

CD4⁺CD25⁺调节性T细胞及TGF-β1、IL-10 在结肠癌肺转移患者外周血中的表达^①

江志超¹,周辉²,赵顺利¹

(1. 湖南省第二人民医院,湖南 长沙 410007 E-mail:jiang.zhichao@126.com;

2. 湖南省肿瘤医院,湖南 长沙 410013)

摘要:目的 探讨结肠癌肺转移患者外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞和血清 TGF-β1、IL-10 的临床意义。方法 分别应用流式细胞仪(FCM)、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、酶联免疫吸附测定(ELISA)方法检测结肠癌肺转移患者、健康人外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞占总 CD4⁺调节性 T 细胞的比例、叉头状螺旋转录因子(Foxp3)表达水平和血清转化生长因子 β1(TGF-β1)、白细胞介素 10(IL-10)含量。结果 结肠癌肺转移患者外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞占总 CD4⁺的比例、Foxp3 表达水平及 TGF-β1 及 IL-10 的浓度均明显高于健康人($P < 0.001$ 或 $P < 0.05$)。结论 结肠癌肺转移患者外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞占总 CD4⁺调节性 T 细胞的比例明显升高,可能是通过 Foxp3 基因控制的抑制性细胞因子 TGF-β1 和 IL-10 而参与结肠癌肺转移的免疫耐受。

关键词: CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞;Foxp3;TGF-β1;IL-10;结肠肿瘤;肿瘤转移

中图分类号: R735.35 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2018)01-0005-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.01.002

Expressions of CD4⁺CD25⁺regulatory T cells and transforming growth factor beta-1, interleukin-10 in peripheral blood in the patients with lung metastasis from colon cancer

Jiang Zhichao¹, Zhou Hui², Zhao Shunli¹

(1. The Second People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410007, Hunan

E-mail:jiang.zhichao@126.com;

2. Hunan Cancer Hospital, Changsha 410013, Hunan)

Abstract: **Objective** To evaluate the clinical significance of peripheral blood CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Tregs) and the serum levels of transforming growth factor beta-1 (TGF-β1), interleukin (IL)-10 in patients with lung metastasis from colon cancer. **Methods** The ratios of CD4⁺CD25⁺ Tregs to CD4⁺ Tregs in the peripheral blood of patients with lung metastasis from colon cancer and healthy controls were determined by flow cytometry, and the levels of forkhead box P3 (Foxp3) were detected by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Meanwhile, the serum levels of TGF-β1 and IL-10 were detected by ELISA. **Results** The ratio of CD4⁺CD25⁺ Tregs to total CD4⁺ Tregs in the peripheral blood, the expression levels of Foxp3, and the concentrations of TGF-β1 and IL-10 in patients with lung metastasis from colon cancer were significantly higher than those in the healthy controls ($P < 0.001$ or $P < 0.05$). **Conclusion** The ratio of CD4⁺CD25⁺ Tregs to total CD4⁺ T cells in the peripheral blood from patients with lung metastasis from colon cancer is increased significantly, which suggests that CD4⁺CD25⁺ Tregs participating in the immune tolerance of patients with lung metastasis from colon cancer might be via the inhibitory cell factors of TGF-β1 and IL-10 regulated by Foxp3 gene.

① 基金项目:湖南省中医药科研计划项目重点课题(201540)

Key words: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells; forkhead box P3; transforming growth factor beta-1; interleukin-10; colonic neoplasms; neoplasm metastasis

近年来,结肠癌肺转移发病率呈逐年上升趋势^[1]。CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(Tregs)是一类具有免疫抑制作用的CD4⁺亚群,可诱导肿瘤特异性地局部免疫耐受,促进肿瘤转移^[2]。本文通过检测结肠癌肺转移患者外周血中CD4⁺CD25⁺调节性T细胞数量、叉头状螺旋转录因子(Foxp3)表达水平及转化生长因子β1(TGF-β1)、白细胞介素10(IL-10)含量变化,探讨CD4⁺CD25⁺调节性T细胞参与结肠癌肺转移免疫耐受的作用机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料 随机选取2014年5月—2017年5月在湖南省第二人民医院肿瘤科、湖南省肿瘤医院胃肠外科住院且经病理学检查确诊的结肠癌肺转移患者30例,其中男19例,女11例,年龄19~70岁;Ⅱ期12例,Ⅲ期11例,Ⅳ期7例,所有肿瘤患者均无免疫系统疾病史,入院前未进行放疗、免疫治疗等综合治疗,均知情并签署同意书。对照组10例来自湖南省第二人民医院的健康体检人群,年龄20~70岁,所有研究对象均无溃疡性结肠炎、甲状腺功能减退等自身免疫性疾病史及免疫治疗史,均知情并签署同意书。

1.2 试剂及仪器 RNA提取试剂盒、反转录试剂盒购于北京康为世纪生物科技有限公司,UltraSYBR Mixture(with Rox)购自CWbio. Co. Ltd,PCR引物由上海生工公司合成,人调节性T细胞染色试剂盒(Forkhead Box P3, Scurfin, JM2, Treg, Foxp3 PCH101 PE, CD4 FITC, CD25 APC)购于美国eBioscience公司, TGF-β1和IL-10 ELISA试剂盒购于美国eBioscience公司, BIO-RAD model550型酶标仪购自美国伯乐公司, 荧光定量PCR仪购自Thermo公司, Cytomics TM FC500型流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特(Beckman Coulter)公司。

1.3 标本采集与处理 采集符合纳入标准的30例结肠癌肺转移患者与10名健康体检者,清晨空腹采集经肝素钠抗凝的外周静脉血2 ml, 8 h内进行流式细胞术的测定前处理;同时干燥管采集静脉血2 ml, 室温离心3000 r/min 10 min, 分离收集血清-20℃保存用于ELISA检测。

1.4 流式细胞仪检测 Tregs 密度梯度法分离获得外周单个核细胞(PBMC), 三色标记的CD4、CD25、Foxp3抗体做细胞表面染色, 按人调节性T细胞染色试剂盒说明书进行操作。采用Cytomics TM FC500型流式细胞仪进行检测, 测定10 000个细胞, 激发波长为488 nm, 发射波长为535 nm, 分析时设门以除去

细胞碎片和细胞团块对测定的干扰。以同型抗体染色作为阴性对照。

1.5 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 Foxp3 mRNA 参照有关文献设计, 运用Primer 5.0软件, 由上海生物工程技术有限公司合成Foxp3引物(Forward Primer 5'- CACAACATGCGACCCCTTTCA CC -3', Reverse Primer 5'- AGGTTGTGGCGGATG-GCGTTCTTC -3')。Trizol法提取总RNA, 并经紫外分光光度计测定, 计算提取物RNA浓度, 并经反转录扩增cDNA。RT-PCR检测NF-κB mRNA表达, 取cDNA 3 μl (1 μl), 10 × Buffer 2 μl, MgCl₂ 4 μl, 10mmol/L dNTPs 2 μl, 引物100 ng, Tag DNA多聚酶1U, 总体系20 μl。循环条件: 94℃预变性3 min, 94℃变性40 s, 退火1 min (NF-κB 56℃, β-actin 55℃), 72℃延伸(NF-κB 60 s, β-actin 90 s), 共35个循环, 72℃共延伸7 min。用Thermo荧光定量PCR仪检测Foxp3 mRNA, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算Foxp3 mRNA的相对表达量。

1.6 血清TGF-β1、IL-10的检测 实验采用ELISA法, 按TGF-β1及IL-10 ELISA Kit说明书操作, 在同一条件下测各标本的OD值。

1.7 统计学方法 采用SPSS 21.0软件进行统计学分析。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示, 流式细胞仪检测结果应用Cell Quest软件分析, 两组间比较用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组CD4⁺CD25⁺Tregs和Foxp3表达频率 流式细胞术检测结肠癌肺转移患者(观察组)和健康人群(对照组)外周血CD4⁺CD25⁺Tregs细胞的结果, 见表1。与对照组(2.47±0.29)%相比, 结肠癌肺转移患者外周血中CD4⁺CD25⁺Tregs占CD4⁺T细胞的比例为(5.11±0.43)%, 差异有统计学意义($P < 0.001$), CD4⁺/Foxp3⁺和CD25⁺/Foxp3⁺与对照组相比, 差异亦具有统计学意义($P < 0.001$ 或 $P < 0.05$)。见图1。

表1 两组CD4⁺CD25⁺Tregs和Foxp3表达频率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

| 组别 | n | CD4 ⁺ /CD25 ⁺ | CD4 ⁺ /Foxp3 ⁺ | CD25 ⁺ /Foxp3 ⁺ |
|-----|----|-------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 观察组 | 30 | 5.11±0.43 | 2.07±0.40 | 1.06±0.22 |
| 对照组 | 10 | 2.47±0.29 | 1.13±0.06 | 0.53±0.21 |
| t | | 18.017 | 12.458 | 6.668 |
| P | | <0.001 | <0.05 | <0.001 |

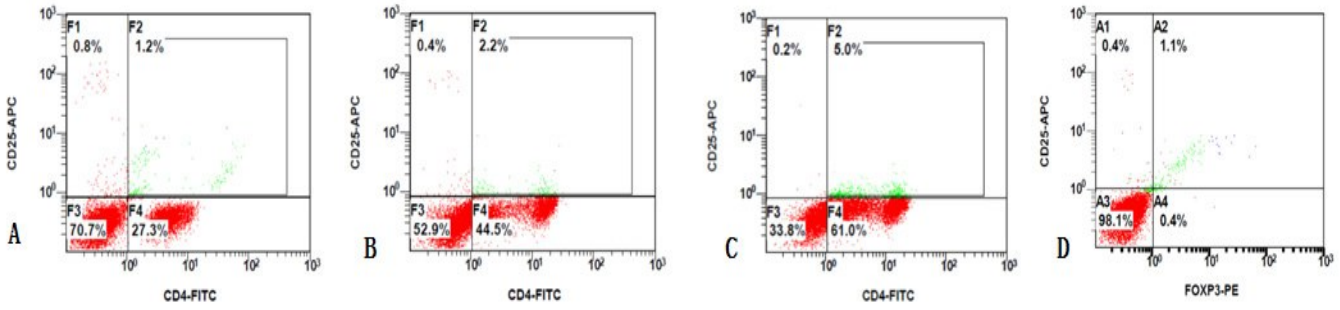


图 1 两组外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞散点图

注：A:同型阴性对照;B:对照组 CD4⁺CD25⁺T 细胞图;C:观察组 CD4⁺CD25⁺T 细胞图 ;D:观察组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞图

2.2 Foxp3 mRNA 水平比较 根据实时聚合酶链反应(real-time PCR)原始检测结果,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量计算公式:

$$F=2^{-\left[\left(\frac{\text{对照组的基因平均 Ct 值}}{\text{对照看家基因平均 Ct 值}}\right) - \left(\frac{\text{待检样品的基因平均 Ct 值}}{\text{待检样品看家基因平均 Ct 值}}\right)\right]}$$

结果如图 2 所示,结肠癌肺转移患者外周血 Foxp3 mRNA 均值 RQ(3.705±0.290)明显高于对照组(1.033±0.206),差异有统计学意义($t=26.858, P<0.001$)。

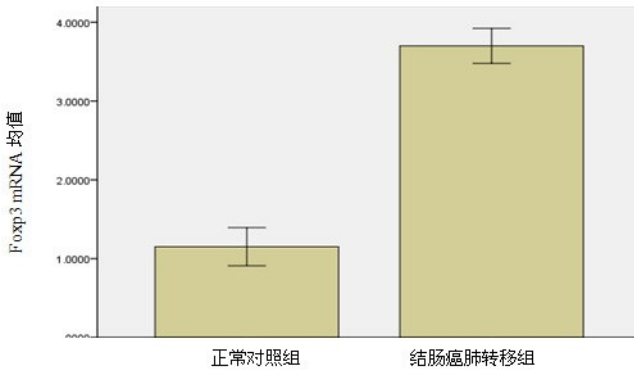


图 2 两组 Foxp3 mRNA 均值 RQ 比较

2.3 外周血 TGF-β1、IL-10 含量比较 用 BIO-RAD model 550 型酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔相应细胞因子的 OD 值。将 TGF-β1、IL-10 的 OD 值分别录入 Excel 工作表中,以标准品浓度作纵坐标,对应 OD 值作横坐标,绘制出 TGF-β1、IL-10 的标准线性回归曲线,分别按曲线方程计算各样本的浓度值,用 SPSS 21.0 软件计算各细胞因子的均值(见表 2)。与对照组相比,结肠癌肺转移患者外周血血清 TGF-β1、IL-10 数量偏高,差异有统计学意义($P<0.001$ 或 $P<0.05$)。

3 讨论

结肠癌患者最常见的转移部位是局部淋巴结、肝脏、肺脏和腹膜,有关结肠癌肺转移的报道并不多,结肠癌肺转移与中医的“肺与大肠相表里”具有异曲同工

表 2 两组 TGF-β1、IL-10 含量比较 ($\bar{x}\pm s, \text{pg/ml}$)

| 组别 | n | TGF-β1 | IL-10 |
|-----|----|--------------|-----------|
| 观察组 | 30 | 766.01±42.36 | 2.09±0.36 |
| 对照组 | 10 | 499.25±40.18 | 0.91±0.17 |
| t | | 17.455 | 13.899 |
| P | | <0.001 | <0.05 |

之妙。诸多研究表明^[3-5],CD4⁺CD25⁺T 细胞在宫颈癌、胰腺癌、胃癌、头颈肿瘤等恶性肿瘤患者的外周血和病变组织中有不同程度的升高,且与肿瘤的转移与预后关系密切。本研究结果显示:结肠癌肺转移患者外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例为(5.11±0.43)%,明显高于健康对照组(2.47±0.29)%($P<0.05$),进一步说明 CD4⁺CD25⁺T 细胞在肿瘤免疫中发挥重要的抗肿瘤免疫作用。叉头状螺旋转录因子(Foxp3)是公认的 CD4⁺CD25⁺Tregs 所特有的细胞标志,它在胃癌外周血及癌组织中高表达,可抑制 T 细胞活化过程中的许多关键基因,与 CD4⁺CD25⁺Tregs 的发育和功能维持关系密切^[6]。本研究用 RT-PCR 检测结肠癌肺转移患者外周血 Foxp3 mRNA 均值 RQ(3.705±0.290)明显高于健康对照组(1.033±0.206),差异有统计学意义($P<0.05$),说明 Foxp3 mRNA 是参与结肠癌肺转移 CD4⁺CD25⁺T 细胞分化的重要基因之一。

CD4⁺CD25⁺T 细胞参与免疫耐受反应的机制有多种途径,如可通过分泌或影响 TGF-β1、IL-10 等抑制性细胞因子而参与肿瘤的免疫逃逸、免疫耐受或肿瘤转移^[7]。TGF-β1 作为肿瘤免疫调节的重要因子,其水平高低影响着 CD4⁺CD25⁺调节 T 细胞对卵巢癌机体的免疫负调节机制,在卵巢癌不同病期的表达有调节作用^[8]。本研究发现,结肠癌肺转移患者外周血 TGF-β1 水平(766.01±42.36) pg/ml 较健康对照组(499.25±40.18) pg/ml 明显增高,组间比较差异有统计学意义($P<0.05$),说明 TGF-β1 在一定程度上

(下转第 25 页)

- [8] Patzer L. Nephrotoxicity as a cause of acute kidney injury in children[J]. *Pediatr Nephrol*, 2008, 23(1): 2159-2173.
- [9] 邱涛, 张璐, 周江桥, 等. 心脏死亡器官捐献供肾移植与司法途径标准供者供肾移植术后早期效果分析比较[J]. *中华移植杂志(电子版)*, 2015, 9(4): 155-159.
- [10] Seo CH, Ju JI, Kim MH, et al. Risk factors and long-term outcomes of delayed graft function in deceased donor renal transplantation[J]. *Ann Surg Treat Res*, 2015, 89(4): 208-214.
- [11] 刘斌, 曾凡军, 陈知水, 等. 心脏死亡器官捐献供者肾移植的近期效果评价[J]. *第三军医大学学报*, 2015, 37(1): 64-68.
- [12] Ledinh H, Weekers L, Bonvoisin C, et al. Results of kidney transplantation from controlled donors after cardiocirculatory death: a single center experience[J]. *Transpl Int*, 2012, 25(2): 201-209.
- [13] Xiaoming P, Xiang H, LinJuan L, et al. Preliminary results of transplantation with kidneys donated after cardiac death: a path of hope for organ transplantation in China[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2015, 30(9): 1590-1596.
- [14] Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, et al. OPTN/SRTR 2011 Annual Data Report: kidney[J]. *Am J Transplant*, 2013, 13(Suppl 1): 11-46.
- [15] 中华医学会器官移植学分会, 中华医学会外科学分会移植学组, 中国医师协会器官移植医师分会. 中国心脏死亡捐献器官评估与应用专家共识[J]. *中华移植杂志(电子版)*, 2014, 8(3): 117-122.
- [16] Callaghan CJ, Harper SJ, Saeb-Parsy K, et al. The discard of deceased donor kidneys in the UK [J]. *Clin Transplant*, 2014, 28(3): 345-353.

收稿日期: 2018-01-03

(上接第7页)

参与了结肠癌肺转移患者免疫耐受的抑制作用。本研究还发现, 结肠癌肺转移患者外周血中 IL-10 的含量 (2.09 ± 0.36) pg/ml 明显高于健康对照组 (0.91 ± 0.17) pg/ml, 说明 IL-10 同样是结肠癌肺转移患者的免疫抑制因子, 影响着结肠癌肺转移患者的预后。

本研究表明, CD4⁺ CD25⁺ T 细胞在结肠癌肺转移免疫耐受中发挥重要作用, 可能是结肠癌发生肺转移的重要推手。其作用机制可能是通过其重要的关键转录因子 Foxp3 mRNA 的主导, 产生大量抑制性细胞因子如 TGF- β 1、IL-10 等, 影响结肠癌组织周围效应细胞的杀伤能力; 或是通过 TGF- β 1、IL-10 等抑制性细胞因子竞争性抑制 Th1 类细胞免疫反应的功能, 影响着结肠癌肺转移的病情转归与预后。

参考文献:

- [1] Matsuo Y, Chen F, Hamaji M, et al. Comparison of long-term survival outcomes between stereotactic body radiotherapy and sublobar resection for stage I non-small-cell lung cancer in patients at high risk for lobectomy: A propensity score matching analysis[J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(17): 2932-2938.
- [2] Navarrate AM, Delignat S, Teillaud JL, et al. CD4⁺

CD25⁺ regulatory T cell-mediated changes in the expression of endocytic receptors and endocytosis process of human dendritic cells[J]. *Vaccine*, 2011, 29(15): 2649-2652.

- [3] 徐华, 王丹波. 宫颈癌患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞及其 Foxp3 表达的临床意义[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2015, 16(1): 8-10, 14.
- [4] 雷宏伟, 高岩, 李杰. 胰腺癌患者外周血 CD4⁺ CD25^{high} T 细胞比率变化特点及其临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(9): 1319-1322.
- [5] 张海东, 孟玮, 龚单春, 等. CD4⁺ CD25⁺ Tregs 与 Foxp3 在头颈部鳞状细胞癌患者外周血中表达的初步研究[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2017, 31(13): 1009-1012.
- [6] 陆威, 李永翔, 张尚鑫, 等. 胃癌患者外周血及癌组织中 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞、转录因子 Foxp3 的表达及临床意义[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(7): 790-793.
- [7] 沈玮, 田庚. CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞、TGF- β 1 和 IL-10 在上皮性卵巢癌中的变化[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(24): 4776-4778.
- [8] 王武琴, 吴梦, 陈献, 等. 卵巢癌患者外周血 CD4⁺ 调节 T 细胞与 TGF- β 1 水平的相关性研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(1): 69-72.

收稿日期: 2018-01-24