

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.02.017

## FOXP3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞及其与结直肠癌的相关性

### Relationship of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells and colorectal cancer

卓长华<sup>1,2</sup>, 徐焯<sup>1</sup>综述; 蔡三军<sup>1</sup>审阅(1. 复旦大学附属肿瘤医院大肠外科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032; 2. 福建省肿瘤医院胃肠肿瘤外科, 福州 350014)

**[摘要]** 结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的恶性肿瘤及肿瘤相关致死原因之一,临床上多采用以外科手术为主的多学科综合治疗策略。调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)被认为是肿瘤免疫逃逸和免疫治疗失败的一个重要因素。近年的研究显示,叉头样转录因子 3(transcription factor forkhead box P3, FOXP3)不仅是 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞的重要的胞内标志,也是与其发育分化与功能发挥相关的重要因子。FOXP3<sup>+</sup> Treg 与多种人类肿瘤的生存预后存在关联,高比例的 FOXP3<sup>+</sup> Treg 常与不良的临床预后存在相关。然而,新近多个研究表明,在 CRC 患者中,肿瘤组织中 FOXP3<sup>+</sup> Treg 富集常与其更好的生存预后有关。Treg 在肠道黏膜中可能通过抑制肠道细菌侵袭所引起的炎症和免疫反应,起到了正面抗肿瘤而非免疫耐受的效应。近来, Treg 特定的去甲基化区域(Treg-specific demethylated region, TSDR)被认为是稳定表达 FOXP3 的 nTreg 的一个特异的表观遗传学标志,多项研究证实人类自然发生型 Treg(naturally occurred Treg, nTreg)细胞上该区域呈显著的去甲基化现象。FOXP3-TSDR 去甲基化状态检测对结直肠癌相关研究策略或许是一个重要的启发。

**[关键词]** 调节性 T 细胞;结直肠癌;叉头样转录因子 3; Treg 特定的去甲基化区域

**[中图分类号]** R735.3; R730.51

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2014)02-0210-06

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是威胁人类健康的常见恶性肿瘤之一。在美国男性和女性中,结直肠癌为第三大常见肿瘤及癌症致死的第二大原因,预计 2014 年美国结肠和直肠癌新发病例数达 136 830, 预估病死数达 50 310<sup>[1]</sup>。中国肿瘤登记年报 2012 显示,截止 2009 年末,我国结直肠癌肿瘤发病率 29.44/10 万,病死率为 14.23/10 万,为中国第三大常见肿瘤,在肿瘤致死原因中排名第五<sup>[2]</sup>。目前,外科手术仍然是可能根治 CRC 最有效的方法。新辅助放化疗、辅助治疗和分子靶向药物治疗是中晚期 CRC 患者的重要治疗手段,而免疫治疗(或称生物治疗)也正成为 CRC 综合治疗的一个组成部分。

调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)是一类能对自身免疫原保持免疫耐受、发挥功能性免疫抑制和防止免疫损伤的特定淋巴细胞亚群。由于大多数的肿瘤可以表达自身抗原, Treg 引起的免疫耐受,被认为是肿瘤免疫逃逸和免疫治疗失败的一个重要因素<sup>[3]</sup>。近年来, Treg 成为免疫学和肿瘤学研究的一个热点。本文就 Treg 及与 CRC 相关的 Treg 研究进展做一综述。

### 1 Treg 研究简要历程

1970 年, Gershon 等<sup>[4]</sup>首先报道了在小鼠体内

发现了胸腺来源的抑制性 T 细胞的存在。1984 年, North 等<sup>[5]</sup>在肿瘤小鼠中发现 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞具有抑制抗肿瘤的作用。1995 年, Sakaguchi 等<sup>[6]</sup>把 CD4<sup>+</sup> T 细胞表面表达的 IL-2 受体  $\alpha$  链(即 CD25)作为小鼠 Treg 的表型标志。2001 年,多个研究小组<sup>[7-9]</sup>的研究显示,人类 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 具有与小鼠 Treg 类似的体外免疫抑制活性,并将 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 确定为人 Treg 表面标志。2003 年, Hori 等<sup>[10]</sup>发现了影响小鼠 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 分化和功能表达的一种重要的胞内分子标志物,即叉头样转录因子 3(transcription factor forkhead box P3, FOXP3)。2005 年, Roncador 等<sup>[11]</sup>证实了人类内源性 FOXP3 蛋白的存在,把 FOXP3 作为人 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 的表型标志。2006 年, Liu 等<sup>[12]</sup>报道 CD127<sup>low</sup> 可作为 CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg 的表面标志物。Baecher-Allan 等<sup>[13]</sup>发现 HLA-DR<sup>+</sup> Treg。2008 年, Ito 等<sup>[14]</sup>发现 Treg 新表面标志 ICOS。2009 年, Mi-

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81372646)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81372646)

**[作者简介]** 卓长华(1975 - ),男,福建省福州市人,博士生,主要从事大肠癌与肿瘤免疫学基础及临床研究。E-mail: czhuo12@fudan.edu.cn

**[通信作者]** 蔡三军(Cai Sanjun, corresponding author), E-mail: cai-sanjun@csc.org.cn

yara 等<sup>[15]</sup>提出基于功能划分和分化动态的 FOXP3<sup>+</sup> Treg 细胞亚群的新分类法。2012 年, Blatner 等<sup>[16]</sup>发现,在结肠癌中根据 Treg 细胞是否表达 ROR $\gamma$ t,可影响其具有促癌和抑癌这两种截然不同的生物学效应。

## 2 FOXP3<sup>+</sup> Treg 的起源、分化与增殖

胸腺的微环境,包括各种胸腺间质细胞成分如皮质和髓质上皮细胞及树突状细胞等对其发生起到重要的孕育作用。T 细胞系均起源于胸腺,首先以 CD45RA<sup>+</sup>幼稚型 T 细胞进入外周,经不同活化作用后,分化为普通 T 细胞或 Treg 细胞两个亚群。普通 T 细胞可进一步分化为 CD45RO<sup>+</sup>记忆性 T 细胞,后者可被重新激活为活化的 T 细胞。Treg 分化为终末效应性 Treg,可以表达特定的细胞表面标志。而幼稚型普通 T 细胞也可经由转换激活的 Treg 样细胞(activated converted Treg-like cells)通过未知的机制转变为效应性 Treg,而它们均拥有相似的表面标志如 CD45RA<sup>-</sup>等<sup>[15,17]</sup>。

## 3 CD4<sup>+</sup>及 CD8<sup>+</sup> Treg 细胞亚群及 FOXP3<sup>+</sup> Treg 的新分型法

### 3.1 CD4<sup>+</sup> Treg

CD4<sup>+</sup> Treg 为 Treg 主要部分,其表面标志主要有 CD25、CTLA-4、GITR<sup>[10]</sup>。Zou<sup>[18]</sup>把 CD4<sup>+</sup> Treg 分为三类:(1)自然发生型 Treg(naturally occurred Treg, nTreg),为经典的 Treg,在 CD4<sup>+</sup> T 细胞群体中约占 5%~10%,主要表型标志为 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup><sup>[19]</sup>。(2)诱导性 Treg(induced Treg cell, iTreg),存在于外周淋巴系统,由幼稚或普通 CD4<sup>+</sup> T 细胞在受到自身抗原或肿瘤抗原诱导或刺激后转化而成,效应分子为 IL-10。表型标志可为 CD4<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>,又称 Regulatory 1(Tr1)细胞<sup>[20]</sup>。(3)Th3 细胞,存在于外周,口服食物抗原(耐受原)后由普通 CD4<sup>+</sup> T 细胞转化而成,效应分子以 TGF- $\beta$  为主。表型标志为 CD4<sup>+</sup> TGF- $\beta$ <sup>+</sup><sup>[21]</sup>。

### 3.2 CD8<sup>+</sup> Treg

CD8<sup>+</sup> Treg 比例较少,约占人体内淋巴结及脾脏淋巴结总数 1%,其作用常被忽视<sup>[22]</sup>。CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> T 细胞是肠道淋巴细胞的主要成分,约占其 40%左右<sup>[22]</sup>。此外,CD8<sup>+</sup> Treg 还有 IL-10<sup>+</sup><sup>[23-24]</sup>、CCD28<sup>-</sup><sup>[25]</sup> CD25<sup>+</sup><sup>[26]</sup>等表型。CD8<sup>+</sup> Treg 作用的效应细胞因子为 IFN- $\gamma$ <sup>[22]</sup>。和 CD4<sup>+</sup> Treg 功能类似,CD8<sup>+</sup> Treg 也可表达 FOXP3 而发挥免疫抑制作用<sup>[26]</sup>。

### 3.3 FOXP3<sup>+</sup> Treg 的新分型法

Miyara 等<sup>[15,17]</sup>通过 FOXP3 及细胞表面分子 CD45RA 和 CD25 的表达水平,把人类 FOXP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 细胞分为三型:第 1 型,即幼稚或静息性 Treg(naive or resting Treg, CD45RA<sup>+</sup> FOXP3<sup>lo</sup> CD25<sup>lo</sup>)。该型 Treg 在抗原刺激后可分化为第 2 型,即效应性 Treg(effector Treg, CD45RA<sup>-</sup> FOXP3<sup>hi</sup> CD25<sup>hi</sup>),此型为终末分化且具有高度抑制功能的亚群。第 3 型,即细胞因子分泌型 Treg(cytokine-secreting Treg, CD45RA<sup>-</sup> FOXP3<sup>lo</sup> CD25<sup>lo</sup>),该型又称 FOXP3<sup>+</sup> non-Treg,无体外抑制活性,但可分泌促炎症因子。其中,第 2 型 Treg 可表达 CTLA-4, PD-1, CCR4 和 Tim-3 等,它们对其他两型特别是第 1 型幼稚型 Treg 具有抑制作用。另外,在肿瘤患者中,第 2 型 Treg 主要存在于组织而非外周血中<sup>[15]</sup>。这种新分类法有助于对抑制性或非抑制性 FOXP3<sup>+</sup> 细胞亚群做出定义,从而细分出 Treg 细胞发育的不同阶段,并有利于评估其在生理性和病理性免疫反应中的适应过程<sup>[27]</sup>。

## 4 FOXP3<sup>+</sup> Treg 与 CRC

Treg 通过抑制机体对外来抗原(包括肿瘤抗原)过度的免疫反应起到免疫调节作用,但由此可能导致肿瘤免疫耐受和免疫逃逸。已有报道,多种人类肿瘤与 Treg 比例异常升高有关,包括乳腺癌<sup>[28]</sup>、胰腺癌<sup>[29]</sup>、卵巢癌<sup>[30]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[31]</sup>、原发性肝细胞癌<sup>[32]</sup>、恶性黑素瘤<sup>[33]</sup>、胃癌<sup>[34]</sup>等。在这些研究中,高比例的 FOXP3<sup>+</sup> Treg 常与不良的临床预后密切相关。

但是,在与 CRC 相关的 Treg 研究中,却出现了与上述不一致甚至相反的生存预后结论。Sinicrope 等<sup>[35]</sup>的一项纳入 160 名 II-III 期 CRC 患者的研究及 Suzuki 等<sup>[36]</sup>的一项纳入 94 名 II-III 期 CRC 患者的研究,均无法得出 FOXP3<sup>+</sup> Treg 表达水平高低与患者的总生存时间(OS)之间的关联性。

Salama 等<sup>[37]</sup>使用组织芯片技术研究了共 967 名 CRC II 期和 III 期患者的肿瘤标本中 FOXP3<sup>+</sup> Treg、CD45RO<sup>+</sup>记忆性 T 细胞及 CD8<sup>+</sup> T 细胞的密度。他们发现,在肿瘤组织中 FOXP3<sup>+</sup> Treg 的密度比癌旁正常黏膜组织中的显著增加。多因素分析显示,肿瘤组织 FOXP3<sup>+</sup> Treg 增多是患者生存改善的一个独立相关因素(HR = 0.54, P < 0.001)。而在癌旁正常黏膜中 FOXP3<sup>+</sup> Treg 增多与预后不良存在相关(HR = 1.51, P < 0.019)。

Correale 等<sup>[38]</sup>用免疫组化法研究了 57 名 IV 期大肠癌患者标本中 FOXP3<sup>+</sup> Treg 的肿瘤组织浸润得

分(tumor infiltration score, TIS)。他们发现,化疗或化疗联合免疫治疗前 TIS 较高的患者生存预后较好(平均存活月数, OS: TIS 高分 vs 低分为 43.2 vs 28.6,  $P=0.0005$ ; PFS: TIS 高分 vs 低分为 15.8 vs 8.8,  $P=0.0009$ )。

Frey 等<sup>[39]</sup>对 1420 名非转移的 CRC 患者使用错配修复蛋白(mismatch repair protein, MMR)状态进行分层(MMR 缺陷 223 名, MMR 表达 1197 名;对后者又随机分成 2 亚组,分别为 613 和 584 名)。研究者发现,在 MMR 表达的 2 亚组中,FOXP3<sup>+</sup> Treg 高表达均与 TNM 分期早( $P=0.001$ ,  $<0.001$ )、直肠肿瘤( $P=0.01$ ,  $<0.045$ )及较好的 5 年生存率( $P=0.004$ ,  $<0.001$ )存在正相关。有趣的是,在 MMR 缺陷的患者中,FOXP3<sup>+</sup> Treg 高表达与淋巴结无转移( $P=0.023$ )和无肿瘤血管生成( $P=0.023$ )少及更好的 5 年生存率( $P=0.029$ )存在相关性。Cox 多因素回归分析显示,FOXP3<sup>+</sup> Treg 高表达在 MMR 表达的 2 亚组患者中均为独立预后因素( $P=0.019$ ,  $0.007$ ),且可作为预测无疾病生存时间(DFS)的指标。

Nosho 等<sup>[40]</sup>使用组织芯片技术和病理图像技术,进行了一项含各期 CRC 患者共 768 例的队列研究。在单因素研究中,研究者发现 CD8<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup> 和 FOXP3<sup>+</sup> T 细胞密度与癌症特定( $P<0.007$ )及总体生存率( $P<0.04$ )存在密切相关;但在多因素分析中,只有肿瘤浸润性 CD45RO<sup>+</sup> 细胞密度才与生存预后密切相关( $HR=0.51$ ,  $P=0.0032$ )。

Lee 等<sup>[41]</sup>使用免疫组化法研究 87 例Ⅱ期结肠癌患者标本的肿瘤上皮内和间质中 CD3<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup>、FOXP3<sup>+</sup> 和 CD25<sup>+</sup> T 细胞含量。他们发现,肿瘤上皮内 CD45RO<sup>+</sup> 高表达和 FOXP3<sup>+</sup> T 细胞高表达的患者 5 年预估生存率均高于此二者低表达的患者(分别为 100% vs 79.2%,  $P=0.017$  和 100% vs 78.8%,  $P=0.040$ );研究者指出,肿瘤组织中 FOXP3<sup>+</sup> T 细胞的含量检测,可能有助于预测出Ⅱ期 CRC 患者中需要术后辅助化疗的那些高危患者亚群。

Blatner 等<sup>[16]</sup>在结肠中发现了促癌和抑癌这两种不同的 Treg 细胞亚群。他们观察到把健康小鼠体内分离的 Treg 细胞输注到患结肠炎或结肠炎诱发的肠癌小鼠上,可起到确切的保护作用。Treg 的这两种截然不同的生物学效应取决于 Treg 细胞是否表达 ROR $\gamma$ t 蛋白。在结肠癌中,ROR $\gamma$ t 在平衡保护性和致病性 Treg 的组成、Treg 不同亚群在调节炎症反应的强度、免疫监视的效能以及疾病转归的严重程度中均起到核心作用。该实验显示了结肠中

Treg 细胞的“两面性”。

在肠黏膜局部免疫中,Treg 细胞通过调节肿瘤微环境和影响肿瘤细胞的生物学行为发挥作用<sup>[42]</sup>。研究表明,炎症在促进细胞异常增殖、血管生成和远处转移等方面起到促进肿瘤生长的作用<sup>[43-45]</sup>。CRC 中 Treg 异常富集与预后良好的相关性看起来有悖常理,但可能与这些 Treg 细胞对炎症的抑制作用有关。Terzic 等<sup>[46]</sup>提出了结直肠肿瘤致病的感染性微环境假说,认为在肠道肿瘤的发生与进展中,慢性炎症是个不可忽视的因素。实际上,在 CRC 患者中,Treg 可通过抑制 Th17 细胞介导的炎症反应来抑制肠道微生物,后者被认为是一类促肿瘤形成的辅助性 T 细胞<sup>[47]</sup>。在散发性 CRC 中,FOXP3<sup>+</sup> Treg 可能通过抑制肠道细菌侵袭所引起的炎症和免疫反应,起到了正面抗肿瘤而非免疫耐受的效应<sup>[48]</sup>。

Sakaguchi 研究小组<sup>[15]</sup>观察到,在不同肿瘤组织中存在不同的 FOXP3<sup>+</sup> T 细胞亚群成分的不同组合。其中,浸润到结肠癌组织中的 FOXP3<sup>+</sup> T 细胞中不仅包含了高含量的 eTreg 细胞(第 2 型 Treg),也有大量的 non-Treg 细胞(第 3 型 Treg)(未发表的数据,Treg 分型见前述)。因此,即使组织中含有大量的 FOXP3<sup>+</sup> 肿瘤浸润细胞(TIL),其中增加的第 3 型 Treg 细胞能够分泌更多的促炎症细胞因子,可诱导机体产生抗炎症反应从而起到积极的抗肿瘤效应。这种能力有助于解释为何在结肠癌患者中组织 Treg 细胞增多反而具有更好的生存预后<sup>[27]</sup>。当然,对上述 FOXP3<sup>+</sup> Treg 的“抗炎症假说”有必要进行更深入的研究,以便更好地理解其在 CRC 的免疫调节中所扮演的角色。

## 5 Treg 特定的去甲基化区域(Treg-specific demethylated region, TSDR)与 CRC 的相关性

事实上,除经典型 nTreg 外,在外周中还存在 iTreg 细胞,它们是普通型 CD4<sup>+</sup> T 细胞或幼稚型细胞被诱导后分化而成的。在体外实验中,在 TGF- $\beta$  存在的情况下,这些 iTreg 也能表达 FOXP3<sup>[3,49]</sup>。然而,这种 iTreg 表达的 FOXP3 是瞬时且不稳定的,因此人们对其是否具有抑制性活性作用尚存在争议<sup>[50-51]</sup>。当失去外源性的 TGF- $\beta$  时,即使再进行抗原刺激,大多数的 iTreg 也不再表达 FOXP3<sup>[52]</sup>。目前,人们对 Treg 的研究多是通过免疫组化、流式细胞术等传统方法,采用以侦测组织或细胞内 FOXP3 蛋白质含量的方法来判断 Treg 是否表达及表达水平高低。不难发现,这些方法均无法阐明 CRC 患者的生存预后与“真正的”nTreg 表达水平之间的相关性。

Baron 等<sup>[53]</sup>发现,在 nTreg 的 *FOXP3* 基因第一内含子上某些特定区域的 CpG 岛( CGI )存在明显的去甲基化现象,且这些 nTreg 与稳定表达 FOXP3 蛋白存在显著相关;而在幼稚型 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 细胞或体外 TGF- $\beta$  诱导的 iTreg 上,在这些区域未见或仅有不完全的去甲基化现象。这些区域被称为 TSDR<sup>[52-54]</sup>,又称 CNS2,它是调节 *FOXP3* 基因表达的一个重要的甲基化敏感的反应元件<sup>[55]</sup>。

多个研究<sup>[52-53,56]</sup>表明,在稳定表达的 FOXP3 的 nTreg 谱系细胞中,TSDR 是极其重要的且为可信赖的表观遗传学标志。研究者利用甲基化特定的定量 PCR( MS-qPCR )技术,通过对 *FOXP3*-TSDR 去甲基化状态的检测,以期代替上述免疫组织组化、流式细胞术等传统的 Treg 定性和定量检测手段。与传统检测方法相比,该方法更为便捷、对待测标本要求更低、结果更为客观可信。目前相关研究在恶性黑色素瘤<sup>[33]</sup>、感染性疾病<sup>[57]</sup>、器官移植<sup>[54]</sup>、糖尿病<sup>[58]</sup>、转移性肾癌<sup>[59-60]</sup>、自身免疫性疾病<sup>[61-63]</sup>等方面可见相关报道。

但在与 CRC 相关的研究中,利用 *FOXP3*-TSDR 去甲基化状态检测评估 nTreg 含量的研究报道尚少。Wieczorek 等<sup>[54]</sup>利用此技术,在外周血标本中,CRC 患者(  $n = 27$  )的 TSDR 去甲基化率比健康志愿者(  $n = 20$  )的稍高,但无统计学差异( 2.3% vs 1.4%,  $P = 0.068$  )。而在石蜡包埋切片组织( FFPE )样本中,CRC 患者(  $n = 15$  )的 TSDR 去甲基化率比健康志愿者(  $n = 10$  )的明显增高( 6.3% vs 1.5%,  $P < 0.001$  )。然而,基于样本量不足及统计效力等问题,该研究尚无法得出 *FOXP3*-TSDR 去甲基化状态与 CRC 患者生存预后相关性的结论。Lucas 等<sup>[64]</sup>检测了 7 个常见 CRC 癌细胞株的 TSDR 去甲基化状态,发现它们均仅有极低的表达。我们的前期研究工作也证实,CRC 癌细胞本身极少表达 TSDR 去甲基化状态及 *FOXP3* mRNA( 未发表数据 )。由此推定,CRC 癌灶组织与癌周正常黏膜组织的去甲基化水平( 即 nTreg 密度或含量 )之间的差异是与癌灶间质中的 nTreg 的异常增殖程度有关。这一替代传统鉴定 Treg 的表观遗传学研究手段与策略,对 CRC 患者的免疫状态评价、生存预后研究及可能的免疫干预治疗等相关研究来说,无疑是个很好的启发。

## 6 结 语

随着对 FOXP3<sup>+</sup>Treg 的深入研究,人们发现,不仅胸腺来源的 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> nTreg 可表达 FOXP3,其

他不同来源的 iTreg 也可表达类似的抑制功能。这使得人们将 FOXP3<sup>+</sup> 作为人 Treg 的唯一细胞表型这一鉴定策略已变得不再可靠,从而导致研究者在该细胞群体的细胞表型、功能及稳定性等方面研究中产生不少困惑,这也体现在许多已发表的相关报道中存在差异较大、不相一致的研究数据和结论<sup>[17]</sup>。因此,需要我们做进一步努力,以期发现一些能特异性地辨识可稳定发挥“调节性功能”的 nTreg 的表观遗传学生物标志,使之在 CRC 相关研究中发挥更可靠的作用。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [ J ]. CA Cancer J Clin, 2014, 64( 1 ): 9-29.
- [ 2 ] He J, Chen W, Ed. Chinese cancer registry annual report 2012 by national cancer center & disease prevention and control bureau, ministry of health [ B ]. Beijing: Military Medical Science Press, 2012.
- [ 3 ] Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells [ J ]. J Clin Invest, 2003, 112( 9 ): 1437-1443.
- [ 4 ] Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: The role of thymic lymphocytes [ J ]. Immunology, 1970, 18( 5 ): 723-737.
- [ 5 ] North RJ, Bursucker I. Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1 + 2- suppressor T cells down-regulate the generation of Ly-1-2 + effector T cells [ J ]. J Exp Med, 1984, 159( 5 ): 1295-1311.
- [ 6 ] 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 ]. J Immunol, 1995, 155( 3 ): 1151-1164.
- [ 7 ] Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, et al. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood [ J ]. J Immunol, 2001, 167( 3 ): 1245-1253.
- [ 8 ] Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human CD25( + ) CD4( + ) T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function [ J ]. J Exp Med, 2001, 193( 11 ): 1295-1302.
- [ 9 ] Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, et al. Identification and functional characterization of human CD4( + )CD25( + ) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood [ J ]. J Exp Med, 2001, 193( 11 ): 1285-1294.
- [ 10 ] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 [ J ]. Science, 2003, 299( 5609 ): 1057-1061.
- [ 11 ] Roncador G, Brown PJ, Maestre L, et al. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells at the single-cell level [ J ]. Eur J Immunol, 2005, 35( 6 ): 1681-1691.

- [ 12 ] Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells [ J ]. *J Exp Med*, 2006, 203( 7 ): 1701-1711.
- [ 13 ] Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells [ J ]. *J Immunol*, 2006, 176( 8 ): 4622-4631.
- [ 14 ] Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, et al. Two functional subsets of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in human thymus and periphery [ J ]. *Immunity*, 2008, 28( 6 ): 870-880.
- [ 15 ] Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor [ J ]. *Immunity*, 2009, 30( 6 ): 899-911.
- [ 16 ] Blatner NR, Mulcahy MF, Dennis KL, et al. Expression of RORgammat marks a pathogenic regulatory T cell subset in human colon cancer [ J ]. *Sci Transl Med*, 2012, 4( 164 ): 164ra159.
- [ 17 ] Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, et al. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system [ J ]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10( 7 ): 490-500.
- [ 18 ] Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy [ J ]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6( 4 ): 295-307.
- [ 19 ] Sellitto A, Galizia G, De Fanis U, et al. Behavior of circulating CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in colon cancer patients undergoing surgery [ J ]. *J Clin Immunol*, 2011, 31( 6 ): 1095-1104.
- [ 20 ] Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis [ J ]. *Nature*, 1997, 389( 6652 ): 737-742.
- [ 21 ] Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells [ J ]. *Immunol Rev*, 2001, 182, 207-214.
- [ 22 ] Smith TR, Kumar V. Revival of CD8<sup>+</sup> Treg-mediated suppression [ J ]. *Trends Immunol*, 2008, 29( 7 ): 337-342.
- [ 23 ] Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, et al. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells [ J ]. *Nat Med*, 2001, 7( 12 ): 1339-1346.
- [ 24 ] Wei S, Kryczek I, Zou L, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8<sup>+</sup> regulatory T cells in human ovarian carcinoma [ J ]. *Cancer Res*, 2005, 65( 12 ): 5020-5026.
- [ 25 ] Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, et al. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: The crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4 [ J ]. *Nat Immunol*, 2002, 3( 3 ): 237-243.
- [ 26 ] Cosmi L, Liotta F, Lazzari E, et al. Human CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> thymocytes share phenotypic and functional features with CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory thymocytes [ J ]. *Blood*, 2003, 102( 12 ): 4107-4114.
- [ 27 ] Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy [ J ]. *Curr Opin Immunol*, 2014, 27C: 1-7.
- [ 28 ] Watanabe MA, Oda JM, Amarante MK, et al. Regulatory T cells and breast cancer: Implications for immunopathogenesis [ J ]. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, 29( 4 ): 569-579.
- [ 29 ] Shevchenko I, Karakhanova S, Soltsek S, et al. Low-dose gemcitabine depletes regulatory T cells and improves survival in the orthotopic Panc02 model of pancreatic cancer [ J ]. *Int J Cancer*, 2013, 133( 1 ): 98-107.
- [ 30 ] Wicherek L, Jozwicki W, Windorbska W, et al. Analysis of Treg cell population alterations in the peripheral blood of patients treated surgically for ovarian cancer - a preliminary report [ J ]. *Am J Reprod Immunol*, 2011, 66( 5 ): 444-450.
- [ 31 ] Suzuki K, Kadota K, Sima CS, et al. Clinical impact of immune microenvironment in stage I lung adenocarcinoma: Tumor interleukin-12 receptor beta2 ( IL-12Rbeta2 ), IL-7R, and stromal FoxP3/CD3 ratio are independent predictors of recurrence [ J ]. *J Clin Oncol*, 2013, 31( 4 ): 490-498.
- [ 32 ] Cabrera R, Ararat M, Xu Y, et al. Immune modulation of effector CD4<sup>+</sup> and regulatory T cell function by sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62( 4 ): 737-746.
- [ 33 ] de Vries IJ, Castelli C, Huygens C, et al. Frequency of circulating Tregs with demethylated FOXP3 intron 1 in melanoma patients receiving tumor vaccines and potentially Treg-depleting agents [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17( 4 ): 841-848.
- [ 34 ] Yoshii M, Tanaka H, Ohira M, et al. Expression of Forkhead box P3 in tumour cells causes immunoregulatory function of signet ring cell carcinoma of the stomach [ J ]. *Br J Cancer*, 2012, 106( 10 ): 1668-1674.
- [ 35 ] Sinicrope FA, Rego RL, Ansell SM, et al. Intraepithelial effector ( CD3<sup>+</sup> )/regulatory ( FOXP3<sup>+</sup> ) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma [ J ]. *Gastroenterology*, 2009, 137( 4 ): 1270-1279.
- [ 36 ] Suzuki H, Chikazawa N, Tasaka T, et al. Intratumoral CD8( + ) T/FOXP3( + ) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59( 5 ): 653-661.
- [ 37 ] Salama P, Phillips M, Grieu F, et al. Tumor-infiltrating FOXP3<sup>+</sup> T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer [ J ]. *J Clin Oncol*, 2009, 27( 2 ): 186-192.
- [ 38 ] Correale P, Rotundo MS, Del Vecchio MT, et al. Regulatory ( FOXP3<sup>+</sup> ) T-cell tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemimmunotherapy [ J ]. *J Immunother*, 2010, 33( 4 ): 435-441.
- [ 39 ] Frey DM, Droezer RA, Viehl CT, et al. High frequency of tumor-infiltrating FOXP3( + ) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients [ J ]. *Int J Cancer*, 2010, 126( 11 ): 2635-2643.
- [ 40 ] Noshio K, Baba Y, Tanaka N, et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: Cohort study and literature review [ J ]. *J Pathol*, 2010, 222( 4 ): 350-366.
- [ 41 ] Lee WS, Park S, Lee WY, et al. Clinical impact of tumor-infiltrating lymphocytes for survival in stage II colon cancer [ J ]. *Cancer*, 2010, 116( 22 ): 5188-5199.
- [ 42 ] Lozano T, Casares N, Lasarte JJ. Searching for the achilles heel of FOXP3 [ J ]. *Front Oncol*, 2013, 3294.
- [ 43 ] Colotta F, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability

- [ J ]. *Carcinogenesis*, 2009, 30( 7 ): 1073-1081.
- [ 44 ] Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoeediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion [ J ]. *Science*, 2011, 331( 6024 ): 1565-1570.
- [ 45 ] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The next generation [ J ]. *Cell*, 2011, 144( 5 ): 646-674.
- [ 46 ] Terzic J, Grivennikov S, Karin E, et al. Inflammation and colon cancer [ J ]. *Gastroenterology*, 2010, 138( 6 ): 2101-2114 e2105.
- [ 47 ] Ladoire S, Martin F, Ghiringhelli F. Prognostic role of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells infiltrating human carcinomas: The paradox of colorectal cancer [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60( 7 ): 909-918.
- [ 48 ] Boschetti G, Nancey S, Sardi F, et al. Therapy with anti-TNF alpha antibody enhances number and function of Foxp3( + ) regulatory T cells in inflammatory bowel diseases [ J ]. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17( 1 ): 160-170.
- [ 49 ] Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, et al. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4<sup>+</sup> T cells [ J ]. *Eur J Immunol*, 2007, 37( 1 ): 129-138.
- [ 50 ] Pillai V, Ortega SB, Wang CK, et al. Transient regulatory T-cells: A state attained by all activated human T-cells [ J ]. *Clin Immunol*, 2007, 123( 1 ): 18-29.
- [ 51 ] Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4<sup>+</sup> FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype [ J ]. *Blood*, 2007, 110( 8 ): 2983-2990.
- [ 52 ] Floess S, Freyer J, Siewert C, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells [ J ]. *PLoS Biol*, 2007, 5( 2 ): e38.
- [ 53 ] Baron U, Floess S, Wiczorek G, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3( + ) conventional T cells [ J ]. *Eur J Immunol*, 2007, 37( 9 ): 2378-2389.
- [ 54 ] Wiczorek G, Asemussen A, Model F, et al. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue [ J ]. *Cancer Res*, 2009, 69( 2 ): 599-608.
- [ 55 ] Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, et al. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate [ J ]. *Nature*, 2010, 463( 7282 ): 808-812.
- [ 56 ] Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression [ J ]. *Eur J Immunol*, 2008, 38( 6 ): 1654-1663.
- [ 57 ] Tatura R, Zeschnigk M, Adamzik M, et al. Quantification of regulatory T cells in septic patients by real-time PCR-based methylation assay and flow cytometry [ J ]. *PLoS One*, 2012, 7( 11 ): e49962.
- [ 58 ] McClymont SA, Putnam AL, Lee MR, et al. Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes [ J ]. *J Immunol*, 2011, 186( 7 ): 3918-3926.
- [ 59 ] Schwarzer A, Wolf B, Fisher JL, et al. Regulatory T-cells and associated pathways in metastatic renal cell carcinoma ( mRCC ) patients undergoing DC-vaccination and cytokine-therapy [ J ]. *PLoS One*, 2012, 7( 10 ): e46600.
- [ 60 ] Pohla H, Buchner A, Stadlbauer B, et al. High immune response rates and decreased frequencies of regulatory T cells in metastatic renal cell carcinoma patients after tumor cell vaccination [ J ]. *Mol Med*, 2012, 181499-1508.
- [ 61 ] Peiseler M, Sebode M, Franke B, et al. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency [ J ]. *J Hepatol*, 2012, 57( 1 ): 125-132.
- [ 62 ] Barzaghi F, Passerini L, Gambineri E, et al. Demethylation analysis of the FOXP3 locus shows quantitative defects of regulatory T cells in IPEX-like syndrome [ J ]. *J Autoimmun*, 2012, 38( 1 ): 49-58.
- [ 63 ] Alexander T, Sattler A, Templin L, et al. FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup> regulatory T cells are expanded in active systemic lupus erythematosus [ J ]. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72( 9 ): 1549-1558.
- [ 64 ] Lucas S, van Baren N, de Smet C, et al. Demethylation of the FOXP3 gene in human melanoma cells precludes the use of this epigenetic mark for quantification of Tregs in unseparated melanoma samples [ J ]. *Int J Cancer*, 2012, 130( 8 ): 1960-1966.
- [ 收稿日期 ] 2013 - 09 - 30 [ 修回日期 ] 2014 - 03 - 10
- [ 本文编辑 ] 阮芳铭, 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中计量单位使用的要求

本刊严格执行国务院颁发的《中华人民共和国法定计量单位》,全面贯彻国家标准 GB3100-3102-1993《量和单位》的规定,正确使用量和单位的名称和符号。(1)量符号以斜体拉丁和希腊字母表示( pH 用正体除外),例如 *m*(质量)、*t*(时间)、*c*(浓度)、*V*(体积)、*p*(压力)、*F*(力)等。(2)单位符号一律以正体拉丁或希腊字母表示,例如 kg(千克)、m(米)、h(小时)、mol/L(摩尔每升)等。(3)表示人体检验指标的量浓度或质量浓度时,一般使用 L(升)作为检验组成含量单位的分母。(4)表示用药剂量单位时,不能写成 mg/kg/d 的形式,应写成 mg/( kg · d )或 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 的形式。(5)单位符号常见书写错误:长度单位符号 A(埃)已不用,应写作 0.1 nm;时间单位“小时”符号为 h(不是 hr)、“秒”符号为 s(不是 sec);转速单位符号为 r/min(不是 rpm);量浓度单位符号为 mol/L(不是 M、N,也不是 mol/mm<sup>3</sup>);力的单位“牛顿”符号为 N(不是 dyn(达因)、kgf(千克力),换算 1 dyn = 10<sup>-5</sup> N);热量单位“焦耳”符号为 J(不是 cal(卡)、kcal(千卡),换算 1 cal = 4.187 J);放射性活度单位符号为 Bq(不是 Ci(居里),换算 1 Ci = 3.7 × 10<sup>10</sup> Bq)。

(本刊编辑部)