

• 临床检验研究论著 •

# 胃癌患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>调节性 T 淋巴细胞数量和分布的研究

郝燕

(内蒙古医科大学第一附属医院核医学科, 内蒙古呼和浩特 010059)

**摘要:**目的 分析 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>调节性 T 淋巴细胞(Treg)数量和分布的相关性,研究两者之间的相关性。方法 选取该院 60 例胃癌患者,用流式细胞仪分析患者术前外周血与肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中 Treg 以及 CD8<sup>+</sup>T 细胞的比率。另选出 10 例胃癌患者分别于手术前、后用 ELISA 检测血清和腹腔冲洗液中细胞因子的水平,并进行对比分析。结果 胃癌患者外周血分析 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 显著高于健康对照组,癌症早期患者低于晚期患者( $P < 0.05$ );胃癌患者血清比例低于健康对照组( $P < 0.05$ )。肿瘤组织浸润淋巴细胞中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 的比率与 CD8<sup>+</sup>T 细胞的比率呈负相关( $r = -0.4, P < 0.05$ )。10 例患者肿瘤切除后 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 的比率显著降低( $P < 0.01$ )。结论 胃癌患者外周血中的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 明显比 CD8<sup>+</sup>T 细胞高很多,发展速度极快,经分析研究,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 比率的增高与 CD8<sup>+</sup>T 细胞的降低,可能与癌细胞自身的免疫力有着密切关系。

**关键词:**胃肿瘤; T 淋巴细胞,调节性; 流式细胞术; 细胞因子类

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)05-0545-03

## Study on number and distribution of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T lymphocyte in patients with gastric cancer

Qie Yan

(Nuclear Medicine Department, First Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010059, China)

**Abstract: Objective** To analyze CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T (Treg) lymphocyte numbers and distribution, to study the relationship between the two. **Methods** 60 patients with gastric cancer in the hospital were enrolled in the study, the multi-parameter flow cytometry analysis were applied for the Treg and CD8<sup>+</sup>T cell ratio in the peripheral blood and tumor infiltrating lymphocytes (TIL) for preoperative patients. 10 patients with gastric cancer were recruited and had ELISA detection of IFN- $\gamma$ , IL-4 cytokines extent and comparative analysis before and after operation. **Results** The patients with gastric analysis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes was significantly higher than the healthy control group, lower than that of patients with advanced disease ( $P < 0.05$ ). For patients with early cancer, proportion of patients with gastric cancer serum Th1 / Th2 was lower than the healthy control group, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Tumor infiltrating lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T lymphocyte ratio and CD8<sup>+</sup>T cell ratio was negatively correlated ( $r = -0.4, P < 0.05$ ). 10 patients after removal of tumor, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes ratio was significantly reduced, there were differences with statistically significant ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** patients with gastric cancer in peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes was significantly higher than that CD8<sup>+</sup>T cells, and the fast progress analysis study, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T lymphocyte ratio increased and CD8<sup>+</sup>T cells reduced, probably has a close relationship with the cancer cell's own immune system.

**Key words:** stomach neoplasms; T-Lymphocytes, regulatory flow cytometry; cytokines

胃癌是中国最常见的恶性肿瘤之一,系源于上皮的恶性肿瘤,也称胃腺癌。胃癌在人类所有恶性肿瘤中,恶性程度名列前茅。胃癌的发病、发展与机体肿瘤免疫状态以及肿瘤的免疫逃逸机制有关,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>调节性 T 细胞(Treg)在发病过程中起着重要作用<sup>[1]</sup>。本研究采用流式细胞仪分析胃癌 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 数量和分布的相关性,研究两者之间的关系,报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取本院普外科 2010 年 2~12 月确诊为胃癌的 60 例患者作为观察组,其中男性 35 例,女性 25 例,年龄 48~65 岁,平均年龄(55.2±2.5)岁。所有患者临床 TNM 分期标准按照国际抗癌协会所要求,分为:Ⅰ期、Ⅱ期各 12 例,Ⅲ期 22 例,Ⅳ期 14 例。另选取 16 例健康体检者作为对照组,男性 8 例,女性 8 例,年龄 47~66 岁,平均年龄(57.2±1.2)岁。

**1.2 仪器与试剂** 采用美国 BD 公司生产的流式细胞仪,抗体 CD4-PC5、CD25-PE、CD8-FITC,同型对照 IgG1-FITC、IgG2a-FITC 均为 BD 公司生产。

## 1.3 方法

**1.3.1 样本采集和处理** 观察组患者空腹采集静脉血 3 mL,通过淋巴细胞分离液对单个核细胞进行分离,抗凝剂使用肝素钠,注入 200 mL 生理盐水冲洗胃肿瘤表面,然后用 PBS 清洗余血,取肿瘤组织体积大小 5 mm<sup>3</sup> 组织块,选用机械研磨法制备单细胞悬液。对照组以同样方法采集静脉血。

**1.3.2 细胞因子的检测** 将胃癌患者与对照组外周血、腹腔冲洗液上清液用于检测。血清和上清液经 2 500 r/min 离心 5 min,放置于 -75 ℃ 以备用。按照试剂说明进行操作,测量血清和上清液中相应因子。

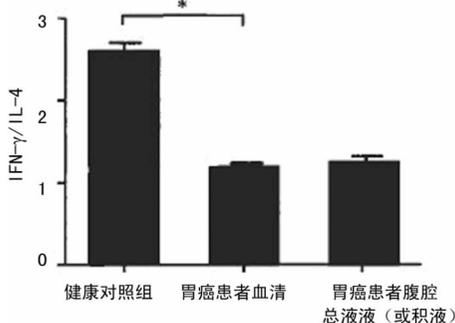
**1.3.3 细胞比率分析** 通过流式细胞仪对观察组患者肿瘤组

织、外周血以及对照组的外周血中的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞进行检测,选用 BD FACS Diva 软件分析 Treg 以及 CD8<sup>+</sup> 细胞的比率。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS10.0 软件统计分析,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,采用 Pearson 相关性分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 观察胃癌患者免疫状况** 观察胃癌患者血清、腹腔冲洗液上清液以及对照组血清中 IFN- $\gamma$ 、IL-4 的水平,以此进行对比。经观察研究取证,胃癌患者血清中 IFN- $\gamma$ /IL-4 比值为  $1.18 \pm 0.35$ , 比对照组血清中水平 ( $2.55 \pm 0.52$ ) 明显下降 ( $P < 0.05$ )。胃癌腹腔冲洗液上清液中 IFN- $\gamma$ /IL-4 比值为  $1.24 \pm 0.54$ 。结果反映,Th1 细胞的减少和 Th2 细胞的生长是通过胃癌患者血清中 IFN- $\gamma$ /IL-4 的比值所体现出来的。检测分析观察组患者血清、清液与对照组血清中 IFN- $\gamma$ 、IL-4, 见图 1。



\*:  $P < 0.05$ , 两组间比较。

**图 1 胃癌患者血清和腹腔冲洗液中清液与对照组血清中 IFN- $\gamma$ 、IL-4 的变化**

**2.2 胃癌 TNM 不同分期中 Treg 细胞比率的比较** 观察分析胃癌患者在不同分期,外周血和 TIL 中 Treg 细胞占 CD4<sup>+</sup> 细胞的比率,见表 1。观察组外周血 Treg 的比率比对照组外周血 Treg 的比率高,TIL 中 Treg 比率同样高于外周血 ( $P < 0.05$ );观察组早期患者 (I、II 期为早期,III、IV 期为晚期) Treg 比率与对照组之间的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),观察组晚期患者外周血 TIL Treg 细胞比率高于观察组早期患者,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

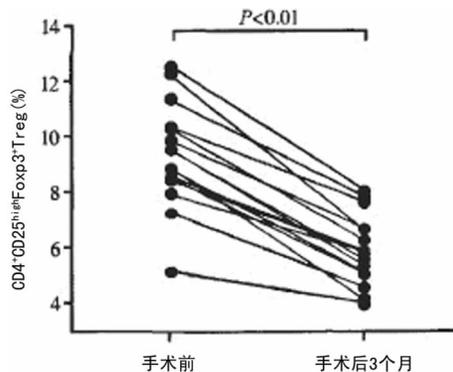
**表 1 TNM 不同分期中对照组、观察组早晚期 Treg 和 CTL 的比率 ( $\bar{x} \pm s$ , %)**

组别	n	Treg		TIL 中 CTL
		外周血	TIL	
对照组	16	5.3 ± 0.8	—	—
观察组	60	7.4 ± 2.4	20.4 ± 5.4	55.1 ± 7.9
早期 (I + II 期)	24	6.2 ± 1.5	16.1 ± 4.8	64.9 ± 8.4
晚期 (III + IV 期)	36	8.5 ± 2.5	23.1 ± 7.6	47.5 ± 7.5

—: 无数据。

**2.3 分析 Treg 细胞与细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 比率的相关性** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞可利用细胞直接接触方式抑制产生 CD8<sup>+</sup>CTL<sup>[2-3]</sup>。Treg 与 CTL 的比率呈负相关 ( $r = -0.4, P < 0.05$ ), CTL 随着 Treg 比率递增而降低。

**2.4 肿瘤切除后与 Treg 细胞比率的相关性** 观察 10 例胃癌患者手术前后外周血选用酶联免疫吸附试验,经过手术后 3 个月进行跟踪了解,手术后外周血中 Treg 细胞比率与手术前做比较,明显降低,存在差异,具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。详见图 2。



**图 2 胃癌患者手术前与手术后 3 个月与 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞比率示意图**

**3 讨论**

肿瘤的形成不仅与其诱导机体对肿瘤抗原的免疫适应和免疫无能紧密相关,还可依赖于肿瘤细胞本身的免疫逃逸功能有关,其机制:(1)因为肿瘤细胞对有效抗原性表位有所不足,与有效的抗肿瘤免疫效应很难结合;(2)肿瘤细胞分子发生改变,阻抗机体免疫细胞抗原递呈和免疫识别等<sup>[4]</sup>。

CD4<sup>+</sup>T 细胞因分泌细胞因子与介导不同,可分为 Th1 和 Th2。Th1 主要作用是分泌 IFN- $\gamma$ ,对肿瘤免疫反应起到抗击作用;Th2 主要作用是分泌 IL-4、IL-10 等,介导体液免疫。Th1/Th2 两者之间互相调节:Th1 分泌出的 IFN- $\gamma$  抑制 Th2 分化和功能,Th2 分泌出的 IL-10 可抑制 Th1 分化与功能<sup>[5]</sup>。Th1/Th2 两者之间互相调节、相互平衡,直接给机体的免疫功能造成一定的影响,并且与疾病有不可分离的关系。据结果显示,IFN- $\gamma$  下调、IL-4 上调,是造成多种肿瘤患者体内 Th1 和 Th2 细胞偏离平衡的主要原因,不仅存在 Th1 和 Th2 偏离现象,根据分析,还存在 Th1 和 Th2 漂移的现象。

T 细胞另一个细胞群 CD8<sup>+</sup>T 细胞,在抗肿瘤中也起到典范作用,CD8<sup>+</sup>T 细胞利用穿孔素的释放与颗粒酶等毒性细胞物质溶解靶细胞<sup>[6]</sup>。机体内存在如此多的不断发生、发展的抗肿瘤因素,主要原因在于机体内还有些抑制抗肿瘤的因素的存在,导致肿瘤抗原表位的短缺,肿瘤免疫逃逸。

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 是近几年才被人们所认识的一类免疫调节细胞,是细胞 CD4<sup>+</sup>细胞的新组织成员,在人体组织内发挥抑制性免疫调节作用,具有免疫抑制性的特征,在自身免疫性疾病的治疗、肿瘤的免疫治疗等方面具有潜在的应用价值。人体内 Treg 细胞具有免疫抑制功能,是一类调节性细胞,可参与多种免疫性疾病的发生和发展过程,对机体免疫起着抑制作用<sup>[7]</sup>。

健康人体内的各种免疫细胞在数量上持有固定的比率,如果比率失调,就会减低免疫功能的免疫作用,致使肿瘤细胞逃脱免疫系统的攻击,胃癌患者的 CD8<sup>+</sup>T 细胞杀伤力降低、Treg 升高,与胃癌发生免疫逃逸的机制脱离不了关系。经研究表明,胃癌患者 Treg 细胞比率的升高,与早期胃癌患者、晚期胃癌相比,Treg 细胞比率有显著升高现象,足以说明,胃癌患者的肿瘤组织中的 CTL 降低,与 Treg 有密切联系,呈负相关。导致此现象的原因为 Treg 具有免疫抑制作用,利用细胞

直接接触而完成<sup>[8]</sup>。

临床研究发现,胃癌晚期患者外周血 Treg 水平比早期胃癌患者高很多,胃癌患者 Treg 的免疫功能与肿瘤生长有着紧密关系,可直接与肿瘤发展同步进行。通过研究发现可知,肿瘤免疫机制中 Treg 细胞的作用和外周血 Treg 细胞的比率变化,在临床指导与免疫治疗过程中,具有非常大的重要意义,在未来肿瘤研究治疗反面,是一个非常有效的方法<sup>[9-12]</sup>。

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 不仅与肿瘤免疫机制有关系,与其数量多少和肿瘤恶性程度也有相关性,该细胞数量增多,说明肿瘤预后较差。所以,恶性肿瘤患者外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 数量比对照组要高出 1 倍以上。经检测,晚期(Ⅲ+Ⅳ期)恶性肿瘤患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞水平比早期(Ⅰ+Ⅱ期)患者高,Ⅳ期恶性肿瘤患者的外周血调节 T 细胞水平最高。

Foxp3<sup>+</sup>Treg 是促进 T 细胞生长及功能发挥的重要因素。因为 Treg 具有抑制机体抗肿瘤免疫的作用,所以 Foxp3<sup>+</sup>Treg 在肿瘤免疫中具有促瘤的作用。根据肿瘤分期与 Foxp3 基因表达,探索研究 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞对细胞杀伤肿瘤效应的影响范围,可以为更深一步研究免疫治疗的临床应用打下坚实的基础。

参考文献

[1] 梁建明,孙青,钟永,等.胃癌患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞比率及表型特征研究[J].蚌埠医学院学报,2010,35(9):883-886.  
 [2] Stephens LA, Mottet C, Mason D, et al. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro[J]. Eur J Immunol, 2001, 31(4): 1247-1254.

(上接第 544 页)

卵巢癌的一种新的血清标志物,也是卵巢良恶性疾病鉴别诊断的良好指标。本研究首次采用先进的化学发光微粒子免疫方法联合检测血清 HE4 和 CA 125 水平,并结合 ROMA 值风险评估在盆腔包块患者罹患恶性卵巢癌的早期诊断上具有较好的应用价值,为临床上卵巢癌的早发现、早诊治以及提高卵巢癌患者的预后提供了新的思路。

参考文献

[1] Ho SM. Estrogen, Progesterone and Epithelial Ovarian Cancer [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2003, 1(1): 73.  
 [2] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2004, 62(1): 10-29.  
 [3] Schink JC. Current initial therapy of stage III and IV ovarian Cancer: challenges for managed care[J]. Semin Oncol, 1999, 26 (Suppl 1): S2-7.  
 [4] Strigini FA, Gadducci A, Del Bravo B, et al. Differential diagnosis of adnexal masses with transvaginal sonography, color flow imaging, and serum CA 125 assay in pre- and postmenopausal women [J]. Gynecol Oncol, 1996, 61(1): 68-72.  
 [5] Kobayashi H, Yamada Y, Sado T, et al. A randomized study of screening for ovarian Cancer: a multicenter study in Japan[J]. Int J Gynecol Cancer, 2008, 18(3): 414-420.  
 [6] Bast RC Jr. Status of tumor markers in ovarian cancer screening

[3] Yamagiwa S, Gray JD, Hashimoto S, et al. A role for TGF-beta in the Generation and expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells from human peripheral blood[J]. J Immunol, 2001, 166(12): 7282-7289.  
 [4] 雷晓,余佩武,赵永亮,等. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞在胃癌患者的表达及其临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(5): 397-400.  
 [5] Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones [J]. Science, 1991, 254(5029): 279-282.  
 [6] 周光炎. 免疫学原理[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2007: 247-249.  
 [7] Terabe M, Berzofsky JA. Immunoregulatory T cells in tumor immunity[J]. Curr Opin Immunol, 2004, 16(2): 157-162.  
 [8] 张通通,袁向亮,李美星,等. 胃癌 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>调节性 T 细胞的异常增高与患者免疫抑制状态的相关性分析[J]. 诊断学理论与实践, 2010, 9(4): 339-342.  
 [9] 袁向亮,沈定丰,卢剑,等. 胃癌 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>调节性 T 淋巴细胞数量和分布及 Foxp3 基因表达与肿瘤分期的相关性[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(4): 378-383.  
 [10] 史学菲,白平,唐承薇,等. 胃癌患者手术前后 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的变化[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2011, 18(9): 942-946.  
 [11] 吕承刚,李永翔. 胃肠道恶性肿瘤患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的检测及意义[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(7): 817-820.  
 [12] 齐治,李荣,陈凛,等. 胃癌患者外周血调节性 T 细胞检测及初步分析[J]. 中华实验外科杂志, 2009, 26(5): 608-609.

(收稿日期:2012-12-02)

[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(Suppl 10): S200-205.

[7] Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas [J]. Cancer Res, 2005, 65(6): 2162-2169.  
 [8] Moore RG, Mcmeekin DS, Brown AK, et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian Cancer in patients with a pelvic mass[J]. Gynecol Oncol, 2009, 112(1): 40-46.  
 [9] Hellstrom I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma[J]. Cancer Res, 2003, 63(13): 3695-3700.  
 [10] Rosenthal A, Jacobs I. Ovarian cancer screening [J]. Semin Oncol, 1998, 25(3): 315-325.  
 [11] Park Y, Lee JH, Hong DJ, et al. Diagnostic performances of HE4 and CA125 for the detection of ovarian Cancer from patients with various gynecologic and non-gynecologic diseases [J]. Clin Biochem, 2011, 44(10/11): 884-888.  
 [12] Montagnana M, Danese E, Ruzzenente O, et al. The ROMA (risk of ovarian malignancy algorithm) for estimating the risk of epithelial ovarian Cancer in women presenting with pelvic mass: is it really useful? [J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(3): 521-525.

(收稿日期:2012-11-09)