

· 临床研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.05.015

甲状腺乳头状癌患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Treg 的检测及其临床意义

石嘉俐,周佳青(上海交通大学医学院附属仁济医院耳鼻咽喉头颈外科,上海 200127)

[摘要] 目的:检测 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} 调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)在甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)患者外周血的比例,探讨其临床意义。方法:选择 2010 年 8 月至 2011 年 2 月在上海交通大学医学院附属仁济医院进行手术治疗的 PTC 患者 40 例及甲状腺腺瘤患者 30 例,以 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} 为标志,采用流式细胞术检测 PTC 患者及甲状腺腺瘤患者外周血中 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Treg 的比例,分析其与 PTC 临床病理特征的关系。结果:与甲状腺腺瘤患者比较,PTC 患者外周血中 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Treg 比例明显升高[(7.836 ± 1.668)% vs (5.365 ± 1.156)% , P < 0.05];外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Treg 比例与 PTC 临床分期、颈部淋巴结转移相关(均 P < 0.05),与年龄、性别及肿瘤大小无关(P > 0.05)。结论:PTC 患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Treg 比例显著增加,且与 PTC 临床分期、颈部淋巴结转移相关。

[关键词] 甲状腺乳头状癌;CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞;颈部淋巴结转移;TNM 分期

[中图分类号] R736.1; R730.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)05-0544-04

Detection and clinical significance of CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} regulatory T cell in peripheral blood of papillary thyroid carcinoma patients

SHI Jia-li, ZHOU Jia-qin (Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Renji Hospital, Medical School of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the proportion of CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} regulatory T cells in peripheral blood of papillary thyroid carcinoma (PTC) patients and its clinical significance. **Methods:** Forty patients with PTC and 30 patients with thyroid adenoma were included in this study. They were all treated in Renji Hospital, Medical School of Shanghai Jiaotong University between August 2010 to February 2011. The proportion of CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Treg in peripheral blood of PTC and thyroid adenoma patients was evaluated by flow cytometry, and their relationship to clinicopathological features of PTC was studied. **Results:** Compared to thyroid adenoma patients, the proportion of CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Treg in peripheral blood of PTC patients was significantly increased ([7.836 ± 1.668]% vs [5.365 ± 1.156]% , P < 0.05). The proportion of CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Treg was related to clinical tumor stage and cervical lymph node metastasis of PTC patients (all P < 0.05), but not related to age, gender, and tumor size (P > 0.05). **Conclusion:** The proportion of CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Treg in peripheral blood of PTC patients was significantly increased, and related to clinical tumor stage and cervical lymph node metastasis of PTC patients.

[Key words] papillary thyroid carcinoma; CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell; cervical lymph node metastasis; TNM stage
[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(5): 544-547]

甲状腺癌(thyroid carcinoma, TC)是最常见的一类内分泌恶性肿瘤,其发病率逐年升高,其中甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)约占甲状腺癌的 80%。大多数 PTC 经外科手术治疗后,预后良好,但部分 PTC 具有较高的侵袭性,具有去分化的发展趋势,其预后不良。乳腺癌、胃癌、肝癌、胰腺癌等众多恶性肿瘤组织浸润淋巴细胞及外周血淋巴细胞中 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞(regulatory T cell,

Treg)增多^[14], CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞是 Sakaguchi 等^[5]首先报道的一群具有免疫调节功能的 T 细胞亚群,能显著抑制多种免疫细胞的功能。为了探讨 PTC

[作者简介] 石嘉俐(1985 -),女,上海市人,硕士生,主要从事头颈部肿瘤的研究。E-mail: sger1228@126.com

[通信作者] 周佳青(ZHOU Jia-qin, corresponding author), E-mail: jqzhou03@163.com

患者是否也存在这样一群 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞,并参与肿瘤的免疫逃逸,本研究以 CD4⁺、CD25⁺、CD127^{low/-} 作为特异性标志检测了临床 PTC 患者外周血中的 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的比例变化,并初步探讨其在肿瘤免疫及肿瘤发生、发展中的作用,以期深入研究 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Treg 细胞在 PTC 防治、预后判断中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象和分组

PTC 组:选择 2010 年 8 月至 2011 年 2 月在上海交通大学医学院附属仁济医院耳鼻咽喉头颈外科进行手术治疗的 PTC 患者(经病理确诊)40 例,其中女性 30 例、男性 10 例,年龄 18~70 岁,中位年龄 44.3 岁,≤45 岁 17 例、>45 岁 23 例;TNM 分期 I 期 32 例、II 期 3 例、III 期 3 例、IV 期 2 例;颈部淋巴结转移患者 12 例,未有颈部淋巴结转移者 28 例;肿瘤≤1 cm 18 例,>1 cm 22 例。患者均无近期感染史,无自身免疫疾病史,无其他已知肿瘤疾病;手术前均未行放疗、化疗,无孕妇。对照组:选择同一时期在仁济医院耳鼻咽喉头颈外科进行手术治疗的甲状腺腺瘤(thyroid adenoma, TA)患者(经病理确诊)30 例,其中女性 22 例、男性 8 例,年龄 34~66 岁,中位年龄 48.7 岁。患者无近期感染史,无自身免疫疾病史,无其他已知肿瘤疾病,手术前均未行放疗、化疗,无孕妇。所有患者均签署知情同意书,并报医院伦理委员会批准同意,实验研究符合医学伦理学原则和医学道德规范。

1.2 主要试剂和仪器

小鼠抗人 CD127-PE 单抗、小鼠抗人 CD4-FITC 单抗、小鼠抗人 CD25-APC 单抗、小鼠抗小鼠 IgG1-APC 单抗、小鼠抗小鼠 IgG1-PE 单抗购自 eBioscience 公司,淋巴细胞分离液 Ficoll-Hypaque 购自 GE 公司。

1.3 外周血单个核细胞的分离

术前 24 h 内采集 PTC 实验组和对照组抗凝外周静脉血 2 ml,加 2 倍体积的 PBS 悬浮细胞,混匀。将 4 ml 稀释全血缓慢加入 4 ml 淋巴细胞分离液 Ficoll-Hypaque(1.077 g/ml),室温下 2 500 × g 离心 25 min。轻轻吸取中间白色的淋巴细胞层,加 2 ml PBS,1 500 × g 离心 10 min;去上清,加 200 μl PBS,混匀单细胞悬液,每个标本分为实验管和对照管,每管中加入 100 μl 单细胞悬液。

1.4 流式细胞术检测 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Treg 细胞的表达

每份 100 μl 细胞样品中分别加入相应荧光标

记抗体各 10 μl,实验管为小鼠抗人 CD4-FITC、CD25-APC、CD127-PE 单抗,对照管为小鼠抗人 CD4-FITC 单抗、小鼠抗小鼠 IgG1-APC、IgG1-PE 单抗(作为同型对照),充分混匀,室温下避光孵育 30 min;各样品中分别加入 1 ml PBS,1 500 × g 离心 5 min,去上清,重悬于 200 μl PBS 中,上流式细胞仪检测。利用 Cell quest 图像分析软件分析,在 CD4 和 SSC 双参数点图上,参照阴性对照圈定 CD4⁺ 细胞,由软件分析系统给出 CD4⁺ 细胞占外周血白细胞的比例,然后在以 CD25 和 CD127 设门的双参数点图上选取 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} 细胞(即 Treg 细胞),得到 Treg 细胞占外周血白细胞的比例。

1.5 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS17.0 版软件进行统计学分析,两独立样本采用 *t* 检验,多组数据进行 One-Way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲状腺腺瘤与甲状腺癌患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Treg 比例的比较

检测甲状腺腺瘤与甲状腺癌患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Treg 占 CD4⁺ T 细胞的比例,结果(图 1)显示,PTC 组的比例为(7.836 ± 1.668)%,较对照组的(5.365 ± 1.156)% 明显增高($P < 0.05$)。

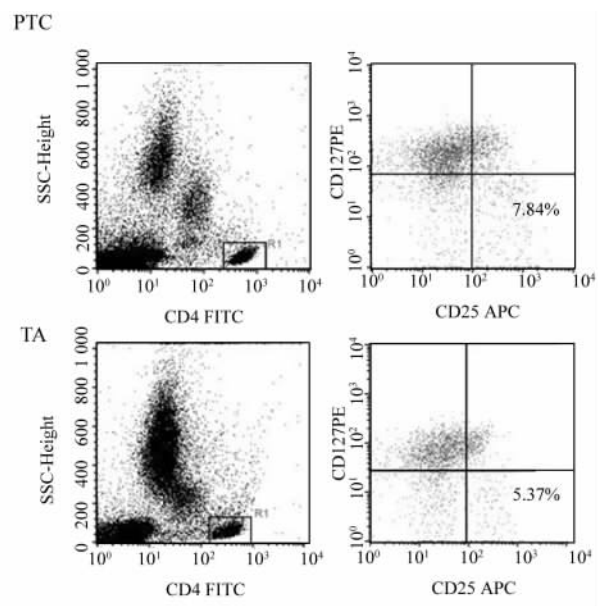


图 1 TA 与 PTC 患者外周血中 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Treg 的比例

Fig. 1 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Treg proportion in peripheral blood of PTC and thyroid adenoma patients

2.2 PTC 患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 的比例与 PTC 临床病理特征的关系

12 例存在颈部淋巴结转移患者的外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 的比例显著高于 22 例无颈部淋巴结转移患者, 因此 PTC 组外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 的比例在淋巴结转移患者显著升高 ($P = 0.005$)。此外, III 期 PTC 患者组外周血的 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 比例显著高于 I 期、II 期患者组 (均 $P < 0.01$)。PTC 组外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 的比例在 22 例 >45 岁患者与 18 例 ≤45 岁患者差异无统计学意义 ($P = 0.890$), 此外与患者性别、肿瘤大小也无关。

表 1 PTC 患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 的比例与 PTC 临床病理特征的关系

Tab. 1 Relationship between the proportion of CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg in peripheral blood of PTC patients and clinicopathological features of PTC

Clinicopathological feature	n	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low/-} Treg proportion (%)	P
Age			
≤45	18	8.150 ± 2.059	0.890
>45	22	8.037 ± 1.880	
Gender			
Male	10	8.953 ± 1.279	0.114
Female	30	7.723 ± 1.696	
TNM			
I	32	7.534 ± 1.304	0.008
II	3	8.290 ± 0.240	
III	3	11.185 ± 2.015*	
IV	2	8.550 ± 0.071	
Tumor size (d/cm)			
≤1	18	8.093 ± 2.019	0.861
>1	22	8.220 ± 1.778	
Lymph node metastasis			
+	12	9.483 ± 2.022	0.005
-	28	7.142 ± 1.274	

3 讨论

CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 是具有能识别靶细胞 MHC 分子所提呈 TCR-自身抗原肽, 并能发挥免疫抑制功能的 T 细胞, 与多种自身免疫疾病及肿瘤的发生、发展有关^[6-12]。

转录因子叉头蛋白 3 (forkhead box P3, Foxp3) 是较为公认的鉴定人类 CD4⁺CD25⁺Treg 的标志物, 但 FoxP3 存在于胞内, 只能用于流式等细胞的鉴定和检测, 而不能用于细胞分离、提纯。CD127 (IL-7 受体) 与 FoxP3 的表达呈负相关^[13]。CD127 在 CD4⁺CD25⁺Treg 中低或无表达, 而在活化的 CD4⁺T 细胞中高表达, 因此用 CD4⁺、CD25⁺、CD127^{low/-} 作为标志, 可以很好地检测 Treg 亚群。

乳腺癌、胃癌、肝癌、胰腺癌等众多恶性肿瘤患者外周血淋巴细胞中 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 增多^[14]。本研究发现, PTC 组患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 百分比明显高于对照组, 推测在 PTC 发展过程中 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 可能起着重要作用。研究^[14]发现, 除了在多种恶性肿瘤患者的外周血的 Treg 有所增加外, 肿瘤浸润淋巴细胞中的 Treg 也升高, 提示肿瘤局部存在免疫抑制现象。Shimizu 等^[15]发现, 去除 Treg 可诱导对同源肿瘤细胞的免疫应答, 促进肿瘤病变部位的炎症反应, 有利于诱导对多种肿瘤抗原的免疫应答。

PTC 患者淋巴结转移情况对 PTC 患者的手术方案选择及复发可能存在显著影响^[16-17], 因此本研究对不同 PTC 淋巴结转移情况间的 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 表达水平进行对比研究, 结果显示, 颈部淋巴结转移 PTC 患者外周血的 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 百分比显著高于无颈部淋巴结转移。CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 在 PTC 颈部淋巴结转移过程中起着一定的作用, 且随着 PTC 肿瘤细胞浸润到局部淋巴结, CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 细胞介导的免疫抑制有增强趋势。PTC 患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 的表达情况, 一定程度上可反映患者 PTC 患者淋巴结转移的情况及复发的可能性, 可以作为预测辅助指标。

在 PTC 组中肿块直径 ≤1 cm 的甲状腺乳头状微癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 百分比与肿块直径 >1 cm 的 PTC 患者外周血比例无显著性差异, 其原因可能与 PTC 早期就具有侵袭颈部淋巴结的特性有关, 甲状腺乳头状微癌患者存在颈部淋巴结转移的情况颇为常见, 故其外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 百分比与 >1 cm 的 PTC 患者

外周血中比例差异无统计学意义。

TNM 分期较晚的 PTC 患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 百分比呈增高趋势,且差异有统计学意义。CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 数目与肿瘤分期密切相关,提示 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 数目与 PTC 肿瘤负荷有关,同时 PTC 肿瘤因素也可能使 Treg 水平增加。Treg 水平反映了病情的进展情况,可考虑作为免疫指标在临床应用。

将 Treg 作为抗肿瘤免疫治疗中的一个新靶点,包括去除 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞、单克隆抗体、蛋白分子转移、阻断 Tregs 的迁移和分化、逆转 Tregs 的分化^[21],但高侵袭性及晚期 TC 与 Treg 细胞相关的肿瘤免疫疗法的研究报道仍较少。

[参 考 文 献]

- [1] Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, et al. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor Foxp3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(25): 8326-8331.
- [2] 卢剑,袁向亮,沈立松. 不同分期胃癌患者外周血淋巴细胞 Foxp3 mRNA 表达水平的研究 [J]. *临床检验杂志*, 2007, 25(3): 215-217.
- [3] Kono K, Kawaida H, Takahashi A, et al. CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2006, 55(9): 1064-1071.
- [4] 崔永生,李欣,于春雷,等. 肺癌和乳腺癌患者外周血中 CD4⁺CD25⁺T 细胞及 Foxp3 mRNA 的变化特点及临床意义 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2006, 32(9): 843-846.
- [5] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases [J]. *Immunol*, 1995, 155(3): 1151-1164.
- [6] Cao D, Borjesson O, Larsson P, et al. Foxp3 identifies regulatory CD25^{bright} CD4⁺ T cells in rheumatic joints [J]. *Scand J Immunol*, 2006, 63(6): 444-452.
- [7] Bovenschen HJ, Van Vlijmen-Wklllems IM, Van de Kerdhof PC, et al. Identification of lesional CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in psoriasis [J]. *Dermatology*, 2006, 213(2): 111-117.
- [8] Alvarado-Sanchez B, Hernandez-Castro B, Portales-Perez D, et al. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *J Autoimmun*, 2006, 27(2): 110-118.
- [9] Chen X, Oppenheim JJ. Foxp3(+) regulatory T cells. The phenotypic and functional consequences of tumour necrosis factor receptor type 2 expression on CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells [J]. *Immunology*, 2011, 133(4): 426-433.
- [10] Yan M, Jene N, Byrne D, et al. Recruitment of regulatory T cells is correlated with hypoxia-induced CXCR4 expression, and is associated with poor prognosis in basal-like breast cancers [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 26; 13(2): R47.
- [11] Schuler PJ, Börger V, Bölke E, et al. Dendritic cell generation and CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells in human head and neck carcinoma during radiochemotherapy [J]. *Eur J Med Res*, 2011, 16(2): 57-62.
- [12] Taams LS, Palmer DB, Akbar AN, et al. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation [J]. *Immunology*, 2006, 118(1): 1-9.
- [13] Liu W, Putnam AL, Xu YZ, et al. CD127 expression inversely correlates with Foxp3 and suppressive function of human CD4⁺Treg cells [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(7): 1701-1711.
- [14] Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, et al. Foxp3 expression and overall survival in breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 10; 27(11): 1746-1752.
- [15] Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD4⁺CD25⁺T cells: A common basis between tumor immunity and autoimmunity [J]. *J Immunol*, 1999, 163(10): 5211-5218.
- [16] Watkinson JC, Fxanklyn JA, Olliff JF. Detection and surgical of cervical lymph nodes in differentiated thyroid cancer [J]. *Thyroid*, 2006, 16(2): 187-194.
- [17] Lebourleux S, Rubion C, Audin E, et al. Prognostic factors for persistent or recurrent disease of papillary thyroid with neck lymph node metastases and/or tumor extension beyond the thyroid capsule at initial diagnosis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(10): 5723-5729.
- [18] French JD, Weber ZJ, Fretwell DL, et al. Tumor-associated lymphocytes and increased Foxp3⁺ regulatory T cell frequency correlate with more aggressive papillary thyroid cancer [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(5): 2325-2333.
- [19] Feng LL, Wang X. Targeting Foxp3⁺ regulatory T cells-related immunosuppression for cancer immunotherapy [J]. *Chin Med J(Engl)*, 2010, 123(22): 3334-3342.

[收稿日期] 2011 - 06 - 15

[修回日期] 2011 - 09 - 20

[本文编辑] 韩丹