

· 临床研究 ·

CD4⁺CD25^{high}调节 T 细胞在膀胱癌微环境中的检测及临床意义

张 强, 李进铭, 刘俊波, 谢超帆, 杨雪松

(川北医学院附属医院泌尿外科, 四川南充 637000)

Expression and clinical significance of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in microenvironment of bladder cancer

ZHANG Qiang, LI Jin-ming, LIU Jun-bo, XIE Chao-fan, YANG Xue-song

(Department of Urology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

ABSTRACT: **Objective** To analyze the expression and significance of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in bladder cancer and normal bladder tissues. **Methods** The expression of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in 80 cases of bladder cancer and 50 cases of normal bladder tissues was analyzed with immunohistochemistry, and the correlation between expression of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells and clinicopathological features was discussed. **Results** Bladder cancer tissues had significantly higher percentage of CD4⁺CD25^{high} regulating T cells than normal bladder tissues [(34.79±1.05)% vs. (7.86±0.82)%]. The expression of CD4⁺CD25^{high} regulated T cells was positively correlated with pathological grade of bladder tumors ($P=0.02$), but not with gender, age or lymphatic metastasis ($P>0.05$). **Conclusion** CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells are highly expressed in bladder cancer tissues, which is correlated with the pathological grade of bladder cancer. The increase of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells may be related to the pathogenesis and progression of bladder cancer.

KEY WORDS: bladder neoplasm; immunosuppression; cytokine; T lymphocyte; Foxp3

摘要: **目的** 分析 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞在膀胱癌及正常膀胱组织中的分布及其意义。 **方法** 通过免疫组织化学法, 分析 80 例膀胱癌患者及 50 例正常膀胱组织中 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞的分布差异情况, 并探讨其与临床病理特征之间的相关性。 **结果** 相较于正常的膀胱组织, 膀胱癌组织中 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞所占百分比 [(34.79±1.05)%] 高于对照组 [(7.86±0.82)%], 差异具有显著统计学意义。 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞含量与肿瘤的病理分级呈正相关, 差异具有统计学意义 ($P=0.02$), CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞在膀胱肿瘤微环境中的分布情况与性别、年龄、淋巴转移之间无统计学差异 ($P>0.05$)。 **结论** CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞在膀胱癌组织中的含量显著增加, 且与膀胱肿瘤的病理分级呈相关性, 其揭示 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞含量的增加可能与疾病的发生与进展有关。

关键词: 膀胱肿瘤; 免疫抑制; 细胞因子; T 淋巴细胞; Foxp3

中图分类号: R737.14

文献标志码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1009-8291.2020.04.007

随着人类寿命的增加及工业化程度的提升, 膀胱癌发病率呈上升趋势。据美国癌症学会统计资料显示, 在全身肿瘤中, 膀胱癌位列所有恶性肿瘤的第 9 位, 在男性人群中发病率上升至第 6 位。同样不难发现, 在国内膀胱癌已位居泌尿系肿瘤的第 1 位, 且发病率呈不断上升趋势。膀胱癌因其高复发率、再发恶性程度高及对放化疗敏感性差等问题成为临床治疗的难点。面对包括外科手术在内的各种治疗方案存在的局限性, 免疫治疗成为一个新的研究领域。不管是在动物实验还是在人类肿瘤学的基础研究当中。

免疫治疗都是科研人员手中不可替代的手段^[1-2]。在 T 细胞的所有种类中, 存在着一种具有调节免疫功能的细胞亚群, 调节性 T 细胞 (Treg 细胞), 随着研究的深入, 该类细胞可能在免疫逃逸的作用机制上扮演重要作用^[3]。Treg 细胞在人体内环境中含量的增加可能导致免疫功能的低下。为了探求 Treg 细胞与膀胱癌发生发展的关系, 本研究着重探讨调节性 T 细胞在膀胱肿瘤细胞微环境中的表达及与肿瘤进展、复发、预后的相关性。

1 材料与方法

1.1 一般资料 收集川北医学院附属医院泌尿外科 2016 年 8 月至 2018 年 8 月行膀胱肿瘤等离子电切术患者肿瘤组织 80 例及正常膀胱组织 50 例, 其正常组织取自于膀胱颈部。膀胱肿瘤组平均年龄 (56.7±

收稿日期: 2019-10-06

修回日期: 2020-01-05

基金项目: 南充市市校科技战略合作项目 (No. 18SXHZ0538); 南充市市校科技战略合作项目 (No. 19SXHZ0332)

通信作者: 杨雪松, 医学博士, 副教授。研究方向: 泌尿系肿瘤基础与临床。E-mail: 33047383@qq.com

作者简介: 张强, 医学硕士, 医师。研究方向: 泌尿系肿瘤基础与临床。E-mail: 877135638@qq.com

2.35)岁,其中男性39例,女性41例;随访12个月后,局部复发11例;正常组平均年龄(55.9±2.89)岁;随访12个月后,局部复发15例。

1.2 实验试剂及方法 主要试剂:羊抗人 Foxp3 单克隆抗体、DAB 显色试剂盒、即用型免疫组化 Elivision TM plus 试剂盒、磷酸盐缓冲液。待检病理标本经甲醛液固定、石蜡包埋及切片工序后进行脱蜡水化及抗原修复。经 PBS 漂洗后滴加羊抗人 Foxp3 单克隆抗体,室温下孵育,滴加生物素标记兔抗羊 IgG 聚合物,室温下孵育,经 PBS 漂洗后滴加新鲜配制的 DAB 显色试剂;冲洗,苏木素复染,0.1%(体积分数)盐酸乙醇分化,滴加 PBS 返蓝,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

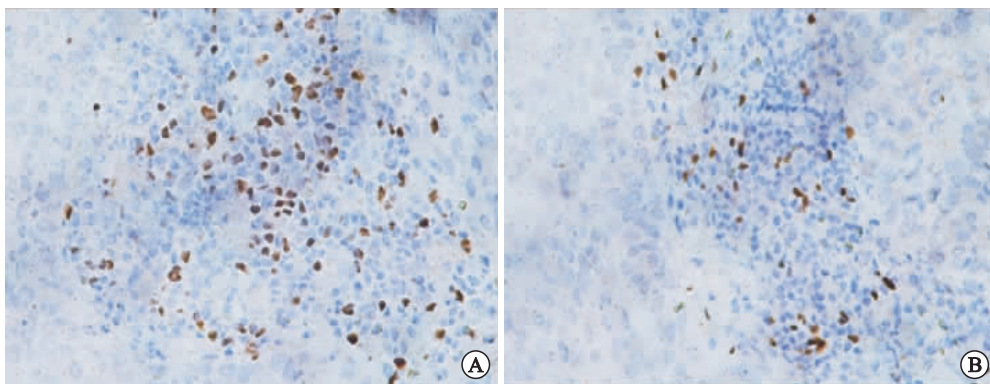
1.3 结果判定 以 Foxp3 为标记物检测 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞在膀胱癌中的表达,观察主要通过细胞内含有 Foxp3 的数量与总体的比值,来间接反映 Treg 细胞的分布情况。具体执行方案为在低倍镜下观察含有 Foxp3 的阳性细胞大体数量,调至高倍镜下随机选取 5 个视野统计每 100 个细胞中 Foxp3 表达阳性的细胞数量,阳性百分数大于 0%且

小于 25%,标记为(+);阳性百分数介于 25%~50%,标记为(++);阳性百分数介于 50%~100%,标记为(+++)。为减少人为偏倚,分别由 2 位独立研究员统计后取平均值,若差异较大,则由第三方研究员介入后再行统计分析。

1.4 统计学方法 运用 SPSS 17.0 进行统计学分析,测量值均采用均 $\bar{x} \pm s$ 方式呈现。不同的阳性梯度及与临床病理特征相关性研究,采用 χ^2 检验;肿瘤组 Treg 细胞含量水平与对照组之间采用 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞在不同组织中的差异表达 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞在膀胱各种病理及生理过程中均见不同水平表达(图 1)。在膀胱癌组织中,其阳性率为(34.79±1.05)%,高于正常膀胱组的(7.86±0.82)%。二者之间的差异具有统计学意义($P<0.01$)(图 2)。以 Foxp3 的阳性细胞百分数 25%为界,分为高密度组与低密度组,两组间差异无统计学意义($P \geq 0.05$,表 1)。



A: 高密度分布;B: 低密度分布。

图 1 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞在膀胱尿路上皮癌微环境中不同密度分布情况(Elivision, ×400)

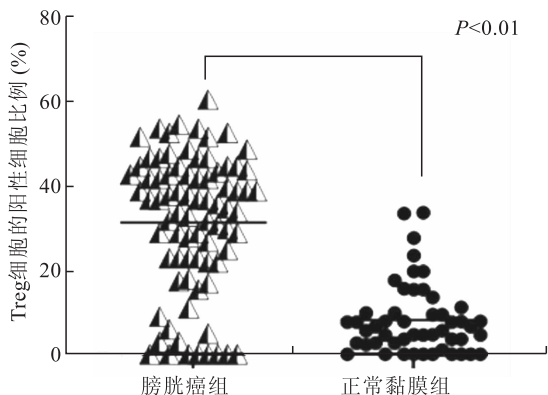


图 2 膀胱中 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞在不同微环境中的水平变化

表 1 不同膀胱微环境下 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞的表达

组别	例数	CD4 ⁺ CD25 ^{high} Treg 细胞		χ^2 值	P 值
		阳性[例(%)]			
		+	++~+++		
膀胱癌组	73	58(79.45)	15(20.55)		
对照组	38	36(94.74)	2(5.26)	4.50	0.034

2.2 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞含量与不同临床参数相关性 对于不同年龄、性别以及是否合并淋巴结转移,各组 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞的阳性表达率无显著统计学差异($P \geq 0.05$),但对于不同的病理分级之间差异却具有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。

表 2 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞表达与临床病理特征的关系

临床参数	例数	CD4 ⁺ CD25 ^{high} Treg 细胞[例(%)]		χ^2 值	P 值
		-	+~++++		
性别				0.09	0.76
男	79	14(17.72)	65(82.28)		
女	51	8(15.69)	43(84.31)		
年龄				2.08	0.15
≥60 岁	77	10(12.97)	67(87.03)		
<60 岁	53	12(22.64)	41(77.36)		
淋巴转移				0.05	0.88
有	16	3(18.75)	13(81.25)		
无	64	11(17.19)	53(82.81)		
病理分级				5.35	0.02
Ta	45	10(22.22)	35(77.78)		
T1	31	1(3.02)	30(96.98)		

3 讨论

在 20 世纪八十年代,ROSENBERG 等^[4]首先报道了 T 淋巴细胞亚群在浸润性肿瘤中在对肿瘤免疫方面有阻止作用。调节 T 细胞拥有众多亚群,如 Tr1、Th3 以及研究较多的 CD8⁺Treg 细胞。根据来源不同,又进一步细分为自然型及诱导型 Treg 细胞^[3]。近年来,肿瘤微环境的概念提出及进一步研究,揭示肿瘤微环境与肿瘤细胞的生长、衰亡及转移等生物学行为密切相关^[5-6]。随着肿瘤免疫治疗领域的进一步拓展,发现 Treg 细胞对 NK 细胞具有抑制作用,并能够减少细胞因子的分泌,且能对单核巨噬细胞在内的众多免疫细胞起抑制或减少作用^[7-8]。Foxp3 是人类中具有高度保守特征的一类生长因子,最早由 BRUNKOW 等^[9]于本世纪初最先提出,是公认的 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞最具有特异性的表达标志物。虽然在不同 T 细胞亚群中,Foxp3 都可表达,但与 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞相比 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞内 Foxp3 表达含量高 30 倍以上^[10]。KRYCZEKL 等^[11]通过一系列实验也证实,肿瘤细胞的免疫抑制水平与 Foxp3 表达含量呈显著相关性,Foxp3 是 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞发挥免疫效能的关键因子还间接影响细胞的生长与发育。

查阅既有文献信息,胃癌患者外周血内 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞含量水平与术后病检分期呈正相关性,且瘤体组织切除后,该细胞含量呈下降趋势,其

中部分胃癌复发患者,CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞含量又呈现上升现象^[12]。同样,在肺癌组织及转移淋巴结中,CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞含量也显著高于普通机体组织^[13]。进一步研究可以看到,在乳腺癌、食管癌等实体肿瘤的外周血及瘤体组织或其淋巴结转移灶中 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞含量表达水平也显著高于其对照组^[14-15]。在膀胱癌研究领域,国内外研究主要集中于肿瘤患者外周血 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞含量水平变化,而肿瘤组织内部与正常膀胱组织的对比研究是一个新的研究领域。对于肿瘤患者 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞含量增多的具体机制尚不清楚,可能与以下因素有关:肿瘤形成的慢性炎症性微环境作用下刺激机体产生的一种生理防御;肿瘤细胞可能分泌未知的一些细胞因子刺激 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞的增殖;肿瘤细胞所具有的特异性抗原通过免疫性提呈细胞作用促使 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞的增殖^[16]。

本研究通过实验发现,CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞在膀胱癌组织中的含量显著增加,且与膀胱肿瘤的病理分级呈相关性,其与已有研究在膀胱癌人群外周血中 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞高于正常人群的研究结果一致。其揭示 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞含量的增加可能与疾病的发生与进展有关。具体作用机制尚待进一步的实验研究来加以证实。

参考文献:

- [1] COUDERC B,ZITVOGEL L,DOUIN EV,et al. Enhancement of anti-tumor immunity by expression of CD70 (CD27 ligand) or CD154(CD40 ligand) costimulatory molecules in tumor cells[J]. Cancer Gene Ther,1998,5(3):163-175.
- [2] WYSOCKI PJ,KARCZEWSKA DA,MACKIEWICZ WM,et al. Human cancer gene therapy with cytokine gene-modified cells [J]. Expert Opinion on Biol Therapy,2004,4(10):1595-1607.
- [3] MOUGIAKAKOS D,CHOUDHURY A,LADSER A. Regulatory T cells in cancer[J]. Adv Cancer Res,2010,107:57-117.
- [4] ROSENBERG SA SPIESS P,LAFRENIERE R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes[J]. Science,1986,233(4770):1318-1321.
- [5] HANAHAHAN D,WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell,2011,144(5):646-674.
- [6] KALINSKI P,TALMADGE JE. Tumor immuno-environment in cancer progression and therapy [J]. Adv Exp Med Biol,2017,1036:1-18.
- [7] AZUMA T,TAKAHASHI T,KUNISATO A. et al. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell suppress NK T cell functions[J]. Cancer Res,2003,63(15):4516-4520.

(下转第 333 页)

- mining identifies cell cycle transcripts that predict non-indolent Gleason score 7 prostate cancer[J]. *BMC Urol*, 2019, 19(1):4.
- [7] 李雪贝, 张良, 饶太文, 等. 血清睾酮水平预测前列腺癌骨转移的临床研究[J]. *中华男科学杂志*, 2017, 23(3):212-216.
- [8] HASHIMOTO K, TABATA H, SHINDO T, et al. Serum testosterone level is a useful biomarker for determining the optimal treatment for castration-resistant prostate cancer[J]. *Urol Oncol*, 2019, 37(7):485-491.
- [9] AKITAKE N, SHIOTA M, OBATA H, et al. Neoadjuvant androgen-deprivation therapy with radical prostatectomy for prostate cancer in association with age and serum testosterone[J]. *Prostate Int*, 2018, 6(3):104-109.
- [10] DANIEL W, WARBURTON, CHRISTOPHER, et al. Testosterone replacement therapy and the risk of prostate cancer[J]. *Asian J Androl*, 2015, 17(6):878-881.
- [11] BELL MA, CAMPBELL JD, JOICE G, et al. Shifting the paradigm of testosterone replacement therapy in prostate cancer[J]. *World J Mens Health*, 2018, 36(2):103-109.
- [12] YUAN, CHEN-YI, JIANG, et al. Low serum testosterone predicts upgrading and upstaging of prostate cancer after radical prostatectomy[J]. *Asian J Androl*, 2016, 18(4):639-643.
- [13] DE AGAML, GUGLIELMETTI GB, BARBOSA JABA, et al. Low serum testosterone is a predictor of high-grade disease in patients with prostate cancer[J]. *Rev Assoc Med Bras*, 2017, 63(8):704-710.
- [14] LLUKANI E, KATZ BF, AGALLIU I, et al. Low levels of serum testosterone in middle-aged men impact pathological features of prostate cancer[J]. *Prostate Int*, 2017, 5(1):17-23.
- [15] RØDGER MA, CHRISTENSEN IJ, BERG KD, et al. Serum testosterone level as a predictor of biochemical failure after radical prostatectomy for localized prostate cancer[J]. *BJU Int*, 2012, 109(4):520-524.
- [16] YAMAMOTO S, YONESE J, KAWAKAMI S, et al. Preoperative serum testosterone level as an independent predictor of treatment failure following radical prostatectomy[J]. *Eur Urol*, 2007, 52(3):696-701.
- [17] UJIKE T, UEMURA M, KAWASHIMA A, et al. A novel model to predict positive prostate biopsy based on serum androgen level[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2018, 25(1):59-67.
- [18] FRIEDERSDORFF F, MANUS P, MILLER K, et al. Serum testosterone improves the accuracy of prostate health index for the detection of prostate cancer[J]. *Clin Biochem*, 2014, 47(10/11):916-920.
- [19] GARCÍA-CRUZ E, CARRIÓN PUIG A, GARCÍA-LARROSA A, et al. Higher sex hormone-binding globulin and lower bioavailable testosterone are related to prostate cancer detection on prostate biopsy[J]. *Scand J Urol*, 2013, 7(4):282-289.
- [20] MEARINI L, ZUCCHI A, NUNZI E, et al. Low serum testosterone levels are predictive of prostate cancer[J]. *World J Urol*, 2013, 31(2):247-252.

(编辑 何宏灵)

(上接第318页)

- [8] LI X, LI D, HUANG X, et al. Helios expression in regulatory T cells promotes immunosuppression, angiogenesis and the growth of leukemia cells in pediatric acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia Res*, 2018, 67:60-66.
- [9] BRUNKOW ME, JEFFERY EW, HJERRILD K A, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse[J]. *Nature Genetics*, 2001, 27(1):68.
- [10] FONTENOT JD, GAVIN MA, RUDENSKY AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(4):330-336.
- [11] SOARES PLM, MONTEIRO GST, RICARDO I, et al. Regulatory T cell and forkhead box protein 3 as modulators of immune homeostasis[J]. *Frontiers in Immunol*, 2017, 8(605):1-24.
- [12] KONO K, KAWAIDA H, TAKAHASHI A, et al. CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2006, 55(9):1064-1071.
- [13] YAN S, ZHANG Y, SUN B. The function and potential drug targets of tumour-associated Tregs for cancer immunotherapy[J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(2):179-186.
- [14] BATES GJ, FOX SB, HAN C, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(34):5373-5380.
- [15] FREDERICK S, VARN, DAVID W, MULLINS, et al. Adaptive immunity programmes in breast cancer[J]. *Immunology*, 2017, 150(1):25-34.
- [16] YI H, WEIBO Q, LI S, et al. Effect of TGF- β 1 on blood CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cell proliferation and Foxp3 expression during non-small cell lung cancer blood metastasis[J]. *Experimental and Therap Med*, 2018, 16(2):1403-1410.

(编辑 何宏灵)