

• 临床检验研究论著 •

Treg、Ki67 和 VEGF 在结直肠癌中的表达及意义*

岳朝艳¹, 马妍慧¹, 沈立松¹, 钱明理^{2△}

(上海交通大学医学院附属新华医院: 1. 检验科; 2. 生物医学工程室 200092)

摘要:目的 探讨调节性 T 细胞(Treg)、增殖细胞核抗原(Ki67)和血管内皮生长因子(VEGF)在结直肠癌(CRC)患者肿瘤微环境中的表达,以及 Treg 与 Ki67、VEGF 的相关性。**方法** 采用流式细胞术测定 21 例 CRC 患者的外周血以及肿瘤微环境和 24 例健康人外周血中 Treg 的表达,同时应用免疫组化法检测 CRC 组织中 Ki67 和 VEGF 的表达。**结果** CRC 患者肿瘤微环境中 Treg 比较[(26.84±10.22)%]明显高于外周血单个核细胞(PBMC)[(7.01±3.08)%],差异有统计学意义($P<0.01$)。Treg 细胞表达频率在 Dukes C 期和 D 期(晚期)的肿瘤组织中[(35.01±6.78)%],明显高于 Dukes A 期和 B 期(早期)[(24.40±8.95)%],差异有统计学意义($P<0.05$)。相关分析表明 Treg 与 Dukes 临床分期呈正相关($r=0.511, P<0.05$); Treg 与 Ki67 的表达呈正相关($r=0.455, P<0.05$); Treg 与 VEGF 的表达呈正相关($r=0.198, P>0.05$),但无统计学意义。**结论** Treg 与 Ki67、VEGF 的相互作用可能促进了肿瘤的发生、发展与转移,对 CRC 的预后评价有着重要的参考价值。

关键词: 结直肠肿瘤; T 淋巴细胞,调节性; 增殖细胞核抗原; 血管内皮生长因子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.11.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)11-1288-03

Expression and clinical significance of Treg, Ki67 and VEGF in colorectal cancer*

Yue Chaoyan¹, Ma Yanhui¹, Shen Lishong¹, Qian Mingli^{2△}

(Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine: 1. Department of Laboratory Medicine; 2. Department of Biomedical Engineering, Shanghai 200092, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship of the expression and clinical significance between regulatory T cells (Treg), proliferating cell nuclear antigen(Ki67) and vascular endothelial growth factor(VEGF) in colorectal cancer(CRC). **Methods**

The proportion of Treg was evaluated by flow cytometry in the peripheral blood and tumor microenvironment in 21 patients with CRC and 24 healthy donors. The expression of Ki67 and VEGF in CRC tissues were detected by immunohistochemistry assay. **Results** The percentage of Treg in tumor microenvironment was significantly higher than in peripheral blood mononuclear cell(PBMC) [(26.84±10.22)% vs (7.01±3.08)%], $P<0.01$. Especially in tumor tissues, the frequency of Treg was markedly increased in advanced clinical stages(Dukes' C and D stage) compared to the early clinical stages(Dukes' A and B stage) [(35.01±6.78)% vs (24.40±8.95)%], $P<0.05$. The frequency of Treg was positively correlated with clinical stages($r=0.511, P<0.05$) and Ki67 expression($r=0.455, P<0.05$), but was not significantly related to the expression of VEGF in tumor($r=0.198, P>0.05$). **Conclusion**

The correlation of Treg, Ki67 and VEGF might be involved in the oncogenesis, development and metastasis of CRC, and could be used as prognostic indicators of CRC.

Key words: colorectal neoplasms; T-lymphocytes, regulatory; proliferating cell nuclear antigen; vascular endothelial growth factor

结直肠癌(CRC)是消化系统最常见的肿瘤,其术后生存率较低,是威胁人类健康的恶性肿瘤之一,对其发病机制的研究具有重要的价值^[1]。肿瘤的发生、发展是一个多因素参与的过程,机体的抗肿瘤免疫反应、细胞周期的调控、肿瘤新生血管的形成与恶性肿瘤的发生、发展密切相关。

调节性 T 细胞(Treg)是一种具有免疫调节功能的 T 细胞亚群, Foxp3 是叉状头转录因子家族中的一个成员,被认为是 Treg 的标志性分子。Treg 在体内不仅参与自身免疫性疾病、移植排斥反应等,还在多种恶性肿瘤的发生、发展及免疫治疗中发挥重要作用。已有研究报道,在 CRC 患者的肿瘤组织中 Treg 的数目显著高于癌旁未受肿瘤侵犯的黏膜层^[2-5]。血管形成是原发肿瘤和转移肿瘤生长的首要条件,血管内皮生长因子(VEGF)是最有效的促血管生长因子,其促进了血管内皮细胞分裂和毛细血管出芽生长,新生的毛细血管既为肿瘤生长提供营养,又为肿瘤的浸润和转移提供了有利条件^[6-7]。增殖细胞核抗原(Ki67)是一种与细胞周期相关的蛋白质,是目前多种

恶性肿瘤研究中的热门生物指标,它与许多肿瘤分化程度、浸润、转移、预后密切相关^[8]。

本组采用流式细胞术测定 CRC 患者的外周血以及肿瘤微环境中 Treg 的表达,同时应用免疫组化法对 Ki67 和 VEGF 的表达进行分析,并探讨 Treg 与 Ki67、VEGF 在 CRC 的生长、浸润、转移中的作用,为临床预测肿瘤的预后提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 7~12 月于本院肛肠科诊治的 19 例 CRC 患者,其中男 8 例,女 11 例,平均年龄 67 岁。按 Dukes 分期将 CRC 患者分成肿瘤早期(Dukes A 期和 B 期)12 例和晚期(Dukes C 期和 D 期)7 例,并分析病史资料中 Ki67、VEGF 的免疫组化结果。所有入选患者术前均未进行过化疗和免疫治疗。

1.2 仪器与试剂 流式抗体 CD4-PC7(美国 Beckman Coulter), CD25-APC(美国 BD Bioscience), CD3-eFluor450、Foxp3-ALex488、固定/破膜液、破膜缓冲液(美国 eBioscience), gentle

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81072009);上海市科委基础研究重点项目(11jc1408300)。 △ 通讯作者, E-mail: mlscmc@yahoo.com.cn。

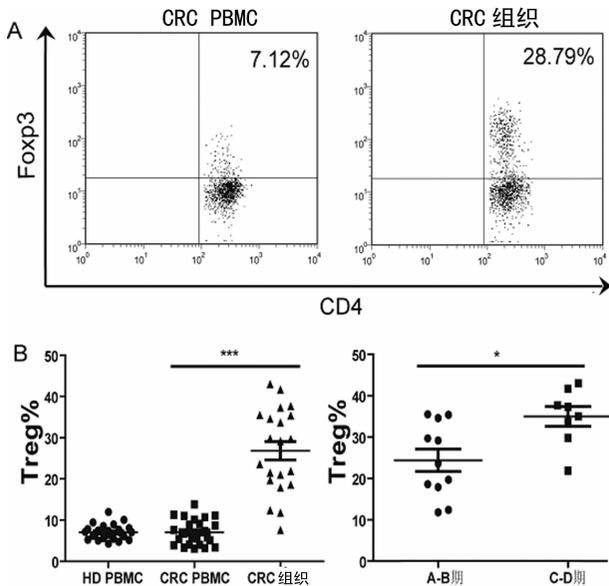
MACS 全自动组织处理器(德国 Miltenyi Biotec), BD FACS canto II 流式细胞仪(美国 BD Bioscience)。

1.3 方法 CRC 患者于术前抽取静脉血 4 mL, 肝素抗凝, 并用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(PBMC)。手术后取新鲜的肿瘤组织, 使用 gentle MACS 全自动组织处理器得到单细胞悬液, 并用淋巴细胞分离液进行密度梯度离心, 吸取单个核细胞层。取不同荧光标记的单克隆抗体各 5 μ L 标记 PBMC 和肿瘤微环境来源的单个核细胞的膜表面分子(CD3、CD4、CD25), 避光室温孵育 30 min, 之后采用固定破膜试剂盒进行细胞固定和破膜, 最后标记核内抗原 Foxp3, 暗处孵育 30 min 后将细胞洗涤两次, 重悬细胞后进行流式细胞检测。采用 FCS Express V3 软件分析处理数据。

1.4 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 u 检验, t 检验, 双变量相关分析采用 Spearman 等级相关、Pearson 相关分析, 所有的统计学分析均采用 SPSS19.0 软件进行处理。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 Treg 在 CRC 中的表达 以 Foxp3 定义 CD4⁺ Treg 细胞, 流式结果显示, 在健康人 PBMC 中, CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比率为 (6.67 \pm 1.39)%, 在 CRC 患者的 PBMC 中, CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比率为 (7.01 \pm 3.08)%, 肿瘤组织中 CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比率为 (26.84 \pm 10.22)%。肿瘤患者 PBMC 中的 Treg 比率高于健康人, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 肿瘤微环境中 Treg 比率明显高于肿瘤患者 PBMC, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。在早期(A 期和 B 期)的肿瘤组织中, CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比率为 (24.40 \pm 8.95)%; 晚期(C 期和 D 期)的肿瘤组织中, CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比率为 (35.01 \pm 6.78)%。Treg 在肿瘤晚期组织中的比率明显高于早期, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。



A: CRC 患者 PBMC 和肿瘤组织中具有代表性的 Treg 流式结果图; B: Treg 在健康人 PBMC、CRC 患者 PBMC 和肿瘤组织以及不同临床分期中的统计图。* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$ 。

图 1 Treg 在 CRC 中的表达分析

2.2 肿瘤微环境中 Treg 与 Ki67、VEGF 的相互关系 Treg 与 Ki67 表达呈正相关($r = 0.455, P < 0.05$), Treg 与 VEGF 表

达呈正相关, 但无统计学意义 ($r = 0.198, P > 0.05$)。进一步应用 Pearson 相关分析 Treg 与临床分期的关系, 发现肿瘤微环境中 Treg 的比率和 Dukes 临床分期呈正相关 ($r = 0.511, P < 0.05$)。表 1 为 19 例 CRC 患者的免疫组化结果。

表 1 CRC 肿瘤组织中 Ki67 和 VEGF 的免疫组化结果

序号	性别	年龄(岁)	Dukes 分期	肿瘤组织 Treg(%)	Ki67	VEGF
1	女	79	B	29.2	++	-
2	女	74	B	29.7	++	+
3	女	62	C	43.0	++	+
4	男	66	C	33.7	20%+	-
5	女	62	B	23.6	++	+
6	女	85	B	35.5	+++	-
7	女	69	B	34.6	++	+
8	男	48	B	19.7	10%+	-
9	女	75	C	21.9	10%+	-
10	女	63	C	6.4	++	部分+
11	男	37	C	2.4	-	+
12	男	70	B	18.6	++	/
13	男	90	B	11.8	10%+	/
14	女	68	A	12.4	+	-
15	男	53	A	17.9	+	-
16	女	72	D	29.8	+	部分+
17	男	61	C	21.5	40%+	-
18	女	61	B	21.0	++	-
19	男	77	B	7.6	++	/

/ : 未检测。

3 讨 论

恶性肿瘤是当今严重危害人类健康的重要疾病, 其最显著的生物学特征是侵袭与转移, 这也是肿瘤无法根治, 最终导致患者死亡的主要原因。肿瘤侵袭转移的发生与预后均与机体免疫系统功能有着必然的联系。Treg 在肿瘤免疫中扮演着抑制效应 T 细胞功能的角色, 其可有效抑制抗肿瘤免疫反应, 参与肿瘤免疫逃避。多数肿瘤患者外周血中 Treg 细胞的数量显著升高, 从而强烈地抑制了机体的抗肿瘤免疫反应。2001 年在非小细胞肺癌和卵巢癌中首次发现 Treg 细胞在肿瘤中的浸润, 随后在许多其他肿瘤或者转移性淋巴结中也发现 Treg 的浸润, 其中包括 CRC^[9]。本研究中, CRC 肿瘤微环境中的 Treg 比率显著升高, 与已有的文献报道相一致。肿瘤患者外周血, 尤其是肿瘤局部微环境中 Treg 细胞的数量增加, 会降低机体免疫系统的抗肿瘤反应。本研究采用流式细胞术对肿瘤局部的 Treg 细胞进行检测, 发现肿瘤微环境中 Treg 细胞的数量和临床分期密切相关。已有文献报道 Foxp3⁺ 细胞比例升高与 CRC 患者较短的生存时间相关, 预示了 Treg 细胞比例对于 CRC 的预后有着重要的作用^[10-11]。对肿瘤微环境中 Foxp3⁺ Treg 细胞的检测可能对 CRC 肿瘤患者的预后有着指导作用。

Ki67 是为 DNA 复制提供场所的核基质及染色体支架的一种组分, 是调节细胞周期必不可少的成分, 其表达因细胞周期不同时期而异, 与细胞增殖密切相关, 被广泛地用于判断肿瘤细胞增殖活性^[8, 13-15], 亦是评估浸润性肿瘤预后的重要指标^[16-18]。通过 Spearman 等级相关分析发现, Treg 与 Ki67 表达呈正相关关系 ($r = 0.455, P < 0.05$), 可能是由于 Treg 细胞在肿瘤局部发挥了抑制肿瘤免疫的作用, 而促进肿瘤细胞增殖。

VEGF 在肿瘤中表达水平较高, 它可促使肿瘤血管生成, 在维持肿瘤的持续生长中起着重要作用, 同时也是肿瘤转移的

基础。在 CRC 中 VEGF 与淋巴结转移和不良预后密切相关^[19]。Treg 与肿瘤转移也存在密切的关系,可能是因为 Treg 参与了肿瘤的免疫逃逸,从而促进了肿瘤的增殖、浸润、转移。已有研究报道,Treg 在乳腺癌的肺转移过程中发挥着重要的作用^[20],本研究虽然发现 Treg 与 VEGF 存在相关关系,但无统计学意义,可能与本研究选取的 CRC 病例数不足有关。

综上所述,Treg、Ki67、VEGF 表达与 CRC 的发生、发展、转移有关,是 CRC 不良预后的因素,Treg 与 Ki67 的联合检测对 CRC 的预后评价有着重要的参考价值,并为 CRC 的免疫治疗提供了新思路。

参考文献

[1] Weitz J, Koch M, Debus J, et al. Colorectal cancer[J]. Lancet, 2005,365(9454):153-165.

[2] Le Gouvello S, Bastuji-Garin S, Aloulou N, et al. High prevalence of Foxp3 and IL17 in MMR-proficient colorectal carcinomas[J]. Gut, 2008,57(6):772-779.

[3] Clarke SL, Betts GJ, Plant A, et al. CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer[J]. PLoS ONE, 2006,1(1):e129.

[4] Ling KL, Pratap SE, Bates GJ, et al. Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients[J]. Cancer Immun, 2007,7:7.

[5] Michel S, Benner A, Tariverdian M, et al. High density of FOXP3-positive T cells infiltrating colorectal cancers with microsatellite instability[J]. Br J Cancer, 2008,99(11):1867-1873.

[6] Wu AW, Gu J, Li ZF. Cox-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer[J]. World J Gastroenterol, 2004,10(16):2323-2326.

[7] Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O. Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004,10(8):2694-2704.

[8] Bura M, Seivert S, Vladika I. Possible prognostic significance of p53 and Ki67 in inverted sinonasal papilloma[J]. Coll Antropol, 2007,31(2):545-549.

[9] Baumgartner JM, McCarter MD. Suppressing the suppressor Role of immunosuppressive regulatory T cells in cancer surgery[J]. Surgery, 2009,145(4):345-350.

[10] Sinicrpe FA, Rego RL, Ansell SM, et al. A low intraepithelial effector (CD3⁺): regulatory (FoxP3⁺) T-cell ratio predicts ad-

verse outcome of human colon carcinoma[J]. Gastroenterology, 2009,137(4):1270-1279.

[11] Betts G, Jones E, Junaid S. Suppression of tumour-specific CD4⁺ T cells by regulatory T cells is associated with progression of human colorectal cancer[J/OL]. Gut, [2011-12-29]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22207629>.

[12] Svensson H, Olofsson V, Lundin S. Accumulation of CCR4⁺CTLA-4hi FOXP3⁺CD25hi regulatory T cells in colon adenocarcinomas correlate to reduced activation of conventional T cells[J]. PLoS One, 2012,7(2):e30695.

[13] Raju B, Mehrotra R, Oijordsbakken G. Expression of p53, cyclin D1 and Ki-67 in pre-malignant and malignant oral lesions; association with clinicopathological parameters [J]. Anticancer Res, 2005,25(6C):4699-4706.

[14] Kannan S, Chandran GJ, Pillai KR. Expression of p53 in leukoplakia and squamous cell carcinoma of the oral mucosa; correlation with expression of Ki67[J]. Clin Mol Pathol, 1996,49(3):M170-175.

[15] Motta RR, Zettler CG, Cambuzzi E. Ki-67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue[J]. Braz J Otorhinolaryngol, 2009,75(4):544-549.

[16] Dragomir LP, Simionescu C, Mărgăritescu C. P53, p16 and Ki67 immunexpression in oral squamous carcinomas[J]. Rom J Morphol Embryol, 2012,53(1):89-93.

[17] Bhargava R, Striebel J, Beriwal S, et al. Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2009,2(5):444-455.

[18] Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2009,101(10):736-750.

[19] Wang TB, Chen ZG, Wei XQ. Serum vascular endothelial growth factor-C and lymphoangiogenesis are associated with the lymph node metastasis and prognosis of patients with colorectal cancer [J]. ANZ J Surg, 2011,81(10):694-699.

[20] Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, et al. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells[J]. Cancer Res, 2011,71(10):3505-3515.

(收稿日期:2012-04-06)

(上接第 1287 页)

for colonoscopy: a multicenter prospective study[J]. Dig Liver Dis, 2010,42(3):191-195.

[5] 余剑波. 粪钙卫蛋白在溃疡性结肠炎诊断中的价值研究[J]. 结直肠肛门外科, 2009,15(5):305-308.

[6] 陈茉莉, 梅俏, 陆春霞, 等. 炎症性肠病粪便中钙卫蛋白水平的改变[J]. 安徽医科大学学报, 2010,45(2):258-260.

[7] 刘文斌, 吕愈敏, 杨雪玲, 等. 粪便钙卫蛋白对溃疡性结肠炎活动性判断价值的研究[J]. 中华消化杂志, 2005,25(7):394-397.

[8] 郭东更, 宫怡. 抗中性粒细胞胞浆抗体在风湿性疾病中的作用机制[J]. 临床荟萃, 2006,21(24):1800-1801.

[9] 刘新光, 于涛, 赵明辉, 等. 抗中性粒细胞胞浆抗体对溃疡性结肠炎的诊断价值[J]. 中华内科杂志, 1999,38(7):451-456.

[10] Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel disease[J]. Clin Chem, 2006,52(2):171-181.

[11] Saxon A, Shanahan F, Landers C. A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel

disease[J]. J Allergy Clin Immunol, 1990,86(2):202-210.

[12] Preda CM, Vermeire S, Rutgeerts P, et al. Prevalence and significance of perinuclear anti-neutrophil antibodies (pANCA) in Romanian patients with Crohn's disease and ulcerative colitis[J]. Rom J Gastroenterol, 2005,14(4):357-360.

[13] 张蜀澜, 李永哲, 李磊, 等. 联合检测炎症性肠病患者抗酿酒酵母细胞抗体和抗中性粒细胞抗体的临床意义[J]. 中华检验医学杂志, 2008,31(10):1142-1146.

[14] 孟华, 刘丽娜, 郭世斌, 等. 抗中性粒细胞胞浆抗体及抗酿酒酵母抗体在溃疡性结肠炎诊断中的应用[J]. 中国误诊学杂志, 2010,10(19):4586-4587.

[15] 田自力, 鲁素彩, 张文英, 等. 抗中性粒细胞胞浆抗体对溃疡性结肠炎的诊断意义[J]. 河北职工医学院学报, 2007,24(3):18-19.

[16] 张冰凌, 厉有名, 虞朝辉, 等. 抗中性粒细胞胞浆抗体在炎症性肠病中的诊断意义[J]. 浙江预防医学, 2003,15(5):11-12.

(收稿日期:2011-11-01)