

文章编号: 1005-6947(2013)10-1302-05

· 基础研究 ·

大肠癌区域引流淋巴结中 Treg 细胞的变化及其与 IL-10, TGF- β_1 的关系

卢永刚¹, 刘凌云¹, 孙秀娟², 何沙¹, 吕一¹

(南方医科大学附属柳州医院 1. 肝胆胰外科 2. 病理科, 广西 柳州 545007)

摘要

目的: 观察大肠癌区域引流淋巴结中 CD4+CD25+ 调节性 T 细胞 (Treg) 情况及其与白细胞介素 10 (IL-10) 和转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 水平的关系。

方法: 用免疫组化法检测大肠癌患者 (淋巴结转移 32 例, 无转移 28 例) 区域引流淋巴结中 CD4+CD25+ 的表达 (Treg 细胞数目); ELISA 法检测外周血血清 IL-10 和 TGF- β_1 水平; 分析 Treg 数目与 IL-10 和 TGF- β_1 水平的相关性。

结果: CD4+CD25+ 在淋巴结转移患者阳性淋巴结中呈高表达, 阴性淋巴结中呈低表达, 而在无转移患者淋巴结中几乎无表达; 淋巴结转移患者阳性淋巴结 CD4+CD25+ 的 OD 值明显高于阴性淋巴结与无转移患者淋巴结 ($P=0.012$; $P=0.002$), 转移患者的阴性淋巴结与无转移患者淋巴结 OD 值差异未达统计学意义 ($P=0.115$)。淋巴结转移患者外周血血清 IL-10, TGF- β_1 水平均明显高于无转移患者 ($P=0.003$; $P=0.004$)。患者淋巴结 CD4+CD25+ 的 OD 值与血清 IL-10 或 TGF- β_1 浓度之间均呈明显正相关 ($r=0.683$, $P=0.000$; $r=0.532$, $P=0.000$)。

结论: 大肠癌患者区域引流淋巴结中 Treg 细胞水平与淋巴结转移密切相关, 血清 IL-10 或 TGF- β_1 水平可作为监测淋巴结转移的指标。

关键词

结直肠肿瘤; T 淋巴细胞, 调节性; 白细胞介素 10; 转化生长因子 β_1

中图分类号: R735.3 文献标志码: A



DOI:10.7659/j.issn.1005-6947.2013.10.014
<http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3659.shtml>

Alteration of Treg cells in regional draining lymph nodes in colorectal cancer and its relations with IL-10 and TGF- β_1 levels

LU Yonggang¹, LIU Lingyun¹, SUN Xiujuan², HE Sha¹, LU Yi¹

(1. Department of Hepatopancreatobiliary Surgery 2. Department of Pathology, the Affiliated Liuzhou Hospital, Southern Medical University, Liuzhou, Guangxi 545007, China)

Corresponding author: LIU Lingyun, Email: alllly@163.com

ABSTRACT

Objective: To observe the status of CD4+CD25+ regulatory T (Treg) cells in regional draining lymph nodes, and its relations with the levels of interleukin 10 (IL-10) and transforming growth factor β_1

基金项目: 广西区卫生厅自筹经费科研课题资助项目 (计划课题临床类 Z2010131 号)。

收稿日期: 2012-09-03; **修订日期:** 2013-03-26。

作者简介: 卢永刚, 南方医科大学附属柳州医院副主任医师, 主要从事肝胆胰外科、胃肠肿瘤基础及临床方面的研究。

通信作者: 刘凌云, Email: alllly@163.com

(TGF- β_1) in colorectal cancer.

Methods: The CD4+CD25+ expression (reflecting Treg cell number) in the regional draining lymph nodes from colorectal cancer (CRC) patients (32 cases with lymphatic metastasis and 28 cases with no lymphatic metastasis) was detected by immunohistochemical staining, the IL-10 and TGF- β_1 levels in peripheral blood serum of the patients were measured by ELISA assay and the correlations of Treg cell number with IL-10 and TGF- β_1 level were analyzed.

Results: The CD4+CD25+ presented high expression in positive lymph nodes and low expression in negative lymph nodes from the CRC patients with lymphatic metastasis respectively, while nearly no expression in the lymph nodes from patients without lymphatic metastasis; the CD4+CD25+ OD value in positive lymph nodes from metastatic patients was significantly higher than that in negative lymph nodes from metastatic patients and in lymph nodes from non-metastatic patients ($P=0.012$ and $P=0.002$), but difference between negative lymph nodes from metastatic patients and lymph nodes from non-metastatic patients did not reach a statistical significance ($P=0.115$). Both IL-10 and TGF- β_1 levels in peripheral blood serum from metastatic patients were significantly higher than those from non-metastatic patients ($P=0.003$ and $P=0.004$). There was a significant correlation between the CD4+CD25+ OD value in lymph nodes and either serum IL-10 or TGF- β_1 concentration in the patients ($r=0.683, P=0.000; r=0.532, P=0.000$).

Conclusion: In colorectal cancer patients, Treg cell number in regional draining lymph nodes is closely related to lymphatic metastasis, and serum IL-10 or TGF- β_1 level can be used as an indicator for monitoring the lymphatic metastasis.

KEY WORDS Colorectal Neoplasms; T-Lymphocytes, Regulatory; Interleukin-10; Transforming Growth Factor beta 1

CLC number: R735.3 **Document code:** A

DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.10.014

近年来我国大肠癌发病率和病死率明显上升, 其防治形势十分严峻。CD4+CD25+ 调节性 T 细胞 (CD4+CD25+ regulatory T cell, Treg) 是一种免疫抑制细胞^[1], 能抑制机体免疫功能^[2-3], 降低恶性肿瘤患者的抗肿瘤免疫能力^[4], 在肿瘤免疫逃逸过程中发挥重要作用^[5]。大肠癌区域引流淋巴结中 Treg 的研究报道较少, 本研究通过检测大肠癌区域引流淋巴结中 Treg 的水平, 初步探讨其与大肠癌患者淋巴结转移的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

按照时间顺序随机选择 2009 年 1 月—2012 年 1 月在柳州医院住院接受手术治疗的结直肠癌患者 60 例, 男 36 例, 女 24 例, 年龄 36~73 岁, 平均 (56.4 ± 10.1) 岁。入选标准: 所有患者经手术及术后病理组织学检查确诊, 手术前 1 个月未接受抗肿瘤治疗, 手术前 2 个月未使用免疫调节剂, 无近期严重感染病史和自身免疫病史, 术

前及术中均未发现其他部位肿瘤转移。患者术中均清扫区域引流淋巴结, 术后病理证实有淋巴结转移者 32 例, 无转移 28 例。

1.2 主要试剂及仪器

即用型 CD4 兔抗人单克隆抗体 (产品编号 RMA-0620, 福州迈新生物技术开发有限公司), 鼠抗人白介素 2 受体 (CD25) 单克隆抗体 (型号 ZM-0042, 中杉金桥公司); 白细胞介素 10 (IL-10)、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 酶联免疫吸附试验试剂盒 (ELISA) (灵敏度: 5 pg/mL, RapidBio Lab 公司, 美国), Multiskan MK3 酶标仪 (Thermo Electron Corporation 公司, 美国)。

1.3 检测方法

1.3.1 免疫组化 SP 法检测大肠癌区域引流淋巴结中 Treg 细胞 (1) 染色步骤: 全部标本组织由 10% 福尔马林溶液固定, 常规脱水后石蜡包埋。石蜡切片常规脱蜡、水化、抗原修复, 即用型 CD4 兔抗人单克隆抗体、CD25 单克隆抗体免疫组化染色, 二氨基联苯胺显色, 苏木素复染。(2) 结果判定: CD4+ 和 CD25+ 均表达在淋巴结

中 CD4+T 淋巴细胞胞膜上, 颗粒呈棕黄色。
 (3) 评估标准: 使用病理图像分析仪(正置显微镜及数据分析系统)双盲法阅片。以标本细胞膜上出现棕黄色颗粒为阳性细胞。对 CD4+ 和 CD25+ 进行定量分析, 即先在低倍镜下($\times 100$)筛选出 CD4+ 和 CD25+ 表达较强的区域, 然后在这些区域中随机选取 5 个高倍视野($\times 400$), 每个视野随机选取 5 个阳性位点测其光密度值(OD 值), 取其平均值。阳性细胞数目越多其 OD 值越大。

1.3.2 ELISA 法检测外周血血清 IL-10 和 TGF- β_1 水平 各组于术前 1 d 空腹采集全血约 3 mL, 高速离心机以 2 000 r/min 高速离心 5 min 后收集上层血清约 0.5 mL 放置 -20 °C 冰箱保存备用。检测均严格按照试剂盒说明书操作。

1.4 统计学处理

使用 SPSS15.0 软件进行统计分析。计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较

采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组数据间的相关关系用双变量相关分析方法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者淋巴结中 CD4+CD25+ 的表达

免疫组化方法检测显示, 在淋巴结转移患者中, CD4+CD25+ 在阳性淋巴结呈高表达, 在阴性淋巴结呈低表达, 而在淋巴结无转移患者淋巴结中几乎无 CD4+CD25+ 表达(图 1), 而淋巴结转移患者淋巴结中均有不同程度的 CD4+CD25+ 表达。将不同性质淋巴结 CD4+CD25+ 的 OD 值进行比较显示, 淋巴结转移患者阳性淋巴结 CD4+CD25+ 的 OD 值明显高于阴性淋巴结与无转移患者淋巴结 ($P=0.012$; $P=0.002$); 转移患者的阴性淋巴结与无转移患者淋巴结 OD 值差异未达统计学意义 ($P=0.115$) (表 1)。

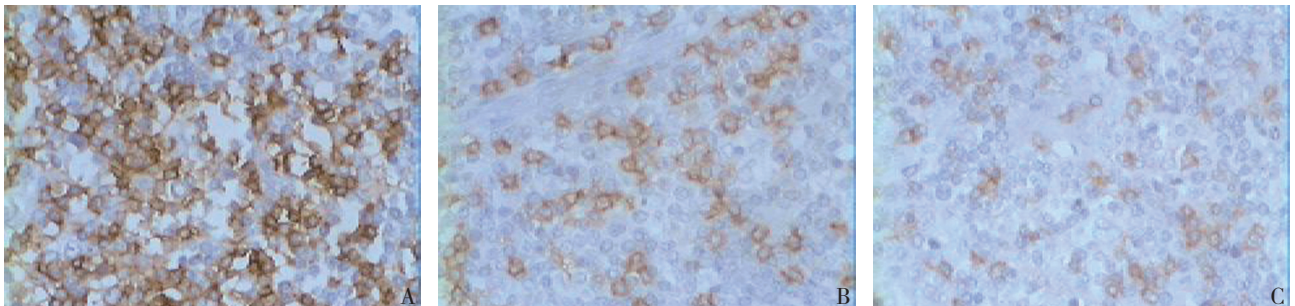


图 1 不同性质淋巴结中 CD4+CD25+ 的表达($\times 400$) A: 淋巴结转移患者阳性淋巴结; B: 淋巴结转移患者阴性淋巴结; C: 无转移患者淋巴结

Figure 1 CD4+CD25+ expression in lymph nodes of different properties ($\times 400$) A: Positive lymph node from metastatic patient; B: Negative lymph node from metastatic patient; C: Lymph node from non-metastatic patient

表 1 不同性质淋巴结中 CD4+CD25+ 的 OD 值比较
 Table 1 Comparison of CD4+CD25+ OD values among lymph nodes of different properties

淋巴结	<i>n</i>	OD 值
转移患者阳性淋巴结	32	0.162 \pm 0.061
转移患者阴性淋巴结	32	0.103 \pm 0.021
无转移患者淋巴结	28	0.046 \pm 0.002

2.2 淋巴结转移患者与无转移患者血清 IL-10, TGF- β_1 浓度

大肠癌淋巴结转移组血清 IL-10, TGF- β_1 浓度均高于大肠癌淋巴结无转移组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (表 2)。

表 2 淋巴结转移患者与无转移患者 IL-10, TGF- β_1 水平比较

Table 2 Comparison of IL-10 and TGF- β_1 levels between metastatic patients and non-metastatic patients

组别	<i>n</i>	IL-10 (pg/mL)	TGF- β_1 (pg/mL)
淋巴结转移组	32	136.23 \pm 14.16	147.98 \pm 17.13
淋巴结无转移组	28	60.03 \pm 15.85	75.15 \pm 6.65
<i>P</i>		0.003	0.004

2.3 Treg 数与 IL-10 及 TGF- β_1 的相关性

相关性分析显示, 大肠癌患者区域引流淋巴结中 CD4+CD25+ 的 OD 值与 IL-10 或 TGF- β_1

浓度之间均呈高度正相关 ($r=0.683$, $P=0.000$; $r=0.532$, $P=0.000$)。

3 讨论

恶性肿瘤的发生、发展与机体免疫机制失衡有关,而阐明其发生、发展及预后与机体免疫功能状态的关系,可能有助于新的治疗方法的建立。

近年来,研究^[6-7]发现Treg与恶性肿瘤的发生、发展、转移及肿瘤患者的生存率密切相关,Treg已成为肿瘤免疫领域的研究热点^[8]。Treg可分为天然性和适应性Treg两大类,目前适应性Treg研究较多,其主要由T淋巴细胞在免疫应答过程中诱导分化产生,并且利用自身合成的细胞因子TGF- β (主要是TGF- β ₁)和IL-10发挥免疫抑制效应^[9]。Treg也可形成使效应细胞转变成免疫抑制细胞的微环境,使一些CD4+CD25-T细胞能被Treg诱导并分泌TGF- β 或IL-10^[10]。研究^[11]还发现Treg可能通过穿孔素-颗粒酶这一途径介导免疫抑制效应。Treg在防止自身免疫性疾病发生的过程中起重要作用,而在该过程中IL-10和TGF- β 功不可没^[12]。Misra等^[13]发现IL-10是肿瘤生长的必需物质,且能促进恶性肿瘤免疫逃逸^[14]。TGF- β 及其受体的异常在肿瘤生成、浸润、转移过程中起重要作用。Akhurst^[15]在体外和体内研究中均发现,TGF- β ₁表达水平越高,结肠癌的癌细胞浸润转移能力越强,癌症相关病死率越高。

已经证实^[16],结直肠癌患者机体细胞免疫功能处于抑制状态。本研究发现,大肠癌患者区域转移淋巴结中Treg表达明显增加,并且部分由其合成的血清TGF- β ₁和IL-10水平相应增多,表明Treg对大肠癌患者机体抗肿瘤免疫产生了一定的抑制效应,而细胞因子TGF- β ₁及IL-10在这一效应中可能起关键作用,提示Treg可能在大肠癌患者癌细胞的发展、侵袭、转移过程中发挥重要作用。

Treg对于调节肿瘤免疫应答及抗肿瘤免疫治疗有特殊意义。Imai等^[17]发现敲除Treg可增强结肠腺癌小鼠模型由IL-2介导的抗肿瘤反应。CD25特异性抗体已被试用于治疗黑色素瘤和结肠癌患者^[18-19]。可以推测,通过某些方法下调

大肠癌患者机体Treg的表达或去除其功能,例如采用封闭性抗体抑制其效应细胞因子TGF- β ₁和IL-10的表达或减弱其体内活性,有可能降低Treg在大肠癌患者体内所产生的免疫抑制作用,从而增强其机体抗肿瘤免疫功能,以致提高大肠癌疗效和改善预后。而Treg在大肠癌发展、侵袭、转移过程中与其他降低机体抗肿瘤免疫效应的因素之间的关系尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. *J Immunol*, 1995, 155(3):1151-1164.
- [2] 张育超,王惠英,吕永添,等.胃癌患者围手术期CD4+CD25+调节性T细胞的变化及其意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2008, 17(5):504-505.
- [3] 束平,秦净,秦新裕,等. M2型巨噬细胞和调节性T细胞在胃癌组织中的表达及其预后预测价值[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2011, 5(14):368-371.
- [4] Clarke SL, Betts GJ, Plant A, et al. CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer[J]. *PLoS One*, 2006, 1:e129.
- [5] Nummer D, Suri-Payer E, Schmitz-Winnenthal H, et al. Role of tumor endothelium in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell infiltration of human pancreatic carcinoma [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(15):1188-1199.
- [6] Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells[J]. *J Exp Med*, 2004, 199(10):1401-1408.
- [7] Sugihara AQ, Rolle CE, Lesniak MS. Regulatory T cells actively infiltrate metastatic brain tumors[J]. *Int J Oncol*. 2009, 34(6):1533-1540.
- [8] 卢永刚,刘凌云,何沙. CD4⁺CD25⁺调节性T细胞与肿瘤免疫的研究进展[J]. *中国现代普通外科进展*, 2013, 16(2):134-137.
- [9] Muller AJ, Scherle PA. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(8):613-625.
- [10] Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, et al. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells[J]. *J Exp Med*, 2002, 196(2):255-260.
- [11] Cao X, Cai SF, Fehniger TA, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance[J]. *Immunity*, 2007, 27(4):635-646.

- [12] Huang X, Zhu J, Yang Y. Protection against autoimmunity in nonlymphopenic hosts by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is antigen-specific and requires IL-10 and TGF-β[J]. *J Immunol*, 2005, 175(7):4283-4291.
- [13] Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, et al. Cutting edge: human CD4⁺CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells[J]. *J Immunol*, 2004, 172(8):4676-4680.
- [14] Mullins DW, Martins RS, Burger CJ, et al. Tumor cell-derived TGF-β and IL-10 dysregulate paclitaxel-induced macrophage activation[J]. *J Leukoc Biol*, 2001, 69(1):129-137.
- [15] Akhurst RJ. TGF-β antagonists: why suppress a tumor suppressor?[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(12):1533-1536.
- [16] 郑晶宏, 田翠, 宫东尧. 结、直肠癌患者 T 淋巴细胞亚群、红细胞免疫功能的研究 [J]. *山东医科大学学报*, 1998, 36(1):68-70.
- [17] Imai H, Saio M, Nonaka K, et al. Depletion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells enhances interleukin-2-induced antitumor immunity in a mouse model of colon adenocarcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(3):416-423.
- [18] Jacobs JF, Punt CJ, Lesterhuis WJ, et al. Dendritic cell vaccination in combination with anti-CD25 monoclonal antibody treatment: a phase I/II study in metastatic melanoma patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(20):5067-5078.
- [19] Okita R, Yamaguchi Y, Ohara M, et al. Targeting of CD4⁺CD25^{high} cells while preserving CD4⁺CD25^{low} cells with low-dose chimeric anti-CD25 antibody in adoptive immunotherapy of cancer[J]. *Int J Oncol*, 2009, 34(2):563-572.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 卢永刚, 刘凌云, 孙秀娟, 等. 大肠癌区域引流淋巴结中 Treg 细胞的变化及其与 IL-10, TGF-β 1 的关系 [J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(10):1302-1306. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.10.014

Cite this article as: LU YG, LIU LY, SUN XJ, et al. Alteration of Treg cells in regional draining lymph nodes in colorectal cancer and its relations with IL-10 and TGF-β1 levels [J]. *Chin J Gen Surg*, 2013, 22(10):1302-1306. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.10.014

欢迎订阅 2014 年《中国普通外科杂志》

《中国普通外科杂志》是国内外公开发行的国家级期刊 (ISSN1005-6947/CN43-1213/R), 面向广大从事临床、教学、科研的普外及相关领域工作者, 以实用性为主, 及时报道普通外科领域的新进展、新观点、新技术、新成果、实用性临床研究及临床经验, 是国内普外学科的权威刊物之一。办刊宗旨是: 传递学术信息, 加强相互交流; 提高学术水平, 促进学科发展; 注重临床研究, 服务临床实践。

本刊由国家教育部主管, 中南大学主办, 中南大学湘雅医院承办。主编吕新生教授, 王志明教授, 顾问由中国科学院及工程院院士汤钊猷、吴孟超、吴咸中、汪忠镐、郑树森、黄洁夫、黄志强、黎介寿、赵玉沛、夏家辉、夏穗生等多位国内外著名普通外科专家担任, 编委会成员由国内外普通外科资深专家学者组成。开设栏目有述评、专题研究、基础研究、临床研究、简要论著、临床报道、文献综述、误诊误治与分析、手术经验与技巧、国内外学术动态, 病案报告。本刊已被多个国内外重要检索系统和大型数据库收录, 如: 美国化学文摘 (CA), 俄罗斯文摘 (AJ), 中国科学引文数据库 (CSCD), 中文核心期刊 (中文核心期刊要目总览 2008, 2011 年版), 中国科技论文与引文数据库 (中国科技论文统计源期刊), 中国核心学术期刊 (RCCSE), 中国学术期刊综合评价数据库, 中国期刊网全文数据库 (CNKI), 中文科技期刊数据库, 中文生物医学期刊文献数据库 (CMCC), 万方数据-数字化期刊群, 中国生物医学期刊光盘版等, 影响因子已居同类期刊前列, 并在科技期刊评优评奖活动中多次获奖。

本刊已全面采用远程投稿、审稿、采编系统, 出版周期短, 时效性强。欢迎订阅、赐稿。

《中国普通外科杂志》为月刊, 国际标准开本 (A4 幅面), 每期 120 页, 每月 15 日出版。内芯采用进口亚光铜版纸印刷, 图片彩色印刷, 封面美观大方。定价 25.0 元 / 册, 全年 300 元。国内邮发代号: 42-121; 国际代码: M-6436。编辑部可办理邮购。

本刊编辑部全体人员, 向长期以来关心、支持、订阅本刊的广大作者、读者致以诚挚的谢意!

编辑部地址: 湖南省长沙市湘雅路 87 号 (湘雅医院内) 邮政编码: 410008

电话 (传真): 0731-84327400 网址: <http://www.zpwz.net> Email: pw4327400@126.com

中国普通外科杂志编辑部