·肿瘤专栏·

外周血 CD8$^+$T 淋巴细胞水平和 CTC 表达对Ⅲ期结直肠癌根治性术后辅助放化疗患者预后的影响

熊露宁，董久兴*，赵 佳，任继勇，刘 军
（河北中石油中心医院肿瘤科，河北 廊坊 065000）

［摘要］ **目的** 探究外周血群集分化 8 阳性细胞（cluster of differentiation 8-positive cells，CD8$^+$）T 淋巴细胞水平和循环肿瘤细胞（circulating tumor cell，CTC）表达对Ⅲ期结直肠癌根治性术后辅助放化疗患者预后的影响。**方法** 选取我院进行治疗的Ⅲ期结直肠癌根治性术后辅助放化疗患者 156 例作为本次研究对象，对患者进行为期 6 个月的随访，根据患者在随访期内是否复发进行分组：未复发组 112 例，复发组 44 例，对患者术后 1 d 的 T 淋巴细胞亚群水平进行检测，并对其 CTC 表达水平进行检测，探究 CTC 表达阳性率与患者临床病理特征间的关系，并探究上述指标对患者预后的预测价值。**结果** 与未复发组相比，复发组 CD3$^+$、CD4$^+$、CD4$^+$/CD8$^+$ 水平较低，但 CD8$^+$ 水平较高（$P<0.05$）。测定患者外周血中 CTC 表达情况，未复发组 CTC 计数为（2.56±0.87）个，复发组 CTC 计数为（6.68±2.74）个，差异有统计学意义（$t=9.782$，$P<0.05$）。患者 CTC 表达与患者的性别、年龄、淋巴结是否转移、组织分化程度无关（$P>0.05$）。采用 ROC 曲线分析 T 淋巴细胞亚群水平及 CTC 表达对患者复发的预测价值，CD3$^+$、CD4$^+$、CD8$^+$、CD4$^+$/CD8$^+$ 及 CTC 表达对患者术后复发曲线下面积（area under the curve，AUC）分别为 0.852、0.703、0.712、0.747、0.920，对上述指标联合应用对患者的复发情况进行预测，其 AUC 值为 0.954。**结论** 患者的 CD3$^+$、CD4$^+$、CD4$^+$/CD8$^+$ 低表达，CD8$^+$ 及 CTC 高表达会增加Ⅲ期结直肠癌根治性术后辅助放化疗患者术后复发概率，且各指标联合检测对患者预后结局具有一定预测价值。

［关键词］ 结直肠肿瘤；CD8$^+$ T 淋巴细胞；循环肿瘤细胞 doi：10.3969/j.issn.1007-3205.2024.03.006
［中图分类号］ R735.34 ［文献标志码］ A ［文章编号］ 1007-3205(2024)03-0284-05

Effect of peripheral blood CD8$^+$ T lymphocyte level and CTC expression on the prognosis of stage Ⅲ colorectal cancer patients undergoing adjuvant radiochemotherapy after radical surgery

XIONG Lu-ning, DONG Jiu-xing*, ZHAO Jia, REN Ji-yong, LIU Jun
(*Department of Oncology, China Petroleum Central Hospital, Hebei Province, Langfang* 065000, *China*)

［**Abstract**］ **Objective** To explore the effect of peripheral blood cluster of differentiation 8-positive cells (CD8$^+$) T lymphocyte level and expression of circulating tumor cells (CTC) on the prognosis of stage Ⅲ colorectal cancer (CRC) patients undergoing adjuvant radiochemotherapy after radical surgery. **Methods** We selected 156 CRC patients undergoing adjuvant radiochemotherapy after radical surgery in our hospital as research subjects. They were followed up for 6 months. According to presence of recurrence during the follow-up period, they were divided into non-rercurrence group ($n=112$) and recurrence group ($n=44$). T lymphocyte subsetlevel and CTC expression levels were detected in patients at 1 d after surgery, to explore the relationship between the positive rate of CTC expression and the clinicopathological characteristics of patients, and to investigate the predictive value of the above indicators for

［收稿日期］2023－04－20
［基金项目］河北省廊坊市科学技术研究与发展计划项目（2021013038）
［作者简介］熊露宁（1982－），女，湖北孝感人，河北中石油中心医院副主任护师，医学学士，从事肿瘤疾病护理研究。
* 通信作者。E-mail：dong-jx@sina.com

prognosis of patients. **Results** Compared with non-recurrence group, recurrence group had lower $CD3^+$, $CD4^+$, and $CD4^+/CD8^+$ levels, but higher $CD8^+$ levels ($P<0.05$). CTC expression in the peripheral blood of patients was determined, and CTC count was (2.56 ± 0.87) in non-recurrence group and (6.68 ± 2.74) in recurrence group, suggesting significant differences ($t=9.782$, $P<0.05$). CTC expression of patients was not related to gender, age, lymph node metastasis, or degree of tissue differentiation of patients ($P>0.05$). Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the predictive value of T lymphocyte subset levels and CTC expression for recurrence, and the area under the curve (AUC) of $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+/CD8^+$ and CTC expression was 0.852, 0.703, 0.712, 0.747, and 0.920, respectively. The AUC of the combined application of the above indexes in predicting the recurrence of the patients was 0.954. **Conclusion** Low expression of $CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+/CD8^+$, and high expression of $CD8^+$ and CTC in patients with stage Ⅲ CRC undergoing adjuvant chemoradiotherapy after radical surgery will increase the postoperative recurrence rate, and the combined detection of all indicators has certain predictive value for the prognosis of patients.

[**Key words**] colorectal neoplasms; $CD8^+$ T lymphocytes; circulating tumor cells

结直肠癌是临床常见的消化系统恶性肿瘤，其发病率和病死率居于恶性肿瘤前5位。由于其早期临床表现缺乏特异性，多数患者确诊时已至Ⅲ期[1]。根治性手术联合放化疗是目前临床治疗结直肠癌的主要方法，但仍有部分患者术后复发、远处转移，5年生存率仅为40%～60%[2]。影像学检查往往无法显示早期转移灶，而血清肿瘤指标虽然对肿瘤复制活跃程度有一定的指示作用，但假阴性和假阳性的情况并不少见[3]。T淋巴细胞介导的细胞免疫在机体肿瘤监视过程中发挥重要的作用，可在一定程度上预防肿瘤逃逸[4]。循环肿瘤细胞(circulating tumor cell，CTC)可从肿瘤原发灶或转移灶脱落、释放入血而引起肿瘤复发和转移[5]。检测外周血中CTC有助于评估恶性肿瘤患者的血行转移状态。本研究探讨外周血群集分化8阳性细胞(cluster of differentiation 8-positive cells，$CD8^+$)T淋巴细胞水平和CTC表达对Ⅲ期结直肠癌根治性术后辅助放化疗患者预后的影响。

1　资料与方法

1.1　一般资料　选取2019年7月—2022年7月于我院进行治疗的Ⅲ期结直肠癌根治性术后辅助放化疗患者156例为研究对象，对患者进行为期6个月的随访，根据患者在随访期内是否复发分为未复发组112例和复发组44例，2组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)，具有可比性，见表1。

本研究经过医院伦理委员会知情同意，所有患者及家属均知情同意且签署知情同意书。

表1　2组一般资料比较

Table 1　Comparison of general information between the two groups

组别	例数	性别(例数，%)		年龄	体重指数	肿瘤最大直径	疾病类型(例数，%)		疾病类型(例数，%)	
		男性	女性	($\bar{x}\pm s$，岁)	($\bar{x}\pm s$)	($\bar{x}\pm s$，cm)	结肠癌	直肠癌	B期	C期
未复发组	112	59(52.68)	53(47.32)	56.23±11.23	23.56±2.31	4.02±0.88	71(63.39)	41(36.61)	65(58.04)	31(70.45)
复发组	44	23(52.27)	21(47.73)	55.98±12.48	22.98±2.46	3.89±0.87	25(56.82)	19(43.18)	47(41.96)	13(29.55)
χ^2/t 值		0.002		0.121	1.386	0.833	0.577		2.058	
P 值		0.964		0.904	0.168	0.406	0.448		0.151	

纳入标准：①患者具有完整的临床资料，病史明确为结直肠癌，且接受结直肠癌根治术，术后在我院进行辅助放化疗治疗；②患者为首次结直肠癌根治术；③患者入组前3个月未服用对本研究产生影响的药物；④患者依从性较高，术后随访配合度高。排除标准：①患者合并其他恶性肿瘤；②患者合并严重内分泌系统及肝肾系统功能障碍；③患者术前影像学检查提示为广泛性转移；④患者术前进行化疗治疗或进行免疫抑制剂治疗。

1.2　方法　于术后1 d抽取患者外周静脉血标本5 mL，分为2份。1份采用流式细胞术检测$CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$等T淋巴细胞亚群水平，计算$CD4^+/CD8^+$。1份置于柠檬酸葡萄糖抗凝管，24 h内进行富集处理，取PBS缓冲液5 mL置于离心管，再置入富集后的标本，清洗2次，取清洗液离心，取上层液体置于新的离心管，PBS清洗2次，取清洗液离心，弃去上清液，加甲醛甲酚(formocresol，Fc)封闭液

4 ℃反应 5 min。加入抗上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule,EpCAM)抗体包被磁珠,清洗、重悬磁珠,充分混合后 4 ℃反应2 h。启动 IsoFlux 分选设备富集 CTC。采用福尔马林固定富集后样本,洗涤弃去上清,加入 10%驴血清封闭,弃去上清。加入 1%兔源抗 CD45 抗体反应,洗涤弃去上清,加入 0.5%驴抗兔 CyTM3 共轭抗体,避光条件下反应,弃去上清,加入 0.2% Triton X-100,透膜,弃去上清。加入 10%抗 CK-FITC 结合抗体,避光下反应、洗涤弃去上清。染色,弃去上清,重悬样本。磁铁吸附重悬后样本、风干、封片。采用光学显微镜观察细胞形态,细胞直径>12 μm,呈长形或圆形,细胞形态完整者视为阳性。

1.3 观察指标 对患者术后 1 d 的 T 淋巴细胞亚群水平进行检测,并对其 CTC 表达水平进行检测,探究 CTC 表达阳性率与患者临床病理特征间的关系,通过受试者工作特征曲线(receiver operator characteristic curve,ROC),探究上述指标对患者预后的预测价值。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 23.0 统计软件分析数据。计数资料比较采用 χ^2 检验,计量资料比较采用 t 检验,采用 ROC 曲线分析 T 淋巴细胞亚群水平及 CTC 表达对患者复发的预测价值。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组术后 T 淋巴细胞亚群水平比较 与未复发组比较,复发组 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD4^+/CD8^+$ 水平较低,$CD8^+$ 水平较高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.2 2 组术后 CTC 表达情况比较 未复发组 CTC 计数为(2.56±0.87)个,复发组 CTC 计数为(6.68±2.74)个,差异有统计学意义($t=9.782$,$P<0.05$)。

2.3 CTC 表达情况与临床病理的关系 以患者 CTC 计数分为 CTC<2 个组和 CTC≥2 个组,2 组性别、年龄、淋巴结是否转移、组织分化程度差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

2.4 T 淋巴细胞亚群水平及 CTC 表达及其联合应用对患者复发的预测价值 采用 ROC 曲线分析 T 淋巴细胞亚群水平及 CTC 表达对患者复发的预测价值,$CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD4^+/CD8^+$ 及 CTC 表达预测患者术后复发的 AUC 分别为 0.852、0.703、0.712、0.747、0.920,对上述指标联合应用对患者的复发情况进行预测,其 AUC 值为 0.954。见表 4、图 1。

表 2 2 组术后 T 淋巴细胞亚群水平比较

Table 2 Comparison of T lymphocyte subset levels between the two groups

($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	$CD3^+$(%)	$CD4^+$(%)	$CD8^+$(%)	$CD4^+/CD8^+$
未复发组	112	65.87±7.12	39.15±6.12	24.89±5.45	1.66±0.44
复发组	44	55.46±7.15	34.79±6.23	29.45±6.56	1.23±0.46
t 值		8.208	3.984	4.433	5.423
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 3 CTC 表达情况与临床病理的关系

Table 3 Relationship between CTC expression and clinicopathology

(例数,%)

组别	例数	性别		年龄		淋巴结转移	
		男性	女性	≤60 岁	>60 岁	是	否
CTC<2	85	41(26.28)	44(28.21)	45(28.85)	40(25.64)	44(28.21)	41(26.28)
CTC≥2	71	32(20.51)	39(25.00)	36(23.08)	35(22.44)	34(21.79)	37(23.72)
χ^2 值		0.156		0.078		0.233	
P 值		0.693		0.781		0.630	

表 4 T 淋巴细胞亚群水平及 CTC 表达及其联合应用对患者复发的预测价值

Table 4 Prognostic value of T lymphocyte subset levels, CTC expression and their combination for recurrence of patients

指标	最佳截断值	AUC	95%CI	敏感度	特异度	P 值
$CD3^+$	59.990%	0.852	0.788~0.916	0.820	0.750	<0.001
$CD4^+$	33.255%	0.703	0.593~0.780	0.838	0.523	<0.001
$CD8^+$	29.335%	0.712	0.607~0.786	0.802	0.591	<0.001
$CD4^+/CD8^+$	1.055	0.747	0.661~0.834	0.910	0.500	<0.001
CTC	4.155 个	0.920	0.856~0.985	0.973	0.818	<0.001
联合应用	—	0.954	0.878~0.989	0.987	0.492	<0.001

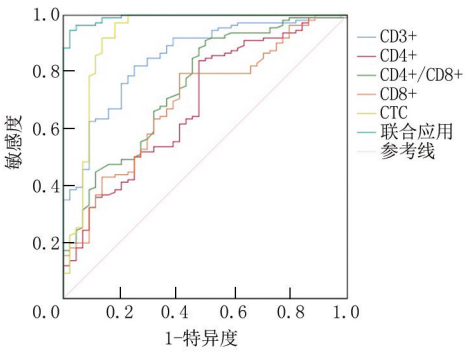


图1　T淋巴细胞亚群水平及CTC表达及其联合应用对患者复发的预测价值曲线

Figure 1　ROC curve of T lymphocyte subset levels, CTC expression and their combination in predictin grecurrence of patients

3　讨　　论

结直肠癌的发病机制复杂，已有研究[6]认为遗传、环境、免疫、生活方式、饮食习惯等因素均与之有关，全球结直肠癌的患病率均较高，其中以东欧、亚洲等国家和地区相对高发[7]。Ⅲ期结直肠癌已至中晚期，手术虽然可以清除原发灶及淋巴结，但患者术后仍然存在较高的复发和转移风险，因此整体预后仍较差[8-9]。术后早期预判肿瘤的微转移有利于临床制定合理的联合治疗方案，以改善患者预后，但目前尚缺乏理想的预测指标[10]。

基础研究[11-12]显示，恶性肿瘤患者机体处于免疫功能异常状态，T细胞介导的细胞免疫是人体抗肿瘤的主要机制。$CD3^+$、$CD4^+$和$CD8^+$T淋巴细胞等是与恶性肿瘤免疫相关的T细胞亚型，$CD3^+$T淋巴细胞是成熟的T淋巴细胞，其数量直接反映细胞免疫功能状态。$CD4^+$T淋巴细胞是辅助性T淋巴细胞，可分泌多种细胞因子，辅助其他免疫细胞而增强机体免疫耐受性。$CD8^+$T淋巴细胞是抑制性T淋巴细胞或细胞毒性T淋巴细胞，是机体抗肿瘤机制的重要环节。$CD4^+/CD8^+$比值与机体细胞免疫稳态有关，该比值低于1.4时提示免疫功能低下[13-14]。夏吉凯等[15]研究认为，结直肠癌患者癌组织和癌旁组织中的$CD4^+$、$CD8^+$T淋巴细胞水平差异有统计学意义，$CD8^+$、$CD4^+$T淋巴细胞水平是影响患者预后的独立因素。

本研究显示，与未复发组相比，复发组$CD3^+$、$CD4^+$、$CD4^+/CD8^+$水平较低，$CD8^+$水平较高；这一结果提示，Ⅲ期结直肠癌患者的$CD3^+$、$CD4^+$、$CD4^+/CD8^+$水平较低，而$CD8^+$水平较高时机体处于免疫抑制状态，术后更易复发。这可能是由于Ⅲ期结直肠癌疾病本身可引起机体免疫紊乱，可引起免疫抑制因子大量释放[16]。而根治性手术以及放化疗等治疗手段可进一步抑制患者免疫功能，使机体$CD3^+$、$CD4^+$水平下降，而$CD8^+$水平升高，使机体处于免疫紊乱状态，引起肿瘤免疫耐受状态，机体免疫系统对肿瘤细胞的监视作用下降或丧失，有利于肿瘤细胞的逃逸和增殖，从而更易复发[17-18]。

CTC被认为是肿瘤组织脱落、转移到血中的细胞，具有肿瘤细胞的遗传和表观特征。CTC在原发灶侵袭局部血管前即可向上皮间质转化，使侵袭和转移能力提高而形成远处转移灶[19-20]。CTC检测有助于显示影像学检查无法发现的早期微转移[21]。赵琳等[22]观察了CTC检测在胃癌、结直肠癌患者预后评估中的价值，显示CTC值升高者预后不良。本研究测定2组外周血中CTC表达情况，显示未复发组CTC计数低于复发组。患者CTC表达与患者的性别、年龄、淋巴结是否转移、组织分化程度无关。上述结果提示，CTC表达水平Ⅲ期结直肠癌根治性术后辅助放化疗患者术后复发有关，且不受性别、年龄、淋巴结是否转移、组织分化程度的影响。外周血中CTC表达较高时提示肿瘤细胞发生脱落，可随血行播散至全身，从而更易复发或转移。

本研究采用ROC曲线分析T淋巴细胞亚群水平及CTC表达对患者复发的预测价值，显示$CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD4^+/CD8^+$及CTC表达对患者术后复发AUC分别为0.852、0.703、0.712、0.747、0.920，这一结果进一步证实，$CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD4^+/CD8^+$及CTC表达水平对于Ⅲ期结直肠癌术后复发具有一定预测价值，其中$CD3^+$和CTC的预测价值更好。在今后的临床工作中应对Ⅲ期结直肠癌患者术后进行血中$CD3^+$和CTC检测，以预测其复发风险，并根据结果选择合理的治疗方案，以减少复发、改善患者预后。

综上所述，$CD3^+$、$CD4^+$、$CD4^+/CD8^+$低表达，$CD8^+$及CTC高表达会增加Ⅲ期结直肠癌根治性术后辅助放化疗患者术后复发概率，且各指标联合检测对患者预后结局具有一定预测价值。

[参考文献]

[1] Caycedo-Marulanda A, Patel SV, Verschoor CP, et al. A snapshot of the international views of the treatment of rectal cancer patients, a multi-regional survey: International tendencies in rectal cancer[J]. World J Surg, 2021, 45(1): 302-312.

[2] 徐璐，孙婧.结直肠癌伴腹膜转移治疗的研究进展[J].临床肿瘤学杂志，2023，28(1)：84-89.

[3] 雷燕，胡帅，王黎，等.不同检测系统测定结直肠癌肿瘤标志物

CA242 结果的一致性分析[J].川北医学院学报,2023,38(1):10－14,18.

[4] 张帆,邸泰霖,韩克松.外周血 T 淋巴细胞亚群水平对结直肠癌患者术后复发的影响及预测价值分析[J].中国内镜杂志,2020,26(11):8－14.

[5] 韦斌,钟晓刚,麦威,等.循环肿瘤细胞对直肠癌术前放化疗患者疗效及预后的评估价值[J].疑难病杂志,2021,20(9):929－934.

[6] 郑莹,王泽洲.全球结直肠癌流行数据解读[J].中华流行病学杂志,2021,42(1):149－152.

[7] Al-Shamsi H, Darr H, Abu-Gheida I, et al. The state of cancer care in the united arab emirates in 2020: challenges and recommendations, A report by the united arab emirates oncology task force[J]. Gulf J Oncolog,2020,1(32):71－87.

[8] 郭源,李云龙,张龙,等.T3、T4 期结直肠癌淋巴结转移危险因素分析[J].肿瘤研究与临床,2020,32(3):161－165.

[9] 李宪哲,熊志中,谢明颢,等.肿瘤大小对 3 114 例Ⅱ期结直肠癌患者预后的影响[J/CD].中华结直肠疾病电子杂志,2021,10(2):149－157.

[10] 魏重操,王晶,邢欣,等.早期结直肠癌的诊断率及临床病理特征分析[J].胃肠病学和肝病学杂志,2022,31(10):1154－1159.

[11] 黎华丽,郑勇斌.结直肠癌中 CAR-T 细胞免疫治疗的研究现状及展望[J].中华实验外科杂志,2021,38(2):205－209.

[12] 林家威,徐胜,黄顺荣,等.结直肠癌患者术后切口部位感染病原学特点及与细胞免疫因子的关系[J].中国临床医生杂志,2021,49(11):1350－1352.

[13] 傅超,梅婷婷,汪鸿涛,等.人结直肠癌组织 $CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞与患者预后的关系[J].温州医科大学学报,2020,50(1):30－35.

[14] 谭杨波,梁典胤,李柳丽.结直肠癌患者 $CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞介导免疫功能的影响因素[J].现代肿瘤医学,2022,30(18):3321－3325.

[15] 夏吉凯,马成,任超峰.结直肠癌患者 $CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞水平对预后的影响[J].热带医学杂志,2020,20(6):810－814.

[16] 刘秋阁,刘亚楠,王刚,等.循环肿瘤细胞监测在晚期非小细胞肺癌疗效评价和预后评估中的作用[J].中国医科大学学报,2020,49(9):50－55.

[17] 于军辉,金岚,王今,等.循环肿瘤细胞对Ⅱ期结直肠癌根治术预后的预测价值 73 例分析[J].中国肿瘤,2020,29(3):230－234.

[18] Tada H, Takahashi H, Ida S, et al. The blood microenvironment influences the molecular phenotypes of circulating tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Anticancer Res,2021,41(2):885－893.

[19] 张筱东,谢星星,张正祥,等.胃癌循环肿瘤细胞膜滤过分离技术检测及其与临床病理特征关系研究[J].陕西医学杂志,2020,49(12):150－153.

[20] Lisencu LA, Bonci EA, Irimie A, et al. The role of circulating tumor cells in chemoresistant metastatic breast cancer[J]. J Clin Med,2021,10(4):684.

[21] 徐萌,蔡美娟.CTC、MDSCs 及 S100A9 水平对Ⅱ～Ⅲ期结直肠癌术后临床预后的评估价值[J].中国现代普通外科进展,2022,25(7):529－533.

[22] 赵琳,刘医辉,董春慧,等.CTC 检测在胃癌结直肠癌预后的价值和差异性分析[J].西安交通大学学报(医学版),2020,41(2):263－267.

(本文编辑:何祯)