

卵巢癌患者 CD8⁺ T 细胞中调节性 T 细胞相关分子标志物的表达率及临床意义

张淑平, 吴 梦, 柯 星, 娄鉴芳, 黄 蕾, 黄珮珺, 王 芳, 孙瑞红*

(南京医科大学第一附属医院检验学部, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:检测卵巢癌患者组织及外周血 CD8⁺ T 细胞中调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)相关分子标志物的表达率,探讨其在卵巢癌发生发展中的临床意义。方法:用流式细胞术检测 31 例卵巢癌患者、31 例卵巢良性肿瘤患者和 31 例健康对照者的外周血,以及 14 例卵巢癌组织和 12 例卵巢良性肿瘤组织 CD8⁺ T 细胞中 Foxp3、CD25、CD28、CTLA-4 及 GITR 的表达率。结果:Foxp3 和 CTLA-4 在卵巢癌组织 CD8⁺ T 细胞中的表达率显著高于卵巢良性肿瘤组织($P < 0.05$);CD28 在卵巢癌组织 CD8⁺ T 细胞中的表达率显著低于卵巢良性肿瘤组织($P < 0.05$)。卵巢癌患者外周血 CD8⁺ T 细胞中 Foxp3、CD25、CTLA-4 的表达率显著高于卵巢良性肿瘤患者和健康对照者($P < 0.05$),CD28 的表达率显著低于卵巢良性肿瘤患者和健康对照者($P < 0.05$)。结论:卵巢癌组织及外周血 CD8⁺ Treg 所占的比例显著高于卵巢良性肿瘤组及健康对照组,且 CD8⁺ T 细胞中 Foxp3 的表达率可能了解卵巢癌进展状况有一定帮助。

[关键词] 卵巢癌;调节性 T 细胞;Foxp3;CD25;CD28;CTLA-4;GITR

[中图分类号] R737.31

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)04-483-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20160422

A study on expression and clinical significance of Treg markers in CD8⁺ T cells in ovarian cancer patients

Zhang Shuping, Wu Meng, Ke Xing, Lou Jianfang, Huang Lei, Huang Peijun, Wang Fang, Sun Ruihong*

(Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and clinical significance of Treg markers in CD8⁺ T cells from peripheral blood and tumor tissues of ovarian cancer patients. **Methods:** Flow cytometry was used to detect the percentage of Foxp3, CD25, CD28, CTLA-4 and GITR in CD8⁺ T cells in tissues from 12 benign ovarian tumor patients, 14 ovarian cancer patients, in peripheral blood from 31 patients with ovarian cancer, 31 patients with benign ovarian tumor and 31 healthy volunteers. **Results:** Flow cytometry revealed that the expressions of Foxp3 and CTLA-4 in CD8⁺ T cells of ovarian cancer tissues were higher than those of benign ovarian tumor tissues ($P < 0.05$); The expression of CD28 in CD8⁺ T cells of ovarian cancer tissues was significantly lower than that of benign ovarian tumor tissues ($P < 0.01$); The expressions of Foxp3, CD25 and CTLA-4 gated on CD8⁺ T cells in peripheral blood of ovarian cancer patients were significantly higher than those of patients with benign ovarian tumor and healthy control subjects ($P < 0.05$), the expression of CD28 gated on CD8⁺ T cells in peripheral blood of ovarian cancer patients was significantly lower than that of patients with benign ovarian tumor and healthy control subjects ($P < 0.05$). **Conclusion:** Frequency of CD8⁺ Treg in ovarian cancer patients was higher than benign ovarian tumor patients and healthy controls. The expression of Foxp3 in CD8⁺ T cells in peripheral blood of ovarian cancer patients correlated with tumor stage, suggesting Foxp3 could be used as an important indicator of ovarian cancer progression.

[Key words] ovarian cancer; regulatory T cells; Foxp3; CD25; CD28; CTLA-4; GITR

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(04): 483-486]

[基金项目] 江苏省实验诊断学重点实验室基金资助(XK201114)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: sungirl515@163.com

卵巢癌的致死率占各类妇科肿瘤的首位,5 年生存率仅 25%~30%,严重威胁着女性的生命健康,分析卵巢癌患者的免疫状态对于阐明卵巢癌的发生、发展机制具有重要作用^[1]。调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)是具有免疫抑制功能的成熟 T 细胞亚群,在机体的肿瘤免疫中发挥重要作用。目前对 Treg 的研究主要集中在 CD4⁺ Treg,而对于 CD8⁺ Treg 的研究远远落后于 CD4⁺ Treg。愈来愈多的研究表明,CD8⁺ Treg 在肿瘤、移植物耐受、自身免疫性疾病中具有重要的免疫调节作用^[2-4]。前列腺癌和结直肠癌等患者体内 CD8⁺ Treg 的数量明显上升,并与肿瘤的分期和预后相关^[5-6]。

本研究对卵巢癌患者外周血和组织 CD8⁺ T 细胞中 Treg 相关分子标志物 Foxp3、CD25、CD28、CTLA-4 及 GITR 的表达率进行检测,并分析其与卵巢癌患者临床病理参数的关系,以期探讨 CD8⁺ Treg 在卵巢癌发生、发展中的临床意义。

1 对象和方法

1.1 对象

外周血样本取自南京医科大学第一附属医院 2014 年 1—6 月就诊的 31 例卵巢癌患者(ovarian cancer, OC),年龄 27~72 岁,中位年龄 51 岁。其中,浆液性腺癌 20 例,黏液性腺癌 5 例,子宫内膜样腺癌 6 例。根据 2009 年国际妇产科联盟(FIGO)分期,Ⅰ期 3 例、Ⅱ期 4 例、Ⅲ期 23 例、Ⅳ期 1 例。31 例卵巢良性肿瘤患者(ovarian benign tumor, OBT),年龄 25~69 岁,中位年龄 47 岁,其中浆液性囊腺瘤 9 例,黏液性囊腺瘤 12 例,巧克力囊肿 3 例,畸胎瘤 7 例。同期的健康体检者(healthy controls, HC)31 例,年龄 27~70 岁,中位年龄 48 岁。卵巢癌组织及卵巢良性肿瘤组织均取自南京军区总院妇产科,14 例卵巢癌组织包括 7 例浆液性腺癌,3 例黏液性腺癌,4 例子宫内膜样腺癌。12 例卵巢良性肿瘤组织包括 6 例黏液性囊腺瘤,1 例浆液性囊腺瘤,3 例巧克力囊肿及 2 例畸胎瘤。所有患者未曾接受过其他外科手术、化疗及免疫抑制剂治疗。患者对实验知情同意,并获得医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 单细胞悬液制备

用淋巴细胞分离液(Ficoll 液,天津灏洋生物公司)分离新鲜外周血单个核细胞(PBMC),PBS 重悬细胞浓度至 1×10^6 个/mL。将新鲜切取的卵巢癌组织和卵巢良性肿瘤组织用无菌外科剪刀剪碎至 1 mm^3 左

右,然后加入含有Ⅳ型胶原酶、DNA 酶 I、透明质酸酶及谷氨酰胺(Sigma 公司,美国)的消化液,37℃孵箱中摇床消化 2 h,200 目筛网过滤,分离单个细胞,Fi-coll 液分离出淋巴单核细胞,PBS 重悬细胞浓度至 1×10^6 个/mL。

1.2.2 抗体染色和流式检测

细胞膜表面抗体检测:上述细胞悬液以 100 μL 为单位加入 anti-CD8-FITC、anti-CD25-APC、anti-CD28-APC、anti-GITR-PE 抗体,室温下避光孵育 20 min,PBS 洗 2 次,弃上清,加 300 μL PBS,上机检测。细胞内抗体检测:上述细胞悬液以 100 μL 为单位加入 anti-CD8-FITC 抗体,室温避光孵育 20 min,破膜缓冲液(含 FBS)洗涤 2 次,加入细胞固定液,室温避光固定 10 min,洗涤后加入破膜剂,室温孵育 30 min,洗涤后加入 anti-Foxp3-PE、anti-CTLA-4-APC 抗体,4℃避光孵育 30 min,洗涤后加入 300 μL PBS 重悬,Beckman Gallios 流式细胞仪检测。anti-CD8-FITC、anti-CD28-APC、anti-CD25-APC、anti-Foxp3-PE、anti-CTLA-4-APC、固定破膜剂以及破膜缓冲液均(BD 公司,美国),anti-GITR-PE(e-Bioscience 公司,美国)。

1.3 统计学方法

用 SPSS20.0 统计学软件进行数据处理,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3 组数据的比较先采用非参数 Kruskal-Wallis 检验,判断各组间差异的显著性,再采用 Mann-Whitney *U* 检验进一步做两两比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢癌组织 CD8⁺ T 细胞中 Foxp3、CD25、CD28、CTLA-4 及 GITR 的表达率

流式细胞检测结果显示,卵巢癌组织 CD8⁺ T 细胞中 CTLA-4、Foxp3 的表达率显著高于卵巢良性肿瘤组织($P < 0.05$);卵巢癌组织 CD8⁺ T 细胞中 CD28 的表达率显著低于卵巢良性肿瘤组织($P < 0.05$);CD8⁺ T 细胞中 CD25 和 GITR 的表达率在卵巢癌组织和卵巢良性肿瘤组织间差异无统计学意义(表 1)。

2.2 卵巢癌患者外周血 CD8⁺ T 细胞中 Foxp3、CD25、CD28、CTLA-4 及 GITR 的表达率

流式细胞检测结果显示,与健康体检者和卵巢良性肿瘤患者对比,卵巢癌患者外周血 CD8⁺ T 细胞中 Foxp3、CD25 及 CTLA-4 的表达率显著增高,差异均有统计学意义($P < 0.01$);CD28 的表达率显著降

低, 差异有统计学意义($P < 0.01$); GITR 的表达率无统计学差异(表 2)。

表 1 卵巢癌组织及卵巢良性肿瘤组织 CD8⁺T 细胞中 Foxp3、CD25、CD28、CTLA-4 及 GITR 的表达率

Table 1 Expressions of Foxp3, CD25, CD28, CTLA-4 and GITR in CD8⁺T cells in ovarian cancer tissues and ovarian benign tumor tissues

Treg 分子标志物	OBT 组(n=12)	OC 组(n=14)	P 值
Foxp3	1.72 ± 1.11	6.75 ± 6.89	0.004
CD25	2.11 ± 1.22	2.76 ± 2.25	>0.05
CD28	69.31 ± 11.73	50.82 ± 18.28	0.009
CTLA-4	3.27 ± 1.72	6.27 ± 5.25	0.046
GITR	2.22 ± 1.42	2.63 ± 1.87	>0.05

表 2 卵巢癌患者、卵巢良性肿瘤患者及健康体检者外周血 CD8⁺T 细胞中 Foxp3、CD25、CD28、CTLA-4 及 GITR 的表达率

Table 2 Expressions of Foxp3, CD25, CD28, CTLA-4 and GITR in CD8⁺T cells in peripheral blood of ovarian cancer patients, benign ovarian tumor patients, and healthy controls (%)

Treg 分子标志物	HC 组(n=31)	OBT 组(n=31)	OC 组(n=31)
Foxp3	0.94 ± 0.62	0.80 ± 0.79	4.09 ± 3.65* [△]
CD25	1.04 ± 0.77	0.96 ± 0.55	2.30 ± 2.12* [△]
CD28	67.72 ± 12.26	64.22 ± 16.91	48.40 ± 16.58* [△]
CTLA-4	0.77 ± 0.62	0.82 ± 0.87	3.64 ± 3.09* [△]
GITR	1.05 ± 0.84	1.05 ± 0.72	1.47 ± 1.02

与 HC 组比较, * $P < 0.01$; 与 OBT 组比较, [△] $P < 0.01$ 。

表 3 卵巢癌患者外周血 CD8⁺T 细胞中 Foxp3、CD25、CD28、CTLA-4 的表达率与临床病理参数的关系

Table 3 Relationship between the expressions of Foxp3, CD25, CD28, and CTLA-4 in CD8⁺T cells from peripheral blood of ovarian cancer patients and clinicopathological parameters

临床病理参数	n	Foxp3	P 值	CD25	P 值	CD28	P 值	CTLA-4	P 值
年龄(岁)			0.795		0.904		0.660		0.631
<55	18	4.52 ± 4.38		2.11 ± 1.61		47.11 ± 16.17		3.14 ± 1.66	
>55	13	3.49 ± 2.34		2.58 ± 2.73		50.19 ± 17.63		4.34 ± 4.36	
TNM 分期			0.033		0.369		0.479		0.508
I/II	7	1.92 ± 0.93		3.19 ± 3.46		43.53 ± 14.60		18.39 ± 4.84	
III/IV	24	4.73 ± 3.91		2.05 ± 1.56		49.82 ± 17.14		7.47 ± 3.30	
淋巴结转移			0.044		0.572		0.931		0.965
无	9	2.47 ± 1.53		2.00 ± 1.05		47.56 ± 16.00		3.28 ± 1.25	
有	22	5.15 ± 4.07		2.43 ± 2.44		48.75 ± 17.17		3.79 ± 3.60	
病理学分级			0.514		0.843		0.155		0.664
I/I~II/II	16	3.70 ± 3.47		2.48 ± 2.66		44.57 ± 16.46		4.24 ± 4.10	
II~III/III	15	4.51 ± 3.91		2.12 ± 1.40		52.49 ± 16.25		3.01 ± 1.25	
组织学分型			0.234		0.320		0.042		0.791
浆液性腺癌	20	5.00 ± 4.20		2.25 ± 2.35		35.01 ± 9.08		3.90 ± 3.60	
黏液性腺癌	5	2.43 ± 1.66		2.64 ± 1.10		50.56 ± 15.85		2.89 ± 1.42	
子宫内膜样腺癌	6	2.45 ± 1.21		2.20 ± 2.19		44.38 ± 17.32		3.44 ± 2.33	

2.3 卵巢癌患者外周血 CD8⁺T 细胞中 Foxp3、CD25、CD28 及 CTLA-4 的表达率与卵巢癌临床病理参数的关系

III/IV 期、有淋巴结转移卵巢癌患者外周血 CD8⁺T 细胞中 Foxp3 的表达率高于 I/II 期、无淋巴结转移卵巢癌患者(均 $P < 0.05$); 浆液性卵巢癌患者外周血 CD8⁺T 细胞中 CD28 的表达率低于黏液性、子宫内膜样卵巢癌患者($P < 0.05$, 表 3)。

3 讨论

Treg 通过多种机制抑制免疫效应细胞的功能, 是肿瘤免疫逃逸的关键因素。Treg 主要包括 CD4⁺Treg、CD8⁺Treg、NKT(natural killer T) Treg 和双阴性(double negative, DN)Treg 等 4 大类^[7]。研究显示, 前列腺癌、结直肠癌等多种肿瘤微环境中 CD8⁺Treg 细胞数量升高, 且这些升高的 CD8⁺Treg 可通过抑制效应性 CD4⁺或 CD8⁺T 细胞抑制机体的抗肿瘤免疫^[5]。活化后的 CD8⁺Treg 分子标志物大部分与 CD4⁺Treg 相同, 到目前为止, 多种类型的 CD8⁺Treg 被发现和报道, 主要包括 CD8⁺CD28⁺Treg、CD8⁺CD25⁺Treg、CD8⁺CD122⁺Treg 及 CD8⁺Foxp3⁺Treg 等, 这些细胞通过不同的作用机制发挥免疫抑制功能, 但目前还没有一种分子标志物是 CD8⁺Treg 所特有的^[8]。

Foxp3 被证明是 Treg 较为特异的标志物之一, 是 Treg 发育和成熟的调控因子, 也是其发挥抑制功能

的重要分子^[9]。Treg 表面组成性表达 CD25 白介素-2 受体(IL-2R),与效应细胞竞争结合白介素-2(IL-2),从而抑制效应细胞的增殖,促进肿瘤的进展^[10];共刺激分子 CD28 是一分子量为 44 kDa 的二聚体糖蛋白,主要表达于淋巴细胞表面,其配体 B7 存在于 APC 细胞表面,根据 CD28 的表达与否,可将 CD8⁺T 细胞分为细胞毒性 T 细胞(CD8⁺CD28⁺,CTL)和抑制性 T 细胞(CD8⁺CD28⁻,TS),CD8⁺CD28⁻Treg 可抑制抗体产生及同种异体抗原所诱导的细胞增殖效应,对免疫应答起负向调节作用^[11];CTLA-4 属 B7 分子家族,组成性表达于 Treg,可抑制 T 细胞的激活从而维持机体免疫耐受^[12];抗 GITR 抗体可阻断 Treg 的免疫抑制功能,导致自身免疫性疾病的发生^[13]。

前期免疫组化研究证明,卵巢癌组织中 CD8⁺T 细胞和 Foxp3⁺ 细胞显著增多,且二者的增多呈正相关,提示卵巢癌患者体内可能存在增多的 CD8⁺Treg^[14]。在此基础上,本研究进一步对卵巢癌患者 CD8⁺T 细胞中 Treg 相关分子标志物的表达率及其临床意义进行研究。研究结果显示,与卵巢良性肿瘤组织相比,卵巢癌组织 CD8⁺T 细胞中 Foxp3、CTLA-4 的表达率增高,CD28 的表达率降低。这表明卵巢癌组织中存在较多的 CD8⁺Treg,这些 CD8⁺Treg 可能在卵巢癌免疫微环境中发挥免疫抑制功能,抑制机体抗肿瘤免疫应答,促进卵巢癌细胞的增殖和转移。在此基础上,又分析了卵巢癌患者外周血中的 CD8⁺T 细胞中 Treg 相关分子标志物的表达率,结果显示,与健康体检者和卵巢良性疾病患者相比,卵巢癌患者外周血 CD8⁺T 细胞中 CD25、Foxp3 及 CTLA-4 的表达率增高,CD28 的表达率降低,并且 III/IV 期患者外周血 CD8⁺T 细胞中 Foxp3 的表达率高于 I/II 期患者,表明卵巢癌患者外周血 CD8⁺T 细胞中 Foxp3 的表达率与卵巢癌的临床分期密切相关,其可能参与了卵巢癌的发生、发展。

总之,CD8⁺Treg 对于卵巢癌的发生和发展具有重要意义,对其进行研究将有助于深入探索卵巢癌的免疫逃逸机制,为卵巢癌的免疫生物治疗提供依据。

[参考文献]

- [1] Luvero D, Milani A, Ledermann JA. Treatment options in recurrent ovarian cancer: latest evidence and clinical potential[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2014, 6(5): 229-239
- [2] Guillonnet C, Picarda E, Anegon I. CD8⁺ regulatory T cells in solid organ transplantation[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2010, 15(6): 751-756
- [3] Sobhani I, Le Gouvello S. Critical role for CD8⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in colon cancer immune response in humans[J]. *Gut*, 2009, 58(6): 743-744
- [4] Kouchaki E, Salehi M, Reza Sharif M, et al. Numerical status of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ and CD8⁺CD28⁻ regulatory T cells in multiple sclerosis[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2014, 17(4): 250-255
- [5] Chaput N, Louafi S, Bardier A, et al. Identification of CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ suppressive T cells in colorectal cancer tissue[J]. *Gut*, 2009, 58(4): 520-529
- [6] Kuniwa Y, Miyahara Y, Wang HY, et al. CD8⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(23): 6947-6958
- [7] 张利宁. 调节性 T 细胞与肿瘤[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(3): 201-205
- [8] Wang RF. CD8⁺ regulatory T cells, their suppressive mechanisms, and regulation in cancer[J]. *Hum Immunol*, 2008, 69(11): 811-814
- [9] Dhamne C, Chung Y, Alousi AM, et al. Peripheral and thymic foxp3⁺ regulatory T cells in search of origin, distinction, and function[J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 253
- [10] McNeill A, Spittle E, Bäckström BT. Partial depletion of CD69 low-expressing natural regulatory T cells with the anti-CD25 monoclonal antibody PC61[J]. *Scand J Immunol*, 2007, 65(1): 63-69
- [11] Wang B, Jiao Z, Shao X, et al. Phenotypic alterations of dendritic cells are involved in suppressive activity of trichostatin-induced CD8⁺CD28⁻ regulatory T cells [J]. *J Immunol*, 2010, 185(1): 79-88
- [12] Selby MJ, Engelhardt JJ, Quigley M, et al. Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells[J]. *Cancer Immunol Res*, 2013, 1(1): 32-42
- [13] Coe D, Begom S, Addey C, et al. Depletion of regulatory T cells by anti-GITR mAb as a novel mechanism for cancer immunotherapy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59(9): 1367-1377
- [14] 张淑平, 柯星, 黄蕾, 等. CD4⁺T, CD8⁺T, Foxp3⁺T 细胞在卵巢癌组织中的分布及临床意义[J]. *现代免疫学*, 34(6): 452-458

[收稿日期] 2015-08-06