

非小细胞肺癌患者外周血 Treg 和 Th17 水平及意义

林昌海,黄露迷,冀晓辉,王春梅,王东林,李代蓉
(重庆市肿瘤研究所,重庆 400030)

摘要: [目的] 探讨非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者外周血中 Treg 和 Th17 细胞的变化及其意义。[方法] 收集 40 例 NSCLC 患者和 20 名健康对照的外周血样本,采用流式细胞术检测外周血中 Treg 和 Th17 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例,酶联免疫吸附实验法检测 TGF- β 和 IL-17 水平。[结果] 肺癌患者外周血中 Treg 细胞和 Th17 细胞比例均显著性高于健康对照组(分别为 $6.65\% \pm 3.70\%$ vs $4.06\% \pm 1.23\%$ 和 $1.20\% \pm 1.19\%$ vs $0.44\% \pm 0.13\%$, $P < 0.05$)。外周血 Treg 和 Th17 细胞表达与 NSCLC 患者分期等无相关性($P > 0.05$)。肺癌患者外周血 TGF- β 和 IL-17 水平明显高于对照组(分别为 25.05 ± 3.19 vs 15.96 ± 3.65 和 4.36 ± 2.79 vs 2.01 ± 1.83 , $P < 0.05$)。[结论] NSCLC 患者外周血中 Treg 和 Th17 细胞以及相关细胞因子均高表达,Treg 细胞以及 Th17 细胞参与了肺癌的发生和发展。

关键词: Treg 细胞; Th17 细胞; 非小细胞肺癌; 肿瘤免疫

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)01-0027-04
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.01.B006

Treg and Th17 Cells in Peripheral Blood of Patients with Non-small Cell Lung Cancer and Their Signification

LIN Chang-hai, HUANG Lu-mi, JI Xiao-hui, et al.
(Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China)

Abstract: [Objective] To determine the levels of Treg and Th17 cells in peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and their significance. [Methods] The peripheral blood samples of 40 NSCLC patients and 20 health subjects were collected. The Treg and Th17 cells in peripheral blood were detected by flow cytometry, the serum TGF- β and IL-17 levels were measured by ELISA. The relationship between the expression of Treg and Th17 cells and clinicopathological features of NSCLC patients was analyzed. [Results] The expression of Treg and Th17 cells in peripheral blood of NSCLC patients were significantly higher than that in healthy controls ($6.65\% \pm 3.70\%$ vs $4.06\% \pm 1.23\%$ and $1.20\% \pm 1.19\%$ vs $0.44\% \pm 0.13\%$, both $P < 0.05$). However the levels of Treg and Th17 were not correlated with the stage of NSCLC ($P > 0.05$). The serum TGF- β and IL-17 levels in NSCLC patients were significantly higher than those in controls (25.05 ± 3.19 vs 15.96 ± 3.65 and 4.36 ± 2.79 vs 2.01 ± 1.83 , both $P < 0.05$). [Conclusion] Treg and Th17 cells and their associated cytokines TGF- β and IL-17 are highly expressed in peripheral blood of NSCLC patients.

Subject words: regulatory T cells; Th17 cells; non-small cell lung cancer; tumor immunity

肿瘤局部的免疫微环境、机体免疫功能状态与肿瘤的发生发展有密切关系。调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg) 是一类具有低反应性和免疫抑制功能的 T 细胞亚群。多数研究认为, Treg 负向免疫

机制可导致肿瘤免疫耐受, 在肿瘤的发展中占有重要地位^[1]。Th17 细胞是一群独立的 CD4⁺ T 细胞亚群, 与 Treg 细胞的分化中密切相关。既往研究证实 Th17 细胞在炎症反应及自身免疫性疾病中发挥重要作用, 但 Th17 细胞在肿瘤的发生发展中的作用存在争议。Th17/Treg 细胞失衡在炎症反应、自身免疫性疾病及肿瘤的发生、发展中起重要作用^[2-4], 在卵巢癌、胃癌、前列腺癌等肿瘤中均存在 Treg 及

基金项目: 重庆市卫计委项目(2010-2-305, 2011-2-350); 重庆市自然科学基金(#2013jcyjA10125)

通讯作者: 李代蓉, 主任医师, 博士; 重庆市肿瘤研究所肿瘤内科, 重庆市沙坪坝区汉渝路 181 号(400030); E-mail: lidairong@sohu.com

收稿日期: 2017-03-07; **修回日期:** 2017-04-06

Th17 细胞异常变化。我们检测了非小细胞肺癌患者外周血中 Treg 与 Th17 细胞及其相关细胞因子 TGF- β 和 IL-17 的表达,分析其与 NSCLC 临床病理参数的关系,了解肺癌微环境的免疫状况。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2014 年 1 月至 5 月在重庆市肿瘤研究所住院治疗确诊的 NSCLC 患者共 40 例,其中男性 19 例,女性 21 例,年龄 32~81 岁,平均年龄 63 岁。所有患者均有明确的病理学诊断,其中鳞癌 16 例,腺癌 21 例,腺鳞癌 3 例。ⅡA 期 2 例,ⅡB 期 5 例,ⅢA 期 13 例,ⅢB 期 9 例,Ⅳ期 11 例。另选取同期 20 名健康体检人员为健康对照,其中男性 11 例,女性 9 例,年龄 55~75 岁,平均年龄 65 岁。肺癌组与对照组间年龄及性别构成差异无统计学意义。本研究方案经医院伦理学委员会审查批准。

1.2 血液样本收集

采集空腹外周静脉血约 30ml,抗凝血在室温 24h 内用于细胞分离及培养。

1.3 流式细胞术检测外周血 Th17 细胞、Treg 细胞

实验所需流式抗体包括鼠抗人 FITC-CD4 抗体、鼠抗人 PE-CD25 抗体、鼠抗人 APC-IL-17 抗体和鼠抗人 FITC-CD4 抗体均购自 Ebioscience 公司。以 CD4+IL-17+ 为 Th17 细胞、以 CD4+CD25+FoxP3+ 为 Treg 细胞。

Th17 细胞检测:取 100 μ l 外周血加入流式细胞专用试管,加入 10 μ l 鼠抗人 FITC-CD4 抗体进行细胞膜表面染色,避光孵育 30min,加入 2ml 溶血素,避光孵育 15min,离心去上清,洗涤细胞后加 2ml 固定液孵育 20min,洗涤细胞后加入 2ml 破膜液孵育 30min 后,洗涤细胞加入 10 μ l 鼠抗人 APC-IL-17 抗体后孵育 20min,洗涤重悬细胞,用流式细胞仪进行检测。

Treg 细胞检测:取 100 μ l 细胞悬液,加入 10 μ l 鼠抗人 FITC-CD4 抗体和 10 μ l 鼠抗人 PE-CD25 抗体混匀,避光孵育 30min,加入 2ml 溶血素,避光孵育 15min,离心去上清,洗涤细胞分别加入固定液、破膜液孵育洗涤细胞,加入 10 μ l 鼠抗人 APC-Foxp3 抗体,孵育 20min,洗涤重悬细胞,用流式细胞仪进

行检测。

用 BD calibur 流式细胞仪检测,采用 Cell Quest 分析软件获取 10 000 个细胞进行分析,结果以百分数表示。

1.4 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血浆中 IL-17 和 TGF- β 水平

按照 ELISA 检测试剂盒使用说明书进行操作。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件处理数据,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,正态分布数据采用独立样本 *t* 检验,非正态分布资料采用 Wilcoxon 秩和检验;计数资料采用率的形式表示并行卡方检验;采用 Spearman 相关或者 Person 相关进行相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌组和对照组外周血中 Treg 细胞、Th17 细胞表达及 Th17/Treg 比较

与正常对照组(4.06% $\pm$ 1.23%)相比,肺癌患者外周血 CD4+CD25+Foxp3+ Treg/CD4 T 细胞百分率(6.65% $\pm$ 3.70%)增高,两组差异有统计学意义($P=0.005$)。肺癌患者外周血 CD4+IL-17+Th17 细胞占 CD4+T 细胞的 1.20% $\pm$ 1.19%,对照组外周血 Th17 细胞占 CD4+T 细胞的 0.44% $\pm$ 0.13%,肺癌患者外周血 Th17 细胞数量明显增加($P=0.001$)。肺癌组 Th17/Treg 高于对照组,两组的 Th17/Treg 比较差异有统计学意义($P<0.05$)(Table 1)。肺癌患者外周血中 Th17 细胞与 Treg 细胞表达不存在相关性($P=0.06$)(Figure 1)。

Table 1 Comparison of levels of Treg and Th17 cells in peripheral blood of NSCLC patients and controls

Variable	Control(n=20)	NSCLC (n=40)	Z	P
Treg	4.06 $\pm$ 1.23	6.65 $\pm$ 3.70	-2.792	0.005
Th17	0.44 $\pm$ 0.13	1.20 $\pm$ 1.19	-3.452	0.001
Th17/Treg	0.09 $\pm$ 0.06	0.38 $\pm$ 0.43	-2.793	0.005

2.2 肺癌患者外周血中 Treg 和 Th17 细胞表达与临床病理特征的关系

肺癌患者外周血中 Treg 和 Th17 细胞与年龄、分期及淋巴结无统计学意义的相关性。

2.3 血浆中 TGF- β 和 IL-17 水平比较

与正常对照组相比,NSCLC 患者血浆中 TGF- β

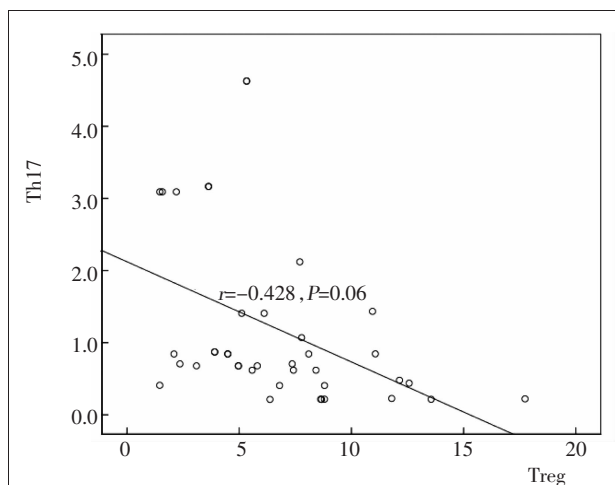


Figure 1 Correlation between expression of Treg cell and Th17 cell in the peripheral blood of NSCLC patients

Table 2 Comparison of levels of TGF- β and IL-17 in peripheral blood of NSCLC patients and controls

Variable	Control(n=20)	NSCLC (n=40)	Z	P
TGF- β	15.96 $\pm$ 3.65	25.05 $\pm$ 3.19	-3.252	0.005
IL-17	2.01 $\pm$ 1.83	4.36 $\pm$ 2.79	-2.323	0.002

和 IL-17 水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$) (Table 2)。

3 讨 论

肿瘤局部的免疫微环境可影响肿瘤发生发展和患者预后。CD4+T 淋巴细胞是机体主要的细胞免疫组分,初始 CD4+T 细胞在特定细胞因子调控下可以分化为辅助性 T 细胞 1(T helper 1, Th1)、Th2、调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)和 Th17 等不同的功能亚群。在 TGF- β 和 IL-6 同时存在时,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^[2]。Treg 与 Th17 功能反向,正常机体内 Treg 和 Th17 之间的相互制约共同维持着内环境的稳定,使机体保持正常的免疫功能^[4]。Th17/Treg 失衡是导致自身免疫性疾病发生的重要原因^[2],但 Th17/Treg 在肿瘤发生、发展中的作用尚不明确。

CD4+CD25+Foxp3+Treg 是一类具有免疫抑制作用的 T 淋巴细胞亚群,占 CD4+ T 细胞比例约 5%~10%^[1,5]。Treg 具有维持机体免疫状态稳定的重要作用。Foxp3(forkhead/winged-helix transcription factor),即叉头状/翼状螺旋转录因子 3,作为 Treg 特异

性转录因子,对 Treg 细胞的分化发育和发挥免疫抑制功能起着关键作用^[1]。目前多数研究认为 Treg 细胞高表达在局部抑制了免疫应答,促进了肿瘤的进展。在多种肿瘤,如肺癌、卵巢癌、胃癌、肝癌患者的外周血和肿瘤组织中 Treg 数量均较健康志愿者增加^[4,6-9],Foxp3 蛋白在肿瘤组织中表达与 Treg 细胞的变化相平行^[8]。还有研究证实,患者体内 Treg 的升高与肿瘤的不良预后有关系^[9,10]。Liu 等^[9]发现癌旁组织中 Treg 的比例在 Luminal 型乳腺癌中显著性高于非 Luminal 型,肿瘤组织内 Treg 细胞的数量为乳腺癌独立预后指标。然而也有研究不支持 Treg 细胞的数量与肿瘤临床分期的联系^[11]。本研究显示,肺癌患者外周血中 Treg 细胞数显著性高于对照组,肺癌患者血浆中 Treg 细胞分泌的细胞因子 TGF- β 的水平也高于正常对照,说明肺癌患者体内存在 Treg 细胞产生的免疫抑制效应。

CD4+IL-17+ Th17 是重要的介导炎症反应的 T 淋巴细胞,其分泌的 IL-17 等细胞因子具有强大的促炎作用,在多种自身免疫性疾病包括系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎中起重要作用^[2]。目前 Th7 细胞在肿瘤发生发展中的作用尚不明确。研究报道在多种荷瘤小鼠模型及肿瘤患者的外周血和肿瘤组织中检测出高水平的 Th-17 细胞及其特征性细胞因子 IL-17A^[12,13],且 Th17 与肿瘤分期、治疗及预后关系密切^[14-17]。Koyama 等^[15]报道,局限期小细胞肺癌患者和初发患者的 Th17 细胞水平较进展期和复发患者高,也有部分不一致的研究结果发现,Th17 细胞水平的增高预示着肿瘤患者的预后较差。进展期胃癌患者外周血中的 Th17 细胞数量明显多于正常人和早期患者,且该水平与患者的 pTNM 分期正相关^[18]。肝癌患者肝肿瘤内 Th17 细胞的增加伴随着患者总体生存率和无病生存率的下降^[19]。我们的研究发现肺癌患者外周血中的 Th17 细胞数量增加,同时外周血中 IL-17A 的阳性率也高于对照组,提示 Th17 及其分泌的 IL-17 参与了促进肿瘤生长及改变肿瘤微环境,与肺癌的发生发展有关。

正常机体内的 Th17/Treg 平衡对保持正常的机体免疫功能具有重要作用。但 Th17/Treg 失衡在肿瘤发生、发展中的作用目前尚不明确^[14-16,20]。Bao 等^[14]发现肺腺癌患者 Th17 与肿瘤进展相关,而贾慧民等^[16]的研究提示肺鳞癌和腺癌患者癌组织中 IL-17 与

Foxp3 表达呈正相关,且 IL-17 和 Foxp3 阳性表达均是影响预后的独立危险因素。我们的研究发现 Th17/Treg 在肺癌患者中高于正常对照组,但未能发现两者表达之间的相关性;Treg 和 Th17 细胞数与患者的肿瘤分期、病理类型和淋巴结转移等无相关性($P>0.05$)。我们的结果与其他研究结果的差异,可能与本研究入组样本数偏少,且其中多数患者分期较晚等因素有关。

我们的研究发现 Treg 和 Th17 细胞及其相关的细胞因子在肺癌和正常人群中存在差异,提示 Treg 和 Th17 细胞可能参与了肺癌的发生和发展,Treg 及 Th17 细胞在肺癌免疫中的作用尚待深入探讨。

参考文献:

- [1] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance[J]. Cell, 2008, 133(5): 775-787.
- [2] Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases [J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(6): 668-677.
- [3] Whiteside TL. Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? [J]. Cancer Immunol Immunother, 2014, 63(1): 67-72.
- [4] Fang Q, Dai AG, Jiang YL. Research progress of Th17 / Treg and pulmonary diseases [J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine, 2016, 21(5): 899-902. [万琴, 戴爱国, 蒋永亮. Th17/Treg 与肺部疾病的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(5): 899-902.]
- [5] Zou Q, Yao X, Feng J, et al. Praziquantel facilitates ifn-gamma-producing CD8 T cells and IL-17-producing CD8 T cells responses to DNA vaccination in mice [J]. PLoS One, 2011, 6(10): e25525.
- [6] Sun WH, Wei XF, Zhao P, et al. Changes in Treg cells and their cytokine production in the peripheral blood of gastric cancer patients following immunotherapy with DC-CIK cells [J]. Chin J Cancer Biother, 2015, 22(1): 79-83. [孙伟红, 魏晓芳, 赵鹏, 等. 胃癌患者 DC-CIK 治疗前后外周血 Treg 细胞及相关细胞因子的变化[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2015, 22(1): 79-83.]
- [7] Zhen QH, Wang N, Song TJ, et al. Change of number of regulatory T cells and NK cells in tumor tissue and main immune organs of murine models of lung cancer and their significances [J]. Journal of Jilin University (Med Edition), 2016, 42(4): 659-664. [郑全辉, 王娜, 宋天姣, 等. 肺癌模型小鼠肿瘤和主要免疫器官组织中调节性 T 细胞和 NK 细胞的数量变化及其意义[J]. 吉林大学学报(医学版), 2016, 42(4): 659-664.]
- [8] Wang HB, Guo CL, Cheng W, et al. Analysis of Treg cells in hepatocellular carcinoma and their clinical significance [J]. Journal of Chinese Oncology, 2015, 21(2): 133-137. [王宏波, 郭存丽, 程文, 等. 肝细胞癌患者病灶局部 Treg 细胞分析及其临床意义[J]. 肿瘤学杂志, 2015, 21(2): 133-137.]
- [9] Liu F, Lang R, Zhao J, et al. CD8 cytotoxic T cell and foxp3 regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes [J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 130(2): 645-655.
- [10] 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.
- [11] Matsuura K, Yamaguchi Y, Ueno H, et al. Maturation of dendritic cells and T-cell responses in sentinel lymph nodes from patients with breast carcinoma [J]. Cancer, 2006, 106(6): 1227-1236.
- [12] Su X, Ye J, Hsueh EC, et al. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells [J]. J Immunol, 2010, 184(3): 1630-1641.
- [13] Shao SF, Yu CM. Expression and clinical significance of Th17 and treg cells in peripheral blood of patients with ovarian cancer [J]. Chinese Journal of Immunology, 2015, 31(4): 537-540. [邵素芳, 于春美. 卵巢癌患者外周血 Th17/Treg 细胞的检测及其临床意义 [J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(4): 537-540.]
- [14] Bao Z, Lu G, Cui D, et al. IL-17A-producing T cells are associated with the progression of lung adenocarcinoma [J]. Oncol Rep, 2016, 36(2): 641-650.
- [15] Shaobin W, Yu X, Jiatian L, et al. Changes of CD4+ T-cell subsets after radiofrequency ablation in lung cancer and its significance [J]. J Cancer Res Ther, 2016, 12(Supplement): C166-C170.
- [16] Jia HM, Fang XZ, Zhang GQ, et al. Expression of IL-17 and foxp3 in IIIA stage lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma and their potential relationship with prognosis of carcinoma [J]. Chinese General Practice, 2012, 15(12): 1345-1349. [贾慧民, 房新志, 张国庆, 等. 白介素 17 与 Foxp3 在 IIIA 期肺鳞癌和腺癌中的表达及与预后的关系研究 [J]. 中国全科医学, 2012, 15(12): 1345-1349.]
- [17] Guan L, Yang F, Gong Y. Expression and significance of Th17 cells in patients with malignant pleural effusion [J]. Guangdong Medical Journal, 2014, 35(4): 537-539. [官莉, 杨芳, 官原. 恶性胸腔积液患者 Th17 细胞的表达及意义[J]. 广东医学, 2014, 35(4): 537-539.]
- [18] Li Q, Chen J, Liu Y, et al. Prevalence of Th17 and treg cells in gastric cancer patients and its correlation with clinical parameters [J]. Oncol Rep, 2013, 30(3): 1215-1222.
- [19] 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.
- [20] Decker T, Fischer G, Bücke W, et al. Increased number of regulatory T cells (tregs) in the peripheral blood of patients with her2/neu-positive early breast cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(11): 1945-1950.