⁺/CD8⁺ ratio, low CD4⁺ CD8⁺ double-positive T lymphocytes and low CD19⁺ B lymphocytes ($P<0.05$). Cox regression analysis showed that TNM stage III, lymph node metastasis, postoperative radiotherapy, high CD4⁺ CD8⁺ double positive T lymphocytes at 5 days after operation and high CD19⁺ B lymphocytes 5 days after operation were risk factors for poor prognosis in colorectal cancer patients ($P<0.05$), and high CD4⁺/CD8⁺ ratio at 5 days after operation was protective factor ($P<0.05$). **Conclusion** Low CD4⁺/CD8⁺ ratio, high CD4⁺ CD8⁺ double positive T lymphocytes and high CD19⁺ B lymphocytes associate with poor prognosis in the short term after surgery in patients with colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer; immune cell; short-term prognosis; T lymphocyte; B lymphocyte

结直肠癌是最常见的癌症之一,我国结直肠癌发病率在男性恶性肿瘤中排名第五,在女性恶性肿瘤中排名第四,病死率在男性恶性肿瘤和女性恶性肿瘤中均排名第五^[1],手术是早中期结直肠癌最常见的治疗方法,然而手术引起的应激反应可能破坏机体的免疫功能,增加癌细胞扩散和转移的可能性,影响结直肠癌手术患者的预后^[2-3]。先天免疫应答在肿瘤免疫微环境的形成和肿瘤发生、发展过程中起重要作用,T淋巴细胞是来源于骨髓的淋巴干细胞,分化、发育成熟后在免疫器官和组织中参与细胞免疫调控,T淋巴细胞耗竭可导致抗肿瘤作用减弱,与肿瘤进展有关^[4-5]。B淋巴细胞在抗原刺激下产生抗体,改变癌细胞上抗原靶点的功能,被树突状细胞呈递和交叉呈递肿瘤抗原,激活补体级联反应,或通过抗体依赖的细胞介导细胞毒性,从而增强自然杀伤细胞的肿瘤杀伤作用^[6-7]。本研究拟探讨结直肠癌患者手术前后外周血中免疫细胞表达变化,评估患者免疫反应状态,并分析免疫细胞表达与短期预后的关系,以期为临床治疗提供参考,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2021 年 3 月至 2022 年 3 月本院收治的 418 例结直肠癌患者纳入结直肠癌组。(1)

纳入标准:①病理证实为结直肠癌;②TNM 分期 I~Ⅲ期,进行腹腔镜根治性结直肠癌切除手术,具备手术指征;③年龄 18 岁以上。(2)排除标准:①合并其他部位恶性肿瘤;②合并类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病;③合并结核分枝杆菌、乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒感染;④既往接受过腹部手术;⑤术后并发器官损伤或胃肠道瘘,术中、术后出血,切口与腹腔感染。另选择同期于本院门诊体检的 136 例健康志愿者为对照组。结直肠癌组中男 236 例,女 182 例;年龄 37~87 岁,平均(62.94±11.55)岁;TNM 分期:Ⅰ期 102 例,Ⅱ期 193 例,Ⅲ期 123 例。分化程度:低度分化 102 例,中度分化 241 例,高度分化 75 例。对照组中男 89 例,女 47 例;年龄 40~89 岁,平均(61.02±12.47)岁。两组性别、年龄比较,差异无统计学意义($\chi^2=1.677, P>0.05; t=3.414, P>0.05$),具有可比性。本研究已经获得本院医学伦理委员会批准(伦理审批号:Z210219),患者及其家属均知情同意本研究,并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 外周血中免疫细胞表达检测 结直肠癌患者术前及术后 1、3、5 d,对照组仅体检日采集外周静脉血 3 mL 注入肝素抗凝试管混匀后,取 100 μ L 肝素抗

凝的全血,加入 10 μ L CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 淋巴细胞亚群单克隆抗体组合试剂(购自美国 Beckman Coulter 公司),混匀后避光孵育 30 min,加入 2 mL 氯化铵溶血 15 min,采用 DxFLiEX 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)检测 CD3⁺T 淋巴细胞、CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞,并计算 CD4⁺/CD8⁺ 比值。取 100 μ L 肝素抗凝全血,加入 CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PerCP 荧光单克隆抗体(天津旷博同生生物技术有限公司),采用 DxFLiEX 流式细胞仪检测 CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞。取 100 μ L 肝素抗凝的全血,加入 DETACHaBEAD[®]-CD19 抗体(美国 BD 公司)室温孵育 30 min,DxFLiEX 流式细胞仪检测 CD19⁺B 淋巴细胞。

1.2.2 随访 所有结直肠癌患者出院后定期接受电话随访和门诊复查,统计随访期间复发、转移和生存情况,随访截止日期 2023 年 3 月 31 日。以复发、转移为预后不良,无复发、转移为预后良好,将患者分为预后良好组和预后不良组。无疾病进展生存(PFS)时间定义为确诊至复发转移或各种原因出现死亡的时间。

1.3 统计学处理 采用 SPSS25.00 统计软件进行数据处理及统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。不同时间点比较采用重复测量方差分析,球形检验分析样本方差相等之间的一致性程度,符合球形检验可进行主成分分析或因子分析。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 Kaplan-Meier 生存曲

线和 Log-Rank 检验分析不同外周血淋巴细胞亚群表达结直肠癌患者生存差异。采用单因素及多因素 Cox 回归分析影响结直肠癌患者预后的因素。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 结直肠癌组术前与对照组外周血淋巴细胞亚群表达比较 结直肠癌组术前外周血 CD3⁺T 淋巴细胞、CD4⁺T 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值明显低于对照组,CD8⁺T 淋巴细胞、CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺B 淋巴细胞明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 结直肠癌患者术前及术后外周血淋巴细胞亚群变化情况 结直肠癌患者外周血 CD3⁺T 淋巴细胞、CD4⁺T 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值于术后 1 d 出现轻度降低后,在 3 d 和 5 d 逐渐升高;而 CD8⁺T 淋巴细胞、CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺B 淋巴细胞则在术后 1 d 升高后逐渐降低。不同时间点比较发现,术后 1 d 和 3 d 外周血 CD3⁺T 淋巴细胞、CD4⁺T 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值均低于术前,差异有统计学意义($P < 0.05$);术后 1 d 和 3 d,CD8⁺T 淋巴细胞、CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺B 淋巴细胞则高于术前,差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后 5 d 外周血 CD3⁺T 淋巴细胞、CD4⁺T 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值高于术后 1 d,差异有统计学意义($P < 0.05$),术后 5 d CD8⁺T 淋巴细胞、CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺B 淋巴细胞低于术后 1 d,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 结直肠癌组术前与对照组外周血淋巴细胞亚群表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺ T 淋巴 细胞(%)	CD4 ⁺ T 淋巴 细胞(%)	CD8 ⁺ T 淋巴 细胞(%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 比值	CD4 ⁺ CD8 ⁺ 双阳性 T 淋巴细胞(%)	CD19 ⁺ B 淋巴细胞(%)
结直肠癌组	418	55.69±5.18	24.66±3.17	28.06±1.53	0.88±0.12	2.14±0.39	14.07±3.12
对照组	136	63.05±6.59	29.35±4.18	26.12±2.43	1.12±0.27	1.85±0.31	10.02±2.42
<i>t</i>		-13.414	-13.175	10.964	-14.349	7.896	13.841
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 2 结直肠癌患者术前及术后外周血淋巴细胞亚群表达变化情况($\bar{x} \pm s$)

时间	CD3 ⁺ T 淋巴细胞(%)	CD4 ⁺ T 淋巴细胞(%)	CD8 ⁺ T 淋巴细胞(%)	CD4 ⁺ / CD8 ⁺ 比值	CD4 ⁺ CD8 ⁺ 双阳性 T 淋巴细胞(%)	CD19 ⁺ B 淋巴细胞(%)
术前	55.69±5.18 ^b	24.66±3.17 ^b	28.06±1.53 ^b	0.88±0.12 ^b	2.14±0.39 ^b	14.07±3.12 ^b
术后 1 d	55.02±4.06 ^a	24.02±3.06 ^a	28.65±1.35 ^a	0.84±0.11 ^a	2.26±0.42 ^a	15.32±3.06 ^a
术后 3 d	55.52±4.24 ^a	24.35±2.75 ^a	28.79±1.43 ^a	0.85±0.13 ^a	2.21±0.31 ^a	14.97±2.43 ^a
术后 5 d	59.02±6.37 ^{ab}	26.74±3.71 ^{ab}	28.15±1.67 ^{ab}	0.95±0.15 ^{ab}	1.93±0.25 ^{ab}	13.02±2.17 ^{ab}
<i>F</i>	21.035	15.326	9.352	13.671	16.859	18.492
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与术前比较,^a $P < 0.05$,与术后 1 d 比较,^b $P < 0.05$ 。

2.3 不同预后结直肠癌患者外周血淋巴细胞亚群表

达比较 所有患者的随访时间为 19(12~24)个月,随

访期间复发 17 例,转移 65 例。预后不良组与预后良好组外周血 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值、CD8⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺ CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞存在时间效应 ($P<0.05$); 两组外周血 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞不存在组间效应和交互效应 ($P>0.05$); 两组外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值、CD4⁺ CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞存在组间效应 ($P<0.05$); 两组外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值、CD4⁺ CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞存在交互效应 ($P<0.05$)。进一步对两组外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值、CD4⁺ CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、

CD19⁺ B 淋巴细胞进行单因素重复测量方差分析,结果显示,术前至术后 5 d 两组外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值呈先降低再升高的趋势 ($F=36.789, P<0.001$; $F=43.625, P<0.001$), CD4⁺ CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞呈先升高再降低趋势 ($F=41.583, P<0.001$; $F=35.271, P<0.001$), 多元方差分析结果显示, 术后 5 d 预后不良组外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值低于预后良好组 ($F=7.984, P<0.001$), 术后 5 d 预后不良组外周血 CD4⁺ CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞高于预后良好组 ($F=8.715, P<0.001$; $F=9.253, P<0.001$)。见表 3。

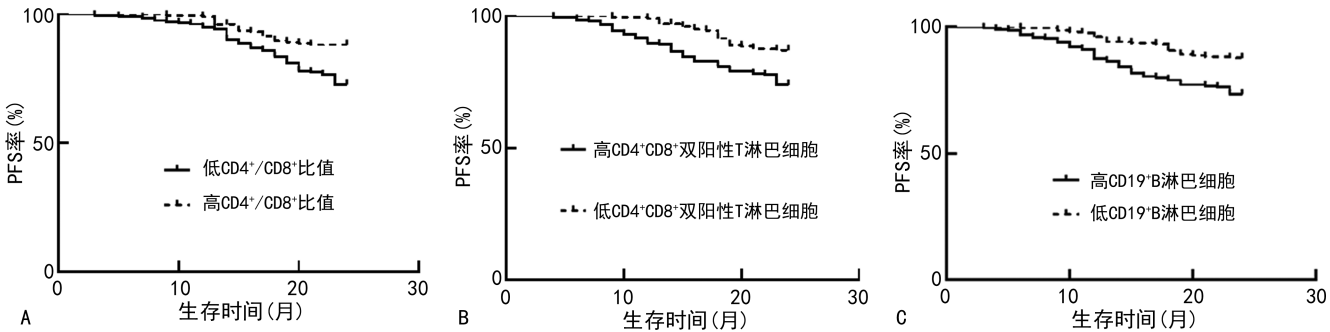
表 3 不同预后结直肠癌患者外周血淋巴细胞亚群表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	时间	CD3 ⁺ T 淋巴细胞(%)	CD4 ⁺ T 淋巴细胞(%)	CD8 ⁺ T 淋巴细胞(%)	CD4 ⁺ / CD8 ⁺ 比值	CD4 ⁺ CD8 ⁺ 双阳性 T 淋巴细胞(%)	CD19 ⁺ B 淋巴细胞(%)
预后不良组	82	术前	55.60±5.03 ^c	24.63±3.09 ^c	28.10±1.50 ^c	0.88±0.12 ^c	2.17±0.35 ^c	14.15±2.90 ^c
		术后 1 d	54.98±4.12 ^b	23.86±3.12 ^b	28.73±1.42 ^b	0.83±0.13 ^b	2.28±0.41 ^b	15.36±2.87 ^b
		术后 3 d	55.31±4.20 ^b	24.13±2.60 ^b	28.85±1.36 ^b	0.84±0.15 ^b	2.23±0.26 ^b	15.01±2.13 ^b
		术后 5 d	58.96±4.02 ^{bc}	26.35±2.83 ^{bc}	28.19±1.02 ^{bc}	0.93±0.06 ^{ac}	2.07±0.25 ^{abc}	14.05±1.21 ^{abc}
预后良好组	336	术前	55.71±4.98 ^c	24.67±3.12 ^c	28.05±1.46 ^c	0.88±0.10 ^c	2.13±0.32 ^c	14.05±3.06 ^c
		术后 1 d	55.03±4.03 ^b	24.05±2.86 ^b	28.63±1.27 ^b	0.84±0.12 ^b	2.26±0.39 ^b	15.31±2.98 ^b
		术后 3 d	55.57±3.91 ^b	24.20±2.73 ^b	28.78±1.47 ^b	0.84±0.14 ^b	2.21±0.27 ^b	14.96±2.26 ^b
		术后 5 d	59.03±4.19 ^{bc}	26.84±2.13 ^{bc}	28.14±1.35 ^{bc}	0.95±0.08 ^{bc}	1.90±0.21 ^{bc}	12.77±1.36 ^{bc}
球形检验	<i>HF</i> 系数		0.867 9	0.904 3	0.851 7	0.932 1	0.907 3	0.884 7
<i>F</i> _{组间} / <i>P</i> _{组间}			0.653/0.325	0.715/0.426	0.804/0.298	15.425/<0.001	21.052/<0.001	26.351/<0.001
<i>F</i> _{时间} / <i>P</i> _{时间}			3.023/0.023	4.172/0.018	2.955/0.037	9.824/<0.001	16.352/<0.001	19.382/<0.001
<i>F</i> _{交互} / <i>P</i> _{交互}			0.421/0.639	0.542/0.439	0.682/0.409	7.421/<0.001	11.427/<0.001	15.427/<0.001

注:与预后良好组相同时间点比较,^a $P<0.05$;与术前比较,^b $P<0.05$,与术后 1 d 比较,^c $P<0.05$ 。

2.4 不同外周血淋巴细胞亚群表达的结直肠癌患者的 Kaplan-Meier 生存曲线分析 通过生存曲线分析术后 5 d 淋巴细胞亚群表达与患者 PFS 率发现,术后 5 d 低 CD4⁺/CD8⁺ 比值 [<0.90 (均值),213 例] 结直肠癌患者 PFS 率低于高 CD4⁺/CD8⁺ 比值 (≥ 0.90 , 205 例) 患者,高 CD4⁺ CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞 ($\geq$

1.93%,215 例) 患者 PFS 率低于低 CD4⁺ CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞 [$<1.93\%$ (均值),203 例] 患者,高 CD19⁺ B 淋巴细胞 [$\geq 13.02\%$ (均值),214 例] 患者 PFS 率低于低 CD19⁺ B 淋巴细胞 ($<13.02\%$,204 例) 结直肠癌患者,差异有统计学意义(Log-Rank $\chi^2=15.010,12.130,13.980, P<0.05$)。见图 1。



注:A 为不同 CD4⁺/CD8⁺ 比值结直肠癌患者生存曲线;B 为不同 CD4⁺ CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞结直肠癌患者生存曲线;C 为不同 CD19⁺ B 淋巴细胞结直肠癌患者生存曲线。

图 1 术后 5 d 不同外周血淋巴细胞亚群表达的结直肠癌患者的 Kaplan-Meier 生存曲线

2.5 预后不良组与预后良好组各项临床资料比较

预后不良组肿瘤最大径 ≥ 4 cm、分化程度为低中分化、TNM 分期为Ⅲ期、有淋巴结转移、有术后放疗比

例高于预后良好组,差异有统计学意义($P<0.05$)。两组年龄、性别、组织学类型、ASA 分级、麻醉方式、术后化疗比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

表 4 预后不良组与预后良好组各项临床资料比较[$\bar{x}\pm s$ 或 $n(\%)$]

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	性别		组织学类型		肿瘤最大径	
			男	女	腺癌	黏液癌或其他	≥ 4 cm	< 4 cm
预后不良组	82	63.51 $\pm$ 10.54	51(62.20)	31(37.80)	59(71.95)	23(28.05)	49(59.76)	33(40.24)
预后良好组	336	62.80 $\pm$ 11.69	185(55.06)	151(44.94)	228(67.86)	108(32.14)	157(46.73)	179(53.27)
<i>t</i> / χ^2		0.502	1.365		0.513		4.477	
<i>P</i>		0.616	0.242		0.474		0.034	

组别	<i>n</i>	分化程度			TNM 分期			淋巴结转移	
		低	中	高	I 期	II 期	III 期	有	无
预后不良组	82	39(47.56)	31(37.80)	12(14.61)	4(4.88)	40(48.78)	38(46.34)	31(37.80)	51(62.20)
预后良好组	336	63(18.75)	210(62.50)	63(18.75)	98(29.17)	153(45.53)	85(25.30)	77(22.92)	259(77.08)
<i>t</i> / χ^2		30.016			26.005			7.625	
<i>P</i>		<0.001			<0.001			0.006	

组别	<i>n</i>	ASA 分级			麻醉方式			术后放疗		术后化疗	
		I 期	II 期	III 期	硬膜外麻醉	全身麻醉	硬膜外+全身麻醉	有	无	有	无
预后不良组	82	21(25.61)	32(39.02)	29(35.37)	21(25.61)	24(29.27)	37(45.12)	38(46.34)	44(53.66)	56(68.29)	26(31.71)
预后良好组	336	62(18.45)	168(50.00)	106(31.55)	101(30.06)	106(31.55)	129(38.39)	106(31.55)	230(68.45)	215(63.99)	121(36.01)
<i>t</i> / χ^2		3.658			1.075			7.080		0.536	
<i>P</i>		0.161			0.584			0.008		0.464	

2.6 影响结直肠癌患者预后的因素 单因素 Cox 回归排除 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞及 CD8⁺ T 淋巴细胞对直肠癌患者预后的影响。以结直肠癌患者预后为因变量(赋值:0=预后良好,1=复发转移),肿瘤最大径(赋值:0= < 4 cm,1= ≥ 4 cm)、TNM 分期(赋值:0=Ⅰ~Ⅱ期,1=Ⅲ期)、分化程度(赋值:0=高分化,1=低中分化)、淋巴结转移(赋值:0=无,1=有)、术后放疗(赋值:0=否,1=是)、术后 5 d CD4⁺/CD8⁺ 比值(原值输入)、术后 5 d CD4⁺CD8⁺

双阳性 T 淋巴细胞(原值输入)、术后 5 d CD19⁺ B 淋巴细胞为自变量(原值输入)构建多因素 Cox 回归方程,结果显示 TNM 分期Ⅲ期、淋巴结转移、术后放疗、术后 5 d CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞升高、术后 5 d CD19⁺ B 淋巴细胞升高是结直肠癌患者预后不良的危险因素($P<0.05$),术后 5 d CD4⁺/CD8⁺ 比值升高是结直肠癌患者预后不良的保护因素($P<0.05$)。见表 5。

表 5 影响结直肠癌患者预后的多因素 Cox 回归分析

因素	β	<i>SE</i>	<i>Wald</i> χ^2	<i>HR</i> (95% <i>CI</i>)	<i>P</i>
常量	9.352	3.584	6.808	—	—
TNM 分期	1.265	0.415	9.291	3.543(1.571~7.992)	<0.001
淋巴结转移	0.689	0.275	6.277	1.992(1.162~3.414)	<0.001
术后放疗	0.705	0.296	5.672	2.024(1.133~3.615)	0.001
术后 5 d CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 比值	-0.432	0.213	4.113	0.649(0.428~0.956)	0.013
术后 5 d CD4 ⁺ CD8 ⁺ 双阳性 T 淋巴细胞	0.639	0.272	5.519	1.895(1.112~3.228)	<0.001
术后 5 d CD19 ⁺ B 淋巴细胞	0.439	0.156	7.919	1.551(1.143~2.106)	<0.001

注:—为无数据。

3 讨 论

手术可引起交感肾上腺髓质和下丘脑-垂体-肾上

腺皮质轴兴奋,导致应激反应,应激反应中产生的糖皮质激素、儿茶酚胺、前列腺素 E₂ 等对免疫功能产生

不良影响,导致围术期免疫功能受到抑制。有研究表明,应激反应对免疫功能的抑制是由 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞功能的抑制引起,免疫抑制可能会对术后恢复和预后产生负面影响,与残留肿瘤细胞生长、肿瘤转移和不良预后有关^[8-9]。T 淋巴细胞、B 淋巴细胞均为体内抗肿瘤免疫反应的重要细胞,在恶性肿瘤中 T 淋巴细胞长期暴露于其同源抗原导致 T 淋巴细胞上抑制性受体表达升高,T 淋巴细胞进入功能障碍状态,表现为 T 淋巴细胞功能减弱,增殖分化受抑制,产生效应细胞因子减少^[10-11],B 淋巴细胞除通过抗原呈递和细胞因子生产等产生抗体外,在肿瘤微环境及抗肿瘤免疫应答中发挥重要作用,肿瘤浸润性 B 淋巴细胞补充 T 淋巴细胞介导的抗肿瘤免疫反应^[12-13]。因此,检测外周血中 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞表达可反映结直肠癌患者免疫状态,对预后分析可能有重要的意义。

本研究通过检测结直肠癌患者术前、术后外周血 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值发现,术后 1 d 外周血中 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值较术前降低,CD8⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞较术前升高,说明结直肠癌手术在一定程度上可能引起免疫抑制,这与手术创伤、术中血流动力学改变、麻醉药物使用等因素有关。CD3⁺ T 淋巴细胞是成熟的 T 淋巴细胞,通过与 T 细胞受体结合向 T 淋巴细胞内传递抗原信号,其表达降低提示 T 淋巴细胞缺乏,CD4⁺ T 淋巴细胞可分泌白细胞介素-2、白细胞介素-10 等细胞因子,激活并辅助 CD8⁺ T 淋巴细胞参与细胞免疫杀伤及清除肿瘤细胞,也可辅助 B 淋巴细胞参与体液免疫。CD8⁺ T 淋巴细胞是细胞毒性 T 淋巴细胞,与自然杀伤细胞构成机体抗肿瘤免疫的重要防线。CD4⁺/CD8⁺ 比值降低是免疫功能障碍的标志,与 T 淋巴细胞衰竭、全身性炎症反应和癌症发病风险增加相关^[14]。CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞来源于胸腺内未成熟的 T 淋巴细胞,成熟的 CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞在包括癌症、自身免疫性疾病、感染性疾病等在内的多种疾病中可检测到^[15]。有研究表明膀胱癌、前列腺癌和肾癌等泌尿系统癌症患者血液循环中 CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞也升高,并可促使 CD4⁺ T 淋巴细胞向辅助性 T 淋巴细胞(Th)2 极化,同时抑制 Th1 增殖,与肿瘤微环境形成、肿瘤细胞免疫逃逸有关^[16]。CD19⁺ B 淋巴细胞是 B 淋巴细胞表面糖蛋白和信号转导分子,参与调节 B 淋巴细胞发育、活化和增殖,CD19⁺ B 淋巴细胞升高常见于自身免疫性疾病和恶性肿瘤,现有研究表明寻常型银屑病和关节病型银屑病患者外周血中 CD19⁺ B 淋巴细胞升高,且与疾病活动度增加呈正相关^[17],前列腺癌患者外周血中 CD19⁺ B 淋巴细胞高于良性前列腺增生患者^[18]。本研究结果显示,结直肠癌患者术后 5 d CD3⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴

细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值高于术后 1 d,术后 5 d CD8⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞低于术后 1 d,分析原因为随着术后肿瘤的切除和机体功能的恢复,结直肠癌患者免疫抑制得以缓解,免疫功能逐渐恢复。

通过随访发现,预后不良患者术后 5 d CD4⁺/CD8⁺ 比值低于预后良好患者,术后 5 d CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞高于预后良好患者。生存曲线和 Cox 回归分析结果显示,低 CD4⁺/CD8⁺ 比值、高 CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、高 CD19⁺ B 淋巴细胞与结直肠癌患者低 PFS 率有关,表明 T 淋巴细胞免疫功能障碍,以及 CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞升高与结直肠癌患者术后短期预后不良有关。KLUGMAN 等^[19]报道 CD4⁺/CD8⁺ 比值降低与肺癌患者较低的生存率相关,LEE 等^[20]研究结果显示,CD4⁺/CD8⁺ 比值 ≥ 1.93 是肺癌患者 PFS 率提高的预测指标。CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞表达升高被认为是肾细胞癌患者总生存率低的独立预测因子^[21],以上结果均支持本研究结论,CD4⁺/CD8⁺ 比值、CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞可能作为结直肠癌短期预后的标志物。

综上所述,结直肠癌患者术后 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值短暂下降后逐渐升高,CD8⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞则先升高后降低。CD4⁺/CD8⁺ 比值、CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞与结直肠癌术后短期内复发转移有关,可作为结直肠癌术后预后评估的指标,对临床治疗及术后随访均有重要价值。

参考文献

- [1] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(7): 783-791.
- [2] DANG Y J, SHI X X, XU W, et al. The effect of anesthesia on the immune system in colorectal cancer patients [J]. Can J Gastroenterol Hepatol, 2018, 2018: 7940603.
- [3] 陈向文, 姜亚君, 于林冲, 等. 扶正解毒汤对结直肠癌术后化疗患者免疫功能及不良反应的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2022, 31(23): 3318-3321.
- [4] WU Y N, YUAN M, WANG C L, et al. T lymphocyte cell: a pivotal player in lung cancer [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1102778.
- [5] 韩孟奎, 李晋, 杨小华. 肝细胞癌肿瘤免疫微环境中 T 淋巴细胞的功能与调控机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(11): 2621-2626.
- [6] YUEN G J, DEMISSIE E, PILLAI S. B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship [J]. Trends Cancer, 2016, 2(12): 747-757.

hibiting NINJURIN 1 [J]. J Neuroinflammation, 2023, 20 (1):91.

[10] YAN W T, ZHAO W J, HU X M, et al. PANoptosis-like cell death in ischemia/reperfusion injury of retinal neurons[J]. Neural Regen Res, 2023, 18(2):357-363.

[11] 肖云兰, 冯霞. NLRP3/IL-1 β 通路在增殖性糖尿病视网膜病变中的作用机制[J]. 国际眼科杂志, 2019, 19(9):1559-1562.

[12] YANG W H, GEORGE A P, WANG C M, et al. Tumor suppressor p53 down-regulates programmed cell death protein 4 (PDCD4) Expression[J]. Curr Oncol, 2023, 30 (2):1614-1625.

[13] LI J B, XIE M R, DUAN M L, et al. Over-expression of programmed death-ligand 1 and programmed death-1 on antigen-presenting cells as a predictor of organ dysfunction and mortality during early sepsis: a prospective cohort study[J]. World J Emerg Med, 2023, 14(3):179-185.

[14] 王佳, 林雪容, 高恒波, 等. miR-21 靶向 CCL20 及 PDCD4 对脓毒症大鼠心肌中细胞凋亡及炎症反应的调节作用[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(4):389-394.

[15] 杨永强, 李娟, 钟海川, 等. 炎症性肠病患者肠黏膜组织中 miR-129 与 PDCD4 表达水平的关系及意义[J]. 国际消化病杂志, 2022, 42(4):231-236.

[16] 斯庆布日古德, 都日娜. 建立视网膜缺血再灌注损伤模型方法的选择[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(26):167-168.

[17] XU J, GUO Y Y, LIU Q, et al. Pregabalin mediates retinal ganglion cell survival from retinal ischemia/reperfusion injury via the Akt/GSK3 β / β -catenin signaling pathway[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2022, 63(12):7.

[18] XU J, LIU Q, MA M, et al. Involvement of moesin phosphorylation in ischemia/reperfusion induced inner blood-retinal barrier dysfunction[J]. Int J Ophthalmol, 2020, 13 (4):545-551.

[19] 孔慧, 崔彦. CD40-ATP-P2X7/NLRP3 炎症信号通路在糖尿病视网膜病变中的作用研究进展[J]. 眼科新进展, 2021, 41(9):879-882.

[20] LIU Z H, QU M, YU L L, et al. Artesunate inhibits renal ischemia-reperfusion-mediated remote lung inflammation through attenuating ros-induced activation of NLRP3 inflammasome[J]. Inflammation, 2018, 41(4):1546-1556.

[21] JIN J, XU G X, YU G H, et al. microRNA-21 could promote the apoptosis of retinal neurons by down-regulating PDCD4 in a rat model of diabetes mellitus[J]. Intern J Clin Experim Med, 2017, 10(4):6029-6041.

[22] YU Z Y, ZHUO Y H, ZHANG Y, et al. TNF- α stimulation enhances the neuroprotective effects of gingival MSCs derived exosomes in retinal ischemia-reperfusion injury via the MEG3/miR-21a-5p axis[J]. Biomaterials, 2022, 63(7):29-75.

(收稿日期:2023-12-14 修回日期:2024-02-08)

(上接第 1460 页)

[7] 胡格, 徐秀理, 王丹, 等. CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 、B 淋巴细胞与抑制/细胞毒性 T 细胞预测宫颈癌放疗患者放射性肠炎的价值[J]. 中国临床研究, 2022, 35(6):779-783.

[8] ZHENG L H, ZHAO J, ZHENG L K, et al. Effect of dexmedetomidine on perioperative stress response and immune function in patients with tumors [J]. Technol Cancer Res Treat, 2020, 19:1533033820977542.

[9] 陈素华, 马天江, 张国耀, 等. II ~ III 期结肠癌患者根治术后肿瘤转移的影响因素[J]. 实用癌症杂志, 2022, 37(4):650-652.

[10] THOMMEN D S, SCHUMACHER T N. T cell dysfunction in cancer[J]. Cancer Cell, 2018, 33(4):547-562.

[11] 翟素平, 张成辉, 马听炜. 肿瘤标志物及 T 淋巴细胞亚群在肺癌化疗患者中的变化及临床意义[J]. 癌症进展, 2021, 19(16):1678-1681.

[12] ENGELHARD V, CONEJO-GARCIA J R, AHMED R, et al. B cells and cancer[J]. Cancer Cell, 2021, 39(10):1293-1296.

[13] 李玥婷, 施鹏旭, 英子伟, 等. 自然杀伤细胞、CD19 $^{+}$ 对乳腺癌患者保乳手术治疗后复发预测价值研究[J]. 临床军医杂志, 2019, 47(3):250-252.

[14] CASTILHO J L, BIAN A H, JENKINS C A, et al. CD4/CD8 ratio and cancer risk among adults with HIV[J]. J Natl Cancer Inst, 2022, 114(6):854-862.

[15] OVERGAARD N H, JUNG J W, STEPTOE R J, et al. CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ double-positive T cells: more than just a developmental stage[J]. J Leukoc Biol, 2015, 97(1):31-38.

[16] BOHNER P, CHEVALIER M F, CESSON V, et al. Double positive CD4 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T cells are enriched in urological cancers and favor T helper-2 polarization[J]. Front Immunol, 2019, 10:622.

[17] LU J, DING Y, YI X, et al. CD19 $^{+}$ B cell subsets in the peripheral blood and skin lesions of psoriasis patients and their correlations with disease severity[J]. Braz J Med Biol Res, 2016, 49(9):e5374.

[18] ROYA N, FATEMEH T, FARAMARZ M A, et al. Frequency of IL-10+CD19 $^{+}$ B cells in patients with prostate cancer compared to patients with benign prostatic hyperplasia[J]. Afr Health Sci, 2020, 20(3):1264-1272.

[19] KLUGMAN M, FAZZARI M, XUE X, et al. The associations of CD4 count, CD4/CD8 ratio, and HIV viral load with survival from non-small cell lung cancer in persons living with HIV[J]. AIDS Care, 2022, 34(8):1014-1021.

[20] LEE P H, YANG T Y, CHEN K C, et al. Higher CD4/CD8 ratio of pleural effusion predicts better survival for lung cancer patients receiving immune checkpoint inhibitors[J]. Sci Rep, 2021, 11(1):9381.

[21] NISHIDA K, KAWASHIMA A, KANAZAWA T, et al. Clinical importance of the expression of CD4 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T cells in renal cell carcinoma[J]. Int Immunol, 2020, 32 (5):347-357.

(收稿日期:2023-10-16 修回日期:2024-01-29)