

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2022. 24. 019

肾细胞癌患者外周血 T 淋巴细胞表面 PD-1 水平及临床意义

林 锋, 张 黎, 王彩燕

厦门大学附属第一医院血液科, 福建厦门 361003

摘 要:**目的** 探讨程序性死亡受体-1(PD-1)在初诊肾细胞癌(RCC)患者外周血 T 淋巴细胞表面的水平及其临床意义。**方法** 收集 2021 年 4 月至 2022 年 5 月于该院初诊的 42 例 RCC 患者(RCC 组)的临床资料,选取同期 45 例体检健康者作为对照组。采用流式细胞术检测受试者外周血中 T 淋巴细胞及 PD-1 水平。**结果** 与对照组比较,RCC 组 CD8⁺ T 淋巴细胞百分比升高,CD4⁺/CD8⁺ 降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);两组 CD4⁺ T 淋巴细胞百分比比较,差异无统计学意义($P = 0.20$);RCC 组 CD4⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞表面 PD-1 水平明显升高($P < 0.05$)。外周血 T 淋巴细胞表面 PD-1 水平与患者的年龄、性别、病理分级、临床分期、肿瘤最大径、肿瘤位置、病理类型均无关($P > 0.05$),而与组织中 Ki-67 水平有关,Ki-67 水平 $\geq 10\%$ 的患者外周血 T 淋巴细胞表面 PD-1 水平高于 Ki-67 水平 $< 10\%$ 的患者($P < 0.05$)。**结论** RCC 患者外周血 T 淋巴细胞水平存在失衡且 T 淋巴细胞表面的 PD-1 水平升高,PD-1 的水平与肿瘤组织中 Ki-67 水平有关,联合检测 RCC 患者外周血 T 淋巴细胞表面 PD-1 水平可更好地预测 RCC 的进展和分期。

关键词: 肾细胞癌; T 淋巴细胞; 程序性死亡受体-1; Ki-67

中图法分类号:R737.11

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)24-3388-04

Level of PD-1 on peripheral blood T lymphocyte surface in patients with renal cell carcinoma and its clinical significance

LIN Feng, ZHANG Li, WANG Caiyan

Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361003, China

Abstract: Objective To investigate the level of programmed death receptor-1(PD-1) on peripheral blood T lymphocyte surface in patients with newly diagnosed renal cell carcinoma(RCC) and its clinical significance. **Methods** Clinical data of 42 newly diagnosed RCC patients (RCC group) were collected in the hospital from April 2021 to May 2022, and 45 healthy subjects were collected as control group during the same period. T lymphocyte and PD-1 on peripheral blood T lymphocyte surface were detected by flow cytometry. **Results** Compared with the control group, the percentage of CD8⁺ T lymphocyte in RCC group was increased, and CD4⁺/CD8⁺ was decreased, with statistical significance ($P < 0.05$); there was no significant difference in the percentage of CD4⁺ T lymphocyte between the two groups ($P = 0.20$); the level of PD-1 on CD4⁺ T lymphocyte and CD8⁺ T lymphocyte surface in RCC group was significantly increased ($P < 0.05$). PD-1 level on peripheral blood T lymphocyte surface was not correlated with age, sex, pathological grade, clinical stage, tumor maximum diameter, tumor location and pathological type ($P > 0.05$), but was correlated with Ki-67 level in tissues. The level of PD-1 on peripheral blood T lymphocyte surface in patients with Ki-67 level $\geq 10\%$ was higher than that in patients with Ki-67 level $< 10\%$ ($P < 0.05$). **Conclusion** There is imbalance in T lymphocyte level in peripheral blood of patients with RCC and the level of PD-1 on T lymphocyte surface is increased. The level of PD-1 is related to the level of Ki-67 in tumor tissue. Combined detection of PD-1 on peripheral blood T lymphocyte surface of RCC patients could better predict the progression and staging of RCC.

Key words: renal cell carcinoma; T lymphocyte; programmed death receptor-1; Ki-67

肾细胞癌(RCC)是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,其发病率逐年上升,肾透明细胞癌约占所有 RCC 的 80%,是 RCC 最常见的组织学类型^[1-2]。由于 RCC 对常规的放疗、化疗不敏感,近年来,对 RCC 患者进行免疫靶点的治疗成为临床研究中的热点。T

淋巴细胞作为抗肿瘤免疫的主要细胞已被用于 RCC 的治疗^[3]。程序性死亡受体-1(PD-1)作为一种重要的免疫抑制分子,当 T 淋巴细胞表面的 PD-1 受体与肿瘤细胞表面的程序性死亡配体-1(PD-L1)结合后,会抑制 T 淋巴细胞杀伤肿瘤的作用^[4]。既往有研究

表明 RCC 患者中 PD-1 高表达能够导致免疫抑制性肿瘤微环境形成,使肿瘤细胞逃避机体免疫监视,不利于 RCC 患者的预后^[5-6]。增殖细胞核抗原 Ki-67 是一种反映细胞增殖活性的核蛋白抗原,通过激活细胞周期蛋白依赖激酶 2/细胞周期蛋白 E 通路,加速 G1/S 期的进程,促进细胞增殖,Ki-67 已被证实可作为多种肿瘤细胞的增殖标志物^[7]。本研究通过流式细胞术检测患者外周血 T 淋巴细胞及其表面 PD-1 的水平情况,结合增殖细胞核抗原 Ki-67 水平,分析 RCC 患者的免疫状况,以期用灵敏、高效的方法为 RCC 患者的早期诊断及预后提供可靠依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2021 年 4 月至 2022 年 5 月于本院初诊为 RCC 的 42 例患者(RCC 组)的临床资料,其中男 35 例,女 7 例;年龄 13~82 岁;临床分期:I~II 期 39 例,III~IV 期 3 例;病理分级:I~II 级 33 例,III~IV 级 9 例;病理类型:透明细胞癌 33 例,其他类型 9 例(包括未分类 RCC 5 例、嫌色细胞癌 1 例、肾母细胞癌 1 例、乳头状细胞癌 2 例);肿瘤位置:左肾 18 例,右肾 24 例;选取同期 45 例体检健康者作为对照组,其中男 32 例,女 13 例,年龄 18~69 岁。本研究符合《赫尔辛基宣言》,并获得本院医学伦理委员会批准,受试者均知情同意。

1.2 仪器与试剂 所用荧光单克隆抗体:FITC 标记 CD4、PE 标记 CD8;检测仪器、检测软件及数据分析采用美国 BD 公司的 FACSCanto II 流式细胞仪、Diva 自动上机软件。

1.3 方法

1.3.1 一般资料收集 记录所有 RCC 患者的性别、年龄、临床分期、病理分级、肿瘤最大径、位置和增殖细胞核抗原 Ki-67 的水平,分析外周血 T 淋巴细胞水平及 T 淋巴细胞表面 PD-1 水平与临床病理特征的关系。

1.3.2 T 淋巴细胞比例及其表面 PD-1 水平检测 清晨采集受试者空腹静脉血 3 mL 于含肝素钠抗凝剂的采血管中,处理前充分混匀。在流式管底部加入 10 μ L PD-1 检测试剂,吸取 100 μ L 混匀的外周血标本,加入管底,避免标本碰到管壁上部;轻轻涡动混匀,室温避光反应 15 min;向管内加入 2 mL 1 $\times$ 溶血素,轻轻涡动混匀,室温避光孵育 10 min;300 $\times$ g 离心 5 min,弃上清液;向管内加入 2~3 mL 磷酸盐缓冲液,涡动混匀,300 $\times$ g 离心 5 min,弃上清液;向管内加入

0.5 mL 磷酸盐缓冲液并完全混合,上机检测。采用 FSC/SSC 双参数设门,获取 1 $\times$ 10⁵ 个淋巴细胞,根据淋巴细胞膜上 CD 分子水平的不同,流式细胞仪可以分辨出各种不同的细胞,并计算出 CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞百分比及 CD4⁺/CD8⁺。

1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件对数据进行处理和分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,若方差齐则采用 *t* 检验进行组间比较,若方差不齐则采用近似 *t* 检验进行组间比较。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 T 淋巴细胞比较 与对照组比较,RCC 组 CD8⁺T 淋巴细胞百分比升高,CD4⁺/CD8⁺降低,差异均有统计学意义(*P*<0.05);两组 CD4⁺T 淋巴细胞百分比比较,差异无统计学意义(*P*=0.20)。见表 1。

表 1 两组 T 淋巴细胞比较($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ T 淋巴细胞 (%)	CD8 ⁺ T 淋巴细胞 (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
RCC 组	42	50.81 $\pm$ 11.75	38.36 $\pm$ 9.45	1.47 $\pm$ 0.66
对照组	45	53.83 $\pm$ 10.15	33.85 $\pm$ 9.50	1.78 $\pm$ 0.75
<i>t</i>		-1.287	2.220	-2.044
<i>P</i>		0.20	<0.05	<0.05

2.2 两组 T 淋巴细胞表面 PD-1 水平比较 与对照组比较,RCC 组 CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞表面 PD-1 水平明显升高(*P*<0.05),见表 2。

表 2 两组 T 淋巴细胞表面 PD-1 的水平比较($\bar{x}\pm s, \%$)				
组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ T 淋巴细胞表面 PD-1	CD8 ⁺ T 淋巴细胞表面 PD-1	
RCC 组	42	27.52 $\pm$ 10.93	26.13 $\pm$ 12.27	
对照组	45	17.74 $\pm$ 5.15	19.71 $\pm$ 6.91	
<i>t</i>		5.281 ^a	2.975 ^a	
<i>P</i>		<0.05	<0.05	

注:^a 为方差不齐,采用近似 *t* 检验。

2.3 外周血 T 淋巴细胞表面 PD-1 水平与患者临床病理特征的关系 RCC 患者中,外周血 T 淋巴细胞表面 PD-1 的水平与患者的年龄、性别、病理分级、临床分期、肿瘤最大径、肿瘤位置、病理类型均无关(*P*>0.05),而与组织中 Ki-67 水平有关,Ki-67 水平 $\geq$ 10%的患者外周血 T 淋巴细胞表面 PD-1 水平高于 Ki-67 水平<10%的患者(*P*<0.05)。见表 3。

表 3 外周血 T 淋巴细胞表面 PD-1 水平与患者临床病理特征的关系($\bar{x}\pm s$)							
项目	<i>n</i>	CD4 ⁺ T 淋巴细胞表面			CD8 ⁺ T 淋巴细胞表面		
		PD-1(%)	<i>t</i>	<i>P</i>	PD-1(%)	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄(岁)							
13~<55	19	25.68 $\pm$ 11.52	-0.994	0.33	23.56 $\pm$ 10.98	-1.241	0.22
55~82	23	29.05 $\pm$ 10.42			28.25 $\pm$ 13.10		

续表 3 外周血 T 淋巴细胞表面 PD-1 水平与患者临床病理特征的关系($\bar{x}\pm s$)

项目	n	CD4 ⁺ T 淋巴细胞表面			CD8 ⁺ T 淋巴细胞表面		
		PD-1(%)	t	P	PD-1(%)	t	P
性别							
男	35	27.80±11.49	0.358	0.72	26.93±12.00	0.943	0.35
女	7	26.16±8.14			22.13±13.77		
临床分期(期)							
I~II	39	27.49±11.19	-0.095	0.93	26.47±12.44	0.803	0.43
III~IV	3	28.25±3.61			19.30±6.08		
肿瘤位置							
左肾	18	28.56±13.26	0.525	0.60	23.01±11.05	-1.444	0.16
右肾	24	26.75±9.03			28.46±12.83		
病理类型							
透明细胞癌	33	26.30±11.48	-1.402	0.17	25.57±12.42	-0.558	0.58
其他类型	9	32.00±7.49			28.17±12.17		
肿瘤大小(cm)							
最大径≥4	21	28.91±12.34	0.818	0.42	28.92±14.18	1.498 ^a	0.14
最大径<4	21	26.14±9.42			23.33±9.54		
病理分级							
I~II 级	33	26.98±9.79	-0.617	0.54	25.71±12.20	-0.415	0.68
III~IV 级	9	29.53±14.95			27.64±13.15		
Ki-67(%)							
≥10	24	30.81±10.73	2.376 ^a	<0.05	31.88±11.58	4.148 ^a	<0.05
<10	18	23.14±9.84			18.45±8.50		

注:^a 为方差不齐,采用近似 t 检验。

3 讨 论

肿瘤微环境中炎症细胞的浸润和免疫分子的调节对肿瘤的发生、发展至关重要,肿瘤微环境包括由 CD4⁺T 淋巴细胞和 CD8⁺T 淋巴细胞在内的肿瘤浸润淋巴细胞组成^[8]。RCC 被认为是一种免疫原性肿瘤,肿瘤微环境中免疫细胞浸润是 RCC 预后的重要因素^[9]。目前关于 RCC 免疫功能的研究不多且说法不一,有研究报道 RCC 肿瘤组织中 CD4⁺T 淋巴细胞和 CD8⁺T 淋巴细胞的高度浸润与肿瘤较高的分级和较短的患者生存期有关^[10]。有研究表明,增加 CD4⁺肿瘤浸润 T 淋巴细胞的数量,联合抗 PD-1 治疗能够缓解 RCC 患者病情^[11]。因此,深入研究 RCC 患者的免疫细胞及免疫检查点对 RCC 的诊断治疗意义重大。本研究结果表明,RCC 组外周血 CD8⁺T 淋巴细胞百分比对照组明显升高,CD4⁺/CD8⁺较对照组明显降低,RCC 患者外周血中存在 T 淋巴细胞水平失衡,提示 RCC 患者处于免疫抑制状态。

PD-1 属于免疫球蛋白超家族的 I 型跨膜蛋白,为 CD28/细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4/诱导性共刺激分子受体家族的成员,主要表达于肿瘤浸润 T 淋巴细胞表面^[12]。近年来研究发现,PD-1 除了可以在肿瘤组织表达外,还以可溶性形式存在于外周血中^[13]。由于肿瘤组织标本来源困难不能实现多次检测,动态观察的目的,因此,通过检测肿瘤患者外周血

PD-1 水平反映患者的免疫状态至关重要。本研究发现,RCC 组外周血 T 淋巴细胞表面 PD-1 水平均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。通过对 RCC 患者 PD-1 水平的多次动态监测,有助于临床医生对患者病程进展、治疗方案及效果做出及时准确的评估。

Ki-67 作为一种评价细胞增殖的核抗原,其水平指数可以独立预测癌症的进展。既往研究认为 Ki-67 在 RCC 患者中的预后预测价值较高,高水平 Ki-67 的 RCC 患者具有较高的临床病理分级及较短的生存期^[14]。Ki-67 可促进肿瘤细胞增殖,而过快的肿瘤细胞增殖可促进肿瘤微环境中糖酵解产生的乳酸堆积,从而致使调节性 T 淋巴细胞上的 PD-1 水平升高^[15]。本研究结果表明,Ki-67 水平≥10%的患者外周血 T 淋巴细胞表面 PD-1 水平高于 Ki-67 水平<10%的患者($P<0.05$),预示着二者联合检测能更好地预测 RCC 的进展和分期。Ki-67 通过参与细胞周期调控来促进肿瘤增殖,而 PD-1/PD-L1 轴可通过磷酸肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 通路调节肿瘤细胞的增殖、分化^[16]。因此,PD-1 与 Ki-67 对肿瘤细胞的增殖调控是否存在潜在联系值得进一步探讨。

综上所述,RCC 患者外周血中存在 CD8⁺T 淋巴细胞百分比升高,CD4⁺/CD8⁺降低;RCC 组 PD-1 水平的升高与肿瘤组织中 Ki-67 水平有关。外周血 T

淋巴细胞及其表面 PD-1 水平检测可以更好地帮助判断 RCC 患者的免疫状态及预后。但本研究存在一定的局限:RCC 组的临床分期Ⅲ~Ⅳ期数量太少,一定程度上影响统计结果;期待后期大样本研究能更好地呈现外周血 T 淋巴细胞表面 PD-1 水平与患者临床病理特征的关系。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (1): 7-33.
- [2] PATARD J J, LERAY E, RIOUX-LECLERCQ N, et al. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience[J]. J Clin Oncol, 2005, 23 (12): 2763-2771.
- [3] BRAUN D A, BAKOUNY Z, HIRSCH L, et al. Beyond conventional immune-checkpoint inhibition-novel immunotherapies for renal cell carcinoma[J]. Nat Rev Clin Oncol, 202, 18(4): 199-214.
- [4] SUN C, MEZZADRA R, SCHUMACHER T N. Regulation and function of the PD-L1 checkpoint[J]. Immunity, 2018, 48(3): 434-452.
- [5] KIM M H, KO G H, LEE J H, et al. PD-1 expression and its correlation with prognosis in clear cell renal cell carcinoma[J]. In Vivo, 2021, 35(3): 1549-1553.
- [6] UEDA K, SUEKANE S, KUROSE H, et al. Prognostic value of PD-1 and PD-L1 expression in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma[J]. Urol Oncol, 2018, 36(11): 499. e9-499. e16.
- [7] MENON S S, GURUVAYOORAPPAN C, SAKTHIVEL K M, et al. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker [J]. Clin Chim Acta, 2019, 491: 39-45.
- [8] LOCY H, DE-MEY S, DE-MEY W, et al. Immunomodulation of the tumor microenvironment: turn foe into friend

- [J]. Front Immunol, 2018, 9: 2909.
- [9] ZHANG S C, ZHANG E D, LONG J H, et al. Immune infiltration in renal cell carcinoma[J]. Cancer Sci, 2019, 110 (5): 1564-1572.
- [10] NAKANO O, SATO M, NAITO Y, et al. Proliferative activity of intratumoral CD8⁺ T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity[J]. Cancer Res, 2001, 61(13): 5132-5136.
- [11] BRISTOW C L, REEVES MARY A B, WINSTON R. Alphataxin, a small-molecule drug that elevates tumor-infiltrating CD4⁺ T cells, in combination with anti-pd-1 therapy, suppresses murine renal cancer and metastasis [J]. Front Oncol, 2021, 11: 739080.
- [12] YANG R J, PEI T L, HUANG R F, et al. Platycodon grandiflorum triggers antitumor immunity by restricting PD-1 expression of CD8⁺ T cells in local tumor microenvironment[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 774440.
- [13] KHAN M, ZHAO Z H, AROOJ S, et al. Soluble PD-1: predictive, prognostic, and therapeutic value for cancer immunotherapy[J]. Front Immunol, 2020, 11: 587460.
- [14] XIE Y P, CHEN L Y, MA X, et al. Prognostic and clinicopathological role of high Ki-67 expression in patients with renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis[J]. Sci Rep, 2017, 7: 44281.
- [15] KUMAGAI S, KOYAMA S, ITAHASHI K, et al. Lactic acid promotes PD-1 expression in regulatory T cells in highly glycolytic tumor microenvironments [J]. Cancer Cell, 2022, 40(2): 201-218.
- [16] SCHÜTZ F, STEFANOVIC S, MAYER L, et al. PD-1 / PD-L1 pathway in breast cancer [J]. Oncol Res Treat, 2017, 40(5): 294-297.

(收稿日期: 2022-07-10 修回日期: 2022-09-11)

(上接第 3387 页)

- 科杂志, 2018, 32(19): 1483-1486.
- [6] 余力生, 郑宏伟, 韩琳. 分泌性中耳炎与中耳通气系统 [J]. 中华耳科学杂志, 2020, 18(3): 428-430.
- [7] 雷雳, 王丹妮, 郝欣平, 等. 鼓膜置管术治疗放射性分泌性中耳炎的疗效及其并发症处理[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2020, 34(4): 334-337.
- [8] 陶佳, 罗仁忠, 陈彦球, 等. 鼓膜切开或置管: 儿童腺样体肥大合并分泌性中耳炎手术治疗方式对比[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2020, 34(3): 207-210.
- [9] 杨超, 商红磊, 曹永华, 等. 内镜下经鼻咽鼓管咽口导管法吹张并鼓室注射甲泼尼龙治疗分泌性中耳炎[J]. 中国药物与临床, 2022, 22(2): 144-146.
- [10] 罗岚. 黏蛋白在分泌性中耳炎发病机制中的研究进展 [J]. 重庆医学, 2021, 50(22): 3937-3941.
- [11] 赵然师, 左汶奇, 钱怡, 等. 咽鼓管球囊扩张联合鼓膜置管治疗慢性分泌性中耳炎[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2021, 29(6): 639-643.
- [12] MOHAMMED H, QURESHI M H, YATES P. Outcomes of examination under anaesthesia of post-nasal space and

- grommet insertion in adults presenting with otitis media with effusion [J]. J Laryngol Otol, 2021, 135 (7): 620-624.
- [13] 张相民, 蓝小林. 鼻内镜在鼻咽癌放疗后分泌性中耳炎中的应用[J]. 中国内镜杂志, 2004, 10(1): 33-34.
- [14] 龚桃根, 文忠, 柯朝阳. 鼻咽癌放疗后分泌性中耳炎的病因及发病机制[J]. 中华耳科学杂志, 2018, 16(6): 903-906.
- [15] 裴秋萍, 李声岳, 张燕平. 鼻内镜下咽鼓管球囊扩张术治疗老年慢性分泌性中耳炎患者的疗效[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(17): 4364-4365.
- [16] CHEN J B, KONG X F, MU F, et al. Hydrogen-oxygen therapy can alleviate radiotherapy-induced hearing loss in patients with nasopharyngeal cancer [J]. Ann Palliat Med, 2020, 8(5): 746-751.
- [17] 张晨, 徐聪, 郑凡君, 等. 同期咽鼓管球囊扩张术在慢性化脓性中耳炎患者听力重建中的应用[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2020, 34(10): 892-895.

(收稿日期: 2022-03-10 修回日期: 2022-07-20)