

子宫颈癌患者 Treg 及 Th 细胞因子测定的临床意义^{*}

谭玉洁^{1,2}, 谢春霞¹, 张 惠^{1,2}, 马 莉¹ (1. 贵州医科大学附属医院中心实验室, 贵阳 550001; 2. 贵州医科大学附属白云医院检验科, 贵阳 550014)

【摘要】 目的 研究调节性 T 细胞(Treg)与 Th 细胞因子 IFN- γ 、IL-4 在子宫颈癌患者外周血中的表达水平, 探讨其与人乳头瘤病毒(HPV)感染的宫颈疾病之间的关联。**方法** 应用流式细胞及酶联免疫吸附技术检测 40 例子宫颈癌、35 例宫颈上皮内瘤变(CIN)、20 例宫颈炎患者及 20 例健康对照组外周血中 Treg 及 IFN- γ 、IL-4 的水平; 统计观察 Treg 与 IFN- γ 及 IL-4 水平的相关性。**结果** 子宫颈癌组 Treg 的水平显著高于健康对照组、宫颈炎组及 CIN 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。子宫颈癌患者血清中 IFN- γ 水平明显低于健康对照组及宫颈炎组($P < 0.05$)。子宫颈癌患者血清中 IL-4 水平明显高于健康对照组、宫颈炎组及 CIN 组($P < 0.05$)。Treg 的水平与 IFN- γ 的水平呈负相关关系($r = -0.291, P < 0.05$); 而与 IL-4 水平呈正相关关系($r = 0.383, P < 0.05$)。**结论** Treg 的高水平以及 Th 细胞因子失衡可能在子宫颈癌患者免疫耐受以及子宫颈癌前病变进展至子宫颈癌的过程中发挥重要的作用; Treg 与 IFN- γ 及 IL-4 存在相关性, Treg 与 Th 细胞因子 IFN- γ 及 IL-4 可能共同参与了子宫颈癌的发病机制。

【关键词】 子宫颈癌; 调节性 T 细胞; IFN- γ ; IL-4

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.09.009 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)09-1174-03

The clinical significance of regulatory T cells, IFN- γ and IL-4 in patients of cervical cancer^{*} TAN Yu-jie^{1,2}, XIE Chun-xia¹, ZHANG Hui^{1,2}, MA Li¹ (1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital Of Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 550001, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Baiyun Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 550014, China)

【Abstract】 Objective To investigate the level of regulatory T cells, IFN- γ and IL-4 and in cervical cancer, then to analyze the correlation with the occurrence of the disease. **Methods** 40 cervical cancer patients, 35 cervical intraepithelial neoplasias, 20 cervicitis patients and 20 health controls were selected, flow cytometry and enzyme-linked immunosorbant assay were employed for the ratio of regulatory T cells and IL-4 and IFN- γ ; analyze the correlation of Treg cells with IFN- γ and IL-4. **Results** The ratio of regulatory T cells in cervical cancer was significantly higher than that in health controls, cervicitis disease and CIN. The IFN- γ concentration in cervical cancer was significantly lower than that in health controls and cervicitis disease ($P < 0.05$). IL-4 concentration in the cervical cancer was significantly higher than that in health controls, the cervicitis disease and CIN ($P < 0.05$). The level of Treg cells was negatively relevant to IFN- γ ($r = -0.291, P < 0.05$) and positively relevant to IL-4 ($r = 0.383, P < 0.05$). **Conclusion** The high level of Treg cells may play a crucial role in the immune tolerance and cervical precancerous lesions progress to cervical cancer. With CIN progress to cervical cancer, Th1/Th2 balance to the deviation from Th2 cells, the Th1 subsets inhibition and Th2 subsets hyperthyroidism, this imbalance was closely related to the occurrence of tumor. The regulatory T cells had some correlation with IFN- γ and IL-4, Treg cells, IFN- γ and IL-4 may be involved in the pathogenesis of cervical cancer.

【Key words】 cervical cancer; regulatory T cell; IFN- γ ; IL-4

子宫颈癌是全球女性中发病率居第 2 位的恶性肿瘤, 其中 80% 的子宫颈癌患者发生在发展中国家。在中国, 每年大约有 11 万子宫颈癌新发患者, 2~3 万人死于该病。子宫颈癌的发生是多因素作用的结果, 其中调节性 T 细胞(Treg)介导的肿瘤细胞逃逸机制及 Th 细胞的失衡可能是子宫颈癌发生发展的重要原因。本研究通过对子宫颈癌患者外周血 Treg 的数量及 Th 细胞因子 IFN- γ 、IL-4 水平进行观察, 探讨其在疾病发生过程中的作用及临床意义, 以期为子宫颈癌的发病机制及临床免疫治疗提供实验室依据, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 疾病组: 研究对象为 2012 年 7~12 月, 贵阳

医学院附属医院及贵阳医学院附属肿瘤医院的门诊及住院患者, 包括子宫颈癌组 45 例、宫颈上皮内瘤变(CIN)组 35 例(其中 CIN I 级和 CIN II 级各 10 例, CIN III 级 15 例)及宫颈炎组 20 例。宫颈上皮内瘤变分级根据《妇产科学(第 6 版)》诊断标准。采集其外周血备用。所有患者均未接受过放疗和化疗, 近 3 个月未使用过免疫增强剂, 术后均经病理学确诊。健康对照组: 随机选取贵阳医学院附属医院门诊的健康体检女性 20 例, 无自身免疫性疾病及其他恶性肿瘤, 肝肾功能、血尿常规检查均正常。

1.2 仪器与试剂 人 Treg 试剂盒、红细胞裂解液及 PBS 缓冲液由美国 BD 公司生产; 人 IFN- γ 及 IL-4 细胞因子 ELISA

^{*} 基金项目: 贵州省科技厅联合基金项目(黔科合字[2011]037 号)。

作者简介: 谭玉洁, 女, 主任技师, 硕士, 主要从事临床检验诊断及教学工作。

试剂盒由上海西唐生物科技有限公司生产;美国 Canto II 流式细胞分析仪;芬兰 DENLEY DRAGON Wellscan MK 3 酶标仪。

1.3 方法 Treg 检测:采集试验组患者以及健康对照组清晨空腹静脉血 2 mL,使用 EDTA 抗凝。分别在健康对照管及试验管中加入外周血 50 μ L,试验管中加入 FITC 标记鼠抗人 CD4 单抗、APC 标记的鼠抗人 CD127 单抗、PE-cy7 标记的鼠抗人 CD25 单抗 2.5 μ L,避光孵育 15 min,加入 800 μ L 的红细胞裂解液,避光孵育 6~10 min,PBS 缓冲液洗涤 2 次,进行流式细胞检测并采用 Diva 分析软件对结果进行分析。IFN- γ 与 IL-4 测定:按说明书操作,以 OD 值为纵坐标,以标准品水平为横坐标,绘制标准曲线。根据血清样品的 OD 值可在标准曲线上查出其相应的水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两变量相关性采用 Pearson 相关分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组外周血 Treg 的表达水平 Treg 在子宫颈癌组中的水平显著高于健康对照组、宫颈炎组及 CIN 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);CIN III 组中 Treg 与健康对照组、宫颈炎组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);健康对照组、宫颈炎组、CIN I 组和 CIN II 组之间,Treg 的水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组外周血中 Treg 的表达水平

组别	<i>n</i>	Treg(%)
健康对照组	20	6.86±1.00
宫颈炎组	20	6.79±1.46
CIN I 组	10	7.45±1.99
CIN II 组	10	7.72±1.48
CIN III 组	15	8.72±1.36 ^a
子宫颈癌组	45	10.20±1.99 ^b
<i>F</i>	—	18.78
<i>P</i>	—	<0.05

注:与健康对照组、宫颈炎组比较,^a $P < 0.05$;与健康对照组、宫颈炎组及 CIN 组比较,^b $P < 0.05$;—表示无数据。

2.2 各组的外周血清 IFN- γ 与 IL-4 水平 子宫颈癌患者血清中 IFN- γ 水平比对照组及宫颈炎组低,差异有统计学意义($P < 0.05$);CIN III 组血清中 IFN- γ 水平与健康对照组、宫颈炎组、CIN I 及 CIN II 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。子宫颈癌患者血清中 IL-4 水平明显高于健康对照组、宫颈炎组及 CIN 组($P < 0.05$);CIN III 组患者血清中 IL-4 水平与健康对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);健康对照组、宫颈炎组、CIN I 组和 CIN II 组之间,IL-4 的水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。同时,IFN- γ 与 IL-4 的比值随宫颈病变程度加重而呈现逐渐下降的趋势。见表 2。

表 2 健康对照组和试验组中 IFN- γ 与 IL-4 的水平

组别	<i>n</i>	IFN- γ (pg/mL)	IL-4(pg/mL)	IFN- γ /IL-4
健康对照	20	104.20±36.00	84.91±36.17	1.23
宫颈炎	20	93.16±36.05	94.65±28.07	0.98
CIN I	10	91.43±37.38	101.77±27.05	0.90

续表 2 健康对照组和试验组中 IFN- γ 与 IL-4 的水平

组别	<i>n</i>	IFN- γ (pg/mL)	IL-4(pg/mL)	IFN- γ /IL-4
CIN II	10	91.57±38.97	104.78±41.73	0.87
CIN III	15	88.40±40.01	112.06±31.67 ^a	0.79
子宫颈癌	45	71.27±37.11 ^b	152.38±42.62 ^c	0.47
<i>F</i>		2.412	12.42	—
<i>P</i>		<0.05	<0.05	—

注:与健康对照组比较,^a $P < 0.05$;与健康对照组、宫颈炎组比较,^b $P < 0.05$;与健康对照组、宫颈炎组及 CIN 组比较,^c $P < 0.05$;—表示无数据。

2.3 外周血中 Treg 水平与血清中 IFN- γ 及 IL-4 水平的相关性分析 结果显示,Treg 的水平与 IFN- γ 的水平呈负相关关系($r = -0.291, P < 0.05$);与 IL-4 的水平呈正相关关系($r = 0.383, P < 0.05$);IFN- γ 与 IL-4 的水平差异无统计学意义($r = -0.068, P > 0.05$)。

3 讨 论

子宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,严重威胁妇女的健康,每年新增子宫颈癌患者 13 万左右,占女性生殖系统恶性肿瘤的 73%~93%,且病死率较高^[1]。虽然已知机体对肿瘤细胞有一系列的免疫监视机制,但子宫颈癌仍能持续发生甚至发展,其致病机制已成为当今医学领域中热点之一。

目前国内外研究表明,肿瘤的发生、发展与人体的免疫功能密切相关,特别是与 T 淋巴细胞的关系更为密切^[2]。1995 年 Sakaguchi 等^[3]首次报道在健康人的外周血和脾脏组织的 CD4⁺ T 细胞中约有 5%~10% 的细胞高表达 CD25 分子,称之为 CD4⁺ CD25⁺ Treg。其对维持机体免疫的稳定发挥重要的调节作用,不仅能抑制自身免疫性疾病的发生,还可能参与肿瘤免疫的调节^[4]。近年来研究认为^[5-6],Treg 是形成肿瘤免疫耐受的关键因素,是重要的肿瘤免疫抑制细胞。研究结果显示,随着疾病进展,Treg 的水平逐渐升高,提示在子宫颈癌发展过程中 Treg 的数量增多导致其免疫抑制功能增强,从而为肿瘤的发生、发展提供了逃避免疫攻击的环境。

在抗肿瘤免疫的过程中,T 淋巴细胞介导的免疫应答起重要作用。其中辅助性 T 细胞对于抗肿瘤细胞的免疫应答至关重要。其中 Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 、白细胞介素-2(IL-2)等,而 Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-10 等。Th1 主要功能为促进巨噬细胞活化,抗病毒、调节和参与抗肿瘤的免疫功能^[7-8]。Th2 细胞可促进抗体的产生,促进变态反应,并且抑制 Th1 细胞,介导体液免疫应答^[9-10]。本课题的研究结果表明,随着宫颈炎向子宫颈癌发展,Th1 细胞分泌的 IFN- γ 水平逐渐降低,而 IL-4 的水平呈升高趋势,尤其以子宫颈癌患者最为显著。与此同时,IFN- γ /IL-4 比值逐渐下降,证明子宫颈癌患者的机体细胞免疫平衡存在着从 Th1 向 Th2 方向的偏移,从而提示 Th 细胞亚群之间的平衡破坏可能与子宫颈癌的发生存在关联。

数据还显示,Treg 的水平与 IFN- γ 的水平呈负相关关系,一方面,Treg 可能通过分泌抑制性细胞因子 TGF- β 来抑制 NK 细胞产生 IFN- γ ;另一方面,Treg 通过 IL-10 抑制由树突状细胞产生的 Th1 细胞分化所必需的细胞因子 IL-12,从而抑制 Th1 细胞分化,导致 IFN- γ 的水平降低。IFN- γ 的低水平将削弱机体的抗肿瘤免疫功能,从而可能参与肿瘤的发生、发展。Treg 与 IL-4 的水平呈正相关关系。子宫颈癌患者体内 Treg 的水平增加可能引起 IL-10 和 TGF- β 的分泌增多,引起 Th1

细胞向 Th2 细胞的偏移,且 IL-10 是介导 Th2 细胞发育的主要细胞因子,可以促使 Th2 细胞分泌 IL-4 增多。Th2 细胞的优势状态将导致细胞免疫抗肿瘤的免疫功能减弱,保护肿瘤细胞,发生免疫逃逸。Treg 在外周血的表达水平与 IFN- γ 及 IL-4 水平存在不同的相关性,提示 Treg 与 Th 细胞因子可能共同参与了子宫颈癌的发病机制。

总之,Treg 和 Th 细胞因子在恶性肿瘤的发生和发展的多个环节中发挥重要的调节作用,随着研究的深入,越来越多的证据表明 Treg 和 Th 细胞因子失衡与 CIN 的进展及子宫颈癌的发病密切相关。同时,也提示临床如果能将抑制机体的 Treg 细胞与增强抗肿瘤的免疫功能手段相结合,将有可能为相关疾病的治疗和干预提供新的思路。

参考文献

[1] 杨玲,皇甫梅,张思维. 中国 20 世纪 70 年代与 90 年代子宫颈癌病死率及其变化趋势[J]. 中国医学科学院学报, 2003,25(4):386-390.

[2] Kuss I, Hathway B, Ferrs RL, et al. Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Clinical Cancer Research, 2004,10(11):3755-3762.

[3] Sakaguchi S. Regulatory T cells; key controllers of immunologic self-tolerance[J]. Cell, 2000,101(5):455-458.

[4] Shevach EM. Certified professionals; CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells[J]. Experimental Medicine, 2001, 193(11):41-46.

[5] HanY, Wu J, Bi L, et al. Malignant B cells induce the con-

version of CD4⁺ CD25⁻ T cells to regulatory T cells in B-cell non-hodgkin lymphoma[J]. PLoS One, 2011,6(12): 28649-28652.

[6] Lee WC, Wu TJ, Chou HS, et al. The impact of CD4⁺ CD25⁺ T cells in the tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma[J]. Surgery, 2012,151(2):213-222.

[7] Wu TN, Lin KH, Chang YJ, et al. Avidity of CD1d-ligand-receptor ternary complex contributes to T-helper 1(Th1) polarization and anticancer efficacy[J]. Proceedings National Academy Sciences USA, 2011, 108(42): 17275-17280.

[8] Li CH, Kuo WH, Chang WC, et al. Activation of regulatory T cells instigates functional down-regulation of cytotoxic T lymphocytes in human breast cancer[J]. Immunologic Research, 2011,51(1):71-79.

[9] Gao YW, Chen YX, Wang ZM, et al. Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and the presence of CD4⁺ infiltrating T-lymphocyte in human primary hepatocellular carcinoma [J]. Hepato-gastroenterology, 2008, 55(82/83):345-350.

[10] Kitajima M, Ito T, Tumes DJ, et al. Memory type 2 helper T cells induce long-lasting antitumor immunity by activating natural killer cells[J]. Cancer Research, 2011, 71(14):4790-4798.

(收稿日期:2015-10-25 修回日期:2016-01-12)

(上接第 1173 页)

属于试剂盒覆盖范围之外的突变类型造成基因突变结果与酶活性结果之间的不一致,还需测序等其他高敏感性、高准确性方法验证。

所有 G6PD 基因突变或酶活性低下孕产妇接受了专业医生提供的遗传咨询与干预指导建议,包括^[8-9]:建议孕妇分娩后尽快检测新生儿 G6PD 活性及是否存在基因突变;列出文献报道的可诱发 G6PD 缺乏相关症状的药物如解热镇痛类、中药、抗菌药物;提供权威流行病学数据、临床表现及规避措施;检测报告单予以显著警示标志。佛山地区外来年轻务工人员较多,选择回原籍分娩和改变分娩医院变数较大,这是本研究对 G6PD 基因突变和酶活性低下孕产妇后续跟踪数据较少的主要原因。与文献报道相比,本研究获得的 G6PD 缺乏症流行病学数据较低,可能也与佛山地区人口高流动性相关。

南方地区是 G6PD 缺乏症高发地带,研究获取佛山地区 G6PD 缺乏症流行病学数据对指导优生优育、提高出生人口素质有重要意义,对高危人群给予干预指导建议能显著减少血管内溶血事件发生,避免给患者造成更大经济与精神负担。

参考文献

[1] Ella T. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis[J]. Blood Cells Molecules and Diseases, 2009, 42(3):267-278.

[2] 张玉琼. 东莞地区新生儿 G6PD 缺乏症的筛查研究[J]. 广州医药, 2004,35(2):69-72.

[3] Carlson PE, Flanagan CL, Ickes CE, et al. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes[J]. Science, 1956,124(3220):484-485.

[4] 张力,区小冰,佟莉贞,等. 广东地区 G6PD 缺陷的基因型与临床表现[J]. 临床血液学杂志, 2000,2(13):51-53.

[5] Jimenezl CR, Fijneman R. Proteomics of colorectal cancer in a genomic context; first large-scale mass spectrometry-based analysis from the cancer genome atlas[J]. Clinical Chemistry, 2015,61(9):1126-1128.

[6] 杨发达,贾章林. 葡萄糖-6-磷酸活性检测标本的初步探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2010,3(7):639-642.

[7] 王霞,江帆,唐盈,等. 广州地区葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺陷症基因突变的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013,21(7):17-18.

[8] 江帆,冯善伟,王耀强,等. 基于广州市计生网络的唐氏综合征群体干预模式的建立与管理[J]. 中国妇幼保健, 2010,27:3853-3856.

[9] 冯善伟,辜俊梅,李华,等. 依托人口和计划生育体系建立珠蛋白生成障碍性贫血群体干预模式的实践与体会[J]. 中华医学遗传学杂志, 2011,28(2):223-226.

(收稿日期:2015-11-12 修回日期:2016-01-28)