

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.17.021

文章编号: 1005-8982 (2018) 17-0104-05

Tim3 水平对非小细胞肺癌临床进展及预后的影响

朱文良¹, 李靖², 梁新强³, 赖林¹, 梁艳艳¹, 陆运鑫¹, 侯恩存¹

(1. 广西中医药大学附属瑞康医院 肿瘤内科二病区, 广西 南宁 530011; 2. 郑州大学附属肿瘤医院 微创介入科, 河南 郑州 450008; 3. 广西医科大学附属肿瘤医院 基础实验部, 广西 南宁 530021)

摘要: **目的** 探讨非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者外周血 CD4⁺T 细胞表面 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3 (Tim3) 的表达, 及其与 NSCLC 临床进展及预后的关系。 **方法** 前瞻性收集 2013 年 9 月—2014 年 9 月于广西中医药大学附属瑞康医院肿瘤内科诊断的 69 例 NSCLC 患者作为 NSCLC 组, 同期进行健康体检的 65 例健康人员作为对照组。应用流式细胞仪检测 CD4⁺T 细胞表面 Tim3 表达水平。以 NSCLC 组 Tim3 水平的中位数为截点分为 Tim3 高表达组和 Tim3 低表达组, 进而分析 CD4⁺T 细胞 Tim3 水平与患者临床病理特征及预后的关系。 **结果** 与对照组患者比较, NSCLC 组患者外周血 CD4⁺T 细胞表面 Tim3 水平升高 ($P < 0.05$)。Tim3 高表达与 TNM 分期及淋巴结转移有相关性 ($P < 0.05$)。Tim3 低表达患者较高表达患者具有更长的总生存期 ($P < 0.05$)。CD4⁺T 细胞表面 Tim3 高表达是 NSCLC 总生存期的独立预后因素 ($P < 0.05$)。 **结论** 外周血 CD4⁺T 细胞 Tim3 高表达与 NSCLC 生存期相关, 其可能是 NSCLC 预后的生物指标。

关键词: 非小细胞肺癌; CD4⁺T 细胞; T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子; 外周血; 临床预后

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Effect of TIM-3 expression on clinical progress and prognosis of non-small cell lung cancer

Wen-liang Zhu¹, Jing Li², Xin-qiang Liang³, Lin Lai¹, Yan-yan Liang¹, Yun-xin Lu¹, En-cun Hou¹

(1. Department of Medical Oncology, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530011, China; 2. Department of Minimally Invasive Intervention Therapy, Affiliated Tumor Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450008, China; 3. Department of Basic Experiment, Tumor Hospital Affiliated to Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: **Objective** To determine the correlations of the expression of T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3 (TIM-3) on the surface of CD4⁺ T cells from peripheral blood with clinical stage and prognosis in the patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** A total of 69 patients with NSCLC were consecutively enrolled in this prospective study between September 2013 and September 2014 in Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, and 65 healthy people who underwent physical examination in the same period were enrolled as healthy controls. The expression of TIM-3 in peripheral blood was detected by flow cytometry. The NSCLC patients were divided into TIM-3 high-expression group and TIM-3 low-expression group by the median value of TIM-3 on peripheral CD4⁺ T cells. The relationships of TIM-3 expression with clinical features and prognosis were analyzed. **Results** The expression of TIM-3 on the CD4⁺ T cells in the NSCLC patients was significantly higher than that in the healthy controls ($P < 0.05$). High-expression of TIM-3 was significantly associated with lymph node metastasis and tumor stage ($P < 0.05$). Kaplan-Meier survival analysis showed that the patients with

收稿日期: 2016-12-15

[通信作者] 侯恩存, E-mail: encunhoures@163.com

lower TIM-3 expression exhibited longer overall survival as compared to the patients with high TIM-3 expression ($P < 0.05$). Cox multivariate regression analysis showed that high expression of TIM-3 was an independent predictor for the overall survival in the patients with NSCLC ($P < 0.05$). **Conclusions** TIM-3 expression on CD4⁺ T cells is associated with clinical stage and overall survival in the NSCLC patients, and it may be a potential biomarker for predicting prognosis in the patients with NSCLC.

Keywords: non-small cell lung cancer; CD4⁺ T cell; TIM-3; peripheral blood; clinical prognosis

肺癌的发展与 T 细胞免疫功能紊乱及 T 细胞亚群比例失衡有关^[1-2]。T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain 3, Tim3) 可与其配体半乳糖凝集素 9 结合并抑制辅助性 T 细胞 1 (T helper 1 cell, Th1) 的活性, 下调 Th1 免疫应答^[3]。研究显示 Tim3 在多种癌症患者外周血 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞中高表达, 且与癌症发展及预后相关^[4-6]。提示从外周血中探索 Tim3 与癌症预后的关系成为一种思路。本研究初步探讨非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中 Tim3 的表达, 及其与患者临床病理特征及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2013 年 9 月–2014 年 9 月于广西中医药大学附属瑞康医院肿瘤内科住院的 69 例 NSCLC 患者。其中, 男性 43 例, 女性 26 例; 年龄 27 ~ 79 岁, 平均 56.8 岁; TNM 分期 I、II 期患者 36 例 (52.2%), III、IV 期患者 33 例 (47.8%); 鳞癌 33 例 (47.83%), 腺癌 31 例 (44.93%), 其他 5 例 (7.24%); 肿瘤直径 < 3 cm 者 45 例 (65.2%), 肿瘤直径 ≥ 3 cm 者 24 例 (34.8%)。所有患者均经组织病理学或影像学检测确诊。纳入标准: ①符合原发性肺癌的诊断标准; ②无放疗和化疗史。排除标准: ①转移性肺癌患者; ②正在使用抗凝剂或抗血小板聚集药物治疗的患者; ③伴有自身免疫性疾病。同时选择本院体检的 65 例健康人群 (无肿瘤病史, 年龄、性别匹配) 作为对照组。其中, 男性 41 例, 女性 24 例。本研究经广西中医药大学附属瑞康医院伦理委员会批准, 患者均签署知情同意书。

1.2 外周血 CD4⁺ T 细胞表面 Tim3 表达水平检测

清晨空腹条件下采集受试者静脉血于肝素抗凝管抗凝。Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC)。清洗后将 PBMC 重悬于磷酸盐缓冲液中。然后于流

式管中加入 100 μl PBMC 细胞悬液, 并加入藻红素 (Phycoerythrin, PE)–抗人 Tim3 抗体 (1 : 1 000 稀释)、别藻蓝素 (Allophycocyanin, APC)–抗人 CD3 抗体 (1 : 1 000 稀释) 及异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)–抗人 CD4 抗体 (1 : 1 000 稀释), 4℃避光孵育 30 min。流式细胞仪进行检测, 每例至少有 10 000 个细胞用于分析。抗体均购自美国 eBioscience 公司。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验; 计数资料以率表示, 比较用 χ^2 检验, Kaplan–Meier 法制做生存曲线, 比较用 Log-rank 检验; 影响因素的分析采用 Cox 比例风险模型, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者外周血 CD4⁺ T 细胞表面 Tim3 表达水平比较

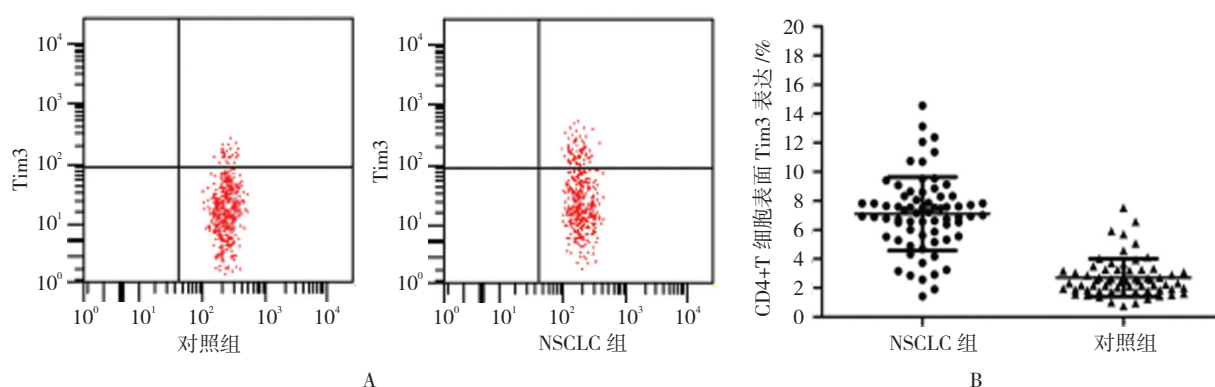
对照组患者外周血 CD4⁺ T 细胞表面 Tim3 表达水平 [$(2.71 \pm 1.30)\%$] 与 NSCLC 组患者外周血 CD4⁺ T 细胞表面 Tim3 表达水平 [$(7.10 \pm 2.53)\%$] 比较, 差异有统计学意义 ($t = 3.231$, $P = 0.000$), NSCLC 组高于对照组。见图 1。

2.2 NSCLC 组患者 Tim3 高表达与 NSCLC 临床病理的相关性

以 NSCLC 组患者 CD4⁺ T 细胞表面 Tim3 百分比的中位数 (7.16%) 为截点分为 Tim3 高表达组和 Tim3 低表达组。Tim3 高表达与 TNM 分期及淋巴结转移有相关性 ($P < 0.05$), 与年龄、性别、吸烟史、肿瘤直径及组织类型无相关性 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 NSCLC 组患者 Tim3 表达水平与 NSCLC 患者预后的关系

Kaplan–Meier 生存曲线分析结果表明, NSCLC 组



A: 流式细胞仪检测结果; B: 流式细胞仪定量结果

图 1 两组患者外周血 CD4⁺T 细胞表面 Tim3 表达水平比较

表 1 NSCLC 组患者 Tim3 高表达与 NSCLC 临床病理因素的相关性

因素	例数	Tim3 高表达 例(%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄				
<60 岁	30	17 (56.7)	0.000	0.983
≥ 60 岁	39	22 (56.4)		
性别				
男	43	25 (58.1)	0.122	0.727
女	26	14 (53.8)		
吸烟史				
有	47	28 (59.6)	0.559	0.455
无	22	11 (50.0)		
肿瘤直径				
<3 cm	45	21 (46.7)	2.518	0.113
≥ 3 cm	24	16 (66.7)		
TNM 分期				
I 、 II 期	36	15 (41.7)	6.759	0.009
III 、 IV 期	33	24 (72.7)		
淋巴结转移				
N ₀	42	18 (42.9)	4.842	0.028
N ₁ ~ N ₃	37	25 (67.6)		
组织类型				
鳞癌	33	18 (54.5)	5.262	0.072
腺癌	31	22 (71.0)		
其他	5	1 (20.0)		

患者中位总生存期 (overall survival, OS) 为 13.4 个月。其中, Tim3 高表达组 35 例, Tim3 低表达组 34 例。Tim3 高表达组和 Tim3 低表达组中位 OS 分别为 11.7 和 16.2 个月, Log-rank 检验结果显示: Tim3 高表达组和 Tim3 低表达组的 OS 比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=6.545$, $P=0.011$), Tim3 低表达组患者高于 Tim3 高表达组患者。见图 2。

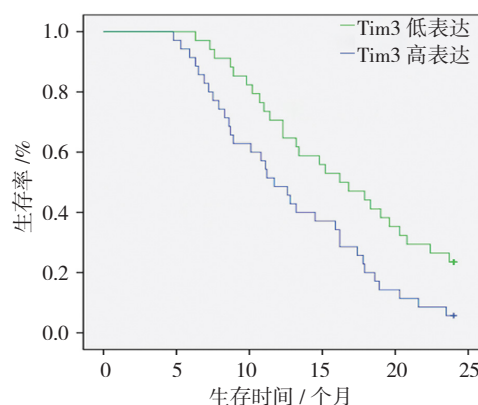


图 2 不同 Tim3 表达水平 NSCLC 患者生存曲线图

2.4 NSCLC 组患者预后的 Cox 风险回归模型单因素及多因素分析

将年龄、性别、吸烟史、肿瘤直径、淋巴结转移、TNM 分期及 CD4⁺T 细胞表面 Tim3 表达等因素纳入 Cox 比例风险回归模型进行分析。单因素 Cox 生存分析结果表明, 男性、吸烟、肿瘤直径 <3 cm、淋巴结转移 N₀、TNM 分期 I、II 期及 CD4⁺T 细胞表面 Tim3 高表达与患者生存不良预后相关 ($P<0.05$)。进一步多因素 Cox 比例风险模型分析结果提示 Tim3 高表达为患者 OS 的独立危险因素 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 NSCLC 组患者预后的 Cox 比例风险模型单因素及多因素分析

变量	单因素分析					多因素分析				
	b	$\hat{HR}$	95% CI		P 值	b	$\hat{HR}$	95% CI		P 值
			下限	上限				下限	上限	
性别 (男性 / 女性)	0.310	1.363	1.124	1.817	0.023					
吸烟史 (有 / 无)	0.571	1.769	0.893	2.654	0.045					
肿瘤直径 (<3 cm / ≥ 3 cm)	-0.359	0.694	0.479	1.123	0.015					
淋巴结转移 ($N_0/N_1 \sim N_3$)	-0.321	0.716	0.627	1.038	0.012					
TNM 分期 (I、II 期 / III、IV 期)	-0.410	0.665	0.573	1.062	0.009	-0.459	0.624	0.571	1.058	0.001
Tim3 表达 (高表达 / 低表达)	0.849	2.342	1.143	3.157	0.002	0.836	2.310	1.144	3.159	0.000

3 讨论

肺癌, 尤其是 NSCLC 是对人类健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一, 具有易复发、易转移的特点。近年来, 随着免疫机制研究的深入, 肿瘤免疫治疗引起越来越多的重视。美国食品药品监督管理局已批准阻断名为程序性细胞死亡蛋白 1/ 程序性死亡受体 - 配体 1 免疫检查点的新免疫疗法用于晚期肺癌和肾癌的治疗。本研究发现 NSCLC 患者外周血 CD4⁺T 细胞表面 Tim3 百分比升高, 且与 NSCLC 生存期相关, 提示 Tim3 可能是预测晚期 NSCLC 预后的生物指标。

T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子家族最早发现于克隆哮喘小鼠模型中, 目前在人体中只发现 3 种家族成员 (Tim1、Tim3 及 Tim4) [4-6]。Tim 广泛参与 Th1 和 Th2 介导的免疫反应, 如 Tim1 可促进细胞因子的产生, Tim4 持续表达于成熟的树突细胞 [7]。研究显示 Tim3 与自身免疫疾病及多种癌症相关。在类风湿性关节炎患者外周血中, CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞表面 Tim3 升高并与疾病活动性评分、血浆肿瘤坏死因子 α 表达及疾病恶化程度呈负相关 [8-9]; 在卵巢癌、胶质瘤及骨肉瘤患者外周血 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞中 Tim3 高表达, 且 CD4⁺T 细胞表面 Tim3 异常高表达与肿瘤的发生发展密切相关。提示外周血 Tim3 表达水平可以作为癌症潜在的诊断和预后指标。ZHUANG 等 [10] 对 30 例 NSCLC 患者肺癌组织样本进行免疫组织化学检测发现, Tim3 在 86.7% 的 NSCLC 患者组织中呈阳性, 且与患者预后有关。然而, 外周血 Tim3 表达水平是否与 NSCLC 患者预后有关尚未见报道。同时, 由于肿瘤组织的提取过程具有创伤性大, 难以获得等缺点, 寻找创伤性小, 易操作的预测指标有重要的临床意义。本研究发

现, NSCLC 患者外周血 CD4⁺T 细胞表面 Tim3 水平高于对照组 ($P < 0.05$), 且 TNM 分期 III、IV 期患者血清 Tim3 高表达水平高于 I、II 期患者, 提示 CD4⁺T 细胞表面 Tim3 的表达增高可能促进 NSCLC 的发生发展和转移, 其异常表达可能与晚期肺癌局部侵袭有关。

对 69 例 NSCLC 患者 Kaplan-Meier 生存曲线的结果显示, Tim3 低表达组中位 OS 高于 Tim3 高表达组 ($P < 0.05$), 提示 Tim3 表达量升高与预后较差有关。这与 Tim3 在其他癌症的作用相同, 即在卵巢癌和骨肉瘤患者外周血 CD4⁺T 细胞中, Tim3 的高水平表达预示着预后不良 [4, 6]。Cox 比例风险模型分析结果提示 Tim3 高表达是 NSCLC 患者 OS 的独立危险因素。研究表明 Tim3 可以通过活化白介素 -6 (Interleukin-6, IL-6) / 信号转导和转录激活因子 3 通路抑制 CD4⁺T 细胞活化和 Th1 细胞极化, 促进淋巴瘤的发生 [11]。另一方面, Th1 细胞可以释放 IL-6 等细胞因子。因此, 笔者推测一些炎症通路可能参与了 Tim3 介导的肺癌的发生与发展。

综上所述, CD4⁺T 细胞表面 Tim3 在 NSCLC 患者外周血中的高表达与 TNM 分期及淋巴结转移有相关性, 可作为评估 NSCLC 患者预后的重要指标。利用 Tim3 水平来判定晚期 NSCLC 患者的生存结局将为临床实践提供了具有新意的指导思路。然而, 在外周血 CD4⁺T 细胞表面 Tim3 水平在被纳入临床检测之前, 仍需要大样本的前瞻性研究进一步评估其应用价值。

参 考 文 献:

[1] WANG W J, TAO Z, GU W, et al. Variation of blood T lymphocyte subgroups in patients with non- small cell lung cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(8): 4671-4673.
[2] DUAN M C, ZHONG X N, LIU G N, et al. The Treg/Th17

- paradigm in lung cancer[J]. J Immunol Res, 2014, 2014: DOI: 10.1155/2014/730380.
- [3] ZHU C, ANDERSON A C, SCHUBART A, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity[J]. Nat Immunol, 2005, 6(12): 1245-1252.
- [4] WU J, LIU C, QIAN S, et al. The expression of Tim-3 in peripheral blood of ovarian cancer[J]. DNA Cell Biol, 2013, 32(11): 648-653.
- [5] HAN S, FENG S, XU L, et al. Tim-3 on peripheral CD4(+) and CD8(+) T cells is involved in the development of glioma[J]. DNA Cell Biol, 2014, 33(4): 245-250.
- [6] LIU H, ZHI L, DUAN N, et al. Abnormal expression of Tim-3 antigen on peripheral blood T cells is associated with progressive disease in osteosarcoma patients[J]. FEBS Open Bio, 2016, 6(8): 807-815.
- [7] MEYERS J H, SABATOS C A, CHAKRAVARTI S, et al. The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases[J]. Trends Mol Med, 2005, 11(8): 362-369.
- [8] LIU Y, SHU Q, GAO L, et al. Increased Tim-3 expression on peripheral lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis negatively correlates with disease activity[J]. Clin Immunol, 2010, 137(2): 288-295.
- [9] LI S, PENG D, HE Y, et al. Expression of TIM-3 on CD4+ and CD8+ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of rheumatoid arthritis[J]. APMIS, 2014, 122(10): 899-904.
- [10] ZHUANG X, ZHANG X, XIA X, et al. Ectopic expression of TIM-3 in lung cancers: a potential independent prognostic factor for patients with NSCLC[J]. Am J Clin Pathol, 2012, 137(6): 978-985.
- [11] HUANG X, BAI X, CAO Y, et al. Lymphoma endothelium preferentially expresses Tim-3 and facilitates the progression of lymphoma by mediating immune evasion[J]. J Exp Med, 2010, 207(3): 505-520.

(李科 编辑)