

· 论 著 ·

青年结直肠癌患者外周血 CD4⁺ CD29⁺ T 细胞水平及其临床意义

敖永曦, 张启洪, 伍时佐, 郑俏聪, 李丹, 吴盛, 许云朋, 谢小斌

阳江市人民医院肿瘤一科, 广东 阳江 529500

摘要: **目的** 探讨青年结直肠癌(CRC)患者外周血 CD4⁺ CD29⁺ T 细胞含量的变化及其临床意义。**方法** 收集 43 例青年 CRC (青年 CRC 组)及 132 例中老年 CRC (中老年 CRC 组)患者作为观察对象,以 65 例慢性结肠炎患者(慢性结肠炎组)及 73 例健康人(健康组)作为对照。采用双激光光源多色流式细胞仪检测外周血 CD4⁺ CD29⁺ T 细胞及其胞内细胞因子肿瘤坏死因子 α(TNF-α)及 γ 干扰素(IFN-γ)的相对百分含量;采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测外周血肿瘤标记物癌胚抗原(CEA)、糖链抗原 19-9(CA19-9)、血管内皮生长因子(VEGF)及转化生长因子 β1(TGF-β1)含量,观察不同分期青年 CRC 患者肿瘤标记物的差异,并分析 CD4⁺ CD29⁺ T 细胞及其胞内细胞因子与肿瘤标记物的相关性。**结果** 青年及中老年 CRC 患者 CD4⁺ CD29⁺ T 细胞及胞内 TNF-α 相对百分含量均显著高于慢性结肠炎组及健康组,且青年 CRC 组显著高于中老年组(P 均 < 0.05)。青年及中老年 CRC 患者胞内 IFN-γ 相对百分含量均显著低于慢性结肠炎组及健康组,且青年组显著低于中老年组(P 均 < 0.05)。I 期 CEA 及 CA19-9 含量显著低于 III 及 IV 期,且 IV 期显著高于 III 期,但 I 期与 II 期无显著差异(P 均 > 0.05); VEGF 及 TGF-β1 含量均表现为明显的梯度:IV $>$ III $>$ II $>$ I 期,且任意两组间的含量差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。CD4⁺ CD29⁺ T 细胞及 TNF-α 水平均与四项肿瘤标记物呈显著正相关,但 IFN-γ 水平与四项肿瘤标记物呈显著负相关($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论** CD4⁺ CD29⁺ T 细胞及胞内 TNF-α 升高、IFN-γ 降低,对 CRC 发病机制及患病年龄均具有一定的特异性,且三者与肿瘤标记物呈显著相关性,在鉴别中早期青年 CRC 具有重要的临床意义。

关键词: 结直肠癌; CD4⁺ CD29⁺ T 细胞; 肿瘤坏死因子 α; γ 干扰素; 癌胚抗原; 糖链抗原 19-9; 转化生长因子 β1; 血管内皮生长因子; 青年患者

中图分类号: R 735.3 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2016)07-0909-04

Level of peripheral blood CD4⁺ CD29⁺ T cells and its clinical significance for young patients with colorectal carcinoma

AO Yong-xi, ZHANG Qi-hong, WU Shi-zuo, ZHENG Qiao-cong,

Li Dan, WU Sheng, XU Yun-peng, XIE Xiao-e

Department 1 of oncology, Yangjiang People's Hospital, Yangjiang, Guangdong 529500, China

Abstract: Objective To investigate the change of CD4⁺ CD29⁺ T cells content of peripheral blood in young patients with colorectal carcinoma (CRC) and its clinical significance. **Methods** Forty-three young CRC patients (young CRC group) and 132 middle- and old-aged CRC patients (middle- and old-aged CRC group) were collected as research objects, and 65 chronic colitis patients (chronic colitis group) and 73 healthy subjects (health group) were served as control. Double laser light source multi-color flow cytometry was used to detect the relative percentage composition of peripheral blood CD4⁺ CD29⁺ T cells and their intracellular cytokines including tumor necrosis factor α(TNF-α) and interferon-γ(IFN-γ). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detected the contents of peripheral blood tumor markers including carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9), vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factorβ1(TGF-β1). The differences of tumor markers in young CRC patients with different stages were observed. The correlations of CD4⁺ CD29⁺ T cells and their intracellular cytokines with tumor markers was analyzed. **Results** The relative percentages composition of peripheral blood CD4⁺ CD29⁺ T cells and intracellular TNF-α in young CRC group and middle- and old-aged CRC group were all significantly higher than those in chronic colitis group and health group which in young CRC group were significantly higher than those in middle- and old-aged CRC group (all

$P < 0.05$), while the relative percentages composition of intracellular IFN- γ in young CRC group and middle- and old-aged CRC group were all significantly lower than those in chronic colitis group and health group which in young CRC group were significantly lower than those in middle- and old-aged CRC group (all $P < 0.05$). The contents of VEGF 及 TGF- β 1 showed a marked gradient (stages IV > III > II > I), and there were significant differences in contents between any two groups (all $P < 0.05$). The CD4⁺CD29⁺T cells and TNF- α levels were significantly positively correlated with four tumor markers, while IFN- γ level were significantly negatively correlated with four tumor markers ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion** The rising of CD4⁺CD29⁺T cells and intracellular TNF- α levels and the lowering of IFN- γ level have certain specificity for CRC pathogenesis and its age of illness, and they have association with tumor markers, so this has important clinical significance for the differentiation of middle- and young-CRC.

Key words: Colorectal cancer; CD4⁺CD29⁺T cells; Necrosis factor α ; Interferon- γ ; Carcinoembryonic antigen; Carbohydrate antigen 19-9; Transforming growth factor β 1; Vascular endothelial growth factor; Young patients

国内流行病学调查显示,中国结直肠癌(CRC)发病率及病死率均居第4位,仅次于肺癌、胃癌、肝癌^[1]。CRC发病中位年龄45~50岁,但近年来结直肠癌发病年龄呈现年轻化趋势,亦即青年CRC发病率增加,部分青年CRC首诊时已为中晚期,尤其是直肠癌患者,往往需要行造瘘术,对生活质量及心理状态造成严重影响^[2]。研究表明,作为 β 整合素的CD29分子,在肿瘤的血管形成及转移机制方面发挥重要作用^[3],且辅助性T细胞(Th)表达CD29分子的Th—CD4⁺CD29⁺T细胞在CRC中可能扮演重要角色^[4],但目前关于该方面的探讨不多,这对于深入研究CRC的免疫机制是不足的。为探索青年CRC患者的T细胞免疫特征及临床意义,笔者对CD4⁺CD29⁺T细胞及其细胞因子与肿瘤标记物的关系进行了研究。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2007年9月至2015年6月期间我院收治的175例CRC患者作为观察对象,排除继发性CRC、自身免疫性疾病、长期服用激素或免疫抑制剂者^[5],其中青年CRC 43例,中老年CRC 132例。青年CRC患者当中男性24,女性19例;年龄19~39(28.38 \pm 8.92)岁;病变位于直肠20例,结肠23例;造瘘者17例。中老年CRC患者当中男性81例,女性51例;年龄55~84(69.23 \pm 15.47)岁;病变位于直肠59例,结肠73例;造瘘者38例。以经肠镜及病理确诊为慢性结肠炎的65例患者(慢性结肠炎组)[男性37例,女性28例,年龄(39.27 \pm 13.56)岁]及73例健康人[男性41例,女性32例,年龄(41.61 \pm 14.27)岁]作为对照,慢性结肠炎组及健康组的性别、年龄差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 流式细胞术 清晨空腹采集静脉血5ml,使用免疫磁珠法分离出CD4⁺CD29⁺T细胞^[6]。使用固定穿透剂对胞内细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及

干扰素(IFN)- γ 进行染色,使用BD公司生产的双激光光源多色流式细胞仪,以CD4及CD29进行设门,进行CD4⁺CD29⁺T细胞、TNF- α 及IFN- γ 的荧光强度测定,均以占T淋巴细胞总数的相对百分含量表示。运用FACSDIVA软件对三者的百分含量进行分析^[7]。

1.3 肿瘤标记物 采用酶联免疫吸附(ELISA)法,对43例青年CRC患者外周血肿瘤标记物癌胚抗原(CEA)、糖链抗原19-9(CA19-9)、血管内皮生长因子(VEGF)及转化生长因子 β 1(TGF- β 1)^[8-10]进行检测。

1.4 统计学方法 使用统计软件包SPSS 17.0处理数据。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析及LSD法进行4组间的两两比较,指标间的相关性分析采用Pearson参数法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组间CD4⁺CD29⁺T细胞及其胞内细胞因子比较 4组间CD4⁺CD29⁺T细胞及TNF- α 、INF- γ 含量差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。与健康组比较,CRC患者表现为CD4⁺CD29⁺T细胞及TNF- α 相对百分含量升高,而IFN- γ 降低(P 均 < 0.05);但慢性结肠炎组患者CD4⁺CD29⁺T细胞、TNF- α 及IFN- γ 相对百分含量与健康组比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。青年及中老年CRC患者CD4⁺CD29⁺T细胞及TNF- α 相对百分含量均显著高于慢性结肠炎组,且青年CRC组显著高于中老年组(P 均 < 0.05);而青年及中老年CRC患者IFN- γ 均显著低于慢性结肠炎组,且青年组显著低于中老年组(P 均 < 0.05)。见表1。

2.2 肿瘤标记物 总体而言,不同分期青年CRC患者肿瘤标记物含量呈现较显著的梯度变化($P < 0.05, P < 0.01$)。CEA:I期显著低于III及IV期,且

IV 期显著高于 II 期及 III 期 (P 均 < 0.05), 但 I 期与 II 期无显著差异 ($P > 0.05$); CA19-9: I 期显著低于 III 及 IV 期, 且 IV 期显著高于 II 期及 III 期 (P 均 < 0.05), 但 I 期与 II 期及 III 期与 II 期差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。VEGF 及 TGF- β 1: 均表现为明显的梯度 (IV $>$ III $>$ II $>$ I), 且任意两组间的含量差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。见表 2。

2.3 相关性分析 CD4⁺CD29⁺T 细胞、TNF- α 均与四项肿瘤标记物呈显著正相关性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 而 IFN- γ 与四项肿瘤标记物呈显著负相关性 (P 均 < 0.05)。见表 3。

表 1 4 组间 CD4⁺CD29⁺T 细胞及其胞内细胞因子相对百分含量比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD4 ⁺ CD29 ⁺ T 细胞		
		TNF- α	IFN- γ	
青年 CRC 组	43	5.38 \pm 3.17 ^{abc}	4.16 \pm 2.78 ^{abc}	0.51 \pm 0.18 ^{abc}
中老年 CRC 组	132	4.02 \pm 2.65 ^{ab}	3.03 \pm 1.67 ^{ab}	1.04 \pm 0.33 ^{ab}
慢性结肠炎组	65	1.02 \pm 0.43	0.86 \pm 0.35	2.34 \pm 0.68
健康组	73	0.89 \pm 0.37	0.65 \pm 0.28	2.96 \pm 0.83
F 值		3.012	2.824	-2.317
P 值		0.013	0.019	0.032

注: 与健康组比较, ^a $P < 0.05$; 与慢性结肠炎组比较, ^b $P < 0.05$; 与中老年 CRC 组比较, ^c $P < 0.05$ 。

表 2 不同分期青年 CRC 患者肿瘤标记物含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

分期	例数	CEA (μ g/L)	CA19-9 (mU/L)	VEGF (ng/ml)	TGF- β 1 (ng/ml)
I 期	15	13.82 \pm 9.27	5.76 \pm 4.18	37.16 \pm 29.37	23.39 \pm 16.25
II 期	12	15.91 \pm 12.63	6.29 \pm 4.73	58.25 \pm 40.32 ^a	31.28 \pm 24.49 ^a
III 期	9	20.38 \pm 15.45 ^{ab}	8.13 \pm 6.92 ^a	79.50 \pm 53.57 ^{ab}	51.39 \pm 35.17 ^{ab}
IV 期	7	31.64 \pm 23.19 ^{abc}	10.37 \pm 8.33 ^{abc}	105.98 \pm 80.24 ^{abc}	64.95 \pm 50.29 ^{abc}
F 值		-7.123	-3.825	-15.394	-13.139
P 值		0.004	0.011	0.000	0.001

注: 与 I 期比较, ^a $P < 0.05$; 与 II 期比较, ^b $P < 0.05$; 与 III 期比较, ^c $P < 0.05$ 。

表 3 CD4⁺CD29⁺T 细胞、TNF- α 及 IFN- γ 与肿瘤标记物的相关性分析

指标	CD4 ⁺ CD29 ⁺ T 细胞		TNF- α		IFN- γ	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
CEA	0.814	0.006	0.792	0.011	-0.749	0.021
CA19-9	0.781	0.014	0.761	0.019	-0.782	0.025
VEGF	0.878	0.000	0.829	0.003	-0.780	0.015
TGF- β 1	0.843	0.002	0.802	0.008	-0.763	0.017

3 讨论

细胞因子是观察免疫细胞功能的重要蛋白质, 其由免疫细胞分泌。细胞因子被分泌出来后, 可作用于其他细胞从而产生免疫反应, 亦可作用于自身细胞, 实现自身免疫调节。CD4⁺CD29⁺T 细胞是细胞膜同时表达 CD4 及 CD29 两种表面分子的 CD4⁺ 辅助性 T 细胞 (Th), 具有多种功能, 其本身可分泌多种细胞因子, 但以 TNF- α 及 IFN- γ 功能尤其重要, 其中 TNF- α 属于促炎因子, 与病情发展有关^[11]; 而 IFN- γ 可起到抗病毒及抗肿瘤作用。但细胞因子的功能具有多样性, 在不同的细胞分泌, 以及对于不同的疾病, 均可能起到不同甚至相反的作用^[12]。究竟 CD4⁺CD29⁺T 细胞及其 TNF- α 及 IFN- γ 含量在青年 CRC 患者有何特征, 临床意义如何, 目前均未见相关研究。

本研究发现, 两组 CRC 患者及慢性结肠炎组患者的 CD4⁺CD29⁺T 细胞及 TNF- α 含量均高于作为阴性对照组的健康组及作为阳性对照组的慢性结肠

炎组, 而 IFN- γ 却表现为降低; 但慢性结肠炎组患者 CD4⁺CD29⁺T 细胞、TNF- α 及 IFN- γ 三者含量均与健康组无显著差异, 这说明一个重要现象——CD4⁺CD29⁺T 细胞、TNF- α 及 IFN- γ 三者对于结肠良性疾病及健康人无特异性。但青年及中老年 CRC 患者 CD4⁺CD29⁺T 细胞及 TNF- α 均显著高于慢性结肠炎组及健康组, 且青年 CRC 组显著高于中老年组, 这说明 CD4⁺CD29⁺T 细胞及 TNF- α 不但对结肠癌而言具有肿瘤特异性, 且与年龄具有显著相关性。青年及中老年 CRC 患者 IFN- γ 均显著低于慢性结肠炎组及健康组, 且青年组显著低于中老年组, 说明 IFN- γ 同样具有 CRC 及年龄特异性。就上述三项指标在 CRC 所起角色方面, 由于 CRC 患者 CD4⁺CD29⁺T 细胞及 TNF- α 表现为升高, 初步说明两者可能起到负面作用, 而降低的 IFN- γ 可能起到抗肿瘤的正面作用^[13]。为进一步核实该问题, 笔者作了以下探讨。在分期与肿瘤标记物方面发现不同分期青年 CRC 患者肿瘤标记物含量呈现较显著的梯度变化: CEA 及 CA19-9 均表现为: I 期 CEA 显著低于 III 及 IV 期, 且 IV 期显著高于 III 期, 但 I 期与 II 期无显著性差异; 后者说明一个重要现象: 在鉴别早期 (I 及 II 期) CRC 方面, CEA 及 CA19-9 的敏感性并不理想。另一方面, VEGF 及 TGF- β 1 均表现为明显的梯度, 亦即 IV $>$ III $>$ II $>$ I, 且任意两组间的含量差异均有统计学意义, 这说明: VEGF 及 TGF- β 1 与分期的关系更为密切, 且两者较

经典肿瘤标记物的 CEA 及 CA19-9 可更好的鉴别中早期 CRC^[14]。

为进一步探讨肿瘤标记物在识别青年 CRC 患者分期的临床意义,笔者进行了相关性分析。Pearson 相关性分析发现 CD4⁺CD29⁺T 细胞及 TNF- α 均与四项肿瘤标记物呈显著正相关性,以 CD4⁺CD29⁺T 细胞与 VEGF 相关性最强,其次为 TGF- β 1,说明 CD4⁺CD29⁺T 细胞与作为肿瘤转移的重要标记物的 VEGF 及 TGF- β 1 关系密切,亦即 CD4⁺CD29⁺T 细胞表达含量越高,VEGF 及 TGF- β 1 含量越高,发生转移的几率越大。IFN- γ 与四项肿瘤标记物呈显著负相关性,说明 IFN- γ 在 CRC 当中可能起到正面作用,其含量越高,患者的肿瘤标记物含量越低,预后越好。

本研究结果显示,CD4⁺CD29⁺T 细胞及 TNF- α 升高、IFN- γ 降低,对 CRC 及患病年龄具有一定的特异性,且三者与肿瘤标记物呈显著相关性,在鉴别中早期青年 CRC 具有重要的临床意义。

本研究还存在一些不足,主要是样本量不够大,未对接受不同化疗形式的患者进行足够长期的观察,未能观察化疗前后 CD4⁺CD29⁺T 细胞及其细胞因子的变化,后续将扩大样本量及观察周期。

参考文献

- [1] Zheng ZX, Zheng RS, Zhang SW, et al. Colorectal cancer incidence and mortality in China, 2010 [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15 (19): 8455 - 8460.
- [2] Thakkar JP, McCarthy BJ, Villano JL. Age-specific cancer incidence rates increase through the oldest age groups [J]. *Am J Med Sci*, 2014, 348(1): 65 - 70.
- [3] Sun C, Zargham R, Shao Q, et al. Association of CD98, integrin β 1, integrin β 3 and Fak with the progression and liver metastases of colorectal cancer [J]. *Pathol Res Pract*, 2014, 210(10): 668 - 674.
- [4] Poschau M, Dickreuter E, Singh-Müller J, et al. EGFR and β 1-integrin targeting differentially affect colorectal carcinoma cell radiosensitivity and invasion [J]. *Radiother Oncol*, 2015, 116 (3): 510 - 516.
- [5] 张国庆, 赵宏, 温新宇, 等. 大肠癌患者化疗前后淋巴细胞亚群变化 [J]. *中国医学科学院学报*, 2013, 35(2): 155 - 160.
- [6] Zhu Y, Feng Y, Liu H, et al. CD4⁺CD29⁺T cells are blamed for the persistent inflammatory response in ulcerative colitis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(3): 2627 - 2637.
- [7] Yu FY, Huang SG, Zhang HY, et al. Effects of baicalin in CD4⁺CD29⁺T cell subsets of ulcerative colitis patients [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(41): 15299 - 15309.
- [8] Zhong W, Yu Z, Zhan J, et al. Association of serum levels of CEA, CA199, CA125, CYFRA21-1 and CA72-4 and disease characteristics in colorectal cancer [J]. *Pathol Oncol Res*, 2015, 21(1): 83 - 95.
- [9] Peng ZH, Wan DS, Li LR, et al. Expression of COX-2, MMP-2 and VEGF in stage II and III colorectal cancer and the clinical significance [J]. *Hepatogastroenterology*, 2011, 58(106): 369 - 376.
- [10] Li Y, Cao H, Jiao Z, et al. Carcinoembryonic antigen interacts with TGF- β receptor and inhibits TGF- β signaling in colorectal cancers [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(20): 8159 - 8168.
- [11] Song J, Zhang J, Wang J, et al. β 1 integrin modulates tumor growth and apoptosis of human colorectal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(1): 302 - 308.
- [12] Huang CR, Lee CT, Chang KY, et al. Down-regulation of ARNT promotes cancer metastasis by activating the fibronectin/integrin β 1/FAK axis [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(13): 11530 - 11546.
- [13] Du F, Shi SS, Sun YK, et al. Clinicopathological characteristics and prognosis of colorectal cancer in Chinese adolescent patients [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2015, 128(23): 3149 - 3152.
- [14] Zhou F, Huang X, Zhang Z, et al. Functional polymorphisms of ITGB1 are associated with clinical outcome of Chinese patients with resected colorectal cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015, 75(6): 1207 - 1215.

收稿日期: 2016-01-08 修回日期: 2016-04-19 编辑: 周永彬