

· 临床研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.04.017

急性白血病患者外周血 Treg 细胞与 Th17 细胞的相关性

黄建霞,张连生,易良才,曾鹏云,吴重阳,白俊(兰州大学第二附属医院血液科,甘肃兰州 730000)

[摘要] 目的:检测急性白血病患者外周血中 Treg 细胞与 Th17 细胞的比例以及相关细胞因子如 IL-17、IL-6、TGF- β 的变化,分析其相关性。方法:选取兰州大学第二医院血液科急性白血病初诊患者 15 例,另取 15 名健康志愿者为对照。流式细胞术检测外周血中 CD3⁺CD4⁺TIL-17⁺ 辅助性 T 细胞(Th17 细胞)、CD4⁺TCD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞(Treg 细胞)占 CD4⁺T 细胞的比例,ELISA 法检测血清中细胞因子 IL-17、TGF- β 、IL-6 的水平。结果:急性白血病患者外周血中 Th17 细胞占 CD4⁺T 细胞的(1.39 \pm 0.24)%,高于对照组的(0.26 \pm 0.11)%($P < 0.05$);急性白血病患者外周血 Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的(11.58 \pm 2.17)%,高于对照组的(2.47 \pm 0.72)%($P < 0.05$);且 Treg 细胞与 Th17 细胞呈正相关($\gamma = 0.37$)。急性白血病患者血清中 TGF- β 、IL-6、IL-17 的水平分别为(26.06 \pm 2.43)、(14.66 \pm 2.47)、(18.63 \pm 2.38)pg/ml,高于对照组的(13.41 \pm 1.92)、(1.44 \pm 0.29)、(10.34 \pm 1.71)pg/ml(均 $P < 0.05$)。结论:急性白血病患者外周血中 Treg、Th17 细胞比例升高,且两者呈正相关;急性白血病患者血清中 TGF- β 、IL-6、IL-17 水平升高,可能影响 Treg 与 Th17 细胞的平衡。

[关键词] 急性白血病;调节性 T 细胞;Th17 细胞;TGF- β ;IL-6;IL-17

[中图分类号] R733.71; R392.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)04-0430-04

Relationship between Treg and Th17 cells in peripheral blood of acute leukemia patients

HUANG Jian-xia, ZHANG Lian-sheng, YI Liang-cai, ZENG Peng-yun, WU Chong-yang, BAI Jun (Department of Hematology, Second Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the proportions of CD3⁺CD4⁺TIL-17⁺ helper T cells (Th17 cells) and CD4⁺TCD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) in the peripheral blood of acute leukemia patients and the changes of related cytokines (including IL-17, TGF- β , IL-6), and to analyze their relationship. **Methods:** The ratios of Treg and Th17 cells in peripheral CD4⁺T cells were examined by flow cytometry. The serum levels of IL-17, TGF- β and IL-6 were measured by ELISA. **Results:** The ratio of Th17 cells in CD4⁺T cells was (1.39 \pm 0.24)%, which was significantly higher than that in the control group ([0.26 \pm 0.11]%, $P < 0.05$); the ratio of Treg cells in CD4⁺T cells was (11.58 \pm 2.17)%, which was significantly higher than that in the control group ([2.47 \pm 0.72]%, $P < 0.05$); and Treg cells were positively related with Th17 cells. The serum levels of TGF- β , IL-6, and IL-17 in acute leukemia patients were (26.06 \pm 2.43), (14.66 \pm 2.47), and (18.63 \pm 2.38) pg/ml, respectively, which were significantly higher than those in the control group ([13.41 \pm 1.92], [1.44 \pm 0.29], and [10.34 \pm 1.71] pg/ml, $P < 0.05$). **Conclusion:** The ratios of Treg and Th17 cells are increased in the peripheral blood of acute leukemia patients, and they are positively correlated with each other. The serum levels of TGF- β , IL-6, and IL-17 are also elevated, which may affect the balance between Treg cells and Th17 cells.

[Key words] acute leukemia; regulatory T cell (Treg); Th17 cell; TGF- β ; IL-6; IL-17

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(4): 430-433]

急性白血病(acute leukemia, AL)是造血干细胞的恶性克隆性疾病。近年来,免疫治疗已经成为白血病治疗尤其是微小残留病灶清除方面的研究热点^[1]。Th17 细胞与 Treg 细胞在调节免疫稳定的过程中起着重要的作用,两者之间的关系是目前研究的重点。本课题通过对急性白血病患者外周血 Treg 细胞、Th17 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例和 IL-6、IL-

[基金项目] 甘肃省科技支撑计划资助项目(No.0804NKCA115)。Project supported by the Science and Technology Supporting Program of Gansu Province (No.0804NKCA115)

[作者简介] 黄建霞(1984-),女,甘肃省兰州市人,硕士生,主要从事肿瘤生物免疫治疗方面的研究。E-mail:huangjx7673@sina.com

[通信作者] 张连生(ZHANG Lian-sheng, corresponding author), E-mail: zls2170@yahoo.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110714.1100.003.html>

17、TGF- β 浓度的测定,探讨急性白血病患者外周血中 Treg 细胞与 Th17 细胞间的关系及相关细胞因子的变化情况,阐述了 Treg 细胞、Th17 细胞等在急性白血病发病中的作用,为临床免疫治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

15 名初诊急性白血病患者来自兰州大学第二附属医院血液科(2010 年 11 月至 2011 年 1 月),均按照 2007 第 3 版张之南《血液病诊断及疗效标准》确诊,且不符合自身免疫疾病、炎症性疾病。患者年龄 14~48 岁,平均年龄(33 \pm 2.5)岁;男性 7 名、女性 8 名。15 名健康志愿者均来自兰州大学第二附属医院体检中心,年龄 21~37 岁,平均(25 \pm 1.5)岁,无肿瘤及自身免疫疾病。

1.2 主要试剂

人淋巴细胞分离液 Ficoll-hypaque 购自北京 Solarbio 化学试剂公司,RPMI 1640 培养液、PMA、离子霉素、莫能霉素购自碧云天生物技术研究所,CD4、CD25、Foxp3 抗体购自美国 BD 公司。人 TGF- β 、IL-6、IL-17 ELISA 试剂盒购自北京达科为生物技术公司,人 Th17 检测试剂盒购自美国 Biolegend 公司。

1.3 流式细胞术检测急性白血病患者 Th17 细胞水平

肝素钠抗凝血 4 ml,经 Ficoll 密度梯度离心分离获得外周血单个核细胞(PBMCs),PBMCs 细胞数为(0.5~1) $\times 10^6$ 。取 500 μ l RPMI 1640 培养液,加入 20 ng/ml PMA、1 μ g/ml 离子霉素、500 ng/ml 莫能霉素,500 μ l PBMCs,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h 后,用 PBS 洗涤 2 次,按人 Th17 检测试剂盒说明书进行操作,用流式细胞仪分析 Th17 细胞的水平。

1.4 流式细胞术检测 PBMCs 中 Treg 细胞水平

取(0.5 $\times 10^4$ ~1 $\times 10^4$)/ μ l PBMCs,试管中加入 20 μ l CD4-PerCP、CD25-FITC,对照管加入 20 μ l CD4 小鼠 IgG1-PE,混匀,室温避光 15~30 min。PBS 洗 1 次,350 $\times g$ 离心 5 min,弃上清。分别加入 1 ml 固定液,混匀,4 $^{\circ}$ C 避光 12 min。加入 2 ml 通透液,350 $\times g$ 离心 5 min,弃上清。实验管中加入 20 μ l Foxp3-PE,对照管中加入 20 μ l 小鼠 IgG2a-PE,混匀,4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。加入 2 ml 通透液,350 $\times g$ 离心 5 min,弃上清。加入 0.5 ml PBS 后,流式细胞仪分析 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的水平。

1.5 ELISA 检测血清中细胞因子的表达

取急性白血病患者非抗凝外周血 2 ml,350 $\times g$ 离心 10 min,将血清移入 EP 管中,根据 TGF- β 、IL-6、IL-17 ELISA 试剂盒说明进行操作,检测血清中

TGF- β 、IL-6、IL-17 的表达水平。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.0 统计软件,应用 *t* 检验分析组间差异,采用 Pearson 法进行相关性分析。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性白血病患者外周血 Th17 细胞比例升高

流式细胞术检测急性白血病患者外周血 Th17 细胞的水平,结果(图 1)显示,白血病患者外周血中 Th17 占 CD4⁺T 细胞的比例为(1.39 \pm 0.24)% ,明显高于对照组的(0.26 \pm 0.11)% ($P < 0.05$)。由此可见,急性白血病患者外周血 Th17 细胞比例升高。

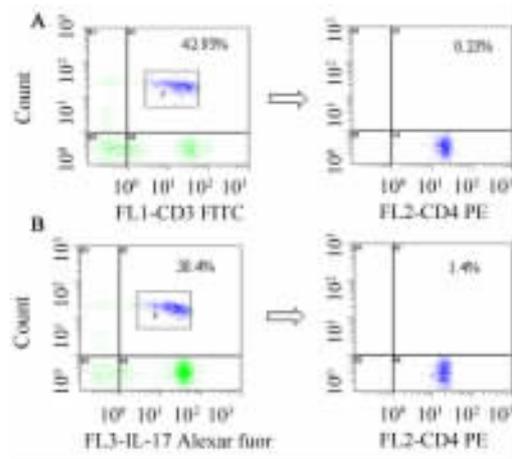


图 1 流式细胞术检测急性白血病患者外周血 Th17 细胞的比例

Fig. 1 Ratio of Th17 cells in peripheral blood of acute leukemia patients as detected by flow cytometry

A: Control group; B: Acute leukemia group

2.2 急性白血病患者外周血 Treg 细胞比例升高

流式细胞术检测急性白血病患者外周血 Treg 细胞的水平,结果(图 2)表明,急性白血病患者外周血中 Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例为(11.58 \pm 2.17)% ,高于对照组的(2.47 \pm 0.72)% ($P < 0.05$)。由此可见,急性白血病患者外周血 Treg 细胞比例升高。

2.4 急性白血病患者外周血表达高水平的 TGF- β 、IL-6 和 IL-17

急性白血病患者血清中 TGF- β 的水平明显高于对照组[(26.06 \pm 2.43) vs (13.41 \pm 1.92)pg/ml, $P < 0.05$]。血清中 IL-6 和 IL-17 的水平也明显高于对照组[(14.66 \pm 2.47) vs (1.44 \pm 0.29)pg/ml, $P < 0.05$]; (18.63 \pm 2.38) vs (10.34 \pm 1.71)pg/ml, $P <$

0.05]。结果说明,急性白血病患者血清中 TGF-β、IL-6 和 IL-17 浓度升高。

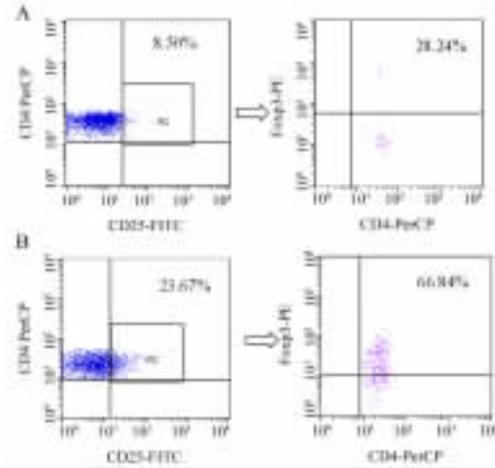


图2 急性白血病患者外周血 Treg 细胞的比例

Fig. 2 Ratio of Treg in peripheral blood of acute leukemia patients as detected by flow cytometry

A: Control group; B: Acute leukemia group

2.5 急性白血病患者外周血 Treg 与 Th17 细胞水平呈正相关

经 Pearson 相关性分析显示,急性白血病患者外周血中 Treg 细胞与 Th17 细胞的数量呈正相关性,相关系数为 0.37(图3)。急性白血病学组 Th17 细胞与血清中 IL-6、IL-17、TGF-β 水平呈正相关,相关系数分别是 0.43、0.44、0.12。急性白血病患者 Treg 细胞与血清中 TGF-β 水平呈正相关,相关系数为 0.46。由此可见,急性白血病患者外周血 Treg 与 Th17 细胞呈正相关性,IL-6、IL-17、TGF-β 影响两者的表达。

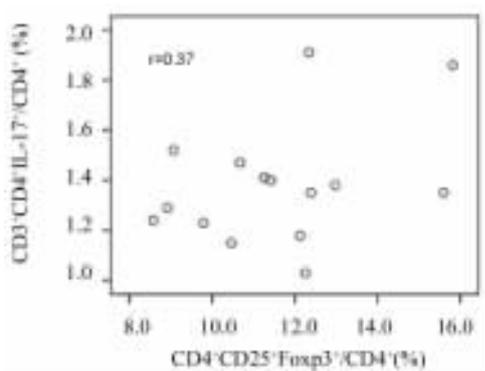


图3 急性白血病患者外周血 Treg 细胞与 Th17 细胞的相关性分析

Fig. 3 Correlation between Treg and Th17 cells in peripheral blood of acute leukemia patients

3 讨论

Th17 细胞是新近发现的一类 T 细胞亚群,表达 IL-12Rβ2(IL-12 受体 β2 链)、IL-23R(IL-23 受体)、CCR4 及 CCR6^[2]。维甲酸相关孤儿受体 γt(RORγt) 是 Th17 细胞特异性转录因子,与信号转导转录激活子 3(STAT3)协同刺激 Th17 细胞的分化及 IL-17 的产生。IL-17 作为促炎因子,在体内通过与 IL-17R 结合激活相关信号分子,促使趋化因子及其他炎症因子释放,扩大炎症反应及自身免疫性反应^[3]。有研究^[4,5]表明,Th17 在蕈样肉芽肿、塞塞里综合征、前列腺癌中表达增高;而 Muranski 等^[6]在黑素瘤免疫治疗中发现,Th17 细胞有抗肿瘤作用。因此,Th17 细胞在肿瘤免疫中的作用是促进肿瘤发展还是促进抗肿瘤免疫,目前尚无定论。

Treg 细胞是一群独特的专职抑制细胞,包括天然性调节性 T 细胞(nTreg 细胞)和诱导性(或称适应性)调节性 T 细胞(iTreg 细胞)两种,其表面都表达 CD4、CD25(白介素-2 受体 α 链)、CTLA-4(T 淋巴细胞毒性相关抗原-4)、GITR(糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体)、Foxp3(叉头翼状螺旋转录因子),其中 Foxp3 对 Treg 细胞的分化及功能维持起着重要的作用^[7]。两种 Treg 细胞功能相近,可阻碍抗肿瘤免疫治疗^[8,9]。在多种恶性肿瘤中 Treg 细胞的数量增加,并且与肿瘤的预后及分期相关^[10-11]。

Ma 等^[12]在系统性红斑狼疮患者中发现 Treg 细胞比例降低,Th17 细胞比例升高,Treg/Th17 比值降低,且与疾病的活动及严重性相关。Nicola 等^[13]在炎症性肠病患者外周血中发现 Th17 细胞异常增高,而 Treg 细胞数目明显减少。但目前急性白血病患者中 Treg 细胞与 Th17 细胞之间的关系及相关细胞因子的研究,国内外尚未见相关报道。

本研究证实,急性白血病患者外周血中 CD4⁺TCD25⁺Foxp3⁺Treg/CD4⁺T 比值升高,CD3⁺CD4⁺TIL-17⁺Th17/CD4⁺T 比值也升高,且 Treg 细胞与 Th17 细胞呈正相关,即急性白血病患者外周血中 Treg 细胞升高的同时 Th17 细胞也升高,并且 Treg 细胞升高的幅度大于 Th17 细胞。对小鼠的研究^[14]发现,Th17 细胞特异性转录因子 RORγt 活化与 Treg 细胞特异性转录因子 Foxp3 活化均依赖于 TGF-β 信号,且 Th17 细胞分化所需的 IL-6 可抑制 Treg 细胞的分化。由 TGF-β 诱导的 iTreg 细胞,其特异性转录因子 Foxp3 可抑制 Th17 细胞特异性转录因子 RORγt 的功能^[15]。由此可见,小鼠体内 Th17 细胞与 iTreg 细胞的分化存在竞争性抑制关系,两者的分

化相互拮抗^[16]。但人 Th17 细胞、iTreg 细胞分化与小鼠不尽相同。

研究^[17]表明,人 Th17 细胞的发育不仅需要 IL-6、TGF- β 参与,而且 IL-21、IL-23、IL-1 β 可能在 Th17 细胞发育过程中起着强化和稳定 Th17 细胞表型的作用,而 IL-17 对 Th17 细胞的分化既无促进作用也无抑制作用。IL-17、IL-21、IL-23、IL-6 作为促炎因子具有抑制免疫监视的作用,并通过 STAT3 信号途径促进肿瘤生长和新生血管生成^[18]。本研究发现,急性白血病患者 IL-17、IL-6、TGF- β 水平均升高,可能通过影响 Treg 细胞与 Th17 细胞的分化,参与急性白血病的发生。一些学者等^[19]发现,在黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌中 Treg 细胞与 Th17 细胞同时升高,且两者的平衡与 IL-2 有关。本研究发现,急性白血病患者外周血中 Treg 细胞与 Th17 细胞水平同时升高,且存在细胞因子水平的改变;除了上述细胞因子外,可能还有未知的细胞因子参与 Treg 细胞与 Th17 细胞的平衡。除了细胞因子的影响外,有研究^[20]还表明,nTreg 细胞还可向 Th17 细胞分化,那么在急性白血病患者中 Th17 细胞水平的升高,是否也与 nTreg 细胞的分化有关?

总之,本研究发现,急性白血病患者免疫环境不平衡,Treg 细胞与 Th17 细胞同时参与了急性白血病的免疫病理过程,Treg 细胞升高的同时 Th17 细胞也升高,两者存在的细胞因子环境也是不平衡的,这将为急性白血病的治疗带来新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] Brichard VG, Lejeune D. Cancer immunotherapy targeting tumour-specific antigens: Towards a new therapy for minimal residual disease [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8(7): 951-968.
- [2] Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells [J]. *J Exp Med*, 2007, 204(8): 1849-1861.
- [3] Pappu BP, Angkasekwinai P, Dong C. Regulatory mechanisms of helper T cell differentiation: New lessons learned from interleukin 17 family cytokines [J]. *Pharmacol Ther*, 2008, 117(3): 374-384.
- [4] Cirée A, Michel L, Camilleri-Brüet S, et al. Expression and activity of IL-17 in cutaneous T-cell lymphomas (mycosis fungoides and sezary syndrome) [J]. *Int J Cancer*, 2004, 112(1): 113-120.
- [5] Steiner GE, Newman ME, Paikl D, et al. Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate [J]. *Prostate*, 2003, 56(3): 171-182.
- [6] Muranski P, Boni A, Antony PA, et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma [J]. *Blood*, 2008, 112(2): 362-373.
- [7] Cassis L, Aiello S, Noris M. Natural versus adaptive regulatory T cells [J]. *Contrib Nephrol*, 2005, 146: 121-131.
- [8] Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive Foxp3⁺ regulatory T cells: More of the same or a division of labor [J]? *Immunity*, 2009, 30(5): 626-635.
- [9] Piccirillo CA. Regulatory T cells in health and disease [J]. *Cytokine*, 2008, 43(3): 395-401.
- [10] Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, et al. Correlation of high numbers of intratumoral Foxp3⁺ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma [J]. *Haematologica*, 2008, 93(2): 193-200.
- [11] Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival [J]. *Nat Med*, 2004, 10(9): 942-949.
- [12] Ma J, Yu J, Tao X, Cai L, et al. The imbalance between regulatory and IL-17-secreting CD4⁺ T cells in lupus patients [J]. *Clin Rheumatol*, 2010, 29(11): 1251-1258.
- [13] Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, et al. Foxp3⁺ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease [J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30(1): 80-89.
- [14] Kimura A, Kishimoto T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance [J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(7): 1830-1835.
- [15] Zhou L, Lopes JE, Chong MM, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR gamma T function [J]. *Nature*, 2008, 453(7192): 236-240.
- [16] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells [J]. *Nature*, 2006, 441(7090): 235-238.
- [17] Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: The third member of the effector T cell trilogy [J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(6): 652-657.
- [18] Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(5): 1175-1183.
- [19] Kryczek I, Wei S, Zou L, et al. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment [J]. *J Immunol*, 2007, 178(11): 6730-6733.
- [20] Voo KS, Wang YH, Santori FR, et al. Identification of IL-17-producing Foxp3⁺ regulatory T cells in humans [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(12): 4793-4798.

[收稿日期] 2011 - 05 - 08

[修回日期] 2011 - 06 - 12

[本文编辑] 王莹