

Th17 细胞及其相关细胞因子在胃癌中的表达及临床意义

李巧霞¹, 李清靖¹, 刘艳军², 陈锦霞¹, 李宏¹, 苏景伟¹, 张超¹,
赵雪峰¹, 单保恩¹

(1. 河北医科大学第四医院, 河北 石家庄 050011;

2. 开封市 95900 部队医院, 河南 开封 475003)

摘要: [目的] 检测 Th17 细胞及其相关细胞因子在胃癌中的表达, 探讨其与胃癌临床病理因素之间的关系。[方法] 收集 45 例胃癌患者和 20 例健康体检者外周血, 分离单个核细胞 (PBMC), 采用流式细胞分析技术检测 Th17 细胞比例; 收集 30 例手术切除胃癌组织标本, 包括癌组织和非癌对照组织, 采用免疫组化法检测胃癌组织内 Th17 细胞浸润情况; 采用荧光定量 RT-PCR 法检测 Th17 细胞相关因子维甲酸相关孤儿核受体 C (RORc)、IL-17、IL-23、IL-21、IL-22、IL-1β、TGF-β、IL-6 mRNA 表达。[结果] 与健康对照组相比, 胃癌患者外周血中 Th17 细胞比例显著增多; 胃癌组织内可见大量 CD4⁺/IL-17⁺ 细胞浸润, 而非癌对照组织内极少见 CD4⁺/IL-17⁺ 细胞; 与非癌对照组织相比, 胃癌组织内 RORc、IL-17、IL-21、TGF-β、IL-6 mRNA 表达水平明显增高, 但两组间 IL-22、IL-23 和 IL-1β mRNA 表达无显著差异。胃癌组织内 RORc mRNA 表达水平与 IL-17、TGF-β、IL-6 mRNA 表达水平呈正相关; 并且, RORc mRNA 表达水平与患者 TNM 分期有相关性。[结论] Th17 细胞促进了胃癌的发生和进展。

关键词: 胃肿瘤; Th17 细胞; IL-17; 维甲酸相关孤儿核受体 (ROR)

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)09-0708-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.09.B002

Expression of Th17 Lymphocytes and Cytokines in Gastric Cancer and Their Clinical Significance

LI Qiao-xia¹, LI Qing-jing¹, LIU Yan-jun², et al.

(1. The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 2. The Hospital of Chinese People's Liberation Army No. 95900, Kaifeng 475003, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of Th17 lymphocytes and cytokines in gastric cancer patients, and to analyze its correlation with clinical parameters. [Methods] Peripheral blood was collected from 45 gastric cancer patients and 20 healthy volunteers. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by Ficoll-Hypaque density centrifugation. Expression of Th17 cells was detected by flow cytometry. Tumor tissues and cancer adjacent tissues were collected from 30 gastric cancer patients, and the distribution of Th17 cells in gastric cancer tissue was detected by double staining immunohistochemistry. mRNA expressions of retinoid acid related orphan receptor C (RORc), IL-17, IL-23, IL-21, IL-22, IL-1β, TGF-β and IL-6 were examined by Real-time RT-PCR. [Results] Compared to healthy controls, the percentage of Th17 cells in peripheral blood was significantly increased in gastric cancer patients. A large number of CD4⁺/IL-17⁺ T cells were observed in gastric cancer tissues, whereas rare CD4⁺/IL-17⁺ T cells were observed in cancer adjacent tissues. mRNA expression levels of RORc, IL-17, IL-21, TGF-β and IL-6 in gastric cancer tissues were significantly increased in comparison to controls. Furthermore, mRNA expression of RORc in gastric cancer tissues has positive correlation with that of IL-17, TGF-β and IL-6 and TNM stage. [Conclusion] Th17 cells may contribute to gastric cancer pathogenesis.

Subject words: gastric neoplasms; T help 17 cell; interleukin 17; retinoid acid related orphan receptor (ROR)

Th17 细胞是一群以分泌 IL-17 为主要特征的

CD4⁺T 细胞亚群。研究表明 Th17 细胞及其分泌的主要细胞因子 IL-17 在宿主抵御微生物感染过程中发挥重要作用, 并且参与了多种炎症和自身免疫性疾病, 作为肿瘤炎症免疫微环境的重要组成部分, Th17 细胞在肿瘤发生发展中的作用已成为目前的研究热点。已有研究证实, 在肝癌、前列腺癌、结肠

基金项目: 河北省自然科学基金 (C2011206086); 河北省卫生厅医学科学研究重点课题 (20110456); 河北省人才工程培养经费资助科研项目 (A201401251)

通讯作者: 单保恩, 教授, 博士生导师, 博士; 河北医科大学第四医院科研中心, 河北省石家庄市健康路 12 号 (050011); E-mail: baoenshan@hbhdy.com

收稿日期: 2015-04-28; **修回日期:** 2015-07-06

癌、卵巢癌、乳腺癌、胃癌等患者肿瘤组织内 Th17 细胞比例明显增高,提示 Th17 细胞与肿瘤的发生发展密切相关^[1-4]。Th17/IL-17 在肿瘤免疫中所发挥的作用往往取决于机体的免疫背景、肿瘤类型及组织器官微环境等诸多因素。因此有必要准确地认识 Th17 细胞及 IL-17 在人类肿瘤中的分布、分化、募集、生物学功能、作用机制和调控规律。

目前,有关 Th17 细胞及其相关因子在胃癌发生发展中作用的研究还处于起始阶段,许多问题都有待深入研究。因此,本研究旨在分析 Th17 细胞及其相关因子在胃癌患者体内的表达水平,及其与胃癌临床病理进展的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2010 年 7 月至 2012 年 4 月期间河北医科大学第四医院胃癌住院患者 45 例,健康体检者 20 例,各抽取外周血 5ml 置于肝素钠抗凝管中。45 例胃癌患者(年龄 24~78 岁,平均年龄 52 岁)不伴有糖尿病、高血压、心血管疾病、妊娠、急慢性感染、结缔组织疾病和既往其他恶性肿瘤。所有患者未行免疫抑制、放射及化学药物治疗。所有病例经过组织病理学证实,胃癌患者 TNM 分期依据 1997 年国际抗癌联盟(UICC)标准。其中 30 例患者留取组织标本,包括胃癌组织、非癌对照组织(距癌组织边缘 5cm),所有标本均在手术切除后,一部分置于液氮中冷冻保存用于提取总 RNA,一部分迅速固定于 4%多聚甲醛溶液中室温保存用于制备组织切片。20 名健康体检者外周血作对照(年龄 26~66 岁,平均年龄 47 岁)。

1.2 主要试剂

人淋巴细胞分离液购自天津川页生化制品有限公司;PMA、Ionomycin、BFA 购自 Sigma 公司;FITC 标记的鼠抗人 CD4 抗体、PE 标记的鼠抗人 IL-17 抗体、Th17 破膜剂、Permeabilization buffer 购自 eBioscience 公司;Trizol 购自 Invitrogen 公司;ReverAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit、SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒购自 Takara 公司;PCR 引物购自上海捷瑞生物工程有限公司;其它试剂为国产分析纯。

1.3 流式细胞仪检测外周血 Th17 细胞比例

新鲜外周血 5ml, Ficoll 分离液分离单个核细

胞,调整细胞浓度为 $2 \times 10^6/\text{ml}$,加入 24 孔培养板中,每孔 1ml,各孔加入终浓度分别为 50ng/ml、1μg/ml 和 10μg/ml 的 PMA、ionomycin、BFA,37℃、5% CO₂ 条件下培养 4h。收集细胞,分装于不同测试管中,每管 100μl,分别加入 FITC-Anti-Human CD4,同型对照管加入等量同型抗体。4℃避光孵育 30min;PBS 洗 2 次,每管加入新鲜配制的 Fixation/Permeabilization 工作液 1ml,4℃避光孵育 30~45min,1×Permeabilization buffer 洗 2 次,加入 PE-Anti-Human IL-17A 抗体,同型对照管加入等量同型抗体,4℃避光孵育 30min,1×Permeabilization buffer 洗涤 2 次,0.5ml PBS 重悬细胞,采用流式细胞仪以 CD4⁺细胞设门分析 CD4⁺细胞中 IL-17⁺细胞比例。

1.4 免疫组织化学染色检测肿瘤组织内 Th17 细胞浸润情况

石蜡切片常规脱蜡至水,用 3%甲醇过氧化氢溶液避光修复 20min;加入正常山羊血清,37℃ 孵育 45min;滴加鼠抗人 CD4 抗体,4℃孵育过夜;滴加生物素化羊抗鼠 IgG,37℃孵育 30min;滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37℃ 孵育 30min;DAB 显色 3~5min,蒸馏水终止显色;滴加兔抗人 IL-17 抗体,4℃孵育过夜;滴加生物素化羊抗兔 IgG,37℃孵育 30min;滴加碱性磷酸酶标记链霉卵白素工作液,37℃ 孵育 30min;ALP 显色 3~5min,蒸馏水终止显色;苏木素复染细胞核 3min,水性封片剂封片,显微镜下观察。

1.5 荧光定量 RT-PCR 检测 Th17 细胞相关因子 mRNA 表达

取出液氮冻存的肿瘤组织,Trizol 法提取组织总 RNA。使用 ReverAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 将总 RNA 反转录成 cDNA。使用 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒进行荧光定量 PCR。预变性:95℃,30s 后;PCR 反应 40 个循环(95℃,5s,60℃,31s)。以 β -actin 作为参照基因,根据待测基因和内参的循环数 Ct 值,按照公式:相对值 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算出待测样本待测基因相对于内参基因的相对表达量。PCR 所用引物序列为,RORc:上游 5'-gcaacagcagcaacaggaa-3',下游 5'-ccaaggtgtaggtagggat-3';IL-17:上游 5'-gc-catagtgaaggcaggaa-3',下游 5'-gtgaggtggatcggttag-3';IL-23:上游 5'-ctccctgatagccctgtgg-3',下游 5'-tgaagcggagaaggagacg-3';IL-21:上游 5'-gattagaatgcgt-caact-3',下游 5'-ccttcattgttctctga-3';IL-22:上游 5'

-aagaagtgtgttcctc-3', 下游 5'-catgtgcttagcctgttg-3'; *TGF-β*: 上游 5'-cccacaacgaatctatgaca-3', 下游 5'-gctgaggtatgccaggaat-3'; *IL-1β*: 上游 5'-acgaatctccgaccacca-3', 下游 5'-gcagggaaccagcatctt-3'; *IL-6*: 上游 5'-atcatcaactggcttttggag-3', 下游 5'-ctggttcttctcactactc-3'; *β-actin*: 上游 5'-taagaccttcaacacccag-3', 下游 5'-gccatctattgctcgaagtc-3'。

1.6 统计学处理

采用 SPSS11.5 分析软件进行统计学分析。数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组间均数比较行单因素方差分析(ANOVA), 方差齐时用最小显著差法(least significant difference, LSD), 方差不齐时用 Dunnett T3 法作两两比较, 细胞因子间关联性用 Pearson 相关分析, 采用 SPSS11.5 分析软件得出散点图及趋势线, 与患者临床病理特征之间的关系采用多元线性回归分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 Th17 细胞在胃癌患者外周血 CD4⁺细胞中比例增高

为了检测 Th17 细胞在患者外周血中的分布, 我们采用细胞内细胞因子染色的流式细胞分析技术

检测了 CD4⁺/IL-17⁺细胞占外周血 CD4⁺细胞的比例, 结果显示, 与健康对照组相比, 胃癌患者外周血中 Th17 细胞比例显著增高 ($6.67\% \pm 0.77\%$ vs $1.63\% \pm 0.10\%$, $P < 0.01$, Figure 1)。

2.2 胃癌组织内 Th17 细胞浸润增多

为了检测 Th17 细胞在胃癌组织内的分布, 我们采用 CD4⁺/IL-17⁺双标记染色的免疫组化方法检测了胃癌组织内 Th17 细胞的分布情况。结果显示, 胃癌组织内可见大量 CD4⁺/IL-17⁺细胞聚集, 而非癌对照组织内未见或极少见 CD4⁺/IL-17⁺细胞(Figure 2)。

2.3 胃癌组织内 Th17 细胞相关细胞因子 mRNA 表达变化

荧光定量 PCR 结果显示, 与对照组织相比, 胃癌组织内 *RORc*、*IL-17*、*IL-21*、*TGF-β* 和 *IL-6* mRNA 表达水平明显增高, 但两组间 *IL-22*、*IL-23* 和 *IL-1β* mRNA 表达无显著差异 (Figure 3)。胃癌组织内 *RORc* mRNA 表达水平增高与 *IL-17*、*TGF-β* 和 *IL-6* mRNA 表达水平增高呈正相关, 而与 *IL-21* mRNA 表达水平增高无相关性(Figure 4); 并且, *RORc* mRNA 表达水平增高与患者 TNM 分期有相关性, 而与患者性别、年龄、肿瘤分化程度、肿瘤大小、浸润深度、血管侵袭、脉管瘤栓等指标无相关性(Table 1)。

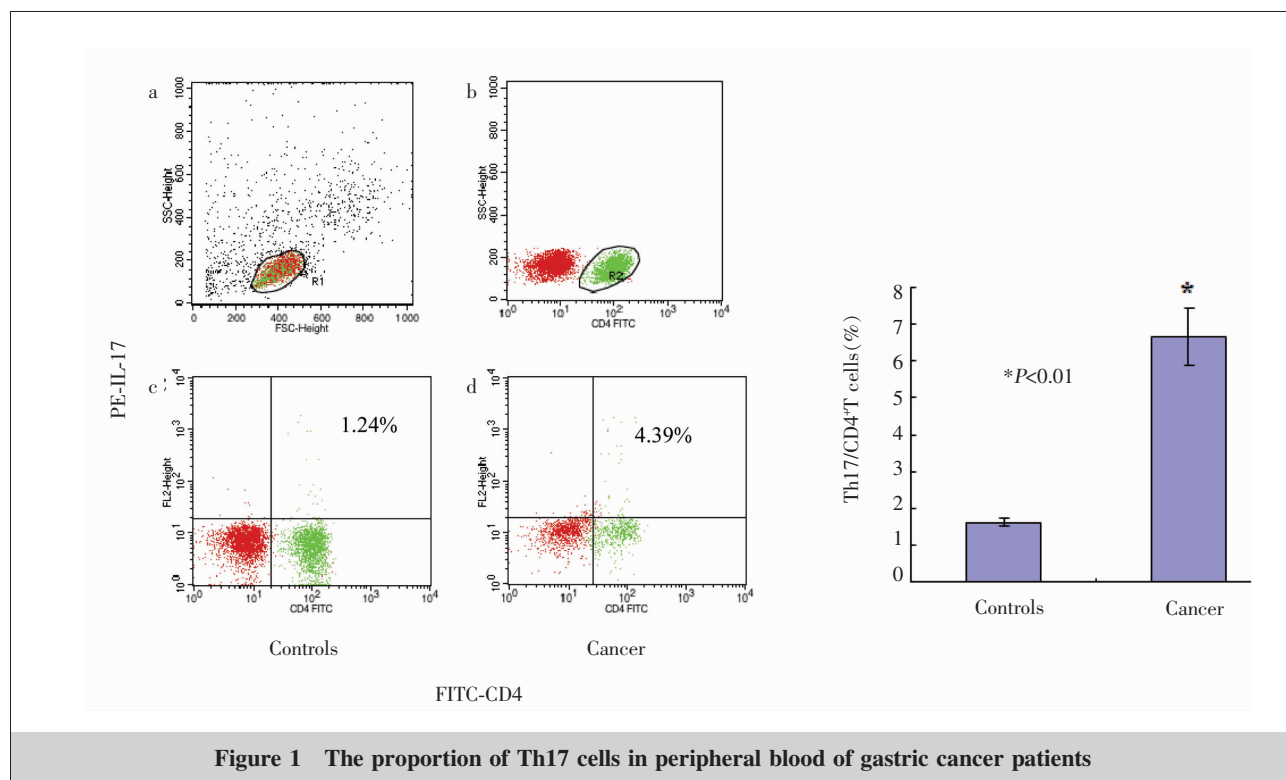
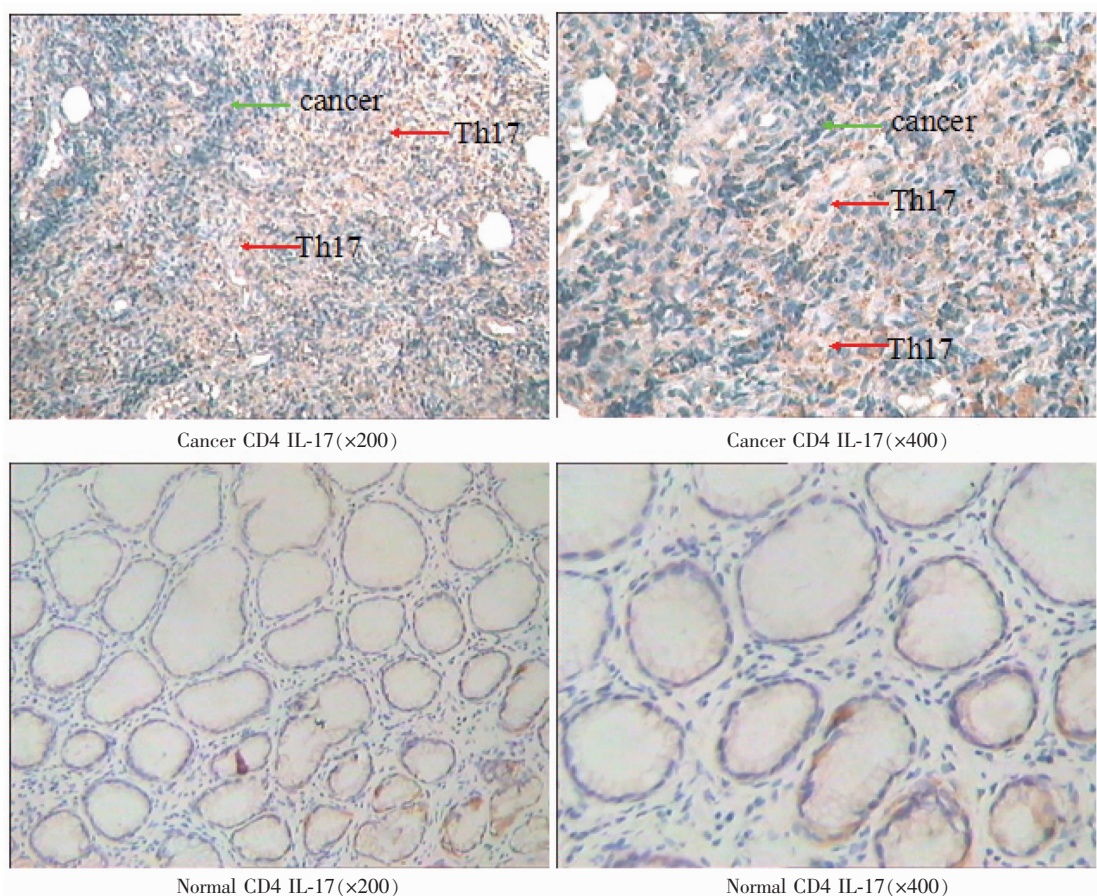


Figure 1 The proportion of Th17 cells in peripheral blood of gastric cancer patients



Note: Green arrows indicated the cancer cells, and the red arrows indicated Th17 cells.

Figure 2 Immunohistochemical staining for CD4/IL-17 in gastric cancer

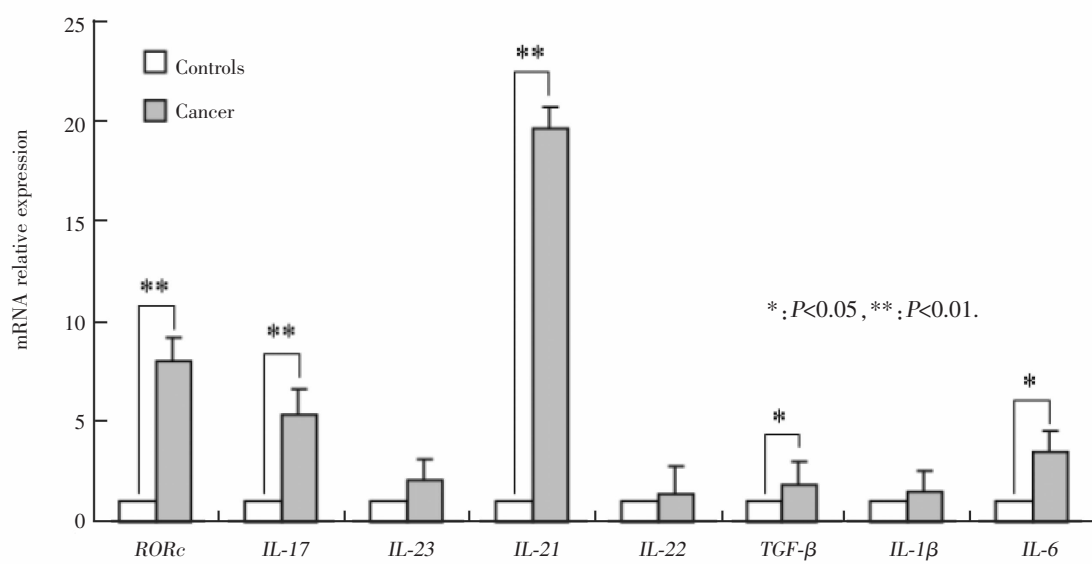


Figure 3 The mRNA expression of cytokines in gastric cancer and controls

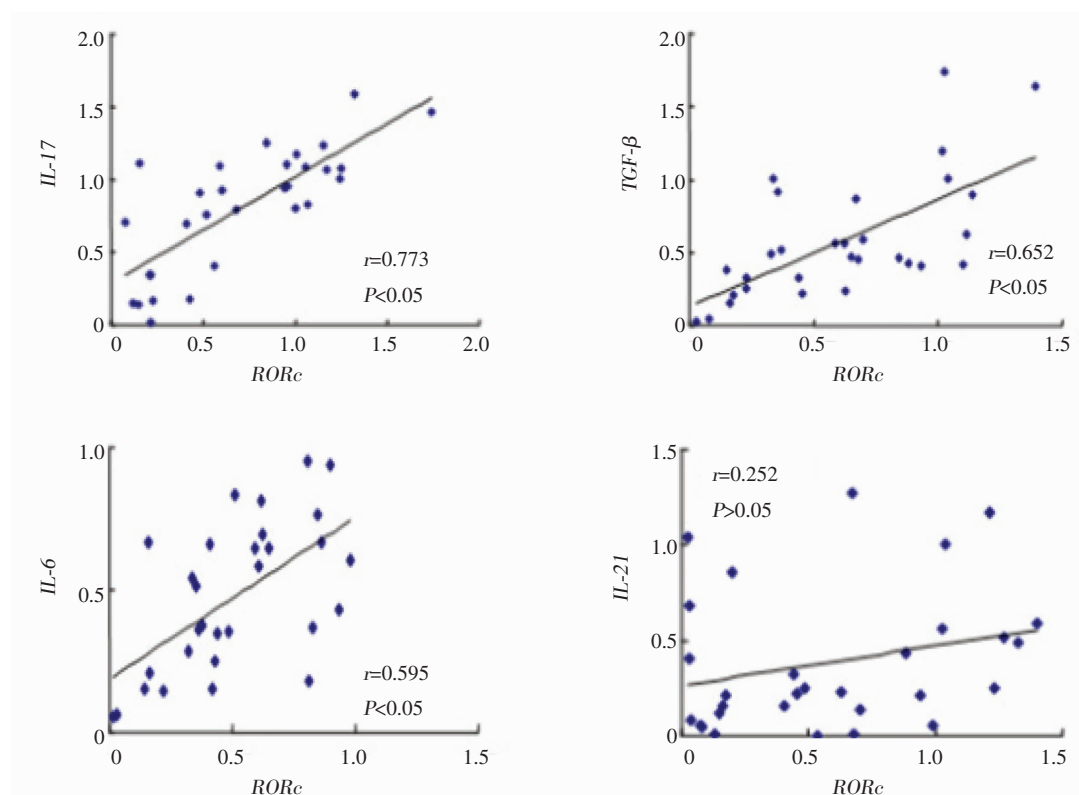


Figure 4 A linear correlation dependability analysis of *RORc* mRNA expression and *IL-17*, *IL-21*, *TGF-β* and *IL-6* mRNA expressions in gastric cancer

3 讨论

Th17 细胞是一类由初始 CD4⁺T 细胞分化而来的效应 T 细胞,主要通过分泌 IL-17 发挥作用,还可以大量分泌 IL-21、IL-22 和 IL-23 等细胞因子,具有不同于 Th1 型和 Th2 型细胞的分化、发育调节机制^[5];维甲酸相关孤儿核受体 C (retinoid acid related orphan receptor C, *RORc*) 是调节 Th17 细胞分化的关键转录因子。Th17 细胞与肿瘤的关系已经受到广泛关注,但其在肿瘤免疫中的作用和意义目前还不清楚。已有研究发现,在骨髓瘤、前列腺癌、肾肿瘤和卵巢癌的肿瘤浸润淋巴细胞中 Th17 细胞明显增多,并且 Th17 细胞功能性细胞因子 IL-17 在血清中的浓度也明显增高^[6,7]。

本研究发现胃癌患者外周血 CD4⁺T 细胞中 Th17 细胞占比例明显增高;并且与对照组织相比,胃癌组织内 CD4⁺IL-17⁺细胞明显增多,与 Zhang 等^[8]研究结果一致。通过检测胃癌组织内 Th17 细胞相关细胞因子 mRNA 表达,并且分析 Th17 细胞特异性

转录因子 *RORc* mRNA 表达水平与胃癌临床病理之间的关系,我们发现胃癌组织内 Th17 细胞表达增高与患者 TNM 分期呈正相关,而与患者性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤分化程度、浸润深度、血管侵袭和脉管瘤栓等因素无关,提示 Th17 细胞亚群可能参与了胃癌的恶性进展过程。

IL-17 是 Th17 细胞的标志性细胞因子,具有强大的招募中性粒细胞、促进多种细胞释放炎症因子、促进细胞增殖及抑制部分肿瘤生长等生物学作用。Kryczek 等^[9,10]发现,IL-17 具有促进肿瘤血管生成的作用;IL-17 可刺激基质细胞分泌 IL-6,促进骨髓瘤的生长。本研究发现胃癌组织内 *IL-17* mRNA 表达水平明显增高,并与 *RORc* mRNA 表达水平增高明显相关,随着 *RORc* mRNA 表达水平的增高,*IL-17* mRNA 表达水平增高,并与患者 TNM 分期有相关性,提示胃癌微环境中的 IL-17 主要来源于 Th17 细胞,Th17 细胞可能通过分泌 IL-17 加重炎症反应来促进肿瘤的发展。

研究发现,TGF-β 和 IL-6 是 Th17 细胞分化的启

Table 1 Association between *RORc* mRNA expression in gastric cancer tissues and clinicopathologic factors

Factor	N	<i>RORc</i> mRNA	<i>t</i>	<i>P</i>
Gender				
Male	23	8.145 ± 1.426	1.215	0.239
Female	7	7.802 ± 1.109		
Age(years old)				
<60	16	8.732 ± 1.075	1.731	0.099
≥60	14	7.303 ± 1.121		
TNM stage				
I	5	5.526 ± 0.473	2.937	0.008*
II	8	6.579 ± 0.629		
III	8	8.944 ± 0.968		
IV	9	10.015 ± 1.254		
Differentiation				
Well	9	7.201 ± 0.842	1.902	0.072
Poor	21	8.435 ± 1.025		
Lymph node metastasis				
Yes	12	8.379 ± 0.755	1.820	0.085
No	18	7.856 ± 1.036		
Size of tumor(cm)				
<4	11	7.482 ± 0.524	1.074	0.272
≥4	19	8.402 ± 1.465		
Invasion depth(mm)				
<15	13	7.930 ± 1.047	1.822	0.084
≥15	17	8.168 ± 0.932		
Blood vessel invasion				
Yes	7	8.597 ± 1.064	0.753	0.483
No	23	7.903 ± 0.983		
Intravascular cancer embolus				
Yes	10	8.552 ± 0.743	1.321	0.203
No	20	7.821 ± 1.155		

*: $P < 0.05$.

动因子,在两者同时存在的情况下,经由 STAT3 通路激活 *RORγt*,活化的 CD4⁺T 细胞向 Th17 细胞分化^[11,12],IL-23 在 Th17 细胞分化过程中发挥重要的调节作用。本研究发现,胃癌组织中 *IL-6*、*TGF-β* mRNA 表达水平明显升高,并与 *RORc* mRNA 表达水平呈明显正相关,提示胃癌组织中 Th17 的聚集可能与肿瘤微环境中 TGF-β 和 IL-6 诱导 Th17 细胞分化有关。此外,研究报道 Th17 细胞还可以通过分泌 IL-21、IL-22 和 IL-23 等细胞因子来发挥功能。然而,本研究发现与对照组织相比,胃癌组织内 *IL-22* 和 *IL-23* mRNA 表达水平无显著增高,*IL-21* mRNA 表达水平虽有增高,但与 *RORc* mRNA 表达水平增高无明显相关性,提示肿瘤微环境内细胞因子网络错综复杂,它们之间的相互作用和调节有待于更深

入的研究。

总之,更好地了解 Th17 细胞及其相关因子在胃癌组织微环境中的功能和分化调节机制,将可能为寻找预防和治疗胃癌的免疫细胞治疗新靶点提供帮助。

参考文献:

- [1] Zhang JP, Yan J, Xu J, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients[J]. J Hepatol, 2009, 50(5): 980-989.
- [2] Chen X, Wan J, Liu J, et al. Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients[J]. Lung Cancer, 2010, 69(3): 348-354.
- [3] Zhu X, Mulcahy LA, Mohammed RA, et al. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines[J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(6): R95.
- [4] Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, et al. Generation and regulation of human CD4⁺ IL-17-producing T cells in ovarian cancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(40): 15505-15510.
- [5] Martinez GJ, Nurieva RI, Yang XO, et al. Regulation and function of proinflammatory TH17 cells [J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1143: 188-211.
- [6] Dhodapkar KM, Barbutto S, Matthews P, et al. Dendritic cells mediate the induction of polyfunctional human IL17-producing cells (Th17 cells) enriched in the bone marrow of patients with myeloma [J]. Blood, 2008, 112 (7): 2878 - 2885.
- [7] Inozume T, Hanada K, Wang QJ, et al. IL-17 secreted by tumor reactive T cells induces IL-8 release by human renal cancer cells [J]. Immunother, 2009, 32(2): 109-117.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments [J]. Blood, 2009, 114(6): 1141-1149.
- [11] Wang RF. Regulatory T cells and innate immune regulation in tumor immunity[J]. Springer Semin Immunopathol, 2006, 28(1): 17-23.
- [12] 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(23): 8326-8331.