

· 论 著 ·

胃癌组织中 Treg 的分布数量及其与 IL-10、TGF- β 关系研究*胡宏波¹, 贾安平², 梁秀兰², 刘振鹏², 杨建², 詹前美¹

(柳州铁路中心医院:1. 检验科;2. 消化内科, 广西 545007)

摘要:目的 研究 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞(Treg)在胃癌组织中的分布数量及意义。方法 采用流式细胞术检测胃癌组织及正常组织中 Treg 数量变化;同时用免疫磁珠细胞分选技术分选出高纯度的 CD4⁺CD25⁺ T 细胞,经体外刺激后检测胞内白介素-10(IL-10)和转化生长因子- β (TGF- β)分泌水平。结果 正常组织中 Treg 数量为(8.40 \pm 0.52)%,胃癌组织中 Treg 数量明显增高[(11.51 \pm 0.64)%]。经体外刺激后,胃癌组织中 Treg 分泌的抑制性细胞因子(IL-10、TGF- β)较正常组织明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 Treg 可能通过分泌 IL-10 和 TGF- β 等抑制性细胞因子干扰抗体抗胃癌的免疫反应。

关键词:胃癌;T 淋巴细胞;白介素-10;转化生长因子- β

中图分类号:R735.2;R730.2

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)03-0265-03

Distribution quantity of Treg and relationship with IL-10 and TGF- β in gastric carcinoma tissue*HU Hong-bo¹, JIA An-ping², LIANG Xiu-lan², et al.

(1. Department of Laboratory;2. Department of Gastroenterology, The Central Hospital of Liuzhou Railroad, Liuzhou 545007, China)

Abstract: Objective To study the distribution quantity and significance of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Treg) in gastric carcinoma tissue. **Methods** The quantity of Treg was determined by flow cytometry from gastric carcinoma tissue and normal tissue. Highly purified CD4⁺CD25⁺ T cells were isolated by immunomagnetic beads, and the production of intracellular suppressor cytokines such as interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor- β (TGF- β) was tested by flow cytometry. **Results** The number of Treg in gastric carcinoma tissue was more than that in normal tissue. Compared with gastric carcinoma tissue, the secretion of intracellular cytokines such as IL-10 and TGF- β was significantly greater in peripheral CD4⁺CD25⁺ T cells of normal tissue after in stimulation vitro ($P < 0.05$). **Conclusion** Treg may obstruct the immunologic reaction of gastric carcinoma by secreting suppressive cytokines, and it plays an important role in gastric carcinoma prognosis.

Key words: gastric carcinoma; T-lymphocytes; IL-10; TGF- β

CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞(CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell, Treg)是一类具有免疫调节作用的细胞群,是健康个体 T 细胞库的组成成分,占 CD4⁺ 细胞 5%~10%^[1]。该细胞群在自身免疫耐受的维持中发挥重要作用。有研究发现在肿瘤患者中 Treg 数目增加,其增加能引起患者生存率下降,并且与患者预后呈负相关^[2]。应用抗 CD25 抗体清除 Treg,能够在荷瘤小鼠体内引起有效的抗肿瘤免疫应答,使其存活期延长,表明 Treg 与肿瘤的发生、发展有密切关系^[3]。因此,作者通过检测胃癌组织中 Treg 分布数量的改变,并以正常组织作为对照,进一步研究 Treg 在胃癌免疫中的作用。

1 临床资料

1.1 一般资料 胃癌组:本院 2007 年 1 月至 2009 年 1 月手术切除的 15 例胃癌标本;对照组:15 例正常胃组织来源于同期因非肿瘤性疾病行胃大部分切除距病变边缘 2cm 正常组织。所有标本均在手术切除后迅速冻存于液氮中,然后置于-80℃低温保存。全部病例术前均未行放、化疗,术后均经病理检查证实。

1.2 主要试剂及仪器设备 抗人 PE-cy5-CD4、FITC-CD25、PE-CD25 单抗及同型对照小鼠 IgG1 抗体购自美国 Becton Dickinson 公司, CytodetectTM 胞内细胞因子刺激/染色试剂盒、抗 IL-10-PE、TGF- β -PE 单抗及同型对照 IgG1 抗体均购自

荷兰 IQ 公司, MagCollect 人 Treg 免疫磁珠细胞分选试剂盒购自美国 R&D 公司, NycoprepTM 1.077 密度梯度分离液购自挪威 Axis-Shield 公司, RPMI 1640 培养基[含 100mg/L 链霉素、1 \times 10⁵ u/L 青霉素、10% 胎牛血清(澳大利 Invitrogen 公司)、5 \times 10⁻⁵ mol/L 2-巯基乙醇]购自美国 Gibco 公司, FACS-Calibur 型流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

1.3 流式细胞仪检测 Treg 剪碎胃组织, 37℃ 消化 2h(消化液含 1mg/mL 胶原酶、2.5u/mL 透明质酸酶、0.1mg/mL DNase), 尼龙网过滤, 经密度梯度离心法分离出单一核细胞。在上述细胞中, 胃癌组加入 PE-cy5-CD4 单抗、FITC-CD25 单抗; 对照组加入等量 FITC 标记同型对照小鼠 IgG1, 振荡混匀, 室温暗处孵育 20min, PBS 洗涤, 上机检测。

1.4 Treg 的分离、纯化 用冷免疫磁珠分选缓冲液调整分离出的单一核细胞为(1~2) \times 10⁷/mL, 取 2mL 细胞悬液加入 CD4⁺ T 细胞生物素化混合抗体, 置冰箱孵育 15min 后加入被链霉亲和素包被的磁珠, 混合反应 15min, 将试管水平放置于磁分离架上, 阴性选择获得 CD4⁺ T 细胞, 再按每 1 \times 10⁷ 细胞加入磁珠标记抗 CD25 单抗, 阳性选择获得 CD4⁺CD25⁺ T 细胞, 通过流式细胞仪分析细胞纯度。

1.5 Treg 内细胞因子检测 取 24 孔细胞培养板, 每孔加入经免疫磁珠分选法分离、纯化得到的 Treg (2 \times 10⁶/mL) 悬液

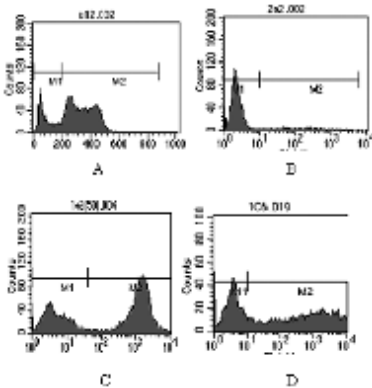
* 基金项目:广西壮族自治区卫生厅科研基金资助项目(Z2008335、Z2009225)。△ 通讯作者。

1mL,共 6 孔,往诱导白介素-10(IL-10)产生孔加入 10 μ L 巴豆脂(PMA)、10 μ L 艾罗霉素、10 μ L 莫能星;往诱导转化生长因子- β (TGF- β)产生孔加入 20 μ L PMA、10 μ L 艾罗霉素、10 μ L 莫能星。37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 饱和水汽培养箱孵育 5h,使 IL-10 产生达高峰;孵育 24h,使 TGF- β 产生达高峰。经 HBSS 洗涤,4%冷多聚甲醛固定细胞、细胞表面抗原染色、细胞破膜、胞内细胞因子染色后,进行流式细胞仪检测,用 Cell Quest 软件分析数据,以荧光抗体染色阳性细胞百分率记录结果。

1.6 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件进行分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃组织中 Treg 表达比较 胃癌组 Treg 表达率为(11.51 \pm 0.64)%,对照组为(8.40 \pm 0.52)%;胃癌组 Treg 分布数量明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。



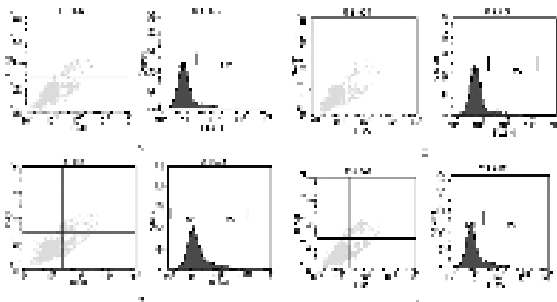
A: 对照组 CD4 $^{+}$ 细胞; B: 对照组 CD25 $^{+}$ 细胞; C: 胃癌组 CD4 $^{+}$ 细胞; D: 胃癌组 CD25 $^{+}$ 细胞。

图 1 胃组织中 Treg 表达的比较

表 1 Treg 抑制性细胞因子表达水平(%, $\bar{x} \pm s$, n=20)

组别	CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ IL-10 $^{+}$		CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ TGF- β $^{+}$	
	未刺激	PMA 刺激	未刺激	PMA 刺激
对照组	0.35 \pm 0.07	1.14 \pm 0.33	0.09 \pm 0.04	0.67 \pm 0.22
胃癌组	0.39 \pm 0.06	2.39 \pm 0.36*	0.19 \pm 0.20	0.94 \pm 0.09*

*: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

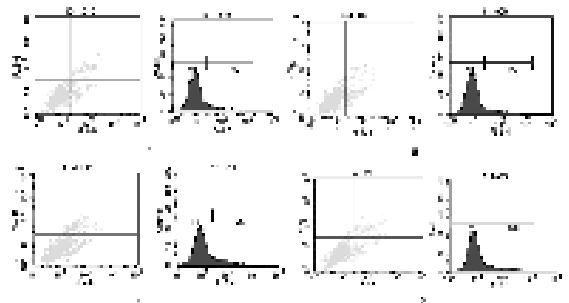


A: 对照组未刺激; B: 对照组 PMA 刺激; C: 胃癌组未刺激; D: 胃癌组 PMA 刺激。

图 2 Treg 抑制性细胞因子 IL-10 分泌水平

2.2 Treg 抑制性细胞因子的表达 分选出的 Treg 纯度大于 89%。两组比较,刺激前 Treg 内 IL-10、TGF- β 分泌水平差异无统计学意义($P > 0.05$);经体外 PMA 和艾罗霉素刺激后,胃

癌组 Treg 内 IL-10 及 TGF- β 分泌水平均比对照组明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2 和图 2、3。



A: 对照组未刺激; B: 对照组 PMA 刺激; C: 胃癌组未刺激; D: 胃癌组 PMA 刺激。

图 3 Treg 抑制性细胞因子 TGF- β 分泌水平

3 讨论

正常情况下天然产生的 Treg 在机体内主要作用是动态调节机体免疫平衡,防止免疫反应无限制扩大及抑制自身免疫反应的发生。然而,在肿瘤患者的肿瘤组织、肿瘤浸润淋巴细胞或外周血中 Treg 数目增加,并且 Treg 增加与患者生存率下降有关。有研究发现给鼠接种肿瘤或自身抗原后,诱导大量活化 Foxp3 $^{+}$ Treg,同时提高了该鼠对于化学诱导致癌以及接种成瘤的敏感性和肿瘤转移率^[4-5];如果选择性清除 Treg,则致瘤敏感性和肿瘤转移率与正常鼠无差异;同样 Treg 数量增加可以加快移植瘤生长速度,降低胃癌细胞凋亡,说明 Treg 在体内也能抑制机体对肿瘤的杀伤活性^[6]。上述现象表明,Treg 能通过不同机制抑制一系列免疫反应,促使肿瘤细胞免疫耐受、逃逸,其机制可能涉及以下几个方面:TCR 信号所激活的 Treg 能够抑制 CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ 和 CD8 $^{+}$ T 细胞活化、增殖,并且这种抑制作用为非抗原特异性^[7]; Treg 具有抑制 NK 细胞增殖、细胞因子分泌和细胞毒作用,以及对单核/巨噬细胞、树突状细胞、B 细胞等免疫活性细胞起抑制或杀伤作用^[8-9]; Treg 通过分泌 IL-10、TGF- β 等抑制性细胞因子和细胞接触依赖的抑制途径,抑制免疫效应细胞功能等^[10];而封闭 Treg 功能后,免疫活性细胞的活性得以释放,且杀伤活性明显增强,同时, Treg 分泌的抑制性细胞因子表达下调^[11-12]。

本研究结果显示胃癌组织内 Treg 分布数量明显高于对照组。同时,通过免疫细胞磁珠分选出高纯度 Treg,经体外 PMA 和艾罗霉素刺激活化后产生多种细胞因子(如 IL-10、TGF- β 等),同时用蛋白质转运抑制剂——莫能星抑制细胞分泌细胞因子至胞外,使其在胞内高尔基体体积聚,以利于细胞因子的检测。本研究还发现 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ IL-10 $^{+}$ T 细胞、CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ TGF- β $^{+}$ T 细胞数量在胃癌组中明显增加,说明活化后的 Treg 可通过分泌 IL-10 和 TGF- β 来抑制 Th1 介导的免疫反应、Th2 介导的抗体产生以及 CD8 $^{+}$ 细胞毒性 T 细胞的活化^[13]。IL-10 可通过直接和间接机制明显降低抗原特异性 T 细胞增殖。IL-10 对 T 细胞的直接作用包括抑制 IL-2 的产生以及延长细胞增殖周期等;间接机制包括下调单核细胞 CD80、CD86 以及 CD28 的配体表达和有效抑制 IL-12 的产生,而 IL-12 是 TH1 细胞分化的关键因子;此外,IL-10 还可阻止 T 细胞受体介导的 CD4 $^{+}$ T 细胞活化。TGF- β 家族成员也是维系 Treg 数量和功能的重要因子^[14];它还能诱导表达 Foxp3,使外周 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ 初始 T 细胞转变为 Treg^[15];有研究表明,

TGF- β 家族成员可以通过剂量依赖方式,在体内外促进 Treg 转化为 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞,后者被认为是真正起作用的 Treg,从而实现 Treg 的反馈调节作用^[16-17]。TGF- β 也可通过抑制免疫效应细胞的增殖、分化以及抑制细胞因子的产生而发挥作用。由此可知,Treg 在胃癌中通过分泌抑制性因子等,使胃癌细胞从机体抗肿瘤免疫反应体系中逃逸,从而促进胃癌的形成与发展。

参考文献:

- [1] Sakaguchi S, Sakaguchi N. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease[J]. *Int Rev Immunol*, 2005, 24(3~4): 211.
- [2] Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer[J]. *Blood*, 2006, 108(3): 804.
- [3] Ohmura Y, Yoshikawa K, Saga S, et al. Combinations of tumor-specific CD8⁺ CTLs and anti-CD25 mAb provide improved immunotherapy[J]. *Oncol Rep*, 2008, 19(5): 1265.
- [4] Zaccone P, Burton O, Miller N, et al. Schistosoma mansoni egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice[J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(4): 1098.
- [5] Nishikawa H, Kato T, Tawara I, et al. Accelerated chemically induced tumor development mediated by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in wild-type hosts[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(26): 9253.
- [6] 曾冬竹, 余佩武, 雷晓, 等. CD4⁺CD25⁺调控 T 细胞对小鼠胃癌的影响[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2007, 10(4): 368.
- [7] Thornton AM, Piccirillo CA, Shevach EM. Activation requirements for the induction of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function[J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(2): 366.
- [8] Banerjee DK, Dhodapkar MV, Matayeva E, et al. Expansion of FOXP3 high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients[J]. *Blood*, 2006, 108(8): 2655.
- [9] Larmonier N, Marron M, Zeng Y, et al. Tumor-derived CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cell suppression of dendritic cell function involves TGF-beta and IL-10 [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(1): 48.
- [10] Shevach EM, Dipaolo RA, Andersson J, et al. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells[J]. *Immunol Rev*, 2006, 212: 60.
- [11] 杨晓鲲, 郑峻松, 张新, 等. G1TR 抗体介导增强 NK 细胞杀伤活性的实验研究[J]. *重庆医学*, 2006, 35(18): 1649.
- [12] Smyth MJ, Teng MW, Swann J, et al. CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer[J]. *J Immunol*, 2006, 176(3): 1582.
- [13] Nakamura K, Kitani A, Fuss I, et al. TGF-beta1 plays an important role in the mechanism of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity in both humans and mice[J]. *J Immunol*, 2004, 172(2): 834.
- [14] Tonkin DR, Haskins K. Regulatory T cells enter the pancreas during suppression of type 1 diabetes and inhibit effector T cells and macrophages in a TGF-beta-dependent manner[J]. *Eur Immunol*, 2009, 39(5): 1313.
- [15] Shevach EM, Davidson TS, Huter EN, et al. Role of TGF-Beta in the induction of Foxp3 expression and T regulatory cell function[J]. *J Clin Immunol*, 2008, 28(6): 640.
- [16] Huber S, Stahl FR, Schrader J, et al. Activin a promotes the TGF-beta-induced conversion of CD4⁺CD25⁻ T cells into Foxp3⁺ induced regulatory T cells[J]. *J Immunol*, 2009, 182(8): 4633.
- [17] Moo-Young TA, Larson JW, Belt BA, et al. Tumor-derived TGF-beta mediates conversion of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in a murine model of pancreas cancer [J]. *J Immunother*, 2009, 32(1): 12.
- (收稿日期: 2009-07-05 修回日期: 2009-08-15)
-
- (上接第 264 页)
- [5] 李育阳. 基因表达技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 125.
- [6] 侯倩. 阿尔茨海默病的诊治进展[J]. *山东医药*, 2008, 48(23): 111.
- [7] Apostolova LG, Dinov ID, Dutton RA, et al. 3D comparison of hippocampal atrophy in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease [J]. *Brain*, 2006, 129(11): 2867.
- [8] Jack CR, Shiung MM, Weigand SD, et al. Brain atrophy rates predict subsequent clinical conversion in normal elderly and amnesic MCI[J]. *Neurology*, 2005, 65(8): 1227.
- [9] Kaye R, Head E, Thompson J, et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis[J]. *Science*, 2003, 300: 486.
- [10] 卢圣栋. 现代分子生物学技术[M]. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 417.
- [11] Li M, He S. Purification and characterization of recombinant human interleukin-29 expressed in Escherichia coli [J]. *J Biotechnol*, 2006, 122: 334.
- (收稿日期: 2009-06-09 修回日期: 2009-09-17)