

· 论著 ·

CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1表达与胃癌临床病理特征、近期预后不良的关系分析

杨 慧* 肖立娇

天津市北辰医院检验科(天津 300400)

【摘要】目的 分析胃癌患者CD4+T细胞表面细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA-4)、淋巴细胞活化基因3(LAG-3)、程序性细胞死亡因子(PD-1)表达与临床病理特征、近期预后不良的关系。方法 回顾性分析本院2019年1月至2022年1月收治的215例行手术治疗胃癌患者的临床资料,比较胃癌组织和癌旁正常组织CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1表达,并比较不同临床病理特征患者胃癌组织CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1表达。另根据患者术后1年复发情况将其分为预后良好组和预后不良组,采用单因素和多因素Logistic回归分析探讨胃癌患者近期预后不良的影响因素。结果 癌组织CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1表达均高于癌旁组织($P<0.05$);低分化程度、N2~3期胃癌患者CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1表达均高于中/高分化程度、N0~1期胃癌患者($P<0.05$)。预后不良组低分化程度、T3~4期、N2~3期患者占比以及CTLA-4、LAG-3、PD-1表达均高于预后良好组($P<0.05$),术后辅助化疗患者占比低于预后良好组($P<0.05$);多因素Logistic回归分析显示,低分化程度、T3~4期、N2~3期及CTLA-4、LAG-3、PD-1高表达均是胃癌患者近期预后不良的危险因素,术后辅助化疗是其保护因素($P<0.05$)。结论 胃癌组织CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1均存在异常高表达,与胃癌患者分化程度、N分期临床病理学特征密切相关,且均是胃癌患者近期预后不良的危险因素。

【关键词】胃癌;细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4;淋巴细胞活化基因;程序性死亡因子;临床病理特征;预后不良

【文献标识码】R735.2

【中图分类号】A

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2025.2.046

Analysis of the Relationship between the Expressions of CTLA-4, LAG-3 and PD-1 on the Surface of CD4+ T Cells and the Clinicopathological Features and Short-term Prognosis of Patients with Gastric Cancer

YANG Hui*, XIAO Li-jiao.

Department of Clinical Laboratory, Beichen Hospital, Tianjin 300400, China

Abstract: **Objective** To analyze the relationship between the expressions of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4), lymphocyte activation gene 3 (LAG-3), programmed cell death factor (PD-1) on CD4+ T cell surface and clinicopathological features and poor short-term prognosis in patients with gastric cancer. **Methods** The clinical data of 215 patients with gastric cancer who underwent surgical treatment in our hospital from January 2019 to January 2022 were retrospectively analyzed. The expressions of CTLA-4, LAG-3 and PD-1 on the surface of CD4+ T cells in gastric cancer tissues and adjacent normal tissues were compared, and the expressions of CTLA-4, LAG-3 and PD-1 on the surface of CD4+ T cells in gastric cancer tissues of patients with different clinicopathological features were compared. In addition, the patients were divided into good prognosis group and poor prognosis group according to the recurrence at 1 year after operation. Univariate and multivariate Logistic regression analysis were used to explore the influencing factors of poor prognosis in patients with gastric cancer. **Results** The expressions of CTLA-4, LAG-3 and PD-1 on the surface of CD4+ T cells in cancer tissues were higher than those in adjacent tissues ($P<0.05$), and the expressions of CTLA-4, LAG-3 and PD-1 on CD4+ T cells in patients with low differentiation and N2-3 stage gastric cancer were higher than those in patients with moderate/high differentiation and N0-1 stage gastric cancer ($P<0.05$). The proportion of patients with low differentiation, T3-4 stage, N2-3 stage and the expressions of CTLA-4, LAG-3 and PD-1 in the poor prognosis group were higher than those in the good prognosis group ($P<0.05$), and the proportion of patients with postoperative adjuvant chemotherapy was lower than that in the good prognosis group ($P<0.05$). Multivariate Logistic regression analysis showed that low differentiation degree, T3-4 stage, N2-3 stage and high expressions of CTLA-4, LAG-3 and PD-1 were all risk factors for poor short-term prognosis of gastric cancer patients, while postoperative adjuvant chemotherapy was a protective factor ($P<0.05$). **Conclusion** CTLA-4, LAG-3, and PD-1 on the surface of CD4+T cells in gastric cancer tissue are abnormally high expressed, which is closely related to the differentiation degree and N-stage clinical pathological characteristics of gastric cancer patients, and they are all risk factors for poor short-term prognosis of gastric cancer patients.

Keywords: Gastric Cancer; Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4; Lymphocyte Activation Gene; Programmed Cell Death Factor; Clinicopathological Features; Poor Prognosis

胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一,发病率居于肿瘤疾病前列,具有较高的死亡率^[1]。临床手术治疗是可根除胃癌的唯一手段,但由于胃癌发病早期临床症状不明显,易出现误诊及漏诊,大部分患者就诊时已处于中晚期,导致临床治疗效果并不十分理想^[2-3]。近年来,免疫治疗已成为新型肿瘤治疗手段,在抗肿瘤中具有一定疗效^[4],了解胃癌患者细胞免疫状态对指导临床靶向治疗和预后评估具有重要意义。CD4+T细胞是机体细胞免疫功能的重要组成部分,在膀胱癌、结肠癌等恶性肿瘤的发生与发展中发挥着重要作用^[5-6]。细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA-

4)、淋巴细胞活化基因3(LAG-3)、程序性细胞死亡因子(PD-1)均为CD4+T细胞表面重要的共抑制分子,能够有效介导机体负性调节信号,抑制B细胞、T细胞的增殖和生物学功能,促进癌症进展^[7-8]。但以上CD4+T细胞表面共抑制分子表达情况是否与临床病理特征、预后有关尚不明确。故本研究通过检测胃癌患者CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1表达情况,分析其与临床病理学特征及预后的关系,以期对胃癌靶向治疗和预后评估提供参考。

1 资料与方法

【第一作者】杨 慧,女,主管技师,主要研究方向:免疫方面。E-mail:ycqcu6@163.com

【通讯作者】杨 慧

1.1 一般资料 回顾性分析本院2019年1月至2022年1月收治的215例胃癌患者的临床资料，其中男139例，女76例；年龄35~75岁，平均(51.46±6.03)岁。

纳入标准：经病理学检查确诊为胃癌患者；年龄>18岁；均行手术治疗；预计生存期≥3个月。排除标准：合并其他恶性肿瘤；入院前接受化疗或放疗；严重肝、肾功能不全；严重心脑血管疾病；免疫功能不全；妊娠哺乳期者；凝血功能障碍者；长期服用糖皮质激素或免疫抑制剂；近期存在急慢性感染者。

1.2 方法

1.2.1 CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1表达检测 收集患者术中切除的胃癌组织及癌旁正常组织，采用磷酸盐缓冲液(PBS)洗去血液，剪去液化和坏死组织，将剩余组织剪碎，PBS反复冲洗3次；采用0.1%Ⅳ型胶原酶37℃消化碎块组织1~2h，制成均匀的单细胞悬液；过滤细胞悬液去除未充分消化的组织碎屑，离心洗涤后用PBS重悬；取细胞悬液置于流式管，每管100μl，加入Fc段受体封闭液，室温封闭10min，再分别加入5μl异硫氰酸荧光素标记的抗人CD4、藻红蛋白标记的抗人PD-1(购自美国eBioscience公司)、抗人CTLA-4(购自美国BD Bioscience公司)、抗人LAG-3于相应流式管内混匀，室温避光30min后用PBS清洗，然后离心去除非特异性结合物，弃上清液后用PBS重悬，混匀并避光放置。采用MACSQuant流式细胞仪(德国Miltenyi公司)进行检测，分析2×10⁶个细胞的数据，FlowJo软件分析检测数据得出结果。

1.2.2 预后不良的判定及分组 患者出院后定期复查，统计胃癌术后1年复发情况，经影像学、组织病理学检查明确发现手术切除部位或附近出现新发肿瘤或出现远处组织器官转移等即为复发。将术后1年复发患者复发归为预后不良组(59例)，术后1年未复发患者归为预后良好组(156例)。

1.2.3 收集资料 收集患者资料，包括性别、年龄、肿瘤最大直径、肿瘤部位、分化程度、T分期、N分期、术后治疗情况。

1.3 统计学分析 将SPSS 26.0软件用以统计学分析，计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”形式进行统计描述，两组间比较采用独立样本t检验；以“n/%”描述计数资料，以 χ^2 检验两样本差异；采用Logistic多元回归分析探讨影响胃癌患者近期预后不良的因素。P<0.05为

差异有统计学意义。

2 结果

2.1 癌组织及癌旁组织CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1表达比较 癌组织CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1表达均高于癌旁组织(P<0.05)，见表1。

2.2 胃癌患者不同临床病理学特征CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1表达比较 不同性别、年龄、肿瘤最大直径、肿瘤部位、T分期胃癌患者CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1表达差异比较均无统计学意义(P>0.05)；低分化程度、N2~3期胃癌患者CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1表达均高于中/高分化程度、N0~1期胃癌患者(P<0.05)，见表2。

2.3 预后良好组和预后不良组胃癌患者单因素分析 预后良好组和预后不良组患者性别、年龄、肿瘤最大直径、肿瘤部位比较差异均无统计学意义(P>0.05)，预后不良组低分化程度、T3~4期、N2~3期患者占比以及CTLA-4、LAG-3、PD-1表达均高于预后良好组(P<0.05)，术后辅助化疗患者占比低于预后良好组(P<0.05)，见表3。将表3中P<0.05的因素作为自变量进行赋值：分化程度(中/高分化=0，低分化=1)、T分期(T1~2期=0，T3~4期=1)、N分期(N0~1期=0，N2~3期=1)、术后药物治疗(是=0，否=1)、CTLA-4、LAG-3、PD-1(实测值)，另将胃癌患者预后情况作为因变量进行赋值(预后良好=0，预后不良=1)，进行多因素Logistic回归分析，结果显示低分化程度、T3~4期、N2~3期及CTLA-4、LAG-3、PD-1高表达均是胃癌患者近期预后不良的危险因素，术后辅助化疗是其保护因素(P<0.05)，见表4。

表1 癌组织、癌旁组织CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1表达比较(%)

组别	例数	CTLA-4	LAG-3	PD-1
癌组织	215	6.45±2.03	9.24±2.61	41.54±12.31
癌旁正常组织	215	3.27±1.02	6.28±2.01	26.48±8.35
t		20.524	13.175	14.845
P		<0.001	<0.001	<0.001

表2 胃癌患者不同临床病理学特征CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1表达比较(%)

临床病理特征	n	CTLA-4	t	P	LAG-3	t	P	PD-1	t	P
性别										
女	76	6.23±1.96	1.139	0.256	9.05±2.58	0.744	0.458	40.18±10.63	1.230	0.220
男	139	6.57±2.16			9.34±2.81			42.28±12.64		
年龄(岁)										
<60	127	6.28±2.05	1.525	0.129	9.08±2.27	1.199	0.232	40.79±10.34	1.176	0.241
≥60	88	6.70±1.89			9.47±2.45			42.62±12.38		
肿瘤最大直径(cm)										
<5	106	6.19±1.78	1.897	0.059	8.95±2.45	1.580	0.116	40.06±10.17	1.835	0.068
≥5	109	6.70±2.14			9.52±2.82			42.98±12.95		
肿瘤部位										
贲门	54	6.23±1.97	0.640	0.590	8.98±2.08	0.550	0.649	40.86±10.23	1.256	0.290
胃体	69	6.34±2.05			9.17±2.15			39.93±10.05		
胃窦	40	6.56±2.13			9.48±2.39			42.67±11.84		
胃底	52	6.74±2.19			9.42±2.23			43.51±12.28		
分化程度										
低分化	111	6.86±2.21	3.120	0.002	9.73±2.71	3.072	0.002	43.95±12.94	3.066	0.002
中/高分化	104	6.01±1.74			8.72±2.04			38.97±10.68		
T分期										
T1~2期	71	6.17±2.04	1.388	0.167	8.86±2.31	1.571	0.118	40.12±10.04	1.293	0.197
T3~4期	144	6.59±2.11			9.43±2.59			42.24±11.88		
N分期										
N0~1	79	5.85±1.76	3.201	0.002	8.52±2.37	3.135	0.002	37.37±10.67	3.707	<0.001
N2~3	136	6.80±2.27			9.66±2.68			43.96±13.54		

表3 预后良好组和预后不良组胃癌患者单因素分析

临床病理特征	预后不良组(n=59)	预后良好组(n=156)	χ^2/t	P
性别				
女	26(44.07)	50(32.05)	2.705	0.100
男	33(55.93)	106(67.95)		
年龄(岁)				
<60	30(50.85)	97(62.18)	2.274	0.132
≥60	29(49.15)	59(37.82)		
肿瘤最大直径(cm)				
<5	35(59.32)	71(45.51)	3.266	0.071
≥5	24(40.68)	85(54.49)		
肿瘤部位				
贲门	17(28.81)	37(23.72)	3.791	0.435
胃体	23(38.98)	46(29.49)		
胃窦	8(13.56)	32(20.51)		
胃底	11(18.64)	41(26.28)		
分化程度				
低分化	41(69.49)	70(44.87)	10.390	0.001
中/高分化	18(30.51)	86(55.13)		
T分期				
T1~2期	11(18.64)	60(38.46)	7.601	0.006
T3~4期	48(81.36)	96(61.54)		
N分期				
N0~1	47(79.66)	89(57.05)	9.415	0.002
N2~3	12(20.34)	67(42.95)		
术后辅助化疗				
是	34(57.63)	119(76.28)	7.260	0.007
否	25(42.37)	37(23.72)		
CTLA-4(%)	7.03±2.29	6.23±1.74	2.747	0.007
LAG-3(%)	10.03±2.73	8.94±2.31	2.933	0.004
PD-1(%)	45.63±13.48	39.99±10.35	3.269	0.001

表4 多因素Logistic回归分析

影响因素	β	SE	Wald	P	OR	95%CI
分化程度	1.262	0.398	10.054	<0.001	3.532	1.619~7.707
T分期	0.938	0.317	8.756	0.008	2.555	1.373~4.756
N分期	1.093	0.356	9.426	0.001	2.983	1.485~5.994
术后辅助化疗	-0.526	0.203	6.714	0.029	0.591	0.397~0.880
CTLA-4	0.849	0.299	8.063	0.010	2.337	1.301~4.200
LAG-3	0.615	0.204	9.088	0.002	1.850	1.240~2.759
PD-1	0.483	0.148	10.651	<0.001	1.621	1.213~2.166

3 讨论

胃癌患者术后易复发,本研究结果显示,术后1年内胃癌患者的预后不良发生率为27.44%,高于高振等^[9]报道的23.01%,低于谢兴旺等^[10]报道的31.20%,可能与胃癌患者病情、治疗略有差异有关,但本研究与上述文献均表明胃癌患者近期预后不良的发生率较高。因此,临床需寻求与胃癌患者病情及预后相关的生物标志物,以期临床靶向治疗提供新思路。

本研究结果显示,胃癌患者癌组织CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1表达均高于癌旁正常组织,低分化程度、N2~3期胃癌患者CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1表达均高于中/高分化程度、N0~1期胃癌患者,表明胃癌患者CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1表达上调,且与分化程度、N分期临床病理特征密切相关。CD4+T细胞活化是通过不同的负性和正性刺激信号形成的,其中CTLA-4、LAG-3、PD-1在信号通路抑制增殖和活化中起负性调控作用,导致CD4+T细胞分泌、增殖等功能受损和高度抑制,降低其缩小、清除原发病灶和阻碍肿瘤浸润转移功能,促进癌细胞免疫逃逸^[11],参与肿瘤恶性进行过程,促进肿瘤侵袭和迁移。既往研究报道^[12-14],CTLA-4、LAG-3、PD-1表达与鼻咽癌、上皮性卵巢癌、肺癌患者临床分期、淋巴结转移等临床病理特征密切相关。本研究

结果与上述报道观点一致,共同表明CTLA-4、LAG-3、PD-1表达与肿瘤患者临床病理学特征相关。

本研究结果还显示,预后不良组CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1表达均高于预后良好组,且经多因素Logistic分析显示,CTLA-4、LAG-3、PD-1高表达均是胃癌患者近期预后不良的危险因素。CTLA-4可与B7分子结合抑制T细胞的活化和增殖,还可通过抑制白细胞介素-2生成等多种生物途径减少CD4+T淋巴细胞数量,改变肿瘤免疫微环境活化与抑制的平衡,使肿瘤逃避免疫系统监控,导致肿瘤复发^[15-16]。LAG-3可与配体MHC-II类分子结合,发挥抑制T淋巴细胞成熟、增殖、分化的临床作用,促进癌细胞的增殖与转移^[17],增加肿瘤复发几率。另外,LAG-3还可直接抑制T淋巴细胞,促进Treg细胞活化增殖,调节APC细胞功能,发挥免疫抑制性,导致癌细胞发生免疫逃逸^[18],导致肿瘤复发。PD-1通过胞外区IgV结构域与程序性细胞死亡蛋白配体结合,向T细胞传递抑制性信号,使T淋巴细胞免疫失活,诱导T细胞凋亡和失活效应细胞,起到抑制抗肿瘤免疫的作用,增加肿瘤复发风险。既往研究报道^[19],PD-1 CD8+T细胞与胃癌患者预后密切相关,本研究结果与其相符。

另外,多因素Logistic回归分析结果还显示,低分化程度、T3~4期、N2~3期均是胃癌患者近期预后不良的危险因素,术后辅助化疗是其保护因素。T、N分期越高,病理分化程度越低,表明患者癌症恶性程度较高,病情越严重,增加手术风险,影响治疗效果,从而导致患者预后不良^[20]。术后辅助化疗可有效调节机体功能,最大限度清除手术未切除病灶,减少术后感染,促进伤口愈合,明显延长患者生存期,减少术后复发。

综上所述,CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1在胃癌组织均高表达,与分化程度、N分期密切相关,且CD4+T细胞表面CTLA-4、LAG-3、PD-1高表达均是胃癌患者近期预后不良的危险因素,有望成为评估胃癌预后的免疫指标和治疗胃癌的潜在治疗免疫靶点。

参考文献

- [1]Wang C, Shi M, Ji J, et al. Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) facilitates the growth and anti-ferroptosis of gastric cancer cells and predicts poor prognosis of gastric cancer [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12 (15): 15374-15391.
- [2]Chen S, Wei Y, Liu H, et al. Analysis of collagen type X alpha 1 (COL10A1) expression and prognostic significance in gastric cancer based on bioinformatics [J]. Bioengineered, 2021, 12 (1): 127-137.
- [3]Rao X, Zhang C, Luo H, et al. Targeting gastric cancer stem cells to enhance treatment response [J]. Cells, 2022, 11 (18): 2828.
- [4]赵婷, 赵卿, 刘茜, 等. 肿瘤免疫治疗联合心理干预对进展期胃癌患者的疗效及免疫功能、心理状态和自我效能感的影响[J]. 贵州医药, 2022, 46 (12): 2015-2016.
- [5]Oh DY, Kwek SS, Raju SS, et al. Intratumoral CD4+ T cells mediate anti-tumor cytotoxicity in Human bladder cancer [J]. Cell, 2020, 181 (7): 1612-1625.
- [6]Yang X, Wu W, Pan Y, et al. Immune-related genes in tumor-specific CD4+ and CD8+ T cells in colon cancer [J]. BMC Cancer, 2020, 20 (1): 585.
- [7]Shi X, Li CW, Tan LC, et al. Immune co-inhibitory receptors PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, and TIGIT in medullary thyroid cancers: a large cohort study [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2021, 106 (1): 120-132.
- [8]Mollavelioglu B, Cetin Aktas E, Cabioglu N, et al. High co-expression of immune checkpoint receptors PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, and TIGIT on tumor-infiltrating lymphocytes in early-stage breast cancer [J]. World J Surg Oncol, 2022, 20 (1): 349.
- [9]高振, 林剑鹏, 王永锋, 等. 胃癌组织TIP30、KAI-1蛋白表达与胃癌根治术后复发的关系分析[J]. 检验医学与临床, 2023, 20 (4): 433-437.
- [10]谢兴旺, 周红见, 蒋斌, 等. miRNA-126-3p与胃癌术后复发的关系[J]. 武汉大学学报(医学版), 2022, 43 (6): 947-951.
- [11]Gaikwad S, Agrawal MY, Kaushik I, et al. Immune checkpoint proteins: signaling mechanisms and molecular interactions in cancer immunotherapy [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86 (Pt 3): 137-150.
- [12]Ahmed MM, Gabriel MG, Morad EA, et al. Expression of immune checkpoint regulators, cytotoxic t-lymphocyte antigen-4, and programmed death-Ligand 1 in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma [J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2021, 29 (6): 401-408.
- [13]朱元媛, 同洪超, 刘永利, 等. BTLA、LAG3和TIM3在上皮性卵巢癌组织中的表达意义[J]. 实用医学杂志, 2019, 35 (5): 698-702.
- [14]孔明, 陈雯, 刘坤坤, 等. PD-1、PD-L1的表达与肺癌临床病理特征及预后的相关性分析[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20 (15): 2904-2909.
- [15]马晓天. 共信号分子功能及其在肿瘤治疗中的应用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28 (12): 1219-1226.
- [16]张国桥, 彭浩, 曹蓉. PDCD1和PD-L1及CTLA-4基因联合检测非小细胞肺癌预后评估[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2021, 28 (4): 280-285.
- [17]Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki IM, et al. Binding of LAG-3 to stable peptide-MHC class II limits T cell function and suppresses autoimmunity and anti-cancer immunity [J]. Immunity, 2022, 55 (5): 912-924.
- [18]Sung E, Ko M, Won JY, et al. LAG-3xPD-L1 bispecific antibody potentiates antitumor responses of T cells through dendritic cell activation [J]. Mol Ther, 2022, 30 (8): 2800-2816.
- [19]Yu K, Gu Y, Zhang P, et al. Intratumoral PD-1+CD8+ T cells associate poor clinical outcomes and adjuvant chemotherapeutic benefit in gastric cancer [J]. Br J Cancer, 2022, 127 (9): 1709-1717.
- [20]李刚刚, 孙继锋, 张成武, 等. 早期胃癌淋巴结转移危险因素及预后分析[J]. 中华普通外科杂志, 2021, 36 (10): 734-738.

(收稿日期: 2023-09-25) (校对编辑: 赵望淇)