

[文章编号] 1007-385X(2007)06-0582-03

· 短篇论著 ·

肝癌微环境中 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞与 T 细胞免疫的关系

Relationship between CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and T lymphocyte immunity in tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma

陈 中,晏建军,黄 亮,严以群(第二军医大学 东方肝胆外科医院 肝外一科,上海 200433)

[摘 要] 目的: 探讨肝细胞癌组织中 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞(CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell, Treg)与肿瘤微环境 T 细胞免疫的关系。方法: 对 52 例肝细胞癌组织和癌旁组织用 CD4、CD25 双重酶标免疫组化染色和用 CD8 EnVision 法染色,对癌组织中 Treg 细胞和 CD4⁺ T、CD8⁺ T、CD4⁺ T/CD8⁺ T 比值进行相关性分析。结果: 正常肝脏组织中未发现 Treg 细胞,肝癌和癌旁组织中 Treg 细胞单个高倍视野平均数分别为(7.6 ± 2.84)、(5.2 ± 1.67),两组比较有显著差异(*P* < 0.01);肝癌及癌旁组织中 CD4⁺ T 细胞单个高倍视野平均数分别为(18.2 ± 3.57)、(25.9 ± 3.36),两组比较有显著差异(*P* < 0.01);肝癌及癌旁组织中 CD8⁺ T 细胞单个高倍视野平均数分别为(49.9 ± 6.61)、(49.5 ± 6.43),两组比较无明显差异;肝癌及癌旁组织中 CD4⁺ T/CD8⁺ T 比值分别为(0.37 ± 0.08)、(0.53 ± 0.09),两组比较有显著差异(*P* < 0.01);肝癌组织中 Treg 细胞的数量与其浸润性 CD4⁺ T 淋巴细胞的数量及 CD4⁺ T/CD8⁺ T 比值呈显著负相关(*P* < 0.01),而与浸润性 CD8⁺ T 淋巴细胞的数量分布无明显相关性。结论: Treg 细胞在肝癌微环境中可能通过抑制 CD4⁺ T 淋巴细胞的增殖来抑制肿瘤局部免疫。

[关键词] 肝肿瘤; CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞; 免疫抑制

[中图分类号] R735.7; R730.2 [文献标志码] A

随着肿瘤免疫学的深入研究,提出了“肿瘤微环境”的概念。肿瘤微环境存在着导致免疫不应答或免疫应答低下的多种因素,研究肿瘤微环境免疫状态比外周血免疫状态能更准确地反映宿主的抗肿瘤免疫反应。Treg 细胞是 CD4⁺ T 细胞的一个重要亚群,表达 CD25(IL-2R α 链)分子,在调节肿瘤免疫方面发挥着重要作用^[1-2],研究肿瘤浸润性 Treg 细胞对了解肿瘤免疫逃避机制具有重要意义。肿瘤疫苗是目前免疫治疗的热点,却未表现出理想效果,其原因可能与肿瘤微环境有关。有关肝癌微环境中 Treg 细胞的数量、功能的研究鲜见报道。本课题旨在研究 Treg 细胞在肝癌微环境 T 细胞免疫中的作用。

1 材料与方 法

1.1 病例选择

收集东方肝胆外科医院 2004 年 12 月至 2005 年 5 月手术患者经病理学检查证实为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的标本 52 例(均包括肝癌组织以及癌旁组织),取材时癌旁组织为距癌结节 2 cm 以内的肝组织;避开坏死区。术前均未接受过包括经肝动脉栓塞化疗在内的任何其他治疗。男 42 例,女 10 例,年龄 29 ~ 71 岁。正常肝组织 8 例,取自肝血管瘤、肝囊肿的周围正常肝组织,男 3 例,女 5 例,年龄 27 ~ 57 岁。所有研究对象均无糖尿病、类风湿、甲状腺功能亢进等自身免疫性疾病史以及免疫治疗史。

1.2 主要试剂

小鼠抗人 CD4 单克隆抗体、小鼠抗人 CD8 单克隆

抗体使用时均用抗体稀释液稀释为 1:100,小鼠抗人 CD25 单克隆抗体,使用时用抗体稀释液稀释为 1:200,即用型羊抗小鼠辣根过氧化物酶(HRP)标记的 EnVision 二抗,以上试剂均为 DAKO 公司产品;生物素化羊抗兔 IgG 和链酶亲合素标记的碱性磷酸酶,使用时均稀释液稀释为 1:200,为 Zymed 公司产品。

1.3 CD4、CD25 双重酶标免疫组化染色以及 CD8 EnVision 法染色

所有标本均经 10% 甲醛固定,常规石蜡包埋,连续切取 4 μ m 厚的切片,石蜡切片常规脱蜡至水, PBS 洗 3 min \times 3;抗原修复 98 $^{\circ}$ C 20 min,室温中冷却 20 min, PBS 洗 3 min \times 3;0.3% H₂O₂ 室温 20 min, PBS 洗 3 min \times 3;CD4(M)1:100 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗 3 min \times 3; EnVision(M)-HRP 试剂 37 $^{\circ}$ C 30 min, PBS 洗 3 min \times 3; 0.04% DAB-0.03% H₂O₂ 显色 8 min, PBS 洗 3 min \times 3; 20% 蛋清孵育抑制内源性生物素, PBS 洗 3 min \times 3; CD25(M)1:200 37 $^{\circ}$ C 2 h, PBS 洗 3 min \times 3;生物素化羊抗兔 IgG 1:200 37 $^{\circ}$ C 30 min, PBS 洗 3 min \times 3; Streptavidin-AKP 1:200 37 $^{\circ}$ C 30 min, PBS 洗 3 min \times 3; 0.02 mol/L pH 9.0 TBS 洗 20 min; NBT/BCIP 显色 30 ~ 120 min; 蒸馏水洗 5 min; 核固红衬染 5 min, 水洗; 常规树

[基金项目] 上海市临床医学中心子项目(No. ZX01B05). Supported by the Program of Shanghai Clinical Medical Center (No. ZX01B05)

[作者简介] 陈 中(1974 -),男,安徽省桐城市人,主治医师,主要从事肝癌的基础与临床研究

* Corresponding author. E-mail: yiqunyan@21cn.com

胶封片。EnVision 法标记 CD8⁺T 淋巴细胞步骤;石蜡切片常规脱蜡至水,PBS 洗 3 min × 3;0.3% H₂O₂ 抑制内源性过氧化物酶 20 min,室温;PBS 洗 3 min × 3;PBS-Triton × 100 洗 20 min, PBS 洗 3 min × 3;滴加适当稀释一抗湿盒中 4 °C 过夜,37 °C 1 h;PBS 洗 3 min × 3;EnVision 试剂 37 °C 30 min;PBS 洗 3 min × 3;DAB 显色 8 ~ 12 min;苏木精衬染,热水蓝化;吹干后,树脂封片。

1.4 免疫组化结果判定

Treg 细胞阳性标准为细胞形态完整,结构清晰,棕黄色和紫蓝色颗粒同时定位于胞质和胞膜上(棕褐色颗粒)。CD4⁺T、CD8⁺T 细胞阳性标准为形态完整,结构清晰,棕黄色阳性颗粒特异性定位于胞质和胞膜上。将切片置于显微镜下采用盲法进行观察,先在低倍镜下观察整张切片,随机选择 5 个高倍视野(×400)计数阳性细胞,并求平均值。

1.5 统计学处理

对各种组织中的 Treg 细胞的分组计数结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.0 统计软件采用非参数检验 Mann-Whitney T 法对数据进行检验。

2 结果

2.1 Treg 细胞的分布特征

癌旁组织中 Treg 细胞多数以散在方式分布,而在癌组织中以簇丛状方式聚集分布于肿瘤间质内并与 CD4⁺T 细胞伴行,与之紧密接触。在正常肝脏组织中未发现 Treg 细胞(图 1A,B),肝癌以及癌旁组织中 Treg 细胞单个高倍视野平均数分别为(7.6 ± 2.84)、(5.2 ± 1.67);两组比较有显著差异($t = 16.567, P = 0.000$)。

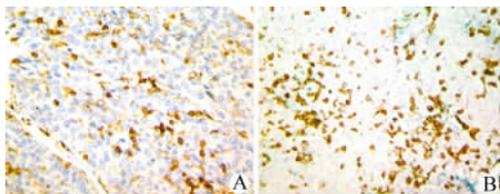


图 1 Treg 细胞在肝癌(A)和癌旁组织(B)中的分布(×400)

2.2 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞分布特征

HCC 组织中 CD4⁺T 细胞较癌旁组织明显减少,差异有显著意义;而 CD8⁺T 细胞两者比较差异无统计学意义;CD4⁺T/CD8⁺T 值癌旁组织较癌组织明显升高,差异有统计学意义(表 1)。

2.3 HCC 组织中 Treg 细胞与肿瘤浸润性 T 淋巴细胞数量的相关性

HCC 组织中 Treg 细胞的数量与其浸润性 CD4⁺T 淋巴细胞的数量以及 CD4⁺T/CD8⁺T 比值呈显著负相关($r = -0.539, P = 0.014; r = -0.545, P = 0.000$),而与浸润性 CD8⁺T 淋巴细胞的数量分布无明显相关性($r = -0.403, P = 0.078$)。

表 1 HCC 和癌旁组织中 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞的数量分布

组织	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T	CD4 ⁺ T/CD8 ⁺ T
HCC 组织	18.2 ± 3.57**	49.9 ± 6.61	0.37 ± 0.08*
癌旁组织	25.9 ± 3.36	49.5 ± 6.43	0.53 ± 0.09

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与癌旁组织相比

3 讨论

CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞在抗肿瘤反应中发挥不同的作用,在局部抗肿瘤免疫中它们处于机体免疫系统与肿瘤相互作用的最前沿,其组成和功能等特征在一定程度上反映了机体抗肿瘤反应的性质、强度和总体水平^[3]。本实验结果发现,癌旁组织中 CD4⁺T 细胞数量较癌组织明显增多,而癌旁组织 CD8⁺T 细胞数量较癌组织无明显差异,且癌旁组织 CD4⁺T/CD8⁺T 比值较癌组织明显升高。该结果提示 HCC 组织局部 CD4⁺T 细胞数量和 CD4⁺T/CD8⁺T 比值的降低,造成了 T 淋巴细胞数量异常,改变了组织局部免疫微环境,免疫抑制逐渐加重,免疫监视功能减弱,有利于肿瘤细胞增殖,从而有利于肿瘤的进展、侵袭或转移。在以细胞免疫为主的肿瘤免疫过程中,Treg 处于关键环节,它在肿瘤组织中的浸润程度代表了机体肿瘤免疫抑制反应的一个方面,在机体免疫调节中起重要作用,决定免疫反应的最终走向是激活免疫还是诱导耐受^[4]。本实验研究发现,肝癌组织中 Treg 细胞数量较癌旁组织明显增多,因此推测,肿瘤特异性 Treg 细胞可能聚集在 HCC 局部组织中,从而抑制肿瘤特异性以及非特异性免疫反应。本研究还发现,肝癌组织中 Treg 细胞数量与 CD4⁺T 细胞数量以及 CD4⁺T/CD8⁺T 比值呈显著负相关,而与 CD8⁺T 细胞数量无明显相关性,提示 HCC 组织中 Treg 细胞可能通过抑制 CD4⁺T 细胞的增殖,导致 T 淋巴细胞亚群之间的平衡被破坏。肿瘤组织和癌旁组织中肿瘤浸润性淋巴细胞比值的下降表明,愈接近肿瘤部位细胞免疫受抑制愈明显。对于 Treg 细胞的效应机制还不明确,实验结果也存在矛盾。有些实验支持 Treg 细胞是通过与 T 细胞直接接触发挥抑制作用;另一

些研究表明 Treg 通过分泌细胞因子(IL-10、TGF- β)而介导抑制效应^[5-9]。本研究发现,HCC 微环境中 Treg 的分布具有异质性,癌旁组织中 Treg 大部分以散在方式分布,而在肿瘤组织中大多呈簇丛状分布,与效应性 T 淋巴细胞相伴;这些分布方式说明,在肿瘤组织中的 Treg 由于与效应性 T 淋巴细胞的紧密接触,抑制效应性细胞的功能,从而发挥抗肿瘤免疫作用。因此进一步探讨 Treg 细胞调节机制或控制 Treg 细胞增殖的方法,可以为设计更有效的抗肿瘤免疫疗法提供依据。

[参考文献]

- [1] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains(CD25). Breakdown of single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. *J Immunol*, 1995, 155 (3): 1151-1164.
- [2] Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, *et al.* Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells[J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(3): 623-630.
- [3] Ohwada S, Iino Y, Nakamura S, *et al.* Peripheral blood T cell subset as a prognostic factor in gastric cancer[J]. *Jpn J Clin Oncol*,

1994, 24(1): 7-11.

- [4] 傅志旋,陈晓耕,刘振华. 肿瘤浸润淋巴细胞的抗肿瘤免疫困境[J]. *国外医学: 肿瘤学分册*, 2004, 31(3): 183-186.
- [5] Kono K, Takahashi A, Ichihara F, *et al.* Prognostic significance of adoptive immunotherapy with tumor-associated lymphocytes in patients with advanced gastric cancer: a randomized trial[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(6): 1767-1771.
- [6] Kono K, Takahashi A, Sugai H, *et al.* Dendritic cells pulsed with HER-2/neu-derived peptides can induce specific T cell responses in patients with gastric cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8 (11): 3394-3400.
- [7] Kawaida H, Kono K, Takahashi A, *et al.* Distribution of CD4⁺ CD25 high regulatory T-cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer[J]. *J Surg Res*, 2005, 124(1): 151-157.
- [8] Yu P, Lee Y, Liu W, *et al.* Intratumor depletion of CD4⁺ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors[J]. *J Exp Med*, 2005, 201(5): 779-791.
- [9] Thornton AM, Piccirillo CA, Shevach EM. Activation requirements for the induction of CD4⁺ CD25⁺ T cell suppressor function [J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(2): 366-376.

[收稿日期] 2007 - 04 - 05

[修回日期] 2007 - 11 - 04

[本文编辑] 郁晓路

· 简讯 ·

《中国肿瘤生物治疗杂志》2008 年度征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》是由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办的国家级医学学术期刊(刊号为 CN31 - 1725/R), 双月刊。本刊为中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊, 已被《中国科技论文与引文数据库》、《中国科学引文数据库》、《中国学术期刊综合评价数据库》、《中文生物医学期刊文献数据库》、《中国核心期刊(遴选) 数据库》、《中国学术期刊文摘》、《中国医学文摘》及美国《化学文献》(CA)、英国《国际农业与生物科学中心数据库》(CABI)、波兰《哥白尼索引》(IC) 等国内外多家权威数据库和文摘刊物收录。

本刊为中国肿瘤生物治疗领域唯一的高级学术刊物, 重点报道我国肿瘤生物治疗方面基础理论与临床的最新研究成果、新实验技术及其学术进展, 宣传我国肿瘤生物治疗的政策和发展策略。主要栏目有述评、专家论坛、论著、研究快报、学术争鸣、技术方法、文献综述、专题讲座、科技动态等。以肿瘤防治专业的中高级临床和科研工作者、医药院校师生及其他相关学科的科技人员为读者对象。

《中国肿瘤生物治疗杂志》每期定价 8.00 元, 全年定价 48.00 元, 邮发代号: 4 - 576, 请通过邮局订阅。若错过, 可从本刊编辑部补订, 请将 48.00 元(优惠免邮资) 寄本刊编辑部, 并注明详细通讯地址及邮政编码, 编辑部将负责如期寄至您手中。

联系地址: 上海市翔殷路 800 号第二军医大学免疫楼

《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部

联系人: 王莹, 韩丹

邮政编码: 200433

联系电话: 021 - 55620605 × 22; 021 - 25070316 × 22; 传真: 021 - 25074547

http: www. biother. org; E - mail: cjcb@ biother. org