

食管癌患者外周血调节性 T 细胞亚群格局变化及其临床意义

赵 强,张毅敏,杨 迅,陈奇勋,毛伟敏

(浙江省肿瘤医院,浙江省胸部肿瘤(肺、食管)诊治技术研究重点实验室,
浙江 杭州 310022)

摘 要: [目的] 分析食管癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻调节性 T 细胞(Treg)占 CD4⁺ T 细胞的比例变化。[方法] 采用流式细胞仪检测 104 例食管癌患者和 68 例健康及良性疾病对照者外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 占 CD4⁺ T 细胞的比例,分析其与临床分期、淋巴结转移及外膜受侵的关系。[结果] 食管癌患者与对照组的外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 占 CD4⁺ T 细胞比例分别为(5.19%±1.82%)和(4.56%±1.16%),两组比较差异有统计学意义($t=2.544, P=0.012$)。Ⅱ a 期 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 细胞比例分别与Ⅱ b 期和Ⅲ a 期比较,差异均有统计学意义 ($P<0.01$); 不同年龄、淋巴结及外膜受侵状况患者的外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 细胞比例变化比较无统计学差异 ($P>0.05$)。[结论] 食管癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 占 CD4⁺ T 细胞的比例明显升高,且分期高患者升高更为明显,提示可能与食管癌免疫逃逸和免疫耐受有关。

主题词: 食管肿瘤; CD4⁺CD25⁺CD127⁻ 调节性 T 细胞; 外周血; 流式细胞术

中图分类号: 735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)04-0285-04

Regulatory T Cell Subset Alteration in the Peripheral Blood of Patients with Esophageal Cancer and Its Clinical Significance

ZHAO Qiang, ZHANG Yi-min, YANG Xun, et al.

(Zhejiang Cancer Hospital, Zhejiang Key Laboratory of Diagnosis & Treatment Technology on Thoracic Oncology(Lung and Esophagus), Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Purpose] To investigate proportion alteration of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ regulatory T cells in CD4⁺ T cells in peripheral blood of the patients with esophageal cancer. [Methods] The percentage of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ regulatory T cells in CD4⁺ T cells in peripheral blood of 104 patients with esophageal cancer and 68 healthy and benign disease controls was detected by flow cytometry, and its relation with clinical stage, lymphatic metastasis and serosa invasion was analyzed. [Results] The percentage of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ regulatory T cells in CD4⁺ T cells in peripheral blood of patients with esophageal cancer and of control group was (5.19%±1.82%) and (4.56%±1.16%) respectively, with significant difference between them ($t=2.544, P=0.012$). The percentage of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ regulatory T cells in stage Ⅱ a was significantly different with that in stage Ⅱ b or stage Ⅲ a ($P<0.01$). But no significant difference was found with that in age, lymph node metastasis and serosa invasion status ($P>0.05$). [Conclusion] The increasing percentage of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ regulatory T cells in the patients of esophageal cancer and much higher in advanced stages. It might relate to immunological escape and immunological tolerance of esophageal cancer.

Subject words: esophageal neoplasms; CD4⁺CD25⁺CD127⁻ regulatory T cells; peripheral blood; flow cytometry

恶性肿瘤与免疫逃逸密切相关,研究发现食管

肿瘤存在局部免疫抑制,并表达可溶性免疫抑制因子^[1]。调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)是抑制性 T 细胞的一类亚群,能以免疫负调节的方式抑制自身反应性 T 细胞的作用,维持自身免疫耐受,在抗

通讯作者: 毛伟敏,主任医师,教授,硕士;浙江省肿瘤医院胸部肿瘤外科,浙江省杭州市半山桥广济路 38 号 (310022);E-mail: maowm1218@163.com。

收稿日期: 2012-11-26; **修回日期:** 2013-01-28

肿瘤免疫中发挥抑制效应^[2-4]。近年来研究发现 Treg 细胞在卵巢癌、头颈部肿瘤、肺癌中有比例增加现象^[5-7],但其机制尚不明确。本研究采用流式细胞技术,对食管癌患者外周血 Treg 亚群 CD4⁺CD25⁺CD127⁻进行分析,并探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本组 104 例食管癌患者均为 2012 年 8 月~2013 年 1 月在浙江省肿瘤医院接受手术治疗的初治患者,其中男性 98 例,女性 6 例;年龄 44~75 岁,平均 61.30 岁。患者均有明确的病理诊断,未接受放疗、化疗及其他抗肿瘤治疗,近 3 个月未使用过免疫增强剂,其病理类型均为鳞状细胞癌。临床分期按 2009 年第 7 版 UICC/AJCC 食管癌分期标准及 TNM 定义进行分期:Ⅰb 期 2 例,Ⅱa 期 44 例,Ⅱb 期 17 例,Ⅲa 期 41 例;病变位于食管上段 6 例,食管中段 53 例,食管下段 45 例;病理证实后行食管癌一切口手术 4 例,二切口手术 68 例,三切口手术 32 例。对照组共 68 例,男性 30 例,女性 38 例,为 2012 年 8 月~2013 年 1 月在我院健康体检者志愿留取血清样本后经全面体检无疾患者以及因胸部疾病手术者术前留取血清样本后经病理证实为良性疾病者,且近 3 个月未使用过免疫增强剂,年龄 19~87 岁,平均 47.79 岁。

1.2 主要试剂

PC5 标记的鼠抗人 CD4 抗体,PE 标记的鼠抗人 CD127 抗体,PE 标记的鼠抗人 CD8 抗体,FITC 标记的鼠抗人 CD25 抗体,CD4 同型对照分别为 PE 标记的鼠抗人 IgG1 免疫球蛋白,FITC 标记的鼠抗人 IgG1 免疫球蛋白(均购自美国贝克曼库尔特公司)。FC500 MCL 型流式细胞仪为美国贝克曼库尔特公司生产。

1.3 流式细胞仪分析

所有观察对象均于确诊后治疗前清晨空腹抽取静脉血 2ml,使用 EDTA 抗凝。应用荧光直接标记法及流式细胞仪检测外周血单个核细胞(PBMC)膜表面 CD4、CD127、CD8、CD25。取不同荧光标记的单克隆抗体各 20 μ l 分别加入 100 μ l 的 EDTA 抗凝的外周血,室温下孵育 15min,加入红细胞裂解液,孵育

15min;PBS 洗涤 2 次,用流式细胞仪检测,Cellquest 软件分析数据,记录阳性细胞百分率,减去非特异对照值。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 15.0 统计软件行 *t* 检验、方差分析、非参数检验,实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 两组外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 细胞比例比较

食管癌组 104 例与对照组 68 例外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 占 CD4⁺ T 细胞比例分别为 (5.19% $\pm$ 1.82%) 和 (4.56% $\pm$ 1.16%)。可见食管癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 细胞比例明显升高。两组比较差异有统计学意义 ($t = 2.544, P = 0.012$)。

2.2 不同临床病理因素食管癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 细胞的比例变化

食管癌 TNM 分期 Ⅰb 期 2 例、Ⅱa 期 44 例、Ⅱb 期 17 例及 Ⅲa 期 41 例患者 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 细胞比例分别为 (4.55% $\pm$ 0.78%)、(4.25% $\pm$ 1.27%)、(5.64% $\pm$ 1.45%) 和 (6.01% $\pm$ 1.79%)。将 4 种分期的 Treg 细胞比例两两进行 *t* 检验,结果表明,期别较高的患者较期别低者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 细胞比例增高,其中 Ⅱa 期和 Ⅱb 期比较,两组表达水平差异有统计学意义 ($t = 3.656, P = 0.001$); Ⅱa 期和 Ⅲa 期两组表达水平差异有统计学意义 ($t = 5.247, P = 0.000$)。其余表达水平比较均无明显统计学差异 ($P > 0.05$)。

术后病理淋巴结阴性 44 例及阳性 60 例患者 Treg 细胞比例分别为 (5.08% $\pm$ 1.82%) 和 (5.27% $\pm$ 1.83%), 两组表达水平差异无统计学意义 ($t = 0.516, P = 0.607$)。

术后病理显示食管外膜未受侵 46 例与受侵 58 例患者 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 细胞比例分别为 (4.97% $\pm$ 1.88%) 和 (5.36% $\pm$ 1.77%), 两组表达水平差异无统计学意义 ($t = 1.099, P = 0.274$)。

食管癌患者 ≤ 60 岁与 > 60 岁患者 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 细胞比例分别为 (5.17% $\pm$ 1.87%) 和 (5.21% $\pm$ 1.80%), 两组表达水平差异无统计学意义 ($t = 0.106, P = 0.916$) (Table 1)。

Table 1 The relationship between CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg and clinicopathological characteristics in patients with esophageal cancer ($\bar{x}\pm s$)

Items	n	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ Treg/ CD4 ⁺ T(%)	t	P
Age(years)				
≤60	49	5.17±1.87	0.106	0.916
>60	55	5.21±1.80		
Stage				
I b	2	4.55±0.78	3.656	0.001*
II a	44	4.25±1.27		
II b	17	5.64±1.45		
III a	41	6.01±1.79		
Lymph node metastasis				
Negative	44	5.08±1.82	0.516	0.607
Positive	60	5.27±1.83		
Serosa invasion				
Negative	46	4.97±1.88	1.099	0.274
Positive	58	5.36±1.77		

*: vs II a, $P<0.05$.

3 讨 论

我国是食管癌的高发国家,虽然手术、放疗、化疗的综合治疗在食管癌治疗中发挥了重要作用,但目前治疗疗效已趋平台,进一步提高其疗效已成为当前研究重点。提高肿瘤的免疫原性的肿瘤免疫治疗被认为疗效欠佳。细胞免疫是机体抗肿瘤免疫的主要方式,而细胞免疫主要由 T 淋巴细胞介导,T 淋巴细胞进一步分化为辅助性 T 淋巴细胞(Th,CD4⁺/CD3⁺)和细胞毒性 T 淋巴细胞(Ts,CD8⁺/CD3⁺)。而这类由 T 细胞介导的 Treg 细胞具有免疫调节作用,是维持自身免疫耐受的关键。调节性 T 细胞是一群具有抑制其他免疫细胞功能的负调控细胞,可抑制机体的抗肿瘤免疫反应^[8-10]。CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞具有免疫应答低下和免疫抑制性两大功能特征。肿瘤抗原可活化 Treg 细胞,抑制机体抗肿瘤免疫应答的产生,保持一种相对稳定的对肿瘤无应答状态。

本研究应用流式细胞学技术检测食管癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 细胞占 CD4⁺ T 淋巴细胞的比例,结果显示,食管癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 占 CD4⁺ T 细胞比例明显高于对照组($P<0.01$)。这群细胞的水平明显升高,提示食管癌患者免疫功能下降。免疫功能失调与肿瘤患者外周血 Treg 细胞比例增加有关,Treg 细胞能抑制机体的抗肿瘤免疫应答,有助于肿瘤细胞的免疫逃逸。临床分

期较晚患者的 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 细胞比例明显较临床分期较早患者增加($P<0.05$),III a 期与 II a 期,II b 期与 II a 期患者 Treg 表达水平比较均有较明显差异,表明可能食管癌患者 Treg 细胞介导的免疫耐受和肿瘤的生长密切相关。但未发现与 I b 期患者的比较有差异,可能是 I b 期患者仅 2 例,样本量过少,有待于进一步扩大样本量进行深入研究。有研究认为可能肿瘤本身可以通过释放一些特殊的细胞因子诱导 Treg 细胞的增生和分化,大多数肿瘤能分泌趋化因子 CCL22,而 Treg 表面高表达 CCL22 受体 CCR4^[11]。活化的 Treg 细胞增多能通过细胞间直接接触方式介导免疫抑制;也可以通过间接作用抑制

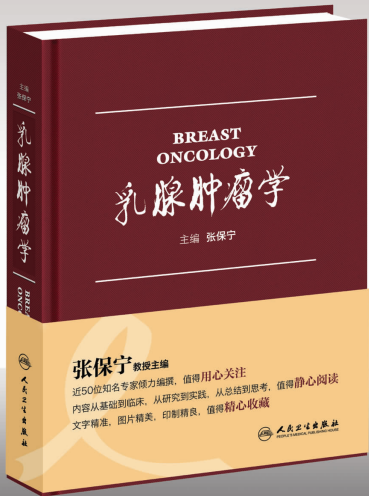
APC 表达协同刺激分子,抑制效应性 T 细胞增殖及 IL-2 产生^[12]。但本研究中未发现年龄、淋巴结及外膜受侵状态不同患者的 Treg 细胞比例的差异($P>0.05$),考虑可能 Treg 细胞比例的改变是肿瘤进展中较晚期事件或 Treg 细胞比例的差异与年龄无关,而与肿瘤的病变程度及免疫状况有关。

CD4/CD8 比值是目前临床上最常用的反映免疫功能状态的指标,但该指标与临床病理分期、肿瘤负荷、PS 状态及生存期之间没有很好的相关性^[13];且 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞本身各自包含了功能各异的细胞群体,因此不可能全面反映机体的免疫功能状态。本研究结果提示,应用流式细胞技术检测食管癌外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 细胞比例能较敏感、特异地反映其细胞免疫功能状态,有可能成为反映食管癌免疫状态及疾病进展的外周血标志物。减少或去除体内的 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 细胞可有效消除其对肿瘤的免疫无应答性,引起肿瘤特异性和非特异性效应细胞的自然发育,激活抗肿瘤免疫的途径。

食管癌微环境中存在 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 细胞介导的免疫抑制网络,对其深入研究将有助于进一步认识食管癌的生理、病理机制以及了解食管癌机体免疫调节机制,可对食管癌的病情及预后判断方面提供一定的线索,也为其免疫治疗提供新的研究策略,有助于临床设计有效的抗肿瘤治疗方案。

参考文献:

- [1] O'Mahony AM, O'Sullivan GC, O'Connell J, et al. An immune suppressive factor derived from esophageal squamous carcinoma induces apoptosis in normal and transformed cells of lymphoid lineage [J]. J Immunol, 1993, 151(9):4847-4856.
- [2] Xu T, Duan Q, Wang G, et al. CD4⁺CD25⁺ high regulatory T cell numbers and FOXP3 mRNA expression in patients with advanced esophageal cancer before and after chemotherapy [J]. Cell Biochem Biophys, 2011, 61(2):389-392.
- [3] Raghavan S, Quiding-Järbrink M. Regulatory T cells in gastrointestinal tumors [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 5(4):489-501.
- [4] Gabitass RF, Annels NE, Stocken DD, et al. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13 [J]. Cancer Immunol Immunother, 2011, 60(10):1419-1430.
- [5] 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.
- [6] Mandapathil M, Szczepanski MJ, Szajnik M, et al. Increased ectonucleotidase expression and activity in regulatory T cells of patients with head and neck cancer [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(20):6348-6357.
- [7] Karagöz B, Bilgi O, Gümtüs M, et al. CD8⁺CD28⁻ cells and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of advanced stage lung cancer patients [J]. Med Oncol, 2010, 27(1):29-33.
- [8] Osaki T, Saito H, Fukumoto Y, et al. Inverse correlation between NKG2D expression on CD8⁺ T cells and the frequency of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with esophageal cancer [J]. Dis Esophagus, 2009, 22(1):49-54.
- [9] 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.
- [10] Liyanade UK, Moore TT, Joo HG et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma [J]. J Immunol, 2002, 169(5):2756-2761.
- [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] Banerjee DK, Dhodapkar MV, Matayeva E, et al. Expansion of Foxp3 high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients [J]. Blood, 2006, 108 (8):2655-2661.
- [13] Tanaka H, Tanaka J, Kjaergaard J, et al. Depletion of CD4⁺CD25⁺ regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumor-draining lymph nodes [J]. J Immunother, 2002, 25(3):207-217.



《乳腺肿瘤学》书讯

由中国医学科学院肿瘤医院张保宁教授主编的《乳腺肿瘤学》于2013年3月由人民卫生出版社出版发行。该书汇聚近50位知名专家,历时2年精心编写而成。该书以“全、新、实用”为编写原则,从基础到临床系统介绍乳腺肿瘤的病因与发病机制、预防与控制、诊断与鉴别诊断、综合治疗策略以及各种治疗方法的新理论、新技术,并融入编写专家个人丰富实践经验的分析与总结。该书编写思路清晰,文字精准,科学性与实用性相得益彰,文图并茂。大16开,精装,117万字。定价188.00元。新华书店、医学专业书店及图书网店均有销售;人民卫生出版社东单瑞康图书零售中心电话:010-59787592,010-65264830;本书策划编辑刘艳梅邮箱:13691566816@163.com,期待您提出宝贵意见和建议。