

食管癌患者外周血中调节性 B 细胞检测的临床意义

石家振,李世宝,周彦*

(蚌埠医学院附属连云港医院检验科,江苏 连云港 222006)

[摘要] 目的:检测食管癌患者和健康对照者外周血中调节性 B 细胞 CD5⁺CD19⁺IL-10(B10)表达量的差异,探讨 B10 在食管癌发生、发展中的作用。方法:收集 60 例食管癌患者和 60 例健康体检者外周血,用流式细胞仪检测调节性 B 细胞的表达情况。结果:食管癌患者外周血中 B10 的数量明显高于健康对照者 ($P < 0.05$),且 III~IV 期 [(3.3 ± 0.6)%] 高于 I~II 期 [(2.1 ± 0.3)%],均高于健康对照者 [(1.4 ± 0.4)%]。结论:食管癌临床分期越晚 B10 升高越明显,提示 B10 细胞与食管癌的发生发展可能存在着一定的关系。

[关键词] 食管癌;调节性 B 细胞;B10;IL-10

[中图分类号] R735.1

[文献标识码] B

[文章编号] 1007-4368(2013)02-210-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20130214

食管癌是一种常见的恶性肿瘤,占肿瘤病死率的第 8 位^[1-2]。以往的研究证实 T 细胞中调节性 T 细胞(regulatory T cell, Tregs)亚群是引起肿瘤患者体内免疫抑制的重要因素^[3]。近年来,在 B 细胞中也发现一种同 Tregs 一样具有负向调节功能的 B 细胞亚群——调节性 B 细胞(regulatory B cell, Bregs)。有研究证实该群细胞是表达 CD5⁺的 B 细胞(CD5⁺CD19⁺)^[4]。CD5⁺B 细胞产生自身抗体、促炎细胞因子和增加抗原提呈的功能在自身免疫病中起到重要作用^[5]。依据其产生不同的细胞因子又分为 Br1、Br3 和 Breg,其中产生白细胞介素(IL)-10 发挥负向免疫调节作用的称为 Br1(B10)^[6-7]。最近,Noh 等^[8]首次在过敏性疾病患者外周血中发现了分泌 IL-10 的 CD5⁺CD19⁺Bregs。Chen 等^[9]发现肝癌患者外周血中 CD19⁺IL-10Bregs 的表达量高于健康对照者,这提示 Bregs 在肿瘤发生、发展和转归过程中发挥着至关重要的调节作用。为了探讨 B10 在食管癌的发生、发展之间的关系,本文对食管癌患者不同分期中 B10 的水平进行检测,以期找到 B10 在食管癌患者诊断、治疗及预后中的作用。

1 资料和方法

1.1 资料

收集 2011 年 12 月~2012 年 7 月蚌埠医学院附属连云港医院胸外科及放疗科 60 例食管癌患者外

周血。所有患者无其他合并症,入院前均未做过手术及化疗且同意参加本研究。入组的食管癌患者按照美国癌症联合会 2010 年制定的标准进行分期(Edge and Compton, 2010): I~II 期 28 例, III~IV 期 32 例。男 34 例,女 26 例,年龄 50~70 岁,平均 63.5 岁。年龄和性别与实验组相匹配的 60 例健康对照者均来自本院体检中心。

仪器设备:Ficoll(GE 公司,美国),Golgi、CD5-FITC、CD19-PE 和 IL-10APC (BD 公司,美国),FIX&RERM (ADG 公司,澳大利亚)。流式细胞仪 FACSCalibur(BD 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 标本收集

用肝素锂抗凝管抽取早晨 6~8 时食管癌患者和健康对照者外周静脉血 5 ml。自采血完毕后 3 h 内进行试验。

1.2.2 外周血单个核细胞(PBMC)的提取和培养

将 2 ml 全血和 2 ml PBS 按 1:1 充分混匀后沿管壁缓慢加入 3 ml 淋巴细胞提取液 Ficoll 离心管中。水平离心 1 500 r/min, 30 min。离心后可见试管内容物可分为 4 层,第一层为血浆层,第二层为分离液层,单个核细胞层处于血浆层和分离液层中间,底层为红细胞层,红细胞层上为粒细胞层;用一次性吸管吸取单个核细胞层收集到另一离心管中,加入 6 ml PBS,以 1 500 r/min、10 min 洗涤 2 次,弃上清后加 RPMI1640 将细胞数调至 2×10^6 个/ml。吸取 0.5 ml 加入 Falcon 流式管中。加入刺激剂 Golgi(含刀豆蛋白 A、脂多糖、离子霉素、葡萄球菌肠毒素 B 等)2 μ l

[基金项目] 连云港市科技局基金资助(SH1008)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: z-y1022@163.com

置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 5 h。

1.2.3 细胞表面及细胞内染色和流式细胞仪检测

向 Falcon 管中分别加入 10 μl CD5-FITC 和 CD19-PE 充分混匀, 室温避光 15 min; 加入 FIX & RERM Reagent(A)100 μl 混匀, 室温避光 15 min; 加 3 ml PBS, 1 500 r/min 离心 5 min 弃上清加 FIX & RERM Reagent (B)100 μl, 同时向管中加 IL-10 APC 5 μl 混匀, 室温避光 15 min; 加 3 ml PBS, 1 500 r/min 离心 5 min 弃上清, 加 500 μl PBS 上流式细胞仪检测。

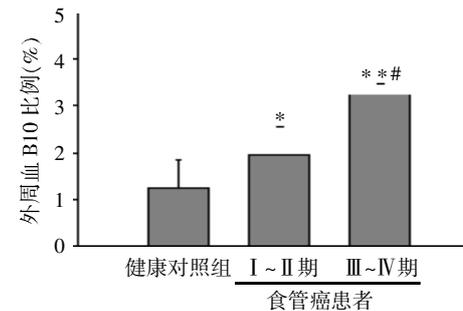
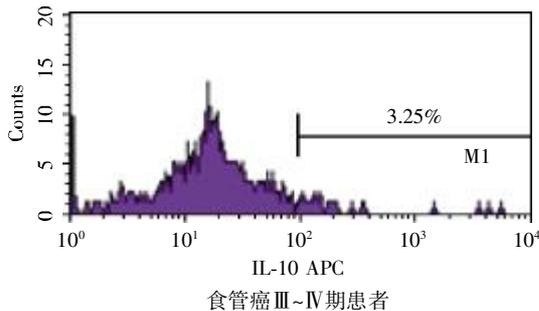
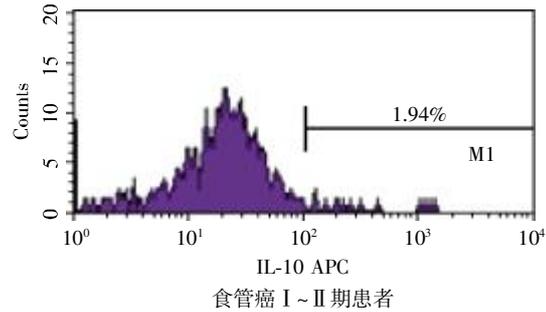
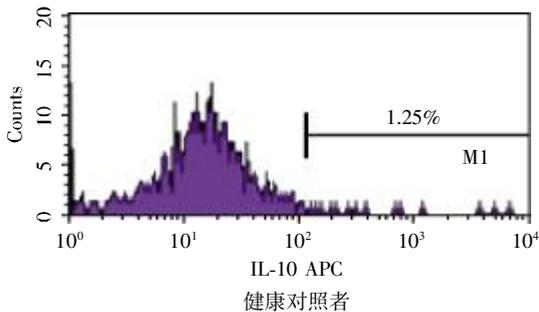
1.3 统计学方法

流式细胞仪所得数据采用 Cellquest Pro 软件分析。数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS18.0 统计软件进行数据处理, 各组样本均数的比较采用单因素方差分析法, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

Ⅲ~Ⅳ期食管癌患者外周血 CD5⁺B 细胞的比例 [(3.51 ± 1.14)%] 高于 I~II 期食管癌患者 [(2.57 ± 0.92)%], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 且高于健康对照者 [(1.63 ± 0.89)%], 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。I~II 期食管癌患者外周血 CD5⁺B 细胞的比例高于健康对照者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1)。

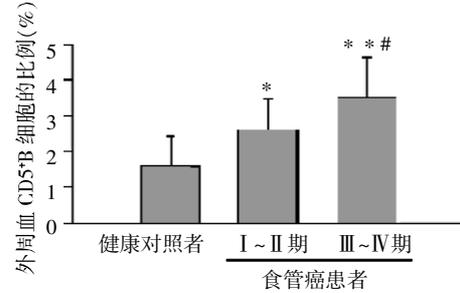
Ⅲ~Ⅳ期食管癌患者外周血中 B10 亚群的比例



与健康对照者比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与食管癌 I~II 期患者比较, # $P < 0.05$ 。

图 2 健康对照者和食管癌患者外周血 B10 亚群流式图与数据分析

[(3.3 ± 0.6)%] 高于 I~II 食管癌患者 [(2.1 ± 0.3)%], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 且高于健康对照者 [(1.4 ± 0.4)%], 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。I~II 期食管癌患者外周血 B10 亚群比例高于健康对照者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2)。



与健康对照者比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与食管癌 I~II 期患者比较, # $P < 0.05$ 。

图 1 健康对照者和食管癌外周血 CD5⁺B 细胞的表达

3 讨论

最近 B10 引起国内外很多学者的关注^[10], 其作用主要集中在抑制炎症、自身免疫病和抗肿瘤效应方面^[9,11-12]。本研究利用流式细胞仪检测分析了食管癌患者与健康对照者外周血中 Bregs 亚群 B10 细胞比例的差异, 结果显示食管癌患者的 B10 比例较健康对照者显著升高。这与 Chen 等^[9]在肝癌患者中 CD19⁺IL-10B 细胞的比例高于健康对照者的研究结果一致。

Inoue 等^[13]发现在小鼠体内去除 B 细胞后增强的抗肿瘤免疫反应很可能与 B 细胞分泌的 IL-10 大量减少有关。同时有研究证实肝癌患者术后第 1 天及 1 周 CD19⁺IL-10 表达量逐渐升高,因为手术解除了 B10 的抑制功能^[9]。有实验小鼠诱导肿瘤后,去除 Bregs 对于清除小鼠的肿瘤很重要^[14]。本研究发现 CD5⁺B 细胞在食管癌患者中的表达量高于健康对照者,且随食管癌分期越晚,癌组织浸润的深度增加和远处转移,CD5⁺B 细胞在食管癌患者中负向抑制作用越强,CD5⁺B 细胞的表达量越高。可能与分泌的抑制性 IL-10 的量有关,IL-10 的量越高抑制性越强。

本研究结果显示随着食管癌临床分期越晚,其免疫功能越低,B10 表达量的增加越多,因此 B10 与食管癌的发生发展可能存在着一一定的关系。

[参考文献]

- [1] Kamangar F,Dores GM,Anderson WF. Patterns of cancer incidence,mortality,and prevalence across five continents;defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world [J]. *J Clin Oncol*,2006,24(14):2137-2150
- [2] Ferlay J,Shin HR,Bray F,et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008;GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*,2010,127(12):2893-2917
- [3] Kandulski A,Malferteiner P,Wex T. Role of regulatory T-cells in *H. pylori*-induced gastritis and gastric cancer[J]. *Anticancer Res*,2010,30(4):1093-1103
- [4] Mizoguchi A,Bhan AK. A case for regulatory B cells[J]. *J Immunol*,2006,176:705-710
- [5] Duan B,Morel L. Role of B-1a cells in autoimmunity[J]. *Autoimmun Rev*,2006,5(6):403-408
- [6] Hardy RR. B-1 B cell development [J]. *J Immunol*,2006,177(5):2749-2754
- [7] Noh G, Lee JH. Regulatory B cells and allergic diseases [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*,2011,3(3):168-177
- [8] Noh J, Noh G, Kim HS, et. Allergen-specific responses of CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) regulatory B cells (Bregs) and CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell (Tregs) in immune tolerance of cow milk allergy of late eczematous reactions[J]. *Cell Immunol*,2012,274(1-2):109-114
- [9] Chen T, Song D, Min Z, et al. Perioperative dynamic alterations in peripheral regulatory T and B cells in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *J Transl Med*,2012,25(10):14
- [10] Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2012,30:221-241
- [11] Teichmann LL, Kashgarian M, Weaver CT, et al. B cell-derived IL-10 does not regulate spontaneous systemic autoimmunity in MRL.Fas(lpr) mice [J]. *J Immunol*,2012,188(2):678-685
- [12] Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, et al. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation[J]. *Immunity*,2002,16(2):219-230
- [13] Inoue S, Leitner WW, Golding B, et al. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity [J]. *Cancer Res*,2006,66(15):7741-7747
- [14] Duan B, Morel L. Role of B-1a cells in autoimmunity[J]. *Autoimmun Rev*,2006,5(6):403-408

[收稿日期] 2012-04-17