

卵巢癌患者外周血 CD4⁺ 调节 T 细胞与 TGF-β1 水平的相关性研究

王武琴¹, 吴梦², 陈献², 娄鉴芳², 黄珮珺², 黄蕾², 孙瑞红², 王芳^{2*}

(¹南京市江宁区中医院检验科, 江苏 南京 211100; ²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: 探讨卵巢癌患者外周血中 CD4⁺CD25⁺及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞的水平及其与转化生长因子 β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1) 水平的相关性。方法: 采用流式细胞术对 24 例上皮性卵巢癌患者外周血中 CD4⁺CD25⁺及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞水平进行检测, 收集每例患者对应的血浆, ELISA 法检测卵巢癌患者血浆中 TGF-β1 浓度, 并选 20 例卵巢良性病变及 20 例健康体检者做对比研究。结果: 与卵巢良性病变及健康对照组相比, 卵巢癌患者 CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞及 TGF-β1 的表达水平明显增高(均 $P < 0.01$); III~IV 期卵巢癌患者 CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞及 TGF-β1 的表达水平明显高于 I~II 期患者($P < 0.05$); Pearson 相关性分析结果显示, 卵巢癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞水平与血浆 TGF-β1 水平均呈正相关($r = 0.656, P < 0.05$; $r = 0.574, P < 0.05$)。结论: 卵巢癌患者外周血存在高水平 CD4⁺调节 T 细胞, 且其与血浆 TGF-β1 水平呈正相关。检测外周血 CD4⁺调节 T 细胞与 TGF-β1 水平对于判断卵巢癌不同病期有重要意义。TGF-β1 水平增高可能参与调节 CD4⁺调节 T 细胞对卵巢癌机体的免疫负调节机制。

[关键词] 卵巢癌; CD4⁺调节 T 细胞; TGF-β1

[中图分类号] R737.31

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)01-0069-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20170114

Correlation between CD4⁺ regulatory T cells and TGF-β1 in peripheral blood of patients with epithelial ovarian cancer

Wang Wuqin¹, Wu Meng², Chen Xian², Lou Jianfang², Huang Peijun², Huang Lei², Sun Ruihong², Wang Fang^{2*}
(¹Department of Laboratory Medicine, the Chinese Medicine Hospital of Jiangning District in Nanjing, Nanjing 211100; ²Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the correlation between CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg) and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) in peripheral blood of patients with epithelial ovarian cancer. **Methods:** The percentages of CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg in peripheral blood from 24 patients with ovarian cancer were detected by flow cytometry. Plasma level of TGF-β1 in each patient was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and compared with that in 20 patients with benign ovarian tumor and 20 healthy volunteers. **Results:** The percentages of CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells and TGF-β1 in ovarian cancer patients were significantly higher than those in 20 patients with benign ovarian tumor and 20 healthy volunteers (both $P < 0.01$). Levels of CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells and TGF-β1 in ovarian cancer patients at stage III~IV were significantly higher than those of patients at stage I~II ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that the percentages of CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells were positively correlated with the levels of TGF-β1. **Conclusion:** The percentages of CD4⁺ Treg cells in peripheral blood from ovarian cancer were higher and positively correlated with TGF-β1 levels. Detection of CD4⁺ Treg cells and TGF-β1 has the clinical value on evaluation of development and prognosis of different stages of ovarian cancer. The increased levels of TGF-β1 may be involved in the immune negative adjustment mechanism of CD4⁺ Treg cells.

[Key words] ovarian cancer; CD4⁺ regulatory T cells; TGF-β1

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(01):0069-0072]

[基金项目] 国家自然科学基金(81272324, 81371894); 江苏省实验诊断学重点实验室基金(XK201114)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: shywf74@sina.com

卵巢癌(ovarian cancer, OC)病死率位于妇科恶性肿瘤之首,严重威胁女性的生命健康。卵巢癌机体通常存在不同程度的免疫抑制状态,寻找抑制卵巢癌患者的免疫应答因素对肿瘤的免疫治疗具有重要意义^[1]。调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)是一群能发挥免疫抑制作用的 T 细胞亚群。CD4⁺CD25⁺ Treg 是 Treg 中的一类重要细胞群体,具有抑制抗肿瘤免疫应答的作用,并且与肿瘤免疫逃逸过程密切相关^[2]。Foxp3 是 Treg 最特异的标志物,Ke 等^[3]研究发现非小细胞肺癌患者高表达 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg,患者机体呈现免疫抑制状态。转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)是一种免疫调节因子,研究显示,TGF- β 1 在多种恶性肿瘤中表达显著增高^[4-6]。

本研究通过检测卵巢癌患者外周血中 CD4⁺Treg 细胞与 TGF- β 1 的表达水平,分析二者的相关关系,探讨 CD4⁺Treg 比例及 TGF- β 1 水平在卵巢癌发生发展中的作用,为卵巢癌的免疫治疗提供新思路。

1 对象和方法

1.1 对象

来自南京医科大学第一附属医院 2014 年 11 月—2015 年 5 月就诊的 24 例卵巢癌患者,年龄 24~78 岁,平均 51 岁。病理类型:浆液性腺癌 17 例,黏液性腺癌 4 例,低分化癌 3 例;分期: I 期和 II 期 4 例, III 期和 IV 期 20 例。20 例卵巢良性疾病患者,年龄 25~69 岁,平均 47 岁,其中巧克力囊肿 9 例,畸胎瘤 8 例,浆液性囊腺瘤 3 例。同期健康体检者 20 例,年龄匹配。均排除其他免疫疾病。所有患者均未曾接受过其他外科手术、化疗及免疫抑制剂治疗。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集和处理

搜集 EDTA-K₂ 抗凝血 2 mL,应用淋巴细胞分离液(天津灏洋生物公司)密度梯度离心法使细胞分层,吸取 200 μ L 上层血浆-70℃储存以备 ELISA 检测使用;吸取白膜层即外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),PBS 洗涤 2 次。

1.2.2 流式细胞术检测卵巢癌患者 CD4⁺Treg 细胞的表达

计数 PBMC,取 1×10^6 个细胞进行流式标记。加入抗 CD4-PE、抗 CD25-APC 抗体(BD 公司,美国)进行细胞膜表面标记,室温下避光孵育 20 min, PBS 洗 2 次后弃上清,加入 Foxp3 破膜剂,固定破膜剂以及破膜缓冲液(BD 公司,美国)。4℃避光孵育 30 min,固定液洗涤细胞 2 次,弃上清,加入抗 Foxp3-FITC 抗体(e-Bioscience 公司,美国)进行胞内标记,4℃避光孵育 30 min,固定液洗涤细胞 2 次,弃上清,加入 200 μ L PBS 重悬,Beckman Gallios 流式细胞仪检测。以 FSC、SSC 定义淋巴细胞,分析 CD4⁺CD25⁺及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 的表达水平。

1.2.3 ELISA 法检测卵巢癌患者血浆中 TGF- β 1 水平

按 TGF- β 1 ELISA 试剂盒(Human TGF- β 1 Platinum ELISA Kit, eBioscience 公司,美国)说明书绘制出标准曲线。实验在同一块 96 孔板上进行,在同一条件下测得每个标本吸光值,各组血浆 TGF- β 1 依标准曲线计算出,计算浓度时需乘以稀释倍数。

1.3 统计学方法

用 SPSS17.0 统计学软件进行数据处理,各组数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢癌患者外周血 CD4⁺Treg 及血浆 TGF- β 1 的表达水平

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 CD4⁺CD25⁺及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 的细胞比例显著增高,差异均有统计学意义,卵巢良性疾病患者外周血 CD4⁺CD25⁺及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 的细胞比例与健康对照组相比无显著差异。卵巢癌患者血浆 TGF- β 1 浓度显著高于健康对照组和卵巢良性疾病患者($P < 0.01$),卵巢良性疾病患者血浆 TGF- β 1 浓度与健康对照组比较无显著改变(表 1)。

表 1 各组 CD4⁺ Treg 及血浆 TGF- β 1 的表达水平比较

Table 1 Expressions of CD4⁺ regulatory T cells and TGF- β 1 in each group

| 组别 | 例数 | CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg(%) | CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg(%) | TGF- β 1(pg/mL) |
|---------|----|--|---|-----------------------|
| 卵巢癌组 | 24 | 25.81 \pm 8.83 | 4.19 \pm 2.23 | 586.16 \pm 202.94 |
| 卵巢良性肿瘤组 | 20 | 9.33 \pm 4.32* | 1.66 \pm 0.65* | 359.46 \pm 84.56* |
| 健康对照组 | 20 | 8.40 \pm 4.14* | 1.24 \pm 0.45* | 307.91 \pm 190.58* |

与卵巢癌组比较,* $P < 0.01$ 。

2.2 卵巢癌患者外周血 CD4⁺Treg 及血浆 TGF-β1 的表达水平与肿瘤分期的关系

Ⅲ~Ⅳ期卵巢癌患者 CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例及 TGF-β1 的表达水平明显高于 I~II 期患者($P<0.05$, 表 2)。

2.3 卵巢癌患者外周血 CD4⁺Treg 表达与血浆 TGF-β1 水平相关性分析

Pearson 相关性分析结果显示, 上皮性卵巢癌患

者外周血 CD4⁺CD25⁺及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例与血浆 TGF-β1 水平均呈现正相关关系($r=0.656, P<0.05; r=0.574, P<0.05$; 图 1)。

3 讨 论

Treg 可通过抑制自身抗原反应性的 T 细胞来介导外周耐受^[7]。多项研究表明 CD4⁺Treg 在多种肿瘤如结直肠癌、食管癌、胃癌、肝癌、肺癌和乳腺癌

表 2 卵巢癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 及 TGF-β1 的表达水平与肿瘤分期的关系

Table 2 Correlations of CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg and TGF-β1 expression and tumor stage of ovarian cancer

| 组别 | 例数 | CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg(%) | CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg(%) | TGF-β1(pg/mL) |
|------|----|--|---|----------------|
| I~II | 4 | 15.56±3.28 | 6.17±2.42 | 481.40±44.27 |
| Ⅲ~Ⅳ | 20 | 27.56±8.28* | 13.43±6.05* | 728.21±197.44* |

与 I~II 期组比较, * $P<0.05$ 。

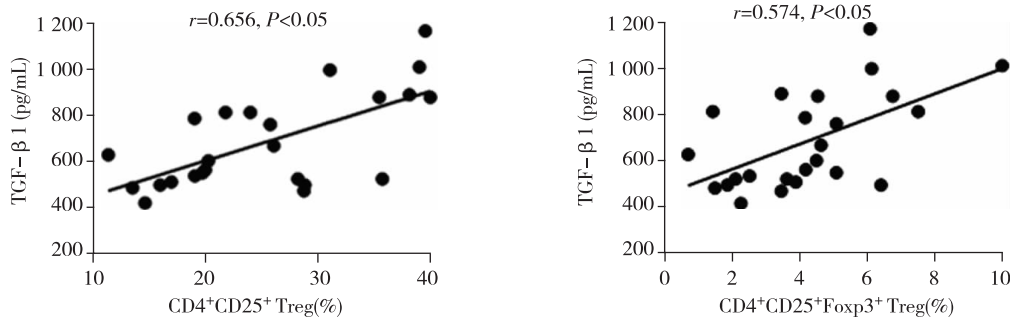


图 1 卵巢癌患者 CD4⁺Treg 比例与 TGF-β1 浓度相关性分析

Figure 1 Correlation analysis between CD4⁺Treg and TGF-β1 in peripheral blood of patients with epithelial ovarian cancer

等患者的外周血中有较高水平^[8-10]。Treg 可抑制宿主效应性细胞的抗肿瘤免疫功能, 使肿瘤发生免疫逃逸^[11-12]。TGF-β1 在恶性肿瘤的发展过程中起着双向调节作用。在肿瘤发生早期, TGF-β1 抑制肿瘤细胞生长。但随着肿瘤的进展, TGF-β1 转变为肿瘤生长刺激因子, 促进肿瘤的生长、浸润和转移^[13]。此外, TGF-β1 也是一种免疫调节因子。Niki 等^[14]发现胃癌患者血清 TGF-β1 表达水平与 CD3、CD4 阳性淋巴细胞比例呈负相关关系, 说明 TGF-β1 与肿瘤患者机体全身免疫抑制状态有关。肿瘤组织及外周血中的 TGF-β1 对 Treg 细胞的募集、扩增和诱导有重要作用。研究发现, 肿瘤微环境中较高水平的 TGF-β1 可刺激正常的 T 细胞转化为 Treg 细胞^[15]。

本研究结果显示, 卵巢癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 及 TGF-β1 的表达水平显著高于健康体检者和卵巢良性疾病患者, 表明卵巢癌患者机体处于免疫抑制状态, 上调的 CD4⁺Treg 及 TGF-β1 可能抑制效应 T 细胞活性进而促进

肿瘤免疫逃逸。进一步对 CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 及 TGF-β1 的表达水平与卵巢癌肿瘤分期进行分析。结果显示 Ⅲ~Ⅳ期卵巢癌患者 CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 及 TGF-β1 的表达水平明显高于 I~II 期患者, 说明 CD4⁺Treg 及 TGF-β1 水平显著增高发生在晚期卵巢癌患者, 提示机体免疫抑制状态与卵巢癌的病程进展有一定关系。外周血 CD4⁺Treg 比例与血浆 TGF-β1 浓度的相互性分析显示, 卵巢癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 水平与血浆 TGF-β1 水平均呈正相关, 表明血浆 TGF-β1 与 CD4⁺Treg 发挥协同作用, 起到免疫耐受作用, 与卵巢癌发生发展有一定关系; TGF-β1 可能参与卵巢癌微环境中 CD4⁺Treg 的募集及诱导过程。

综上所述, 血浆 TGF-β1 与 CD4⁺Treg 发挥协同作用促进卵巢癌进展, 检测外周血 CD4⁺Treg 与 TGF-β1 水平对于判断卵巢癌病期有重要意义。但是卵巢癌微环境中 CD4⁺Treg 与 TGF-β1 相互作用机制, 还有待进一步深入探讨。

[参考文献]

- [1] Zhang SP, Ke X, Zeng SY, et al. Analysis of CD8 (+) Treg cells in patients with ovarian cancer: a possible mechanism for immune impairment [J]. *Cell Mol Immunol*, 2015, 12(5):580-591
- [2] Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer [J]. *Blood*, 2006, 108(3):804-811
- [3] Ke X, Zhang S, Xu J, et al. Non-small-cell lung cancer-induced immuno-suppression by increased human regulatory T cells via Foxp3 promoter demethylation [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2016, 65(5):587-599
- [4] Yu JL, Li JH, Cheng RG, et al. Effect of matrine on transforming growth factor beta 1 and hepatocyte growth factor in rat liver fibrosis model [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 7(5):390-393
- [5] Janda K, Krzanowski M, Dumnicka PA, et al. Transforming growth factor beta 1 as a risk factor for cardiovascular diseases in End-stage renal disease patients treated with peritoneal dialysis [J]. *Clin Lab*, 2014, 60(7):1163-1168
- [6] Ma GF, Miao Q, Zeng XQ, et al. Transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 in gastric precancer and cancer and roles in tumor-cell interactions with peripheral blood mononuclear cells *in vitro* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e54249
- [7] Von Herrath MG, Harrison LC. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(3):223-232
- [8] Prado-Garcia H, Romero-Garcia S, Rumbo-Nava U, et al. Predominance of Th17 over regulatory T-cells in pleural effusions of patients with lung cancer implicates a proinflammatory profile [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(3):1529-1535
- [9] Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(6):2457-2464
- [10] Izawa S, Mimura K, Watanabe MA, et al. Increased prevalence of tumor-infiltrating regulatory T cells is closely related to their lower sensitivity to H₂O₂-induced apoptosis in gastric and esophageal cancer [J]. *Cancer Immuno Immunother*, 2013, 62(1):161-170
- [11] Ozgur HH, Ercetin AP, Eliyatkin NA, et al. Regulatory T cells and their prognostic value in hepatopancreatobiliary tumours [J]. *Hepatogastroenterology*, 2014, 61(135):1847-1851
- [12] Zhuo C, Xu Y, Ying M, et al. FOXP3⁺regs: heterogeneous phenotypes and conflicting impacts on survival outcomes in patients with colorectal cancer [J]. *Immunol Res*, 2015, 61(3):338-347
- [13] Bollard CM, Rossig C, Calonge MJ, et al. Adapting a transforming growth factor beta-related tumor protection strategy to enhance antitumor immunity [J]. *Blood*, 2002, 99(9):3179-3187
- [14] Niki M, Okajima K, Isozaki H, et al. Measurement of the plasma transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) level in patients of gastric carcinoma-compared with the serum IAP level and the lymphocyte subsets (CD3, CD4, CD8) [J]. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi*, 1996, 93(5):303-311
- [15] Liu CZ, Zhang L, Chang XH, et al. Overexpression and immunosuppressive functions of transforming growth factor 1, vascular endothelial growth factor and interleukin-10 in epithelial ovarian cancer [J]. *Chin J Cancer Res*, 2012, 24(2):130-133

[收稿日期] 2016-04-18

本刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆
<http://jnm.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
审理情况。