

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.01.013

· 临床研究 ·

## 食管鳞癌患者外周血中 Th17 细胞的检测及其临床意义

亓磊, 田辉, 岳韦名, 高存, 朱应超, 司立博(山东大学齐鲁医院 胸外科, 山东 济南 250012)

[摘要] 目的:检测食管鳞癌患者外周血 Th17 细胞占淋巴细胞的比例及外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中 *ROR $\gamma$ t* 和 *IL-17* 的表达水平,探讨 Th17、*ROR $\gamma$ t* 及 *IL-17* 在食管鳞癌中的临床意义。方法:收集山东大学齐鲁医院 2009 年 8 月至 2010 年 6 月 40 例食管鳞癌患者 PBMC 标本,其中男 24 例、女 16 例,年龄 34~78(61 $\pm$ 8.76)岁。采集 40 例健康志愿者 PBMC 为对照。流式细胞术检测 Th17 细胞在外周血淋巴细胞中的比例;PT-PCR 检测 PBMC 中 *ROR $\gamma$ t* 和 *IL-17* mRNA 的表达水平。结果:食管鳞癌患者外周血 Th17 细胞占淋巴细胞的比例较健康对照者明显升高[(2.40 $\pm$ 0.55)% vs (0.84 $\pm$ 0.41)% ,  $P < 0.01$ ];PBMC 中 *ROR $\gamma$ t*、*IL-17* mRNA 表达水平均明显高于健康对照组[(0.669 $\pm$ 0.184) vs (0.451 $\pm$ 0.151), (0.625 $\pm$ 0.179) vs (0.438 $\pm$ 0.150),  $P < 0.01$ ],且两者呈明显正相关( $r = 0.551$ ,  $P < 0.01$ )。食管鳞癌患者转移组与未转移组相比, Th17 细胞比例、*ROR $\gamma$ t* 和 *IL-17* mRNA 表达水平明显升高( $P < 0.05$ )。结论:食管鳞癌患者外周血 Th17 细胞占淋巴细胞的比例及 PBMC 中 *ROR $\gamma$ t* 和 *IL-17* mRNA 表达水平明显升高, Th17 细胞可能通过 *ROR $\gamma$ t* 和 *IL-17* 参与食管癌的发生。

[关键词] 食管鳞癌; Th17; *ROR $\gamma$ t*; *IL-17*

[中图分类号] R735.1; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)01-0059-04

## Detection of Th17 cells in peripheral blood of esophageal cancer patients and its clinical significance

QI Lei, TIAN Hui, YUE Wei-ming, GAO Cun, ZHU Ying-chao, SI Li-bo( Department of Thoracic Surgery, Qilu Hospital of Shandong University, Ji'nan 250012, Shandong, China )

[Abstract] **Objective:** To study the ratio of Th17 cells in peripheral lymphocytes and the expression of *ROR $\gamma$ t* and *IL-17* in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), and to investigate their clinical significance. **Methods:** Forty PBMC samples from ESCC patients (24 men and 16 women, mean age 61 $\pm$ 8.76 years), who were diagnosed in Qilu Hospital of Shandong University from August 2009 to June 2010, and 40 healthy volunteers were included in the present study. The ratio of Th17 cells in peripheral lymphocytes was detected by flow cytometry, and the expression levels of *IL-17* and *ROR $\gamma$ t* mRNA in PBMC were examined by PT-PCR. **Results:** The ratio of Th17 cells in the peripheral lymphocytes of ESCC patients was significantly higher than that in healthy volunteers ([2.40 $\pm$ 0.55] % vs [0.84 $\pm$ 0.41] % ,  $P < 0.01$ ). Both *ROR $\gamma$ t* and *IL-17* mRNA expression levels in ESCC patients were significantly higher than those in the healthy volunteers ([0.669 $\pm$ 0.184] vs [0.451 $\pm$ 0.151], [0.625 $\pm$ 0.179] vs [0.438 $\pm$ 0.150],  $P < 0.01$ ), and the two showed a positive correlation ( $r^2 = 0.551$ ,  $P < 0.01$ ). In addition, the Th17 ratio, and *ROR $\gamma$ t* and *IL-17* mRNA expression levels were significantly higher in metastasis ESCC patients compared with those in the non-metastasis ESCC patients ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Th17 ratio and *ROR $\gamma$ t* and *IL-17* mRNA expression levels are significantly increased in ESCC patients, and Th17 cells may participate in the development of ESCC through *ROR $\gamma$ t* and *IL-17*.

[Key words] esophageal cancer; Th17; *ROR $\gamma$ t*; *IL-17*

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(1): 59-62]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30571844);山东省科技攻关项目(No. 2009GG10002007);山东省自然科学基金项目(No. ZR2009CM090)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30571844), the Science and Technology Development Foundation of Shandong Province (No. 2009GG10002007), and the Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2009CM090)

[作者简介] 亓磊(1983-),男,山东省新泰市人,硕士研究生,主要从事胸部肿瘤分子生物学方面的研究

[通讯作者] 田辉(TIAN Hui, corresponding author), E-mail: tianhuiy@sohu.com

[网络出版] 2011-01-25; <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110125.1120.020.html>

Th17 细胞( T helper 17, Th17 )是一种由初始 CD4<sup>+</sup>T 细胞分化而来的效应 T 细胞,能特异性地产生 IL-17,具有不同于 Th1、Th2 细胞的分化、发育调节机制。Th17 细胞介导炎性反应,并参与肿瘤、自身免疫性疾病和移植物抗宿主等疾病的发生,且与疾病的转归和预后关系密切<sup>[1-3]</sup>。*ROR $\gamma$ t* 是 Th17 细胞特异性的转录因子,调控 IL-17 的分泌。初始型 CD4<sup>+</sup>T 细胞可以分化为 Th1、Th2、Treg 和 Th17 等不同的细胞亚群,在 TGF- $\beta$  和 IL-6 同时存在时,会促进 CD4<sup>+</sup>T 细胞向 Th17 细胞分化。Th17 细胞具有独立的分化和发育调节机制,并特异性地产生 IL-17 效应因子<sup>[4-5]</sup>。

多种慢性炎症疾病中可见 Th17 细胞及其分泌的 *ROR $\gamma$ t*、IL-17 高表达,由慢性炎症导致的肿瘤中 IL-17 表达也升高<sup>[6-8]</sup>。食管慢性炎症引起的基底膜改变与食管上皮细胞异常增生相关<sup>[9]</sup>,食管癌的发生也与炎症密切相关<sup>[10-11]</sup>。本课题通过检测食管癌患者外周血中 Th17 细胞占淋巴细胞的比例及外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中 *ROR $\gamma$ t* 及 IL-17 表达水平,探讨 Th17 细胞以及 *ROR $\gamma$ t* 和 IL-17 表达的改变在食管癌中的意义,为深入研究 Th17 细胞在肿瘤免疫中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床资料及标本

标本来源于山东大学齐鲁医院 2009 年 8 月至 2010 年 6 月食管鳞癌患者,所有患者术前均未行化疗或放射治疗。其中男 24 例、女 16 例,年龄 34 ~ 78 岁,平均(61 ± 8.76)岁。其诊断参照病理组织分型及 2009 年国际抗癌联盟(UICC)与美国癌症联合会(AJCC)联合推出的国际食管癌 TNM 分期。按食管癌组织病理诊断分为低分化鳞癌 9 例、低-中分化鳞癌 10 例、中分化鳞癌 12 例、中-高分化鳞癌 2 例、高分化 7 例;其中伴淋巴结转移者 28 例,未转移者 12 例。正常对照组 40 例,全部为健康志愿者,其中男性 23 例、女性 17 例,年龄 23 ~ 68 岁,平均(46 ± 9.63)岁。术前取肝素钠抗凝外周血 4 ml。所有受试者均签署知情同意书,并报伦理委员会批准。

### 1.2 主要试剂

TRIzol、FIX&PERM、PMA、蛋白质转运抑制剂莫能霉素和离子霉素购自美国 IVGN 公司,逆转录试剂盒、RT-PCR 试剂购自日本 TaKaRa 公司。PE-Cy5 标记的 anti-human CD3、FITC 标记的 anti-human CD8、anti-IL-17 抗体购自美国 eBioscience 公司。

### 1.3 流式细胞术检测外周血中 Th17 细胞的含量

取肝素钠抗凝血 200  $\mu$ l 于试管中,用 RPMI 1640(不含小牛血清)1:1 等体积混合;加入刺激剂 1  $\mu$ g/ml PMA 50  $\mu$ l、50  $\mu$ g/ml 离子霉素 16  $\mu$ l、0.1 mg/ml 莫能霉素 13.6  $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 5 h。每管加入 100  $\mu$ l 刺激后血,测定管加入 10  $\mu$ l CD3-PE-Cy5 和 10  $\mu$ l CD8-FITC,避光孵育 15 min。加入 100  $\mu$ l FIX&PERM 中的 Reagent A(即固定液),避光孵育 15 min;加入 3 ml 生理盐水,1 200  $\times$ g 离心 5 min,弃上清。加入 100  $\mu$ l FIX&PERM 中的 Reagent B(即破膜和溶血液),同时加入 10  $\mu$ l IL-17 抗体,室温避光孵育 15 min;加入 3 ml 生理盐水,1 200  $\times$ g 离心 5 min,弃上清。对照管中加入相应的同型对照抗体。加入 500  $\mu$ l 流式缓冲液重悬细胞,上流式细胞仪检测。莫能霉素使淋巴细胞表面 CD4 抗原内陷,故以 CD8-FITC 反标,散点图中上左象限即为外周血 Th17 细胞占淋巴细胞的比例。

### 1.4 外周血单核细胞的分离

取肝素钠抗凝全血 3 ml,加入 3 ml PBS 混匀,在一支离心管中加入 3 ml 淋巴细胞分离液,上层小心加入稀释后的全血,2 000  $\times$ g 离心 20 min,吸取中间单个核细胞层,3 ml PBS 液洗 2 次,即为 PBMC。

### 1.5 RT-PCR 检测 PBMC 中 *ROR $\gamma$ t* 和 *IL-17* mRNA 的表达

采用 TRIzol 试剂,酚-氯仿法提 PBMC 总 RNA,按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA, -20 $^{\circ}$ C 冰箱冻存。用 Primer 5.0 软件设计引物,并由济南博尚公司合成。*ROR $\gamma$ t* 的上游引物为 5'- CCTGGGCTC-CTCGCCTGACC-3',下游引物为 5'- TCTCTCTGC-CCTCAGCCTTGCC-3',扩增片段长度为 169 bp;*IL-17* 的上游引物为 5'- CAAGACTGAACACCGACTA-AG-3',下游引物为 5'- TCTCCAAAGGAAGCCTGA-3',扩增片段长度为 231 bp;*GAPDH* 的上游引物为 5'-GCCATCAACGACCCCTTCATT-3',下游引物为 5'-CGCCTGCTTACCACCTTCTT-3',扩增片段长度为 696 bp。以上述制备的 cDNA 为模板,反应条件:*ROR $\gamma$ t* 为 94  $^{\circ}$ C 30 s、65  $^{\circ}$ C 30 s、72  $^{\circ}$ C 30 s,35 个循环;*IL-17* 为 94  $^{\circ}$ C 30 s、56  $^{\circ}$ C 30 s、72  $^{\circ}$ C 30 s,35 个循环;*GAPDH* 为 94  $^{\circ}$ C 30 s、57  $^{\circ}$ C 30 s、72  $^{\circ}$ C 30 s。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析仪进行扫描分析,以目的基因(*ROR $\gamma$* 、*IL-17*)与 *GAPDH* 灰度值的比值作为目的基因 mRNA 的相对表达水平。

### 1.6 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS17.0 统计软件分

析,采用两样本  $t$  检验。 $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 食管鳞癌患者外周血中 Th17 细胞占淋巴细胞的比例升高

流式细胞术检测结果(图 1)显示,食管鳞癌患者外周血 Th17 细胞占淋巴细胞的比例为(  $2.40 \pm 0.55$  )%,显著高于健康对照组外周血 Th17 细胞所占比例的(  $0.84 \pm 0.41$  )%,差异有统计学意义(  $P < 0.01$  )。

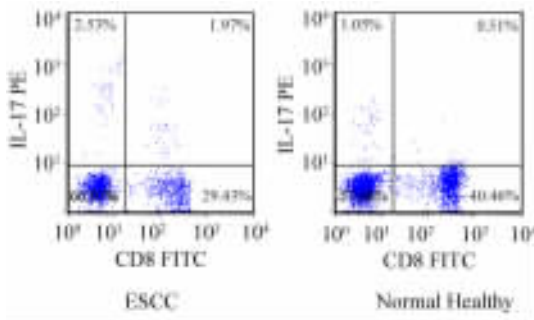


图 1 食管鳞癌患者外周血 Th17 细胞占淋巴细胞的比例高于健康志愿者 Th17 细胞的比例

Fig.1 Ratio of Th17 cells in peripheral lymphocytes in ESCC patients was higher than that in healthy volunteers

### 2.2 食管鳞癌患者 PBMC 中 $ROR\gamma t$ mRNA 和 $IL-17$ mRNA 表达水平升高

RT-PCR 检测 PBMC 结果(图 2)表明,食管鳞癌患者 PBMC 中  $ROR\gamma t$  mRNA 表达水平(  $0.669 \pm 0.184$  )明显高于健康对照组(  $0.451 \pm 0.151$  ),差异有统计学意义(  $P < 0.01$  );食管鳞癌患者 PBMC 中  $IL-17$  mRNA 表达水平(  $0.625 \pm 0.179$  )也明显高于健康对照组(  $0.438 \pm 0.150$  ),差异有统计学意义(  $P < 0.01$  )。

对  $ROR\gamma t$  和  $IL-17$  mRNA 的表达水平进行直线相关性分析,结果显示, $ROR\gamma t$  与  $IL-17$  mRNA 表达水平呈明显正相关(  $r = 0.551, P < 0.01$ , 图 3)。

### 2.3 食管鳞癌患者淋巴结转移组外周血 Th17 细胞的比例及 $ROR\gamma t$ 和 $IL-17$ mRNA 的表达水平

食管鳞癌患者淋巴结转移组外周血中 Th17 细胞占淋巴细胞的比例为(  $2.51 \pm 0.46$  )%,显著高于未转移组的(  $2.15 \pm 0.48$  )%,差异有统计学意义(  $t = 2.265, P = 0.029$  )。食管鳞癌转移组的  $ROR\gamma t$  mRNA(  $t = 2.259, P = 0.030$  )和  $IL-17$  mRNA(  $t = 2.573, P = 0.014$  )表达水平也均高于未转移组,差

异有统计学意义(  $P < 0.05$  )。

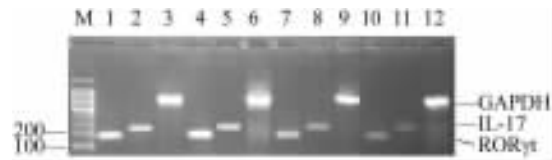


图 2 食管鳞癌 PBMCs 中  $ROR\gamma t$  与  $IL-17$  mRNA 的表达水平

Fig. 2 Expression levels of  $ROR\gamma t$  and  $IL-17$  mRNA in PBMCs of ESCC patients

1-6: ESCC; 7-12: Healthy volunteers

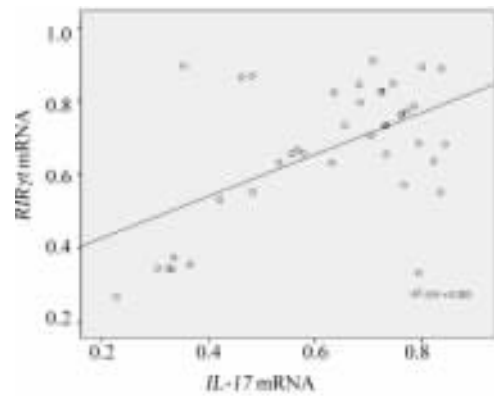


图 3 食管鳞癌患者 PBMCs 中  $ROR\gamma t$  与  $IL-17$  mRNA 的表达呈正相关(  $r^2 = 0.551, P < 0.01$  )

Fig. 3  $ROR\gamma t$  mRNA is correlated with  $IL-17$  mRNA expression in PBMCs of ESCC patients (  $r^2 = 0.551, P < 0.01$  )

## 3 讨论

肿瘤初期的炎症反应具有抗肿瘤效应,但慢性炎症的长期存在可为细胞转化提供有利的微环境,成为诱发肿瘤的因素之一<sup>[12-13]</sup>。动物肿瘤模型证明,IL-17 可加快肿瘤血管的发生,利于肿瘤的生长、转移和浸润<sup>[14]</sup>。将 IL-17 和人非小细胞肺癌( non-small-cell lung cancer, NSCLC )细胞一起培育,发现 IL-17 本身对肿瘤细胞并无直接的促进或抑制作用<sup>[14]</sup>。研究乳腺癌患者 Th17 细胞时发现,HER-2 阳性较 HER-2 阴性乳腺癌患者以及健康对照者外周血中 Th17 细胞的比例明显下降(分别为 0.314%、0.748% 和 0.840%)<sup>[15]</sup>。由此可见,IL-17 具有多效性,Th17 细胞的不同亚型以及其分泌不同的细胞因子决定了其对肿瘤的生长起到促进或抑制的作用。

已经有研究<sup>[16-17]</sup>证实,Th17 在胃癌、卵巢癌等肿瘤中高表达。本研究以食管鳞癌为研究对象,检测其外周血中 Th17 细胞占淋巴细胞的比例、主要转

录因子 *ROR $\gamma$ t* 及 *IL-17* mRNA 的表达水平。结果显示,食管鳞癌外周血 Th17 细胞占淋巴细胞的比例显著高于健康对照组,表明食管癌细胞存在 Th17 高表达现象。食管癌患者 *ROR $\gamma$ t* 及 *IL-17* mRNA 的表达水平均明显高于健康人,并且两者呈正相关,表明 Th17 细胞特异性转录因子 *ROR $\gamma$ t* 表达水平的增高可能促进了 IL-17 的高表达。研究<sup>[14]</sup>表明,IL-17 能促进肿瘤血管再生,诱导表皮细胞产生炎症因子,引发炎症。因此,Th17 细胞可能通过其介导的炎症作用参与食管鳞癌的发生。

目前无直接证据证明 IL-17 与肿瘤转移相关。但研究<sup>[18]</sup>发现,肿瘤细胞 IL-17R 的表达与肿瘤转移潜能相关。为了进一步探讨 Th17 细胞在食管癌发生、发展中的可能机制,根据食管癌病理诊断结果将食管鳞癌分为淋巴结转移组和未转移组,检测结果显示,淋巴结转移组外周血 Th17 细胞占淋巴细胞的比例显著高于未转移组,提示 Th17 细胞与食管鳞癌的淋巴结转移存在着一定的关系。进一步分析 *ROR $\gamma$ t* 和 *IL-17* mRNA 在淋巴结转移组和未转移组的表达水平,结果显示,淋巴结转移组 *ROR $\gamma$ t* 和 *IL-17* mRNA 的表达均显著高于未转移组。Th17 细胞及其特异性转录因子 *ROR $\gamma$ t* 及细胞因子 *IL-17* mRNA 的表达随着食管癌的进展而表达上调,提示 Th17 细胞参与了食管癌的进展。

引发肿瘤炎症的强度和持续时间决定了机体免疫系统对肿瘤保护效应的强弱<sup>[12]</sup>。在食管癌的初发阶段,Th17 细胞可能发挥促炎症作用,抑制肿瘤细胞的生长;但是随着病程的进展,机体免疫系统功能失去平衡,此时的 Th17 细胞则可能促进肿瘤进展或抑制抗肿瘤效应。但食管癌微环境中 Th17 细胞的具体功能有待进一步研究。目前,对 Th17 细胞的产生、分化、发育及其在疾病中的具体机制尚不完全清楚,Th17 细胞在肿瘤发生、发展中的作用还需更深入的研究,这些研究结果可能为肿瘤的防治提供新的思路。

## [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17 [ J ]. Nat Immunol, 2005, 6( 11 ): 1133-1141.
- [ 2 ] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages [ J ]. Nat Immunol, 2005, 6

( 11 ): 1123-1132.

- [ 3 ] Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, et al. The role of T helper 17 ( Th17 ) and regulatory T cells ( Treg ) in human organ transplantation and autoimmune disease [ J ]. Clin Exp Immunol, 2007, 148( 1 ): 32-46.
- [ 4 ] Dong C. TH17 cells in development: An updated view of their molecular identity and genetic programming [ J ]. Nat Rev Immunol, 2008, 8( 5 ): 337-348.
- [ 5 ] Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 cells [ J ]. Annu Rev Immunol, 2009, 27( 3 ): 485-517.
- [ 6 ] Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: Linking microbial infections to chronic inflammation and cancer [ J ]. Cell, 2006, 124( 4 ): 823-835.
- [ 7 ] Caruso R, Fina D, Paoluzi OA, et al. IL-23-mediated regulation of IL-17 production in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa [ J ]. Eur J Immunol, 2008, 38( 2 ): 470-478.
- [ 8 ] Langowski JL, Zhang X, Wu L, et al. IL-23 promotes tumor incidence and growth [ J ]. Nature, 2006, 442( 7101 ): 461-465.
- [ 9 ] 张国红, 苏敏, 田东萍. 慢性炎症介导的基底膜改变在食管上皮癌变中的作用 [ J ]. 癌症, 2005, 24( 9 ): 1071-1075.
- [ 10 ] 侯浚, 林培中, 陈志峰, 等. 磁县食管癌普查研究 [ J ]. 肿瘤防治研究, 1998, 25( 1 ): 73-75.
- [ 11 ] 冯笑山, 侯建峰, 董彩红, 等. 洛阳地区 20 年间食管病变的变化分析 [ J ]. 中国肿瘤临床与康复, 2010, 17( 2 ): 97-99.
- [ 12 ] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer [ J ]. Nature, 2002, 420( 6917 ): 860-867.
- [ 13 ] Lucia MS, Torkko KC. Inflammation as a target for prostate cancer chemoprevention: Pathological and laboratory rationale [ J ]. J Urol, 2004, 171( 2 Pt 2 ): S30-35.
- [ 14 ] Numasaki M, Watanab M, Suzuki T, et al. IL-17 enhances the net angiogenic activity and *in vivo* growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis [ J ]. J Immunol, 2005, 175( 9 ): 6177-6189.
- [ 15 ] Horlock C, Stott B, Dyson PJ, et al. The effects of trastuzumab on the CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup> T-cell axis in patients with breast cancer [ J ]. Br J Cancer, 2009, 100( 7 ): 1061-1067.
- [ 16 ] Zhang B, Rong G, Wei H, et al. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer [ J ]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374( 3 ): 533-537.
- [ 17 ] Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, et al. Generation and regulation of human CD4<sup>+</sup> IL-17-producing T cells in ovarian cancer [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105( 40 ): 15505-15510.
- [ 18 ] Honorati MC, Cattini L, Facchini A. Possible prognostic role of IL-17R in osteosarcoma [ J ]. J Cancer Res Clin Oncol, 2007, 133( 12 ): 1017-1021.

[ 收稿日期 ] 2010 - 10 - 29

[ 修回日期 ] 2010 - 12 - 11

[ 本文编辑 ] 韩 丹