

新辅助治疗后外周血双阴性 T 细胞比例与进展期直肠癌预后的关系研究

赵欣焯¹, 郭宇廷², 张毅勋³, 卫强¹, 刘海义³

基金项目: 山西省肿瘤医院国家肿瘤区域医疗中心科教培育基金项目(编号:SD2023034)

作者单位: 1. 山西医科大学第二临床医学院, 太原 030001; 2. 山西省肿瘤医院, 中国医学科学院肿瘤医院山西医院, 山西医科大学附属肿瘤医院肝胆胰胃外科, 太原 030013; 3. 山西省肿瘤医院, 中国医学科学院肿瘤医院山西医院, 山西医科大学附属肿瘤医院结直肠外科, 太原 030013

第一作者: 赵欣焯, 在读硕士研究生, 研究方向: 直肠癌的新辅助治疗。E-mail: pandasyxx@126.com

通信作者: 刘海义, 外科学博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 结直肠癌的新辅助治疗。E-mail: shanxiliuhaiyi@126.com



刘海义, 外科学博士, 教授, 硕士研究生导师。任山西省肿瘤医院结直肠外科主任、党支部书记。中国抗癌协会大肠癌专业委员会委员, 中国抗癌协会结直肠肿瘤整合康复专业委员会副主任委员, 中国抗癌协会中西整合结直肠癌专业委员会常委, 中华医学会肿瘤学分会委员, 中国医师协会结直肠肿瘤专业委员会委员, 北京整合医学学会结直肠肿瘤分会副会长, 山西省抗癌协会大肠癌专业委员会主任委员等。《中华结直肠疾病电子杂志》《肿瘤研究与临床》杂志编委。作为主要研究人员完成山西省科技厅课题 1 项, 主持完成“十三五”国家重点研发计划“精准医学”专项“结直肠癌专病队列研究”项目课题三——结直肠癌内镜及外科治疗

临床队列研究, 以及其他课题多项。提出“阶梯式新辅助治疗在进展期直肠癌中应用”的新理念; 创新开展青年大肠息肉病的改良 Bacon 保肛手术; 开展改良双悬吊牵引技术在腹腔镜直肠癌手术中的应用, 优化模块化手术流程, 明显提高手术效率和质量。在中华系列期刊和中国科技核心期刊发表本专业论文 30 余篇, 发表 SCI 论文 8 篇, 参编《直肠癌保肛手术》《结直肠肿瘤学》《肠造口学》等专著。

[摘要] 目的 探究新辅助治疗后外周血双阴性 T 细胞 (DNT) 比例与进展期直肠癌预后的关系。方法 回顾性收集 2017 年 1 月至 2021 年 12 月山西省肿瘤医院结直肠外科收治的 219 例直肠癌患者的临床资料, 采集其新辅助治疗后的 DNT 比例指标, 取中位数为截断值, 将其分为 DNT 高水平组 (DNT $\geq 3\%$) 125 例和 DNT 低水平组 (DNT $< 3\%$) 94 例, 比较两组 TNM 分期、病理肿瘤退缩分级 (TRG)、神经管侵犯、生存预后等指标。结果 两组性别、年龄、体质量指数、肿瘤下界距肛门距离、术前肿瘤分期 (cT 分期、cN 分期)、直肠周围筋膜侵犯情况比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。相较于 DNT 高水平组, DNT 低水平组患者的神经管侵犯率较低 ($P = 0.014$), 且有更好的生存预后 ($P = 0.014$)。结论 新辅助治疗后外周血 DNT 比例与直肠癌患者的神经管侵犯及生存预后显著相关。DNT 低水平组患者的神经管侵犯率更低, 总体生存期更长。

[关键词] 直肠癌; 新辅助治疗; 双阴性 T 细胞; 预后

[中图分类号] R 735.3⁺7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2024)05-0501-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2024.05.05

A study on the relationship between double-negative T cells ratio in peripheral blood and prognosis of advanced rectal cancer after neoadjuvant therapy ZHAO Xinxuan¹, GUO Yuting², ZHANG Yixun³, WEI Qiang¹, LIU Haiyi³.

1. Second Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Department of Hepatobiliary, Pancreatic and Gastric Surgery, Shanxi Cancer Hospital, Shanxi Hospital Cancer Hospital Chinese Academy of Medical Sciences, Cancer Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan 030013, China; 3. Department of Colorectal Surgery, Shanxi Cancer Hospital, Shanxi Hospital Cancer Hospital Chinese Academy of Medical Sciences, Cancer Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan 030013, China

[Abstract] Objective To explore the relationship between double-negative T cells(DNT) ratio in peripheral blood and prognosis of advanced rectal cancer after neoadjuvant therapy. **Methods** The clinical data of 219 patients with rectal cancer who were admitted to the Department of Colorectal Surgery of Shanxi Cancer Hospital from January 2017 to December 2021 were retrospectively collected. The indicator of DNT ratio of the patients after neoadjuvant therapy was collected, and the median value was taken as the cut-off value, and the patients were divided into high level DNT group($DNT \geq 3\%$, 125 cases) and low level DNT group($DNT < 3\%$, 94 cases). The indicators of TNM stage, pathological tumor regression grade(TRG), neurovascular invasion and survival prognosis were compared between the two groups. **Results** There were no significant differences in gender, age, body mass index, distance from tumor lower bound to the anus, preoperative tumor stage(cT stage, cN stage), and perirectal fascia invasion between the two groups($P > 0.05$). Compared with the patients in the high level DNT group, the patients in the low level DNT group had lower rate of neurovascular invasion($P = 0.014$), and better survival prognosis($P = 0.014$). **Conclusion** After neoadjuvant therapy, DNT ratio in peripheral blood is significantly correlated with neurovascular invasion and survival prognosis of the patients with rectal cancer. The patients in the low level DNT group have a lower rate of neurovascular invasion and a longer overall survival period.

[Key words] Rectal cancer; Neoadjuvant therapy; Double-negative T cells(DNT); Prognosis

2020年全球统计数据显示,结直肠癌(colorectal cancer, CRC)已经成为世界上致死率第二的恶性肿瘤^[1]。我国CRC的发病率、死亡率均有所升高,其总体发病率在我国各类癌症发病率排名中已经跃升至第二位^[2]。直肠癌患者作为CRC患者的主体部分,确诊时常处于进展期,肿瘤浸润程度深且伴有淋巴侵犯。对于这类复发转移风险较高的患者,新辅助治疗已经成为标准的治疗模式^[3]。免疫系统在恶性肿瘤的发生发展中起着至关重要的作用。CRC会引起慢性炎症,在这种应激状态下,患者的外周血免疫平衡被打破,机体的淋巴细胞亚群比例也随之改变。双阴性T细胞(double-negative T cells, DNT)是近年来新发现的淋巴细胞亚群之一,其特征是表达 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ T细胞受体(T cell receptor, TCR),而不表达CD4抗原和CD8抗原^[4]。尽管DNT在外周血T淋巴细胞亚群中比例较低,只占3%~6%^[5],但是其可以通过产生细胞因子来调节机体的免疫功能。研究表明,DNT不仅存在于外周血中,而且也浸润到实体肿瘤,如肺癌、肝癌和胰腺癌^[6-8]。CRC患者外周血DNT比例显著高于正常人^[9],据此推测DNT对于直肠癌患者的疗效及预后具有潜在的预测价值。然而,DNT这一指标在临床应用中尚缺乏有效的参考值及临床意义。因此,本研究旨在探索外周血DNT比例与直肠癌患者的临床病理特征及预后间的关系,为临床诊疗提供新的思路 and 依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 回顾性收集2017年1月至2021年12月山西省肿瘤医院结直肠外科收治的219例直肠癌患者的临床资料。以入组患者的DNT比例中位数为截断值,将其分为DNT高水平组($DNT \geq 3\%$)125例

和DNT低水平组($DNT < 3\%$)94例。纳入标准:(1)经组织病理学检查诊断为直肠腺癌;(2)经CT、MRI等检查诊断为进展期直肠癌,TNM分期为 $cT_{3-4}N_{0-2}M_0$;(3)外科手术治疗前接受2~4个周期的新辅助化疗mFOLFOX₆方案(奥沙利铂、亚叶酸钙、5-氟尿嘧啶)。排除标准:(1)患有家族性腺瘤性息肉病或合并其他恶性肿瘤;(2)既往有风湿免疫系统疾病;(3)有使用糖皮质激素或免疫抑制剂药物史;(4)合并重要脏器功能衰竭或心肺功能无法耐受手术。本研究获山西省肿瘤医院伦理委员会批准(伦理号:KY2023137)。

1.2 免疫指标检测 所有患者均于新辅助治疗后、手术前采集清晨空腹静脉全血2 mL,于40℃下保存,在24 h内由山西省肿瘤医院中心实验室采用流式细胞术(FACSCanto II,美国BD公司)检测。取待检静脉全血100 μ L于上样管中,每管加入用不同荧光素标记的单抗组合(北京同生时代生物技术有限公司):抗CD3单抗-PerCP标记、抗CD4单抗-FITC标记和抗CD8单抗-PE标记。震荡混匀后常温孵育20 min,加入红细胞裂解液850 μ L裂解10 min,再以1 500 r/min离心7 min,用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗1次,然后取200 μ L PBS悬浮细胞上机检测。采用FACSDiva软件分析数据结果。

1.3 资料收集 通过查阅电子病案收集患者初次就诊于山西省肿瘤医院时的性别、年龄、体质量指数、肿瘤下界距肛门距离、影像学T分期和N分期、直肠周围筋膜侵犯情况(盆腔CT)。根据术后病理报告收集神经管侵犯和肿瘤退缩分级(tumor regression grade, TRG)情况。TRG分为4级:0级为完全退缩,无肿瘤细胞残留;1级为中等退缩,单个或小灶肿瘤细胞残留;2级为轻微退缩,肿瘤残留,并见大量纤

维化间质;3级为无退缩,广发肿瘤残留,无或少量肿瘤细胞坏死。从患者手术结束的当天开始对其进行生存预后的随访,主要观察指标是总体生存期。随访的形式主要是通过电话或门诊复查,每6个月一次,直至2023年12月。

1.4 统计学方法 应用R语言4.2.3版本统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用成组t检验;不符合正态分布的计量资料以中位数(下四分位数,上四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,组间比较采用Wilcoxon

秩和检验。计数资料以例数(百分率)[$n(\%)$]表示,组间比较采用 χ^2 检验。等级资料组间比较采用秩和检验。使用Kaplan-Meier法绘制生存曲线,采用log-rank检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组术前基线资料比较 两组性别、年龄、体质量指数、肿瘤下界距肛门距离、术前肿瘤分期(cT分期、cN分期)、直肠周围筋膜侵犯情况比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 两组术前基线资料比较[($\bar{x} \pm s$), $M(P_{25}, P_{75})$, $n(\%)$]

组别	例数	性别		年龄(岁)	体质量指数(kg/m ²)	肿瘤下界距肛门距离(cm)	
		男	女			有	无
DNT低水平组	94	54(57.4)	40(42.6)	59.4 ± 7.5	23.3(21.5, 25.6)	6.7(4.9, 9.0)	
DNT高水平组	125	68(54.4)	57(45.6)	58.0 ± 6.8	23.0(21.5, 25.4)	6.2(4.0, 8.8)	
$t/\chi^2/Z$		0.202		1.443	0.081	0.338	
<i>P</i>		0.653		0.151	0.936	0.735	

组别	例数	cT分期			cN分期			直肠周围筋膜侵犯	
		T ₂	T ₃	T ₄	N ₀	N ₁	N ₂	有	无
DNT低水平组	94	4(4.3)	40(42.6)	50(53.2)	6(6.4)	56(59.6)	32(34.0)	11(11.7)	83(88.3)
DNT高水平组	125	4(3.2)	64(51.2)	57(45.6)	3(2.4)	77(61.6)	45(36.0)	23(18.4)	102(81.6)
$t/\chi^2/Z$		0.972			0.658			1.835	
<i>P</i>		0.331			0.510			0.176	

2.2 两组术后临床病理资料比较 相较于DNT高水平组,DNT低水平组患者的神经血管侵犯率较低,

两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),两组患者TRG比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。

表2 两组术后临床病理资料比较[$n(\%)$]

组别	例数	神经血管侵犯		TRG			
		无	有	0级	1级	2级	3级
DNT低水平组	94	87(92.6)	7(7.4)	1(1.0)	9(9.6)	37(39.4)	47(50.0)
DNT高水平组	125	101(80.8)	24(19.2)	10(8.0)	7(5.6)	38(30.4)	70(56.0)
χ^2/Z		6.099		0.446			
<i>P</i>		0.014		0.656			

2.3 两组生存预后比较 随访时间为1~68个月,中位随访时间为30个月。DNT低水平组的生存预后显著优于DNT高水平组(5年总体生存率88.7% vs 73.6%;log-rank检验: $\chi^2 = 8.082, P = 0.014$),见图1。

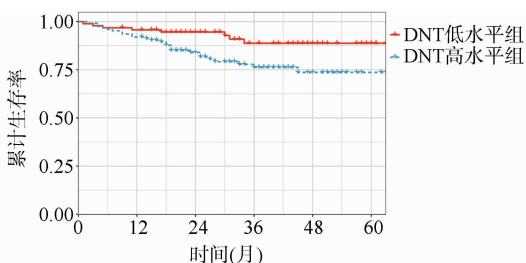


图1 两组生存预后比较

3 讨论

3.1 近年来,随着高通量、高维度测序技术的广泛应用,我们对于肿瘤微环境的认知不断深化。自肿瘤-免疫循环^[10-11]的概念被提出以来,免疫系统与肿瘤之间的复杂交互作用日益受到关注,外周血作为免疫细胞运输的重要环节逐渐引起人们的重视。然而,绝大多数研究只探究了肿瘤局部的免疫微环境,而忽视了外周血这一宏观环境对肿瘤免疫调控的重要作用^[12-15]。尽管外周血免疫功能检测在临床中是一项经济便捷的无创性筛查方法,但是其中的DNT指标与直肠癌患者临床病理特征预后的关系至今尚鲜见相关文献报道,因此我们开展了该项研究。

3.2 DNT 作为调节性 T 细胞的一个重要亚群,广泛存在于人外周血和组织中,参与了免疫微环境的调控^[16]。根据细胞表面 TCR 不同,T 细胞可分为 $\alpha\beta$ T 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞。DNT 约占 $\gamma\delta$ T 细胞的 70%, $\gamma\delta$ T 细胞作为肿瘤微环境的组成部分之一,对于调节肿瘤免疫功能发挥着重要作用^[17]。研究显示,浸润肿瘤的 $\gamma\delta$ T 细胞数量增多与预后呈正相关^[11]。Giacomelli 等^[16]对 CRC 组织及正常黏膜进行免疫组化染色后对比两者免疫细胞浸润情况,发现微卫星稳定的肿瘤浸润 DNT 数量显著低于正常黏膜($P = 0.008$)。这些证据表明 DNT 作为肿瘤免疫微环境的重要组分参与了 CRC 的发生发展。

3.3 外周血 DNT 有多种来源,除了来自特定阶段的胸腺细胞群分化以外,还来自外周的成熟 T 细胞(Treg 细胞、细胞毒性 T 细胞或辅助 T 细胞)。DNT 在不同的病理生理状态下影响机体的免疫系统,从而参与炎症性疾病和肿瘤的发生发展^[18-20]。研究表明,DNT 对肿瘤有着双重作用。一方面,DNT 的抗肿瘤作用可能与 Fas 配体-受体结合、颗粒酶/穿孔素介导的靶细胞凋亡和(或)细胞因子分泌有关^[21];另一方面,已有学者在黑色素瘤患者的转移淋巴结中发现了浸润肿瘤的 DNT,而且疾病进展组的淋巴结中浸润肿瘤的 DNT 数量显著增加,这在一定程度上支持了 DNT 有助于肿瘤转移进展的理论假设^[22]。本研究结果显示,新辅助治疗后较高比例的外周血 DNT 与肿瘤患者的不良预后密切相关,这与上述研究结果一致,但分子层面的具体机制仍有待进一步证实。循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)作为新兴的肿瘤标志物之一,具有无创性、可动态监测和高准确度等优点^[23-24]。多项研究发现 CTC 阳性与 CRC 患者的不良预后和术后神经管侵犯有关^[25-27]。然而,CTC 的检测成本高,目前难以在临床普及。外周血 DNT 检测基于流式细胞术,可以在一定程度上反映患者的免疫功能,其检测方法无创、便捷且经济,对于新辅助治疗后直肠癌患者的风险分层有着重要的借鉴意义。

3.4 本研究结果显示,DNT 低水平组的总体生存率较高,神经管侵犯率更低。这可能是因为外周血较高的 DNT 参与调控肿瘤免疫微环境,从而促进了癌细胞的转移。

3.5 本研究也存在一定的局限性。例如,受样本量和回顾性病例对照研究的限制,存在一定的选择偏倚,研究结论需要在更大规模的队列研究中进行验证。此外,DNT 的具体功能及其在直肠癌免疫微环境中的作用机制还需要更深入的研究。

综上所述,本研究强调了外周血 DNT 作为生物标志物在直肠癌患者病理及预后评估中的重要作用,为进一步探索精准医疗提供了新的视角和可能靶点。未来的研究需要聚焦于 DNT 的调节机制和功能,以及如何为直肠癌患者提供更有有效的治疗方案。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021,71(3):209-249.
- [2] Cao W, Chen HD, Yu YW, 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.
- [3] Schrag D, Shi Q, Weiser MR, et al. Preoperative treatment of locally advanced rectal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2023,389(4):322-334.
- [4] Fischer K, Voelkl S, Heymann J, et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ double-negative regulatory T cells[J]. *Blood*, 2005,105(7):2828-2835.
- [5] Velikkakam T, Gollob KJ, Dutra WO. Double-negative T cells: setting the stage for disease control or progression[J]. *Immunology*, 2022, 165(4):371-385.
- [6] Fang L, Ly D, Wang SS, et al. Targeting late-stage non-small cell lung cancer with a combination of DNT cellular therapy and PD-1 checkpoint blockade[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019,38(1):123.
- [7] Di Blasi D, Boldanova T, Mori L, et al. Unique T-cell populations define immune-inflamed hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2020,9(2):195-218.
- [8] Lu Y, Hu P, Zhou H, et al. Double-negative T cells inhibit proliferation and invasion of human pancreatic cancer cells in co-culture[J]. *Anticancer Res*, 2019,39(11):5911-5918.
- [9] 孙克娜,陈英剑,宋御繁,等. 外周血 T 细胞及双阴性 T 细胞在结直肠癌患者中的变化及临床意义[J]. *现代免疫学*, 2021,41(4):297-301,306.
- [10] Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle[J]. *Immunity*, 2013,39(1):1-10.
- [11] Mellman I, Chen DS, Powles T, et al. The cancer-immunity cycle: indication, genotype, and immunotype[J]. *Immunity*, 2023,56(10):2188-2205.
- [12] Hurtado CG, Wan F, Housseau F, et al. Roles for interleukin 17 and adaptive immunity in pathogenesis of colorectal cancer[J]. *Gastroenterology*, 2018,155(6):1706-1715.
- [13] Wang S, Qu Y, Xia P, et al. Transdifferentiation of tumor infiltrating innate lymphoid cells during progression of colorectal cancer[J]. *Cell Res*, 2020,30(7):610-622.
- [14] Huang C, Wang X, Wang Y, et al. Sirp α on tumor-associated myeloid cells restrains antitumor immunity in colorectal cancer independent of its interaction with CD47[J]. *Nat Cancer*, 2024,5(3):500-516.
- [15] Dewson G, Silke J. The walrus and the carpenter: complex regulation of tumor immunity in colorectal cancer[J]. *Cell*, 2018,174(1):14-16.

- [16] Giacomelli M, Monti M, Pezzola DC, et al. Immuno-contexture and immune checkpoint molecule expression in mismatch repair proficient colorectal carcinoma[J]. *Cancers(Basel)*, 2023,15(12):3097.
- [17] de Vries NL, van de Haar J, Veninga V, et al. $\gamma\delta$ T cells are effectors of immunotherapy in cancers with HLA class I defects[J]. *Nature*, 2023,613(7945):743-750.
- [18] Crispin JC, Tsokos GC. Human TCR- $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ T cells can derive from CD8 $^+$ T cells and display an inflammatory effector phenotype[J]. *J Immunol*, 2009,183(7):4675-4681.
- [19] Liu K, Ye H, Zhou J, et al. Ox40 regulates the conversion and suppressive function of double-negative regulatory T cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018,65:16-22.
- [20] Sun G, Sun X, Li W, et al. Critical role of OX40 in the expansion and survival of CD4 T-cell-derived double-negative T cells[J]. *Cell Death Dis*, 2018,9(6):616.
- [21] Li Y, Dong K, Fan X, et al. DNT cell-based immunotherapy: progress and applications[J]. *J Cancer*, 2020,11(13):3717-3724.
- [22] Vallacchi V, Vergani E, Camisaschi C, et al. Transcriptional profiling of melanoma sentinel nodes identify patients with poor outcome and reveal an association of CD30 $^+$ T lymphocytes with progression[J]. *Cancer Res*, 2014,74(1):130-140.
- [23] Petrik J, Verbanac D, Fabijanec M, et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer: detection systems and clinical utility[J]. *Int J Mol Sci*, 2022,23(21):13582.
- [24] Vasseur A, Kiavue N, Bidard FC, et al. Clinical utility of circulating tumor cells: an update[J]. *Mol Oncol*, 2021,15(6):1647-1666.
- [25] Baek DH, Kim GH, Song GA, et al. Clinical potential of circulating tumor cells in colorectal cancer: a prospective study[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2019,10(7):e00055.
- [26] Yang C, Shi D, Wang S, et al. Prognostic value of pre- and post-operative circulating tumor cells detection in colorectal cancer patients treated with curative resection: a prospective cohort study based on ISET device[J]. *Cancer Manag Res*, 2018,10:4135-4144.
- [27] 韩亚民,殷舞,韦斌,等. 直肠癌患者外周血循环肿瘤细胞围手术期变化及临床意义[J]. *中国临床新医学*,2020,13(12):1229-1234.
- [收稿日期 2024-04-10][本文编辑 吕文娟 余军]

本文引用格式

赵欣烜,郭宇廷,张毅勋,等. 新辅助治疗后外周血双阴性 T 细胞比例与进展期直肠癌预后的关系研究[J]. *中国临床新医学*,2024,17(5):501-505.