论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.18.010

$CD4^+CD25^+FOXP3^+$调节性 T 细胞和 $PD\text{-}1^+CD4^+$T 细胞对宫颈内皮细胞瘤预后的作用

李秀玉[1],胡 波[2],李忠新[1]

(1.深圳市中医院检验科,广东深圳 518000;2.中山大学附属第三医院检验科,广州 510630)

[摘要] **目的** 研究宫颈内皮细胞瘤(CIN)皮损处的 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$调节性 T 细胞(Tregs)和 $PD\text{-}1^+CD4^+$T 细胞及其转归之间的关联性。**方法** 用细胞刷从 CIN 患者收集宫颈淋巴细胞,并用 FACS 分析这些细胞中的 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Tregs 和 $PD\text{-}1^+CD4^+$T 细胞。比较 CIN 消退者和未消退者之间 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Tregs 和 $PD\text{-}1^+CD4^+$T 细胞群的差异。**结果** 宫颈淋巴细胞中 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Tregs 占 11.8%,而 $PD\text{-}1^+CD4^+$T 细胞占 30.3%。与未消退者组比较,CIN 消退组 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Tregs 和 $PD\text{-}1^+CD4^+$T 细胞均明显较低($P<0.05$)。**结论** 宫颈 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Tregs 的产生与 CIN 自发消退成负相关,表明 Tregs 在人乳头瘤状病毒(HPV)相关的肿瘤免疫逃逸中起重要作用。

[关键词] 人乳头瘤病毒;宫颈内皮细胞瘤;T 淋巴细胞,调节性;细胞凋亡

[中图分类号] R757 [文献标识码] A [文章编号] 1671-8348(2015)18-2477-03

The roles of $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ regulatory T cells and $PD\text{-}1^+CD4^+$ T cells on prognosis of cervical intraepithelial lesion

Li Xiuyu[1], *Hu Bo*[2], *Li Zhongxin*[1]

(1. *Department of Laboratory Medicine, Shenzhen Chinese Traditional Medical Hospital, Shenzhen, Guangdong* 518000, *China*; 2. *Department of Laboratory Medicine, Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong* 510630, *China*.)

[**Abstract**] **Objective** This study aims to investigate the correlation of $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Tregs and $PD\text{-}1^+CD4^+$ T cells located at cervical lesions and the prognosis of CIN. PD-1 expression on T cells induces Tregs. **Methods** Cervical lymphocytes were collected from CIN patients and analyzed by FACS. Comparisons were made between populations of cervical Tregs and $PD\text{-}1^+CD4^+$ T cells in CIN regressors and non-regressors. **Results** A median of 11.8% of cervical $CD4^+$ T cells were $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Tregs, while a median of 30.3% were $PD\text{-}1^+CD4^+$ T cells. The proportions of $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Tregs and $PD\text{-}1^+$ cells were significantly lower in CIN regressors when compared with non-regressors. **Conclusion** The prevalence of $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Tregs negative correlates with spontaneous regression of CIN, suggesting that cervical Tregs may play an important role in HPV-related neoplastic immunoevasion.

[**Key words**] human papillomavirus; cervical intraepithelial lesion; T-lymphocytes, regulatory; apoptosis

宫颈皮内细胞瘤(cervical intraepithelial neoplasia,CIN)是一组宫颈病变的统称,包括宫颈不典型增生和原位癌,为宫颈浸润癌的癌前期病变。病理上通常将 CIN 分为 3 级,CIN Ⅰ级指轻度不典型增生,CIN Ⅱ级指中度不典型增生,CIN Ⅲ级指重度不典型增生及原位癌[1-2]。其主要病因是人乳头瘤状病毒(HPV)的感染,但 70%以上 HPV 感染并不导致宫颈损害。可能原因包括招募调节性 T 细胞(regulatory T cells,Tregs)、髓样来源的抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells,MDSCs)和抑制性细胞因子的局部分泌,如 IL-10、TGF-β,导致免疫效应细胞的钝化或失活。此外,体内 T 细胞被激活后诱导产生抑制性受体如 PD-1、CTLA-4,这些抑制性受体被称为免疫检查点(immune checkpoint)。它们在正常生理条件下能保护机体免受免疫损伤或对自身抗原耐受。在慢性病毒性感染或肿瘤患者体内存在 T 细胞功能耗损,主要是因为 PD-1 表达增多[3-5]。本研究观察宫颈局部的 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Tregs 和 $PD\text{-}1^+CD4^+$T 细胞在 CIN 转归中的作用,为了解 CIN 的病理和预后提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与材料 RPMI-1640 培养基、10%胎牛血清购自杭州四季青生物公司,两性霉素 B、肝素购自 Sigma 公司,FITC-anti-PD-1、PC5.5-anti-CD4、APC-anti-CD25 购自 Santa Cruz 公司,40% Percoll 液购自达科为生物公司;全新贝克曼 CytoFLEX 流式细胞仪。

1.2 方法

1.2.1 宫颈细胞样品的收集 细胞刷收集 36 例病理诊断为 CIN 患者的宫颈细胞样品。本研究得到了本院伦理委员会同意,所有患者均签署知情同意书。病例排除有症状的阴道炎或性病。36 例 CIN 患者被分为宫颈细胞学检查消退的 CIN 患者和未消退的患者。在本研究中,细胞学上的消退被定义为连续 2 次间隔 3~4 个月检测细胞学病理正常。其中 18 名患者为消退组,平均随访时间为 16.5 个月。另外 18 名为未消退组,作为对照,平均随访时间为 19.0 个月。收集每个患者的吸烟史和月经情况。

1.2.2 宫颈淋巴细胞的收集和处理 按照文献[6]用 Digene

作者简介:李秀玉(1964-),副主任医师,主要从事临床检验工作。

细胞刷收集细胞。细胞刷插进宫颈，旋转几次。把细胞刷立即放入装入 RPMI-1640 培养基中[含 10%胎牛血清、100 mg/mL 和 2.5 μg/mL 两性霉素 B、抗凝剂(0.1 IU/mL 肝素和 8 nmol/L EDTA)]的试管中。把样品放进含 5 mmol/L DL-二硫苏糖醇中在 37 ℃震动孵育 15 min，取出细胞刷。试管以 330×g 离心 4 min。然后用 40% Percoll 液 10 mL 重悬细胞。混合物用 70% Percoll 液分层，480×g 离心 18 min。单个核细胞分布在 Percoll 界面，吸取这些细胞，用 PBS 洗涤。细胞活性大于 95%，新鲜的样品立即用于后续的分析。

1.2.3 免疫标记和流式细胞仪分析 采用荧光标记的抗体检测宫颈淋巴细胞表面抗原，包括 FITC-anti-PD-1，PC5.5-anti-CD4，APC-anti-CD25(Santa Cruz 公司)。与抗体孵育后，细胞用 FACS 缓冲液(10% FCS，1 mmol/L EDTA，10 mmol/L NaN_3)洗 2 次，FOXP3 固定/渗透工作液渗透，抗细胞内抗原抗体免疫 PE-anti-Foxp3 标记，流式细胞染色缓冲液冲洗细胞 2 次，用流式细胞染色缓冲液重悬细胞，同型抗体作为对照。每个样品至少分析 5 000 个宫颈淋巴细胞，用流式细胞分析软件分析。

1.2.4 HPV 基因分型 HPV 的基因分型委托金域医学检验中心(广州)完成，在本研究中 24 名患者的病毒学检查见表 1。根据国际癌症研究署 HPVs 16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、68、73、82 被定义为高危型 HPV。

1.3 统计学处理 本研究采用 JMP® 软件进行数据分析，计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，Wilcoxon rank sum tests 或 Fisher′s 检验用于配对比较分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

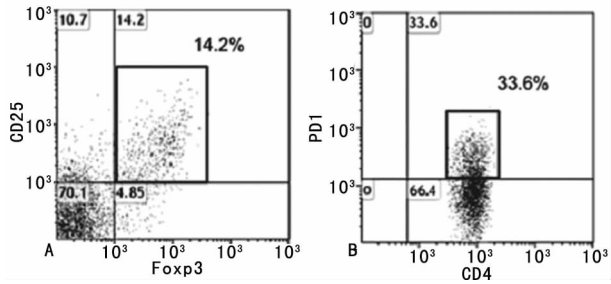
2.1 在 CIN 皮损处分离宫颈耐受 T 细胞亚群 宫颈淋巴细胞从位于 Percoll 和培养基中间相分离得到[3]。$CD4^+$ $CD25^+$ $FOXP3^+$ Tregs 或 PD-1^+ $CD4^+$ T 细胞通过流式细胞仪分析(图 1)。宫颈 $CD4^+$ $CD25^+$ $FOXP3^+$ 占 14.2%，而 PD-1^+ $CD4^+$ T 细胞占 33.6%。在所有的 CIN 患者中，$CD4^+$ $CD25^+$ $FOXP3^+$ Tregs 的均值为 11.8% (IQR：7.2～14.6，$n=36$)，而 PD-1^+ $CD4^+$ T 细胞的比例为 30.3% (IQR：20.2～38.4，$n=36$)。

2.2 HPV 基因型分布 36 例中有 6 人多重感染；结果表明在宫颈内皮细胞瘤中 HPV 感染的基因型主要以 *HPV*16，*HPV*52，*HPV*58 和 *HPV*45 多见。见表 1。

表 1 患者感染 HPV 基因型的人数(n)

HPV 基因型	感染人数(n)
16	13
18	4
31	3
45	5
51	1
52	6
53	2
58	6
70	2
合计	42

2.3 $CD4^+$ $CD25^+$ $FOXP3^+$ Tregs 和 PD-1^+ $CD4^+$ T 细胞和 CIN 之间的关系 所有患者在登记时被诊断 CIN Ⅰ、Ⅱ，随后每 4 个月用阴道镜和宫颈细胞涂片检查随访，比较位于 CIN 消退和未消退(各 18 名)皮损处的 $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ Tregs 和 PD-1^+ $CD4^+$ T 细胞群，以确定是否宫颈耐受性 T 细胞亚群和 CIN 消退之间的相关性。18 名 CIN 消退患者，平均持续时间为 16.5(8～33)月。18 名未消退患者持续性细胞学异常。消退组与未消退组高危型 HPV 感染的检出率(58.3% *vs.* 83.3%，$P=0.37$)，CIN Ⅱ 的百分率(33.6% *vs.* 58.2%，$P=0.40$)和平均年龄(32 岁 *vs.* 38 岁，$P=0.44$)差异无统计学意义。在消退组，宫颈 $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ Tregs 平均为 7.3% (IQR：6.3～11.4)，而未消退组宫颈 $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ Tregs 平均为 13.9% (IQR：11.6～16.9)，前者显著低于后者($P=0.0012$)。消退组宫颈 $PD1^+$ $CD4^+$ T 细胞平均为 20.8% (IQR：15.8～31.9)，而未消退组宫颈 $PD1^+$ $CD4^+$ T 细胞平均为 35.1% (IQR：30.2～42.6)，前者显著低于后者($P=0.017$)。1 例 CIN 患者宫颈皮损处分离的免疫细胞流式细胞仪分析的结果见图 1。



A：$CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ Tregs；B：$PD1^+$ $CD4^+$ T 细胞。

图 1 1 例 CIN 患者宫颈皮损处分离的免疫细胞流式细胞仪分析的结果

3 讨 论

CIN 是宫颈癌的癌前病理损伤，与 HPV 感染密切相关。但 70%以上的 HPV 感染者是一过性感染，仅少数发展成 CIN，最后进展成宫颈癌。这表明除了 HPV 感染因素外，其他因素特别是宿主的免疫反应在宫颈癌的进展中也起重要作用。尽管一些研究报道抑制性淋巴细胞和肿瘤预后差成正相关，在肿瘤组织内 $CD4^+$ $CD25^+$ $FOXP3^+$ Tregs 的表达增加和 PD-1^+ $CD4^+$ T 细胞的增加常常表明预后较差，用 PD-1 单克隆抗体可以阻断 PD-1 的信号途径治疗肿瘤。但是 $CD4^+$ $CD25^+$ $FOXP3^+$ Tregs 和 PD-1^+ $CD4^+$ T 细胞在 HPV-感染相关的宫颈前期损伤的资料不多。本研究结果显示位于宫颈前期损伤部位的 $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ Tregs 和 $PD1^+$ $CD4^+$ T 细胞与 CIN 的自发消退呈负相关。

外周血 $CD4^+$ $CD25^+$ $FOXP3^+$ Tregs 包括天然调节性 T 细胞(nTregs)和诱导性调节性 T 细胞(iTregs)。iTregs 在黏膜耐受、对严重的慢性过敏性炎症以及微生物的预防和肿瘤的监视方面起关键作用，而 nTregs 则在阻止自身免疫和加重免疫反应方面起重要作用[7-9]。在本研究中，作者预测宫颈 $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ Tregs 多数是 iTregs。因为缺乏合适的表面标记区分 iTregs 和 nTregs 细胞群，导致分离 iTregs 困难。

本研究结果还显示宫颈皮损处 $CD4^+$ $CD25^+$ $FOXP3^+$ Tregs 与 CIN 的消退成负相关，但与 CIN 的分级没有明显相

关性(资料没有显示)。宫颈 iTregs 和循环的 Tregs 的 TCR 库可能不同。已知 iTregs 通过黏膜相关的 DC 分泌 TGF-β,从而导致成熟的处女 $CD4^+$ 细胞分化成 iTregs。整个宫颈淋巴细胞的 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs 的比例(平均 11%)是外周血(约 5%)的 2 倍。这表明 iTregs 可能以抗原-依赖的方式连续产生,于是在慢性 HPV 感染的组织和 CIN 皮损处累积。有报道称在宫颈样品中,包括已脱落的上皮细胞和宫颈淋巴细胞在高级别鳞状内皮损伤(HSIL)患者较低级别的鳞状上皮损伤(LSIL)中的 FOXP3 mRNA 高[10]。但是,FOXP3 mRNA 与 Tregs 的数量平行仍不清楚,因为宫颈淋巴细胞非特异性分离。据报道 $CD4^+CD25^+$ Treg 的频率与 HPV16 感染的持续性相关[11-12]。但在本研究中,作者无法了解 CIN 患者 HPV 的感染时间。此外 Treg 可能抑制免疫细胞清除 HPV 感染的细胞。

TGF-β 对诱导和维持 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Treg 非常关键,特别是在处女 $CD4^+$ 细胞向 iTregs 的诱导和效应 T 细胞向 iTregs 的转化中很重要。几个研究已经证明了在宫颈样本中 TGF-β 和维甲酸(RA)受体的表达在 CIN 皮损处降低[13-15]。在这些研究中,TGF-β mRNA 水平与 CIN 分级或 CIN 的自然病程不相关。TGF-β 诱导的 iTregs 水平较 TGF-β 更直接指示 CIN 进展。事实上,在 CIN 皮损处检测抑制性 T 细胞水平可以判断预后。

在本研究中,作者主要研究 $PD\text{-}1^+CD4^+$ T 细胞和 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs,因为 T 细胞的 PD-1 对于处女 $CD4^+$ 细胞分化成 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ iTregs 非常关键。而且,Tregs 和 PD-1/PD-L 途径的整合决定免疫反应的终止和提高对抗肿瘤 T 细胞反应的抑制。PD-1 途径控制黏膜部位 iTregs 的发育、维持和功能。本研究结果显示 $PD\text{-}1^+CD4^+$ T 细胞在宫颈淋巴细胞较外周血多,CIN 皮损处的 $PD1^+CD4^+$ T 细胞的比例与 CIN 自发消退成负相关。至于其他耐受性 T 细胞亚群因受到获取的淋巴细胞数量的限制而未被研究。

作者的研究存在一定的局限性,主要是标本量少,只有 36 个病例,HPV 感染的类型多,且有多个型别的 HPV 感染,获取宫颈淋巴细胞数量受限。但作者的流式细胞仪分析证明了 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs 侵润至 CIN 皮损处,与 CIN 的消退显著相关,与感染的 HPV 亚型无关。相反地,皮损处宫颈 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Tregs 的高发生率可能负责 CIN 的持续性,可作为 CIN 进展的标记物。

参考文献

[1] Insinga RP, Perez G, Wheeler CM, et al. Incident cervical HPV infections in young women: transition probabilities for CIN and infection clearance[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011, 20(2): 287-296.

[2] Konno R, Tamura S, Dobbelaere K, et al. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in healthy Japanese women aged 20 to 25 years old enrolled in a clinical study[J]. Cancer Sci, 2011, 102(4): 877-882.

[3] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 252-264.

[4] Lindsay CR, Spiliopoulou P, Waterston A. Blinded by the light: why the treatment of metastatic melanoma has created a new paradigm for the management of cancer[J]. Ther Adv Med Oncol, 2015, 7(2): 107-121.

[5] Gubin MM, Zhang X, Schuster H, et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens[J]. Nature, 2014, 515(7528): 577-581.

[6] Kojima S, Kawanna K, Fujii T. et al characterization of Gut-Derived intraepithelial lymphocyte (IEL) residing in human papillomavirus (HPV)-Infected intraepithelial neoplastic lesions[J]. Am J Reprod Immunol, 2011, 66(5): 435-443.

[7] Maria A, Lafaille C, Lafaille JJ. Natural and adaptive $Foxp3^+$ regulatory T cells: more of the same or a division of labor[J]. Immunity, 2009, 30(5): 626-635.

[8] Chaudhary B, Elkord E. Downregulation of immunosuppressive environment in patients with chronic HBV hepatitis on maintained remission[J]. Front Immunol, 2015; 6: 52.

[9] Zhang M, Zhou J, Zhao T, et al. Dissection of a circulating and intrahepatic CD4(+)Foxp3(+) T-cell subpopulation in chronic hepatitis B virus (HBV) infection: a highly informative strategy for distinguishing chronic HBV infection states[J]. J Infect Dis, 2012, 205(7): 1111-1120.

[10] Scott ME, Ma Y, Kuzmich L, et al. Diminished IFN-gamma and IL-10 and elevated Foxp3 mRNA expression in the cervix are associated with CIN 2 or 3[J]. Int J Cancer, 2009, 124(6): 1379-1383.

[11] Molling JW, De Gruijl TD, Glim J, et al. CD4(+)CD25(hi) regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia[J]. Int J Cancer, 2007, 121(8): 1749-1755.

[12] Rosales R, Rosales C. Immune therapy for human papillomaviruses-related cancers[J]. World J Clin Oncol, 2014, 5(5): 1002-1019.

[13] Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Madrid-González C, et al. Role of IL-10 and TGF-β1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia[J]. World J Clin Oncol, 2014, 5(4): 753-763.

[14] Guan X, Sturgis EM, Lei D, et al. Association of TGF-beta1 genetic variants with HPV16-positive oropharyngeal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(5): 1416-1422.

[15] Gómez-Gómez Y, Organista-Nava J, Gariglio P. Deregulation of the miRNAs expression in cervical cancer: human papillomavirus implications[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 407052.

(收稿日期:2014-12-28 修回日期:2015-02-16)