

网络出版时间: 2020-9-4 09:35 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200903.1449.023.html>

恶性实体肿瘤患者外周血 T 细胞 中 PD-1、LAG-3、TIM-3 的表达情况

袁 园^{1,2}, 陈继中², 朱亦林², 张 盛², 韩兴华¹, 潘跃银¹

摘要 目的 探究恶性实体肿瘤患者淋巴细胞亚群及 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞上免疫检查点分子 PD-1、LAG-3、TIM-3 的表达情况。方法 使用流式细胞术(FCM)对 30 例恶性实体肿瘤患者和 15 例健康对照者外周血 CD3⁺细胞、CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、CD4/CD8 比值、B 细胞、NK 细胞及其免疫检查点 PD-1、LAG-3、TIM-3 的表达比例进行检测;同时对肿瘤患者淋巴细胞亚群及免疫检查点表达比例进行相关性分析。结果 与健康对照者相比,肿瘤患者外周血 CD3⁺细胞比例升高,CD3⁺T 细胞比例降低,但差异无统计学意义;肿瘤患者与健康对照相比,CD4⁺T 细胞比例(57.64% ± 15.52%) vs (54.69% ± 11.33%)、CD8⁺T 细胞比例(34.03% ± 14.27%) vs (31.13% ± 9.97%)、CD4/CD8 比值 1.94(0.96~2.68) vs 1.85(1.30~2.67)、B 细胞比例 5.90%(3.09%~10.69%) vs 7.63%(6.67%~10.85%)、差异均无统计学意义,但 NK 细胞比例 8.61%(5.58%~16.15%) vs 21.96%(12.84%~36.47%)降低;肿瘤患者 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞上免疫检查点分子 PD-1、LAG-3、TIM-3 的表达比例高于健康对照者,双阳耗竭 CD4⁺T 比例增加,双阳耗竭 CD8⁺T 比例差异无统计学意义;肿瘤患者 CD4⁺T 细胞比例与 PD-1⁺CD4⁺T 细胞、双阳耗竭 CD4⁺T 细胞比例均呈负相关性。结论 恶性实体肿瘤患者外周血部分淋巴细胞比例紊乱,负性免疫检查点分子高表达、共表达,耗竭 T 细胞比例升高,对细胞免疫进行负性调控。免疫检查点分子的协同作用可能参与了肿瘤的发生发展。肿瘤患者免疫检查点抑制剂单药治疗无效的患者,多靶点联合治疗可能会取得更好的效果。

关键词 肿瘤;免疫治疗;耗竭 T 细胞;PD-1;LAG-3;TIM-3
中图分类号 R 730.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)10-1597-09
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.024

2020-07-10 接收

基金项目 安徽省自然科学基金项目(编号:1908085MH260);安徽省科技计划项目(编号:1704a0802148);安徽省重点研究与开发计划项目(编号:1804h08020259)

作者单位:¹安徽医科大学附属省立医院肿瘤科,合肥 230022

²铜陵市人民医院输血科,铜陵 244000

作者简介:袁 园,男,主管检验师,住院医师,硕士研究生;

潘跃银,男,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: yu-eyinpan@gmail.com

免疫治疗是肿瘤治疗学中继手术、化疗、放疗之后另一个重要的发展突破口。第一代免疫检查点细胞毒性 T 淋巴细胞相关分子 4(cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4,CTLA-4)、程序性细胞死亡受体-1(programmed cell death receptor-1,PD-1)、程序性细胞死亡配体-1(programmed cell death ligand-1,PD-L1)的抑制剂已经成为部分晚期肿瘤的治疗策略,然而这些药物仅在少数患者(20%左右)中有效^[1],这可能与肿瘤细胞利用了其他抑制性通路来逃逸免疫攻击有关。除 CTLA-4 和 PD-1/PD-L1 之外,新兴免疫检查点分子如淋巴细胞活化基因 3(lymphocyte activation gene-3,LAG-3)、T 细胞免疫球蛋白黏蛋白 3(T cell immunoglobulin and mucin domain-3,TIM-3)、具有 Ig 和 ITIM 结构域的 T 细胞免疫受体(T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains,TIGIT)等不断涌现^[2]。该研究对恶性实体肿瘤患者外周血淋巴细胞亚群及 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞上免疫检查点 PD-1、LAG-3、TIM-3 的表达水平进行探究,以期对恶性肿瘤患者的多靶点联合免疫治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2019 年 1~12 月在铜陵市人民医院住院治疗的恶性实体肿瘤患者 30 例,其中男 16 例,女 14 例,年龄范围 47~93 岁,中位年龄 67(58,74)岁。入组标准:所有患者均经组织病理学确认为恶性实体肿瘤,排除血液系统肿瘤,患者无自身免疫性疾病,近期末进行放疗或化疗,近期末无严重病毒、细菌等病原体感染。另选取 15 例该院体检中心的健康体检者做为健康对照组,其中男 8 例,女 7 例,年龄范围 43~82 岁,中位年龄 66(56,78)岁,年龄、性别等一般资料与患者组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 样本来源 肿瘤患者和健康体检者按照常规诊疗需要,于清晨空腹状态用 EDTA-K₂ 真空采血管采集静脉血 2~3 ml。待常规检测完成后,利用剩余

血样标本进行本研究的检测。不再单独采集患者和健康对照者血标本。

1.3 主要仪器和试剂

1.3.1 主要仪器 Dx FLEX 流式细胞仪(贝克曼库尔特生物科技有限公司); TL80-2 型医用离心机(江苏天力医疗器械有限公司); QL-901 Vortex 涡旋振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 微量移液器(德国 Eppendorf 公司); IKA 移液器(艾卡广州仪器设备有限公司); BCD-465F 冰箱(广东海信科龙电器股份有限公司); CytExpert 流式分析软件(贝克曼库尔特生物科技有限公司)。

1.3.2 试剂耗材 Mouse Anti-Human CD3 APC-CyTM7 SK7、CD4 APC-R700 RPA-T4、CD8 RPA-T8 BB515、CD56 APC B159、CD279 (PD-1) PE-Cy7 EH12.1、CD223 (LAG-3) PE-CF594 T47-530、CD366 (TIM-3) PE 7D3 均购自美国 BD Biosciences 公司; CD19 Monoclonal Antibody (SJ25C1) PerCP-eFluor 710、Flow Cytometry Staining Buffer 均购自美国赛默飞世尔公司; 荧光单克隆抗体试剂盒、血细胞分析用溶血剂均购自北京同生时代生物技术公司; Coulter Clenz Cleaning Agent 购自贝克曼库尔特(苏州)公司; EDTA-K₂ 真空采血管、流式细胞术专用试管均购自浙江拱东医疗器械有限公司。

1.4 实验方法 运用流式细胞术(flow cytometry, FCM)进行检测: ① 配制 1 × 血细胞分析用溶血剂工作液: 将试剂盒内 10 × 血细胞分析用溶血剂浓缩液取出, 按照当天的样本数量计算(1 ml/管)用量。使用去离子水将浓缩液按照 1:10 稀释成 1 × 血细胞分析用溶血剂工作液, 平衡至室温。② 在流式细胞术专用试管底部加入抗人 CD3(5 μl)、CD4(5 μl)、CD8(5 μl)、CD19(5 μl)、CD56(20 μl)、PD-1(5 μl)、LAG-3(5 μl)和 TIM-3(5 μl)荧光标记的单克隆抗体, 对照管中加入等量阴性对照抗体。③ 充分颠倒混匀 EDTA-K₂ 抗凝的全血。为了保证吸样准确, 使用反向移液技术吸取 100 μl 抗凝全血, 轻轻加入试管底部, 注意避免血液碰触到试管上壁。④ 使用涡旋振荡器, 轻轻涡旋混匀已加入荧光抗体的样本, 20~25 °C 下避光孵育 20 min。⑤ 向荧光抗体样本管中加入 1 × 血细胞分析用溶血剂工作液 1 ml, 使用涡旋振荡器轻柔涡旋混匀, 室温避光孵育 15 min。⑥ 使用移液器向荧光抗体样本管中加入细胞染色缓冲液 1 ml 洗涤, 使用离心机 1 500 r/min

离心 5 min。⑦ 手持流式管, 倾倒入上清液, 然后果断回正, 切勿二次倾倒导致细胞丢失。此时流式管底部应剩余约 200 μl 液体, 涡旋振荡器涡旋混匀。⑧ 重复步骤⑥、⑦。⑨ 向流式样本管加入 500 μl 细胞染色缓冲液, 涡旋振荡器重悬, 上流式细胞仪检测。淋巴门内至少收集 10 000 个细胞, 保存数据。使用 CytExpert 流式分析软件设门分析样本中 CD3⁺、CD3⁺T、CD4⁺T、CD8⁺T、CD4/CD8、B 细胞、NK 细胞以及 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞上的免疫检查点分子 PD-1、LAG-3、TIM-3 的表达情况。

1.5 统计学处理 使用 IBM[®] SPSS[®] 22 统计软件进行分析, 使用 GraphPad Prism 8 软件绘图。符合正态性分布和方差齐性的计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验。若不符合正态分布或方差齐性, 计量资料采用中位数和四分位数间距 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, 两组之间比较采用 Mann-Whitney U 检验。根据双变量是否呈正态性分布采用 Pearson 或 Spearman 相关性分析; 以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤组和对照组外周血 CD3⁺、CD3⁺T 细胞的表达比例 恶性肿瘤患者外周血 CD3⁺ 细胞比例 (59.55% ± 21.09%), 与健康对照组 (53.07% ± 10.43%) 相比有所升高, 但差异无统计学意义 ($t = -1.378, P > 0.05$); 恶性肿瘤患者外周血 CD3⁺T 细胞比例 (40.09% ± 21.18%), 与健康对照组 (46.78% ± 10.39%) 比较有所降低, 但差异无统计学意义 ($t = 1.422, P > 0.05$); 代表性流式图见图 1。

2.2 肿瘤组和对照组外周血 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞的表达比例及 CD4/CD8 比值 恶性肿瘤患者外周血 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞比例 (57.64% ± 15.52%)、(34.03% ± 14.27%), 与健康对照组 (54.69% ± 11.33%)、(31.13% ± 9.97%) 比例接近, 差异均无统计学意义 ($t = -0.654, -0.704, P > 0.05$); 恶性肿瘤患者外周血 CD4/CD8 比值 1.94 (0.96~2.68), 与健康对照组比值 1.85 (1.30~2.67) 相比变化不大, 差异无统计学意义 ($Z = -0.120, P > 0.05$); 流式代表图及统计见图 2。

2.3 肿瘤组和对照组外周血 B 细胞、NK 细胞的表达比例 恶性肿瘤患者外周血 B 细胞比例 5.90% (3.09%~10.69%), 与健康对照组 7.63% (6.67%~10.85%) 相比有所降低, 但差异无统计学意义 ($Z =$

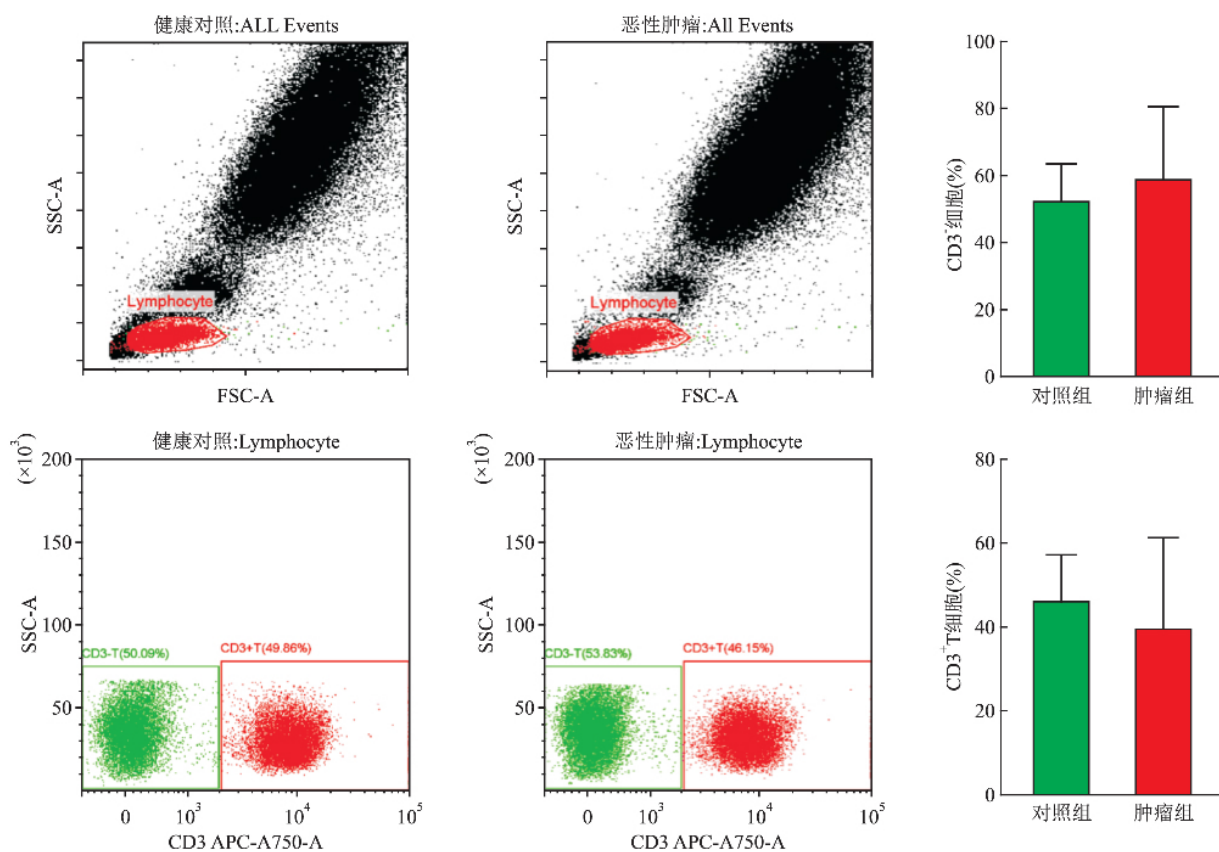


图1 肿瘤组和对照组外周血 CD3⁻、CD3⁺ T 细胞的表达情况

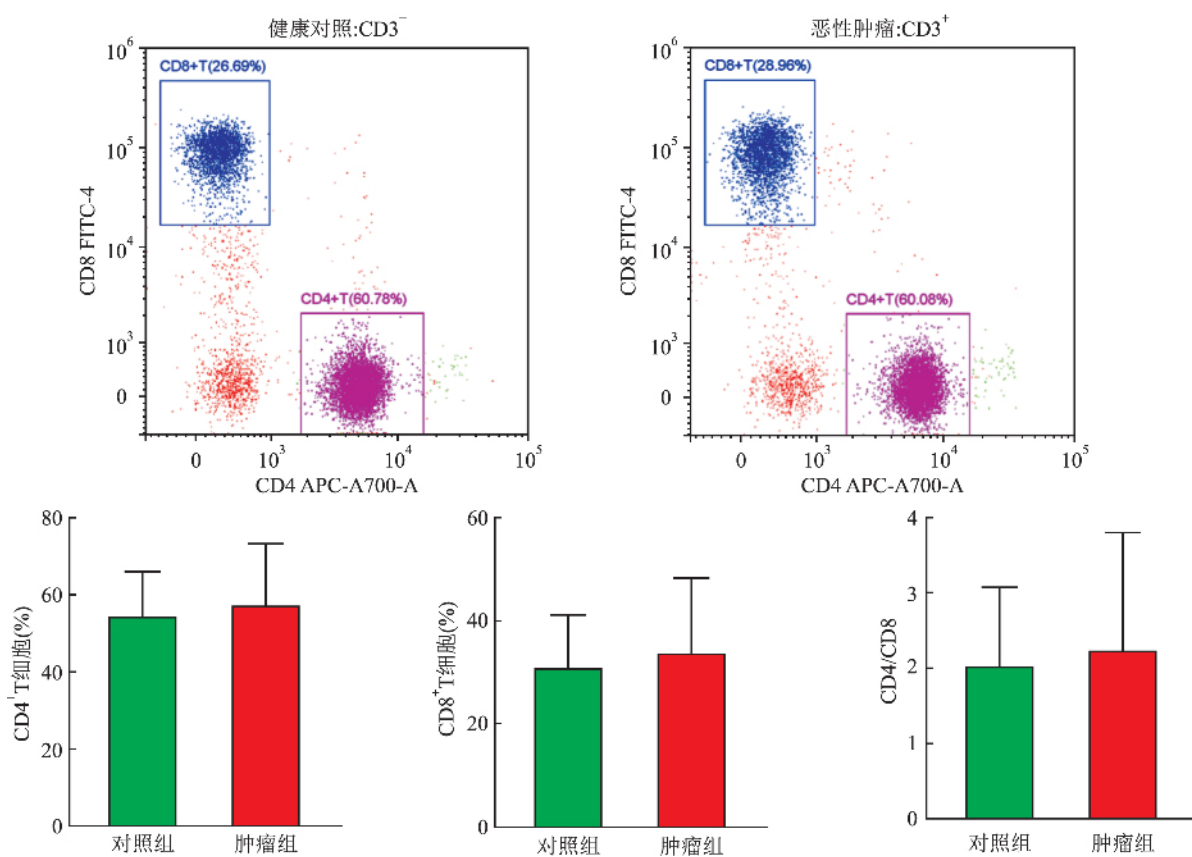


图2 肿瘤组和对照组外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的表达和 CD4/CD8 比值情况

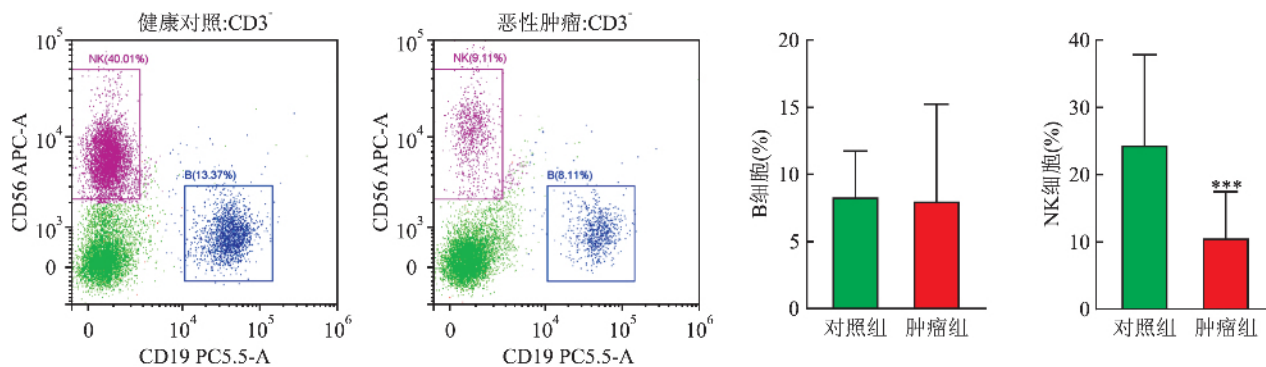


图3 肿瘤组和对照组外周血B细胞、NK细胞的表达情况

与对照组比较: *** $P < 0.001$

-1.156 $P > 0.05$); 恶性肿瘤患者外周血NK细胞比例8.61% (5.58% , 16.15%) , 与健康对照组21.96% (12.84% , 36.47%) 相比降低, 差异有统计学意义 ($Z = -3.539$, $P < 0.001$); 流式代表图及统计见图3。

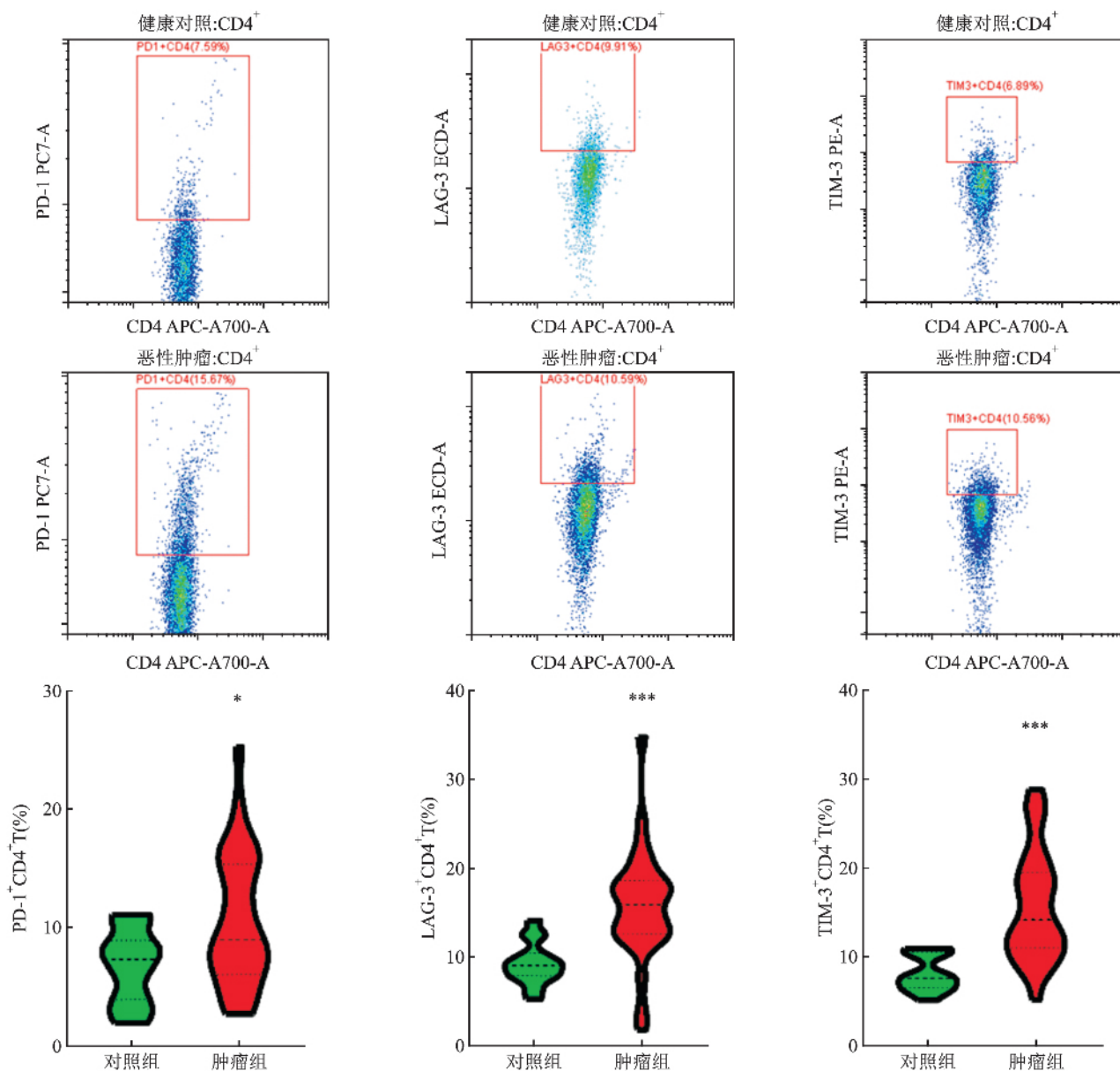
2.4 肿瘤组和对照组外周血CD4⁺T细胞免疫检查点PD-1、LAG-3、TIM-3的表达情况 恶性肿瘤患者外周血PD-1⁺CD4⁺T细胞比例8.96% (6.06% , 15.34%) , 与健康对照组7.34% (3.94% , 8.94%) 相比增高, 差异有统计学意义 ($Z = -2.119$, $P < 0.05$); 恶性肿瘤患者外周血LAG-3⁺CD4⁺T细胞比例15.92% (12.61% , 18.64%) , 与健康对照组9.11% (7.93% , 10.46%) 相比增高, 差异有统计学意义 ($Z = -4.021$, $P < 0.001$); 恶性肿瘤患者外周血TIM-3⁺CD4⁺T细胞比例14.18% (11.01% , 19.50%) , 与健康对照组7.64% (6.51% , 10.55%) 相比增高, 差异有统计学意义 ($Z = -4.466$, $P < 0.001$); 代表性流式图见图4。

2.5 肿瘤组和对照组外周血CD8⁺T细胞免疫检查点PD-1、LAG-3、TIM-3的表达情况 恶性肿瘤患者外周血PD-1⁺CD8⁺T细胞比例10.07% (8.49% , 12.88%) , 与健康对照组6.71% (5.10% , 9.31%) 相比增高, 差异有统计学意义 ($Z = -3.070$, $P < 0.01$); 恶性肿瘤患者外周血LAG-3⁺CD8⁺T细胞比例17.64% (14.27% , 20.74%) , 与健康对照组4.09% (2.52% , 12.41%) 相比增高, 差异有统计学意义 ($Z = -3.852$, $P < 0.001$); 恶性肿瘤患者外周血TIM-3⁺CD8⁺T细胞比例18.66% (9.09% , 23.59%) , 与健康对照组6.60% (5.01% , 12.87%) 相比增高, 差异有统计学意义 ($Z =$

-2.576 $P < 0.01$); 流式代表图及统计见图5。

2.6 肿瘤组和对照组外周血双阳耗竭CD4⁺T、双阳耗竭CD8⁺T细胞的表达情况 双阳耗竭CD4⁺T、双阳耗竭CD8⁺T细胞, 即PD-1、LAG-3、TIM-3中两个分子阳性的CD4⁺T和CD8⁺T细胞, 它们往往代表着T细胞功能高度抑制, 进一步失去活性。恶性肿瘤患者外周血PD-1⁺LAG-3⁺CD4⁺T细胞比例3.03% (1.02% , 6.79%) , 与健康对照组2.10% (1.52% , 2.67%) 相比增高, 差异有统计学意义 ($t = 2.898$, $P < 0.01$); 恶性肿瘤患者外周血PD-1⁺TIM-3⁺CD4⁺T细胞比例2.12% (1.24% , 5.58%) , 与健康对照组1.11% (0.73% , 1.24%) 相比增高, 差异有统计学意义 ($t = 4.389$, $P < 0.001$); 恶性肿瘤患者外周血LAG-3⁺TIM-3⁺CD4⁺T细胞比例2.98% (0.59% , 8.19%) , 与健康对照组1.28% (0.80% , 1.54%) 相比增高, 差异有统计学意义 ($t = 3.207$, $P < 0.01$); 三种表型的双阳耗竭CD8⁺T在肿瘤组与健康组中的比例接近, 差异均无统计学意义。双阳耗竭CD4⁺T细胞流式代表图及统计见图6。

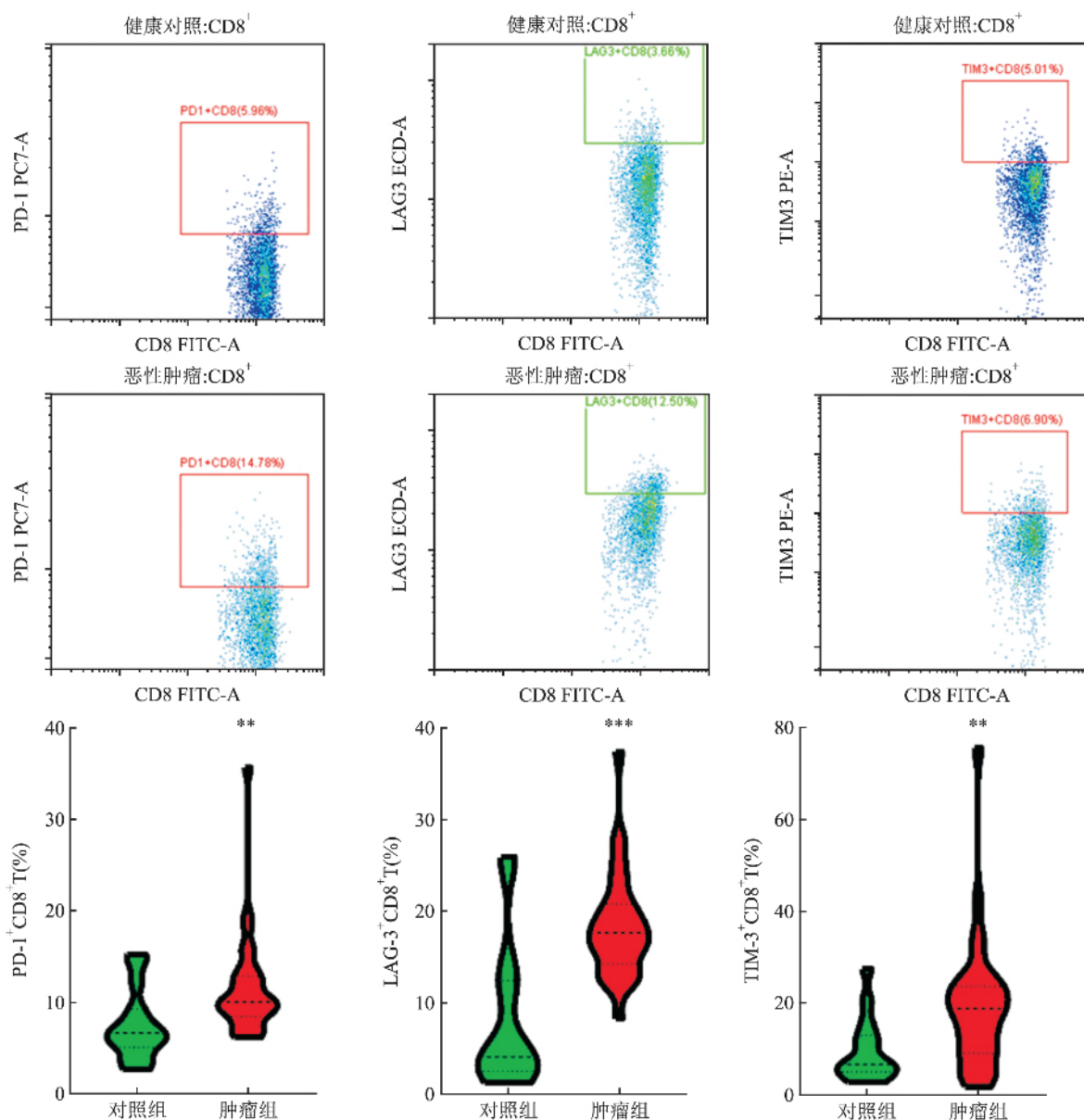
2.7 恶性肿瘤患者外周血CD4⁺T、CD8⁺T细胞及其免疫检查点分子PD-1、LAG-3、TIM-3的相关性分析 恶性肿瘤患者外周血CD4⁺T细胞与PD-1⁺CD4⁺T细胞比例之间采用Pearson相关性分析, 其余均采用Spearman相关性分析。肿瘤患者CD4⁺T细胞比例与PD-1⁺CD4⁺T ($r = -0.506$, $P = 0.004$)、PD-1⁺LAG-3⁺CD4⁺T ($r = -0.606$, $P < 0.001$)、PD-1⁺TIM-3⁺CD4⁺T ($r = -0.516$, $P = 0.004$)、LAG-3⁺TIM-3⁺CD4⁺T ($r = -0.581$, $P < 0.001$) 细胞比例之间均呈负相关性, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。CD8⁺T细胞与各检查点阳性亚群之间均无相关性

图4 肿瘤组和对照组外周血 CD4⁺ T 细胞免疫检查点 PD-1、LAG-3、TIM-3 的表达情况与对照组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ ($P > 0.05$)。见图 7。

3 讨论

T 淋巴细胞以膜标志的不同划分出不同的亚群, CD3 分子在抗原识别中起着信号传递的重要作用, 一般仅存在于 T 细胞表面; CD4⁺ T 细胞主要通过细胞因子的作用调节 T 细胞的亚群分化和 B 细胞的抗体分泌; CD8⁺ T 细胞则通过细胞毒性作用, 直接杀伤或抑制肿瘤细胞, CD4/CD8 比例稳定对机体免疫稳态具有重要意义^[3]。本研究恶性肿瘤患者与健康对照组相比, 外周血中 CD3⁺ 细胞比

例有升高趋势, CD3⁺ T 细胞、B 细胞比例均呈降低趋势, 而 CD4⁺ T 比例、CD8⁺ T 细胞比例及 CD4/CD8 比值均与健康对照组相接近。由此提示恶性肿瘤患者的 T、B 淋巴细胞活化可能受到抑制, 而免疫功能低下与 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞比例的关系不明确, 是否与细胞数量和亚群有关尚待进一步研究; NK 细胞因其固有表达的受体可无需致敏直接识别并杀伤肿瘤细胞, 是非常重要的固有免疫细胞。本研究中肿瘤患者的 NK 细胞的表达比例降低, 这可能导致患者的固有免疫系统对肿瘤细胞的杀伤能力降低, 造成肿瘤的发生和逃逸^[4]。

图5 肿瘤组和对照组外周血 CD8⁺ T 细胞免疫检查点 PD-1、LAG-3、TIM-3 的表达情况与对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

PD-1 是重要的抑制性免疫检查点分子,主要表达于活化的 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B 细胞、自然杀伤细胞、单核巨噬细胞和 DC 细胞表面,其配体为 PD-L1 和 PD-L2; PD-1 与配体结合后通过多种途径抑制 T、B、NK 细胞活化信号和细胞因子的释放^[5]。本研究检测了 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞上 PD-1 分子的表达率,结果显示恶性肿瘤患者与健康对照组比较外周血 PD-1⁺ CD4⁺ T、PD-1⁺ CD8⁺ T 细胞比例均升高,提示肿瘤患者的 T 淋巴细胞功能高度抑制,抗肿瘤免疫功能低下。

LAG-3 是近年来新发现的一种负性免疫检查点

分子,与 CD4 在分子结构上很相似,配体为 MHC-II 分子,主要表达在活化或耗竭 T 细胞、NK 等细胞上^[6]; LAG-3 主要通过直接抑制 T 淋巴细胞,促进 Treg 细胞活化增殖,调节 APC 细胞的功能等方式来发挥免疫抑制性^[7]。本研究发现 LAG-3 不仅可以在肿瘤患者 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞上高表达,提示 LAG-3 可能参与了抗肿瘤免疫抑制,而且 CD8⁺ T 细胞上的表达率高于 CD4⁺ T 细胞。Shapiro et al^[8] 在慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)患者淋巴结中发现 CD8⁺ T 和 CD4⁺ T 均高表达 LAG-3,且 LAG-3⁺ CD8⁺ T 的比例高于 LAG-3⁺

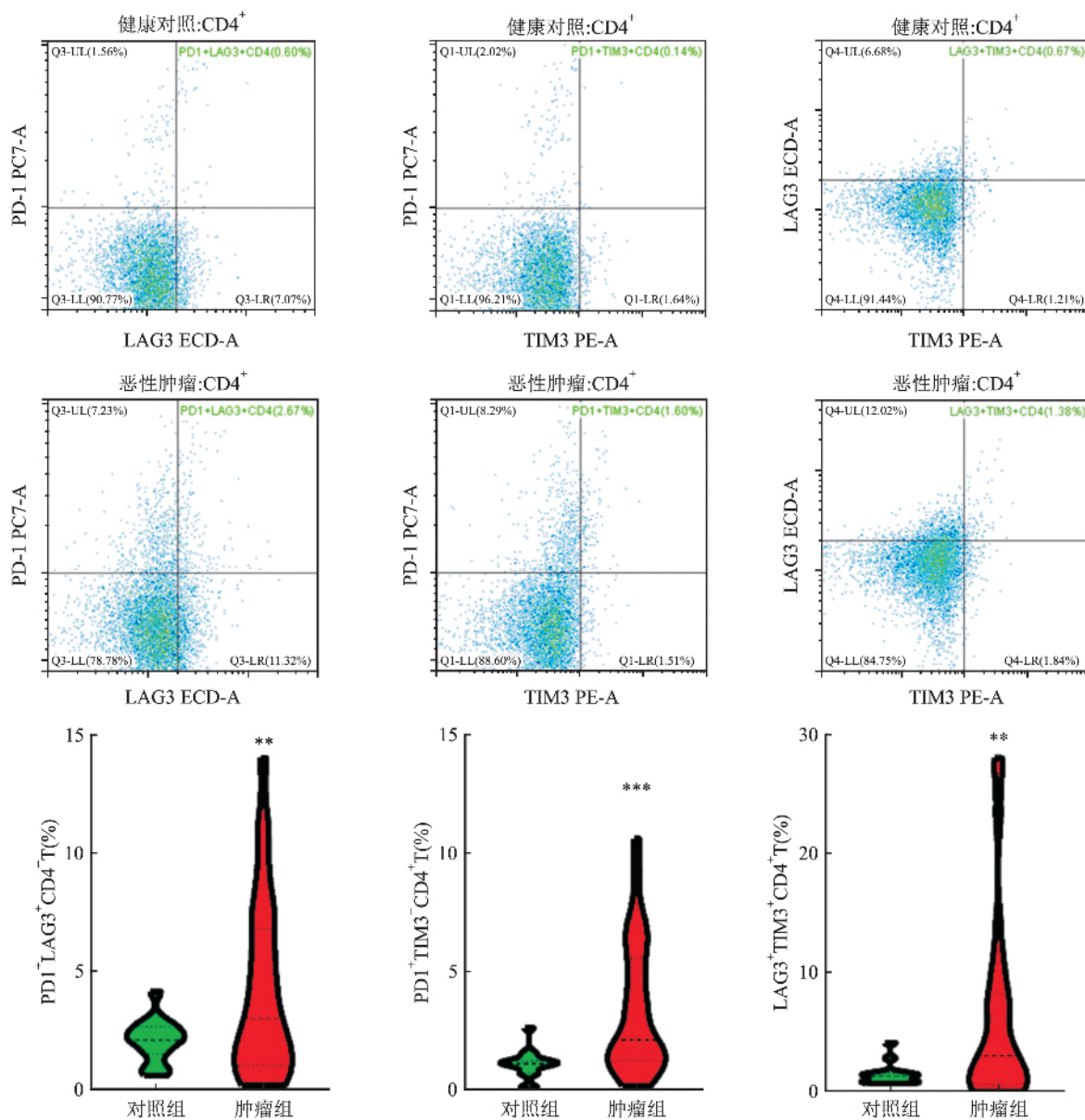


图6 肿瘤组和对照组外周血双阳耗竭 CD4⁺ T 细胞的表达情况
与对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

CD4⁺ T 的比例,本研究结果与之具有一致性。

TIM-3 是一种在 T 淋巴细胞、单核巨噬细胞、Treg 细胞、NK 细胞及肿瘤细胞中均可表达的负性免疫检查点分子, TIM-3 与配体结合可诱导 T 淋巴细胞功能耗竭,不能活化且不能分泌细胞因子^[7]。本研究中肿瘤患者 TIM-3 在 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞中的表达率均高于健康对照组,提示 TIM-3 可能通过抑制 T 淋巴细胞亚群导致肿瘤发生发展。

受肿瘤或慢性感染影响, T 淋巴细胞多种免疫检查点高表达, 细胞因子产生减少, 细胞毒性和增殖能力受损, 表观基因组学改变的现象称为 T 细胞耗

竭^[9]。本研究进一步研究了恶性肿瘤患者与健康对照组外周血中双阳耗竭 T 细胞的表达情况, 结果显示肿瘤患者的 PD-1⁺ LAG-3⁺ CD4⁺ T、PD-1⁺ TIM-3⁺ CD4⁺ T、LAG-3⁺ TIM-3⁺ CD4⁺ T 细胞比例均高于对照组, 而双阳耗竭 CD8⁺ T 细胞比例差异不大, 提示肿瘤患者 CD4⁺ T 细胞功能进一步耗竭, 免疫活化调节功能较差。动物黑色素瘤研究^[10]表明, 耗竭的 CD4⁺ T 细胞可导致肿瘤复发, 而逆转耗竭 CD4⁺ T 细胞的治疗手段对复发性黑色素瘤非常有效。然而 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞的耗竭机制与表型不完全一致^[11], 这可能是本研究中 CD8⁺ T 细胞与

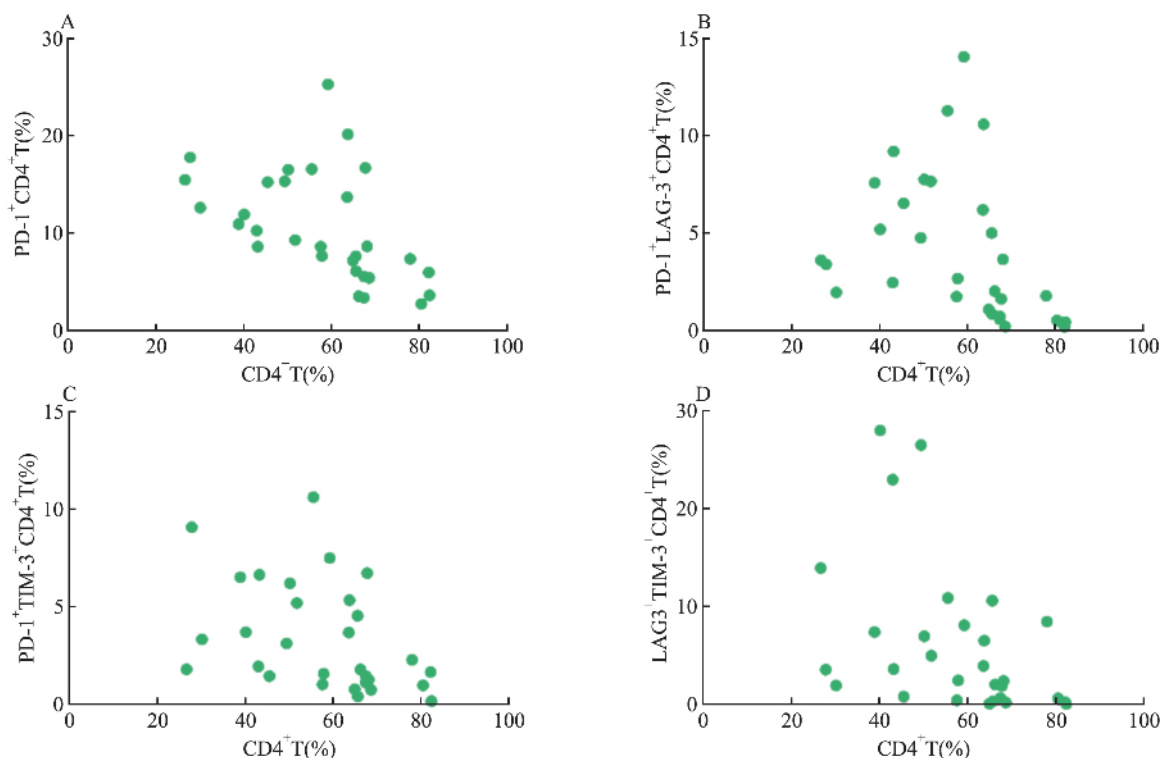


图7 肿瘤患者外周血 CD4⁺T 细胞与 PD-1、LAG-3、TIM-3 阳性亚群之间的相关性

A: 与 PD-1⁺CD4⁺T 细胞比例相关性; B: 与 PD-1⁺LAG-3⁺CD4⁺T 细胞比例相关性; C: 与 PD-1⁺TIM-3⁺CD4⁺T 细胞比例相关性; D: 与 LAG-3⁺TIM-3⁺CD4⁺T 细胞比例相关性

CD4⁺T 细胞未同步呈现双阳耗竭的原因之一,此外也可能与样本量不够大有关。需要引起注意的是,肿瘤患者 TIM-3、PD-1、LAG-3 等负性分子不仅共表达,同时也呈现出此消彼长的趋势,有研究^[12]表明 PD-1 单抗治疗耐药患者的 TIM-3 表达上调。了解肿瘤患者耗竭 T 细胞的分子表型和产生机制,对于更精确的肿瘤免疫治疗策略开发具有重要意义。

本研究对恶性肿瘤组的淋巴细胞亚群及免疫检查点阳性细胞亚群进行了相关性分析,结果显示肿瘤患者 CD4⁺T 细胞比例随着 PD-1⁺CD4⁺T 细胞、双阳耗竭 CD4⁺T 细胞比例的升高而降低,均呈负相关性。提示肿瘤患者 PD-1、LAG-3、TIM-3 高表达与 CD4⁺T 细胞比例降低相关,这进一步印证了免疫检查点分子对 T 淋巴细胞活化增殖的负性调控作用^[5,7]。

综上,本研究表明恶性实体肿瘤患者外周血部分淋巴细胞比例紊乱。负性免疫检查点分子高表达、共表达,耗竭 T 细胞比例升高,对细胞免疫进行负性调控。免疫检查点分子的协同作用可能参与了肿瘤的发生发展,动态监测肿瘤患者淋巴细胞亚群及免疫检查点水平,对临床免疫治疗具有重要价值。

肿瘤患者免疫检查点抑制剂单药治疗无效的患者,多靶点联合治疗可能会取得更好的效果。

参考文献

- [1] Remon J, Chaput N, Planchard D. Predictive biomarkers for programmed death-1/programmed death ligand immune checkpoint inhibitors in nonsmall cell lung cancer[J]. Curr Opin Oncol, 2016, 28(2): 122-9.
- [2] Marin-Acevedo J A, Dholaria B, Soyano A E, et al. Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: New developments and challenges[J]. J Hematol Oncol, 2018, 11(1): 39.
- [3] 张司琪,葛健,夏瑞祥. 急性白血病患者外周血 T 细胞亚群、NK 细胞和调节性 T 细胞的检测及临床意义[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(2): 218-21.
- [4] Oh S, Lee J H, Kwack K et al. Natural killer cell therapy: a new treatment paradigm for solid tumors[J]. Cancers, 2019, 11(10): E1534.
- [5] Boussiotis V A. Molecular and biochemical aspects of the PD-1 checkpoint pathway[J]. N Engl J Med, 2016, 375(18): 1767-78.
- [6] Nguyen L T, Ohashi P S. Clinical blockade of PD1 and LAG3-potential mechanisms of action[J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(1): 45-56.
- [7] Joller N, Kuchroo V K. Tim-3, Lag-3, and TIGIT[J]. Curr Top

- Microbiol Immunol, 2017, 410: 127–56.
- [8] Shapiro M, Herishanu Y, Katz B Z, et al. Lymphocyte activation gene 3-A novel therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Haematologica* 2017, 102(5): 874–82.
- [9] Kurachi M. CD8⁺ T cell exhaustion [J]. *Semin Immunopathol*, 2019, 41(3): 327–37.
- [10] Ostroumov D, Fekete-Drimusz N, Saborowski M, et al. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth [J]. *Cell Mol Life Sci* 2018, 75(4): 689–713.
- [11] Xia A L, Wang J C, Yang K, et al. Genomic and epigenomic perspectives of T-cell exhaustion in cancer [J]. *Brief Funct Genomics* 2019, 18(2): 113–8.
- [12] Romero, Diana. Immunotherapy: PD-1 says goodbye, TIM-3 says hello [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(4): 202–3.

Expression of PD-1, LAG-3 and TIM-3 in peripheral blood T cells of patients with malignant solid tumors

Yuan Yuan^{1,2}, Chen Jizhong², Zhu Yilin², et al

(¹Dept of Oncology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Blood Transfusion, Tongling People's Hospital, Tongling 244000)

Abstract Objective To investigate the expression of lymphocyte subsets, including CD4⁺T and CD8⁺T cells immune checkpoint molecules PD-1, LAG-3 and TIM-3 in patients with malignant solid tumors. **Methods** Flow cytometry (FCM) was used to detect the expression ratios of CD3⁺ cells, CD3⁺T cells, CD4⁺T cells, CD8⁺T cells, CD4/CD8 ratio, B cells, NK cells and their immune checkpoints PD-1, LAG-3 and TIM-3, in peripheral blood of 30 patients with malignant solid tumors and 15 healthy controls. Meanwhile, correlation analysis was performed on lymphocyte subsets and immune checkpoints expression ratios in tumor patients. **Results** Compared with healthy controls, the proportion of CD3⁺ cells in peripheral blood of tumor patients increased and the proportion of CD3⁺T cells decreased, but the difference was not statistically significant. Tumor patients compared with healthy controls, there were no statistically significant differences in CD4⁺T cell ratio (57.64% ± 15.52%) vs (54.69% ± 11.33%), CD8⁺T cell ratio (34.03% ± 14.27%) vs (31.13% ± 9.97%), CD4/CD8 ratio 1.94 (0.96, 2.68) vs 1.85 (1.30, 2.67), B cell ratio 5.90% (3.09%, 10.69%) vs 7.63% (6.67%, 10.85%). However, the proportion of NK cells decreased by 8.61% (5.58%, 16.15%) vs 21.96% (12.84%, 36.47%). The expression rates of immune checkpoint molecules PD-1, LAG-3 and TIM-3 on CD4⁺T, CD8⁺T cells in tumor patients were higher than those in healthy controls, and the proportion of double positive exhausted CD4⁺T increased, but there was no difference in the proportion of double positive exhausted CD8⁺T. The proportion of CD4⁺T cells in tumor patients was negatively correlated with the proportion of PD-1⁺CD4⁺T cells and the proportion of double positive exhausted CD4⁺T cells. **Conclusion** The proportion of peripheral blood lymphocytes in patients with malignant solid tumors is disordered, negative immune checkpoint molecules are highly expressed and co-expressed, and the proportion of exhausted T cells increased, which negatively regulates cellular immunity. Synergistic effects of immune checkpoint molecules may be involved in the development of tumors. Multi-target combination therapy may yield better results in cancer patients whose immuncheckpoint inhibitors have failed single drug therapy.

Key words tumor; immunotherapy; exhausted T cells; PD-1; LAG-3; TIM-3