

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.02.019

Th17/Treg 平衡失调与食管鳞状细胞癌浸润转移的相关性

Correlation of imbalance of Th17/Treg with metastasis of esophageal cancer

郝斌¹, 耿霞², 高存¹, 司立博¹, 田辉¹ (1. 山东大学齐鲁医院 胸外科, 山东 济南 250012; 2. 淄博圣洁医院 外科, 山东 淄博 256400)

[摘要] **目的:**检测食管鳞状细胞癌患者外周血中辅助性 T 细胞 17 (T helper 17, Th17) 和调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 的表达, 探讨食管鳞状细胞癌中 Th17/Treg 比例的变化与食管鳞状细胞癌转移的关系。**方法:**收集山东大学齐鲁医院 2009 年 9 月至 2010 年 5 月食管鳞状细胞癌患者 37 例, 其中男 22 例、女 15 例, 平均年龄 (61 ± 7.85) 岁; 23 例健康志愿者为对照。流式细胞术检测外周血 Th17 的表达情况, 分析 Th17 占 CD3⁺T 细胞的比例, 同样流式细胞术检测外周血 Treg 的表达及其占 CD4⁺T 细胞的比例。分析 Th17/Treg 比例变化与食管鳞状细胞癌病理特征的相关性。**结果:**食管鳞状细胞癌患者外周血中 Th17 占 CD3⁺T 细胞的比例显著升高 [(2.11 ± 0.66)% vs (0.84 ± 0.19)% , P < 0.01], Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例也显著升高 [(6.21 ± 1.48)% vs (4.43 ± 0.78)% , P < 0.01]; 食管鳞状细胞癌患者转移组与未转移组相比, Th17 比例明显升高 [(2.42 ± 0.55)% vs (1.61 ± 0.51)% , P < 0.01], 而 Treg 比例无明显差异。食管鳞状细胞癌患者外周血中 Th17/Treg 比例显著高于正常对照组 [(0.35 ± 0.13)% vs (0.19 ± 0.04)% , P < 0.01]; 食管鳞状细胞癌患者淋巴结转移组与未转移组相比, Th17/Treg 比例显著升高 [(0.39 ± 0.13)% vs (0.29 ± 0.10)% , P < 0.05]。**结论:**食管鳞状细胞癌患者外周血中 Th17/Treg 比例显著升高, 可能参与食管鳞状细胞癌的浸润和转移。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; Th17; Treg; Th17/Treg; 转移

[中图分类号] R735.1; R730.2; R730.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)02-0206-04

初始 CD4⁺T 细胞可以分化为辅助性 T 细胞 1 (T helper1, Th1)、Th2、调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 和 Th17 等不同的亚群, 执行不同的生物学功能。在 TGF-β 和 IL-6 同时存在时, 会促进 CD4⁺T 细胞向 Th17 方向分化; 在 TGF-β 单独存在时, CD4⁺T 细胞向 Treg 方向分化^[1-2]。Th17 介导炎症反应, 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和发展^[3-5]。Treg 具有免疫抑制和免疫耐受两大特性, 肿瘤患者的外周血和肿瘤组织中 Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例较健康志愿者明显升高^[6-7]。有研究^[8]证实, 患者体内 Treg 活性升高与肿瘤患者的免疫功能障碍有关, 而且患者体内 Treg 的升高与肿瘤的不良预后有关系^[9]。Th17 与 Treg 功能反向^[2,10]。正常状态下, Th17 与 Treg 处于平衡状态, 两者相互制约共同维持着内环境的稳定。研究^[11]发现, 急性白血病患者外周血存在 Th17/Treg 失衡现象, 但是在食管鳞状细胞癌中尚未见相关的文献报道。本研究检测食管鳞状细胞癌患者外周血中 Th17 和 Treg 的表达情况, 并探讨两者平衡与肿瘤转移的关系, 以期深入了解 Th17 和 Treg 在食管鳞状细胞癌侵袭转移中的作用。

1 材料与方法

1.1 临床资料及标本

采集 2009 年 9 月至 2010 年 5 月在山东大学齐鲁医院行手术治疗的食管鳞状细胞癌患者术前外周血, 所有患者术前均未行化疗或放射治疗。食管鳞状细胞癌诊断及分期标准参照 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病理组织分型及 TNM 分期。纳入本研究的 37 名患者中, 男性 22 例、女性 15 例; 年龄 38 ~ 78 岁, 平均年龄 (61 ± 7.85) 岁。正常对照组 23 例, 全部为健康志愿者, 其中男性 15 例、女性 8 例; 年龄 37 ~ 68 岁, 平均年龄 (56 ± 8.65) 岁。术前取外周血 4 ml, 肝素钠抗凝。

1.2 主要试剂

FIX & PERM 试剂盒、PMA、蛋白转运抑制剂莫能霉素 (monensin)、离子霉素 (ionomycin) 购自美国 IVGN 公司, PE-Cy5 标记的 anti-CD3、FITC 标记的

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30571844)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30571844)

[作者简介] 郝斌 (1977 -), 男, 山东省淄博市人, 硕士生, 主要从事胸部肿瘤分子生物学方面的研究。E-mail: 857948684@qq.com。

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

anti-CD8 和 IL-17 抗体、FITC 标记的 anti-CD4 单抗、别藻蓝素(allophycocyanin, APC)标记的 anti-CD25 单抗购自美国 eBioscience 公司, RPMI 1640 培养基购自美国 Hyclone 公司, 人淋巴细胞分离液购自天津 TBD 公司。

1.3 流式细胞术检测患者外周血 Th17 占 CD3⁺T 淋巴细胞的比例

取肝素化抗凝全血 200 μ l 于试管中, 用 RPMI 1640 1:1 等体积混合; 加入刺激剂 1 μ g/ml PMA 50 μ l, 50 μ g/ml 离子霉素 16 μ l, 0.1 mg/ml 莫能霉素 13.6 μ l, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱孵育 5 h; 每管加入 100 μ l 刺激后血, 测定管加入 10 μ l CD3-PE-Cy5 和 10 μ l CD8-FITC, 避光孵育 15 min。加入 100 μ l FIX&Perm 中的 Reagent A (即固定液), 避光孵育 15 min, 3 ml 生理盐水, 193 \times g 离心 5 min, 弃上清; 加入 100 μ l Fix&Perm 中的 Reagent B (即破膜和溶血液), 同时加入 10 μ l IL-17 抗体, 室温避光孵育 15 min; 加入 3 ml 生理盐水, 193 \times g 离心 5 min, 弃上清。对照管中加入相应的同型对照抗体。500 μ l 流式细胞染色缓冲液重悬细胞, 上流式细胞仪检测。莫能霉素使淋巴细胞表面 CD4 抗原内陷, 用以避免漏检, 提高检出率, 以 CD3⁺CD8⁻表示 CD4⁺T 细胞, CD3⁺CD8⁻IL-17⁺表示 Th17 (流式图中左上象限为外周血 Th17 占 CD3⁺T 细胞的比例)。

1.4 流式细胞术检测外周血 Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例

患者外周血单个核细胞的分离: 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, 537 \times g 离心 20 min, 吸取中间单个核细胞层, 3 ml PBS 液洗 2 次。调节外周血单个核细胞悬液密度为 1×10^7 /ml ~ 2×10^7 /ml, 取目的管和同型对照管, 分别加入 100 μ l 制备的细胞悬液。每管加入 20 μ l 的 CD4、CD25 混合抗体, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。用 2 ml 的流式细胞仪染色液洗涤细胞, 1 208 \times g 离心 5 min, 弃上清。每管中分别加入 1 ml 固定破膜剂, 用移液器吸打混匀, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min。用 2 ml 的破膜缓冲液洗涤细胞 2 次, 离心后去上清。第二次留约 100 μ l 液体重悬细胞, 每管分别加入 2 μ l 的正常鼠血清封闭, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min。留约 100 μ l 液体重悬细胞, 目的管加入 5 μ l 的 PE-抗人 Foxp3 (PCH101), 同型对照管中加入同型对照抗体, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育至少 30 min。用 2 ml 的破膜缓冲液洗涤细胞 2 次, 离心后弃上清。用 300 μ l 的流式细胞染色缓冲液重悬细胞, 上机分析。

1.5 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* 检验及 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 食管鳞状细胞癌患者外周血 Th17 占 CD3⁺T 细胞的比例升高

实验结果(图 1)显示, 食管鳞状细胞癌患者外周血 Th17 占 CD3⁺T 细胞的比例显著高于健康对照组 [(2.11 \pm 0.66)% vs (0.84 \pm 0.19)% , $P < 0.01$]。淋巴结转移的食管鳞状细胞癌患者外周血中 Th17 占 CD3⁺T 细胞的比例显著高于无淋巴结转移的患者 [(2.42 \pm 0.55)% vs (1.61 \pm 0.51)% , $P < 0.01$]。Th17 占淋巴细胞的比例与肿瘤的大小、分化程度、组织学类型及浸润深度未表现出明显相关 ($P > 0.05$)。

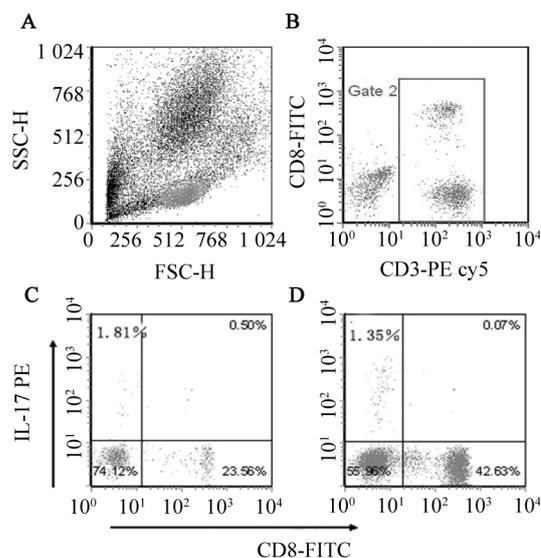


图 1 食管鳞状细胞癌患者外周血 Th17 占 CD3⁺T 细胞的比例升高

A: FCM 圈出淋巴细胞; B: FCM 圈出淋巴细胞中的 CD3⁺T 细胞; C, D: 分别分出食管鳞状细胞癌患者及健康者外周血 CD3⁺CD8⁻IL-17⁺T 细胞

2.2 食管鳞状细胞癌患者外周血 Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例升高

检测结果(图 2)显示, 食管鳞状细胞癌患者外周血 Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例显著高于健康对照组所占比例 [(6.21 \pm 1.48)% vs (4.43 \pm 0.78)% , $P < 0.01$]。淋巴结转移食管鳞状细胞癌患者外周血中 Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例与无淋巴结转移患者无明显差异 ($P > 0.05$)。Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例与肿瘤的大小、分化程度、组织学类型及浸润深度未表现出明显相关 ($P > 0.05$)。

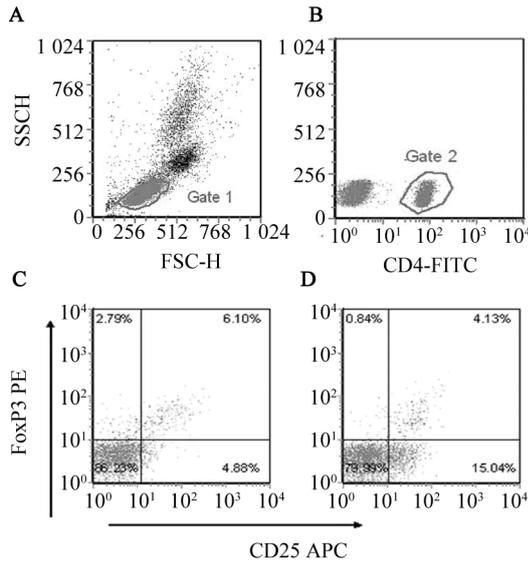


图2 食管鳞状细胞癌患者外周血 Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例升高
A: FCM 圈出淋巴细胞; B: FCM 圈出淋巴细胞中的 CD4⁺T 细胞; C, D: 分别分选出食管鳞状细胞癌患者和健康者外周血 Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例

2.3 食管鳞状细胞癌患者中 Th17/Treg 平衡失调

Th17/Treg 比值在食管鳞状细胞癌患者中显著高于正常对照组 [(0.35 ± 0.13)% vs (0.19 ± 0.04)% , P < 0.01]。有淋巴结转移的患者与无淋巴结转移者相比, Th17/Treg 比值显著升高 [(0.39 ± 0.13)% vs (0.29 ± 0.10)% , P < 0.05]。Th17/Treg 比值与肿瘤大小、浸润深度、临床分期之间未发现显著相关性 (P > 0.05)。

2.4 Th17 与 Treg 的相关性

由于 Th17 与 Treg 在调节细胞分化及功能上都有密切的联系, 本研究对该两者进行了相关性分析。结果(图3)显示, Th17 占 CD3⁺T 细胞比例与 Treg 占 CD4⁺T 细胞比例在正常对照组中呈显著正相关 (r = 0.51, P = 0.014), 而在食管鳞状细胞癌患者中 (r = 0.17, P = 0.33) 无相关性。

3 讨论

研究^[2,12]发现, Th17 及其相关细胞因子可能与肿瘤的发生、发展相关, 并参与介导炎症相关性肿瘤的免疫发病机制。但对 Th17 在肿瘤免疫中的性质、作用和调控机制尚不完全清楚。有研究^[13]报道, Th17 比例在前列腺癌小鼠、宫颈癌及上皮性卵巢癌患者的外周血中显著升高, Th17 的比例在胃癌患者的外周血和引流淋巴结中显著升高, 并且升高的程度与临床分期有关^[14]。本研究显示, 食管鳞状细胞

癌患者外周血中 Th17 占淋巴细胞的比例显著高于健康对照组, 表明食管癌患者存在着 Th17 高表达。

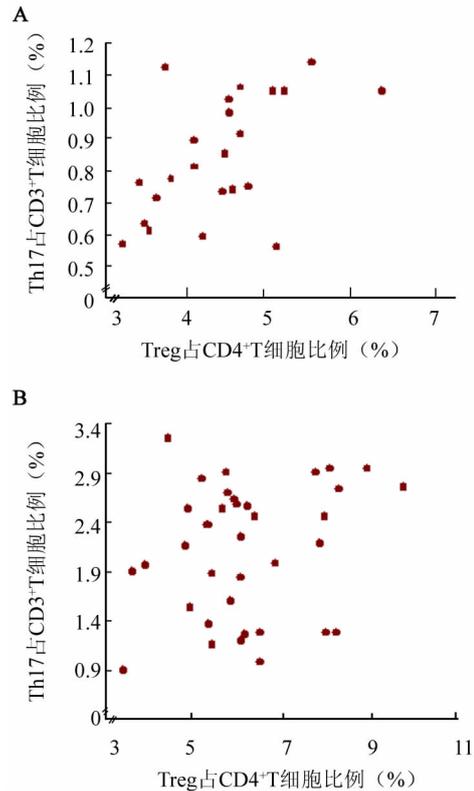


图3 Th17 与 Treg 的相关性
A: 健康对照组; B: 食管鳞状细胞癌患者

Th17 细胞分泌的 IL-17, 促进小鼠后肢缺血后的血管新生^[15]。动物肿瘤模型观察证明, Th17 的特征性细胞因子 IL-17 除了诱发炎症外, 还能上调一系列的血管生长因子, 加快肿瘤血管的发生, 利于肿瘤的生长、浸润和转移^[16-17]。有研究者^[18]认为, 内源性 IL-17 可抑制肿瘤的生长和转移, 但重组的鼠 IL-17 对鼠结肠腺癌细胞的增殖、分化和凋亡没有明显作用。目前无直接证据证明 IL-17 与肿瘤转移相关, 但研究^[19]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 与食管鳞状细胞癌浸润转移的相关性, 本研究对 Th17 与患者临床病理指标之间的相关性进行研究, 结果显示, Th17 比例升高与食管鳞状细胞癌浸润深度、淋巴结转移及病理分期显著相关。由于淋巴结转移、病理分期是判定食管癌患者预后的最重要指标, 因此, Th17 可能参与了食管鳞状细胞癌的浸润转移过程, 并与不良预后相关。

胃癌、肺癌、卵巢癌、肝癌、胰腺癌和乳腺癌等患者的外周血、肿瘤组织、转移淋巴结中都可以检测到 Treg 水平显著升高^[6-7], 且升高程度与疾病发展和

预后呈负相关。本实验结果显示,食管鳞状细胞癌患者外周血中 Treg 水平较正常人显著升高;但是,其与淋巴结转移等临床病理指标之间无显著的相关性。

由于 Th17 和 Treg 的分化调节和效应功能是相反的,Th17/Treg 或许类似于 Th1/Th2,在免疫调节上是相互拮抗、相互平衡的一对^[20],Th17/Treg 平衡失调或许是导致肿瘤进展的因素之一。有研究^[21]表明,Treg 和 Th17 比例随着肿瘤进展而同步升高,并在疾病晚期达到最高水平。研究^[22]中发现,Treg 随着胃癌进展逐步升高,而 Th17 在肿瘤早期呈升高趋势到了晚期却逐渐降低,最终因 Treg 的高值优势而导致 Th17/Treg 比值失衡。本实验结果显示,Th17 比例与 Treg 比例之间在正常人具有良好的相关性,而在食管鳞状细胞癌患者中两者失去相关性,随着疾病进展 Th17 的升高快于 Treg 的升高,并且在晚期患者体内存在的是 Th17 优势导致的 Th17/Treg 比值升高。本研究显示,Th17/Treg 比值在食管鳞状细胞癌患者显著高于正常人,Th17/Treg 比值升高与淋巴结转移显著相关,Th17/Treg 的平衡失调可能在食管鳞状细胞癌的浸润转移中起着很重要的作用。

Th17 及 Treg 比例在食管鳞状细胞癌患者体内升高,并随着疾病进展逐步积聚。同时,食管鳞状细胞癌患者亦存在 Th17/Treg 平衡失调,并与肿瘤的浸润转移密切相关,表明 Th17/Treg 失衡在食管鳞状细胞癌的浸润转移过程中起了重要的作用。因此,深入研究 Th17 与 Treg 在肿瘤浸润转移过程中的作用和可能的机制,将为食管鳞状细胞癌的治疗提供新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] 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.
- [2] Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27(3): 485-517.
- [3] Kimura A, Kishimoto T. Th17 cells in inflammation [J]. *Int Immunol*, 2011, 11(3): 319-222.
- [4] Kamradt T, Chang HD. Diversity and flexibility of Th17 effector functions [J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(2): 1-3.
- [5] 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.
- [6] 彭素芳,王胜军,陈建国,等. 胃癌患者外周血 Th17 和 Treg 细胞的特异性转录因子与相关细胞因子的检测及临床意义 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2010, 32(3): 185-189.
- [7] Baecher-Allan C, Anderson DE. Regulatory T cells and human cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2006, 16(2): 98-105.
- [8] Wang RF. Regulatory T cells and innate immune regulation in tumor immunity [J]. *Springer Semin Immunopathol*, 2006, 28(1): 17-23.
- [9] Nakamura T, Shima T, Saeki A, et al. Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(6): 874-881.
- [10] Mougiakakos D, Choudhury A, Ladser A, et al. Regulatory T cells in cancer [J]. *Adv Cancer Res*, 2010, 107: 57-117.
- [11] 黄建霞,张连生,易良才,等. 急性白血病患者外周血 Treg 细胞与 Th17 细胞的相关性 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18(4): 430-433.
- [12] Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, et al. Th17 cells in human disease [J]. *Immunol Rev*, 2008, 223: 87-113.
- [13] 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]. *Immunol*, 2007, 178(11): 6730-6733.
- [14] 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.
- [15] Wilke CM, Kryczek I, Wei S, et al. Th17 cells in cancer: Help or hindrance? [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(5): 643-649.
- [16] Takahashi H, Numasaki M, Lotze MT, et al. Interleukin-17 enhances bFGF-, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells [J]. *Immunol Lett*, 2005, 98(2): 189-193.
- [17] 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.
- [18] Kryczek I, Wei S, Szeliga W, et al. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis [J]. *Blood*, 2009, 114(2): 357-359.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] Stefanos KS, Bruno TC, Maris CH, et al. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals Th17 and Treg skewing [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(11): 3254-3261.
- [22] Maruyama T, Kono K, Mizukami Y, et al. Distribution of Th17 cells and FoxP3(+) regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(9): 1947-1954.

[收稿日期] 2011 - 11 - 13

[修回日期] 2012 - 02 - 26

[本文编辑] 王莹