

胃癌患者外周血 FOXP3 的检测及临床意义

申卫红,杨春香,朱 岚,黄 璇,潘宇红

(无锡市第三人民医院检验科,江苏 无锡 214041)

[摘要] 目的:通过研究胃癌患者外周血中 FOXP3 的表达,初步探讨其在胃癌发病机制中的临床意义。方法:选择胃癌患者与正常对照各 31 例,用流式细胞仪检测外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞的数量;ELISA 检测胃癌患者和正常对照外周血单个核细胞培养上清中 Th2 型细胞因子白细胞介素(interleukin,IL)-10 和 Th1 型细胞因子 IL-2 的表达;RT-PCR 检测 FOXP3 的 mRNA 表达。结果:胃癌患者外周血中 CD4⁺CD25⁺T 细胞约占 CD4⁺T 细胞(30.4 ± 1.9)%,显著高于正常人外周血中 CD4⁺CD25⁺T 细胞的比例(3.5 ± 0.8)%($P < 0.05$);胃癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞高表达 FOXP3;胃癌患者外周血单个核细胞培养上清主要分泌 IL-10,而 IL-2 分泌无显著变化。结论:FOXP3 表达的增加对肿瘤免疫具有抑制作用,可能参与胃癌的发生。

[关键词] FOXP3; 肿瘤; 胃癌

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] B

[文章编号] 1007-4368(2012)11-1559-03

胃癌在我国各种恶性肿瘤的发病中居首位,且发病率逐年上升,严重威胁着人民的健康和生命。它的发生、发展、浸润和转移与多种因素有关,近年来研究发现肿瘤免疫在其中发挥重要作用,给胃癌诊断和治疗带来了新的方向。研究显示,一些病毒感染能够诱导机体高表达一群 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)。Treg 是一类具有免疫抑制功能的细胞群,特征性表达转录因子 FOXP3 (forkhead transcription factor 3)^[1-2]。国外的许多研究表明,在一些肿瘤患者外周血中 FOXP3 的表达量明显高于正常人对照组^[3-5]。本研究的目的在于建立检测人 FOXP3 逆转录多聚酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)的方法,并用来测定胃癌患者组织中 FOXP3 基因的表达水平,探讨 FOXP3 基因表达水平与胃癌发生发展的关系,以期给胃癌免疫治疗提供一个新的方向。

1 对象与方法

1.1 对象

选取 2010 年 9 月~2011 年 10 月无锡市第三人民医院住院治疗的胃癌患者 31 例,均经病理学证实,其中男 17 例,女 14 例,平均年龄(60.3 ± 8.0)岁。健康体检者 31 名作对照组,男 17 例,女 14 例,平均年龄(60.5 ± 8.5)岁。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞仪检测外周血 T 细胞亚群

分别抽取胃癌患者和健康体检者静脉血 2 ml,

枸橼酸钠抗凝后取全血标本 100 μl,分别加入 PE 标记的 CD4、FITC 标记的 CD25 抗体(美国 BD 公司)各 10 μl,室温避光孵育 30 min。再加入红细胞裂解液(美国 BD 公司),振荡混匀。离心后弃上清液,用 PBS 洗涤后混匀,用流式细胞仪进行计数(FACS Calibur,美国 BD 公司)。以 Cellquest 软件分析数据,获得 CD4⁺CD25⁺T 细胞的百分数。

1.2.2 CD4⁺CD25⁺T 细胞的分离

将分离培养得到的患者或正常人的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)用 CD4⁺T 细胞免疫磁珠分离试剂盒(购自德国 Miltenyi Biotec 公司)进行分离,通过阴性选择获得 CD4⁺T 细胞,然后再用 CD25 免疫磁珠分离,通过阳性选择获得 CD4⁺CD25⁺T 细胞并同时获得 CD4⁺CD25⁻T 细胞。

1.2.3 RT-PCR 检测 FOXP3 mRNA 的表达

收集外周血细胞按照 RT-PCR 试剂盒(德国 QIAGEN 公司)操作方法提取 RNA。根据 GenBank (NM_014009)中 FOXP3 的序列设计引物为:上游:5'-GAACGCCATCCGCCACAACCTGA-3',下游:5'-CCCTGCCCCACCACCTCTGC-3'。PCR 循环条件:95℃ 5 min 预变性,然后 94℃ 30 s,69℃ 30 s,72℃ 1 min,共 30 次循环。

1.2.4 细胞因子检测

胃癌患者以及正常人 PBMC 培养上清中 IL-2 和 IL-10 的检测,采用 ELISA 试剂盒(购自美国 BD 公司)进行检测,检测严格按照试剂盒说明进行。

1.3 统计学方法

所得计量资料描述为均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 采用 SPSS16.0 统计分析软件对样本数据进行处理, 两组间的比较采用 *t* 检验, 若数据方差不齐, 则采用两样本比较秩和检验 (Wilcoxon 两样本比较法), $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌患者外周血中 T 细胞亚群的检测

通过流式细胞仪检测了 31 例胃癌患者和 31 例正常人外周血中 T 细胞亚群的数量, 结果表明: 胃癌患者外周血中 CD4⁺CD25⁺T 细胞约占 CD4⁺T 细胞的 (30.4 ± 1.9)%, 明显高于正常人外周血中 CD4⁺CD25⁺T 细胞的比例 (3.5 ± 0.8)% ($P < 0.05$)。

2.2 RT-PCR 检测外周血 FOXP3 mRNA 的表达

通过 RT-PCR 分别扩增胃癌患者和正常人外周血细胞中 FOXP3 (1 203 bp) 与内参 GAPDH (1 434 bp) 的 mRNA, 发现仅在胃癌患者外周血细胞中检测到 FOXP3 mRNA 表达, 而正常对照组外周血细胞和 CD4⁺CD25⁺T 细胞中均未见 FOXP3 mRNA 表达 (图 1)。

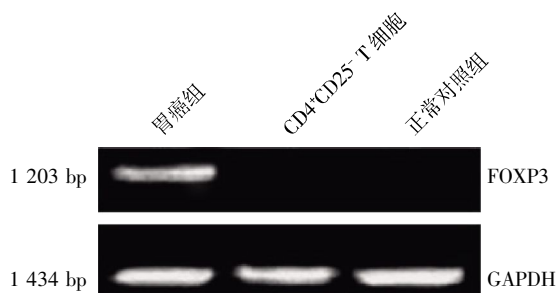


图 1 RT-PCR 检测胃癌患者外周血中 FOXP3 mRNA 的表达

2.3 ELISA 检测 PBMC 上清中细胞因子的表达

从表 1 可以看出, 胃癌患者 PBMC 上清中主要存在 IL-10, 和少量 IL-2。经统计学分析, IL-10 含量与正常对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 胃癌患者和正常人 PBMC 培养上清中的细胞因子 (pg/ml)

组别	例数	IL-2	IL-10
胃癌组	31	25.35 ± 18.20	100.43 ± 20.28*
正常对照组	31	20.52 ± 16.58	18.35 ± 15.18

与正常对照组比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

肿瘤的发生、发展意味着机体的免疫系统功能发生了显著改变。目前认为, CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞的

增加在抑制抗肿瘤反应、诱导肿瘤免疫耐受方面起了重要作用。不管是在肿瘤组织浸润的淋巴细胞、引流淋巴结还是在外周血, CD4⁺CD25⁺Treg 细胞明显增多^[6-8]。从本研究来看, 在胃癌患者中, 外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例明显升高, 反映了 Treg 细胞增加与肿瘤的发生、发展密切相关, 因而 FOXP3 在胃癌的发病机制中起着重要作用。

天然 Treg 细胞在胸腺内发育成熟后表达 FOXP3, 被赋予了免疫抑制功能, 能在缺乏抗原刺激的情况下, 以非分裂形式长时间存活, 并保持相对稳定的数量^[9]。增高的 Treg 细胞主要在肿瘤微环境中抑制抗肿瘤免疫。Treg 细胞发挥抑制作用的分子基础主要有以下几个方面: ①通过 CTLA-4 依赖的直接细胞接触抑制方式来抑制效应细胞的功能; ②分泌抑制性细胞因子如 IL-10 来抑制 CD4⁺ T 细胞的活化和增殖; ③Treg 细胞形成使效应细胞转变成免疫抑制细胞的微环境, 使一些 CD4⁺CD25⁺T 细胞能被 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞诱导并分泌 IL-10 等细胞因子^[10-11]。因而, Treg 细胞介导的免疫抑制干预了免疫应答的各个阶段。

本研究结果提示, 在胃癌患者体内出现一群具有免疫抑制功能的 CD4⁺CD25⁺T 细胞, RT-PCR 检测显示其高表达 FOXP3, 流式细胞仪表明其显著抑制 CD4⁺T 细胞的增殖, 抑制特异性 Th1 反应。肿瘤患者 Treg 细胞增加, 在抑制抗肿瘤免疫方面起到重要作用, 其后果是促进了肿瘤的发展, 削弱了抗肿瘤免疫治疗的效果。因此, 对 FOXP3 介导的免疫耐受进行干预是十分必要的。这为进一步研究 FOXP3 在胃癌中的免疫机制中奠定了基础。

[参考文献]

- [1] van Mierlo GJD, Scherer HU, Hameetman M, et al. Cutting edge: TNFR-s shedding by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells inhibits the induction of inflammatory mediators [J]. *J Immunol*, 2008, 180(5): 2747-2751
- [2] Zhang L, Zhao Y. The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T cells: multiple pathways on the road [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 211(3): 590-597
- [3] Chew A, Salama P, Robbshaw A, et al. SPARC, FOXP3, CD8 and CD45 correlation with disease recurrence and long-term disease-free survival in colorectal cancer [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22047
- [4] Kim HI, Kim H, Cho HW, et al. The ratio of intra-tumoral regulatory T cells (Foxp3⁺)/helper T cells (CD4⁺) is a prognostic factor and associated with recurrence pattern

(下转第 1569 页)

- angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril and the diuretic indapamide activate postnatal vasculogenesis in spontaneously hypertensive rats[J]. *J Pharmacol Exp Ther*,2008,325(3):766-773
- [10] Min LJ, Mogi M, Iwanami J, et al. Angiotensin II type 2 receptor deletion enhances vascular senescence by methyl methanesulfonate sensitive 2 inhibition[J]. *Hypertension*,2008,51(5):1339-1344
- [11] Li H, Liu Q, Wang N, et al. Correlation of different NADPH oxidase homologues with late endothelial progenitor cell senescence induced by angiotensin II :effect of telmisartan[J]. *Intern Med*,2011,50(16):1631-1642
- [12] Yung LM, Wong WT, Tian XY, et al. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats [J]. *PLoS One*, 2011,6(3):e17437
- [13] Sakuta T, Morita Y, Satoh M, et al. Involvement of the renin-angiotensin system in the development of vascular damage in a rat model of arthritis:effect of angiotensin receptor blockers [J]. *Arthritis Rheum*,2010,62(5):1319-1328
- [14] George J, Goldstein E, Abashidze S, et al. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation[J]. *Eur Heart J*, 2004,25(12):1003-1008
- [15] Shen L, Gao Y, Qian J, et al. A novel mechanism for endothelial progenitor cells homing: The SDF-1/CXCR4-Rac pathway may regulate endothelial progenitor cells homing through cellular polarization [J]. *Med Hypotheses*,2011,76(2):256-258
- [16] Ziegler M, Elvers M, Baumer Y, et al. The bispecific SDF1-GPVI fusion protein preserves myocardial function after transient ischemia in mice [J]. *Circulation*,2012,125(5):685-696
- [17] Shao H, Tan Y, Eton D, et al. Statin and stromal cell-derived factor-1 additively promote angiogenesis by enhancement of progenitor cells incorporation into new vessels[J]. *Stem Cells*,2008,26(5):1376-1384
- [18] Ripa RS, Wang Y, Goetze JP, et al. Circulating angiogenic cytokines and stem cells in patients with severe chronic ischemic heart disease--indicators of myocardial ischemic burden? [J]. *Int J Cardiol*,2007,120(2):181-187
- [19] Gil-Bernabe P, Boveda-Ruiz D, D'Alessandro-Gabazza C, et al. Atherosclerosis amelioration by moderate alcohol consumption is associated with increased circulating levels of stromal cell-derived factor-1 [J]. *Circ J*,2011,75(9):2269-2279

[收稿日期] 2012-07-17

(上接第 1560 页)

- in gastric cardia cancer[J]. *J Surg Oncol*,2011,104(7):728-733
- [5] Haas M, Dimmler A, Hohenberger W, et al. Stromal regulatory T-cells are associated with a favourable prognosis in gastric cancer of the cardia [J]. *BMC Gastroenterol*, 2009,4:9-65
- [6] Bacić D, Uravić M, Bacić R, et al. Augmentation of regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) correlates with tumor stage in patients with colorectal cancer[J]. *Coll Antropol*, 2011,35(2):65-68
- [7] Wang LH, Su L, Wang JT. Correlation between elevated FOXP3 expression and increased lymph node metastasis of gastric cancer[J]. *Chin Med J (Engl)*,2010,123(24):3545-3549
- [8] Wu MY, Kuo TY, Ho HN. Tumor-infiltrating lymphocytes contain a higher proportion of FOXP3 (+) T lymphocytes in cervical cancer[J]. *J Formos Med Assoc*,2011,110(9):580-586
- [9] Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, et al. Cutting edge: Direct suppression of B cells by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells [J]. *J Immunol*,2005,175(7):4180-4183
- [10] Walker LS, Chodos A, Eggena M, et al. Antigen-dependent proliferation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells *in vivo* [J]. *J Exp Med*,2003,198(2):249-258
- [11] 徐安琪, 杨晓帆, 王慧娟, 等. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺: 与 SLE 疾病相关的 Treg 标志[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2012,32(6):745-753

[收稿日期] 2012-02-13