文章编号:1000-5404(2006)05-0397-04

论著

$CD4^+CD25^+$调节性T细胞在胃癌患者的表达及其临床意义

雷 晓,余佩武,赵永亮,石 彦,饶 芸,曾冬竹,吴 森,周立新 (第三军医大学西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 研究胃癌患者肿瘤组织、淋巴结及外周血中$CD4^+$、$CD25^+$调节性T细胞(T regulatory cells,Treg)的表达情况与胃癌临床病理的关系并分析其意义。**方法** 胃癌患者肿瘤组织、淋巴结、外周血及对照组中Treg表达情况分别以冰冻切片荧光抗体染色、流式细胞仪进行检测,结合胃癌患者临床病理情况分析。**结果** 健康成人对照外周血Treg表达率为(4.1±5.7)%,胃癌患者外周血Treg表达显著增高(16.8±7.9)%。胃癌组织Treg表达为(6.5±7.2)%,胃癌周围淋巴结Treg比例为(8.4±7.2)%,均较对照组显著增高。胃癌外周血和淋巴结Treg表达与淋巴结转移率和TNM分期有着负相关性,淋巴结转移阳性和TNM分期越晚,Treg表达率越高。**结论** Treg在胃癌患者的瘤组织、淋巴结及外周血中表达较对照组显著增高,并与临床病理存在显著相关性。

关键词:胃癌;调节性T细胞
中图法分类号:R392.12;R730.23;R735.2 **文献标识码**:A

Expression and clinical significance of $CD4^+$ and $CD25^+$ regulatory T cells in patients with gastric carcinoma

LEI Xiao, YU Pei-wu, ZHAO Yong-liang, SHI Yan, RAO Yun, ZENG Dong-zhu, WU Miao, ZHOU Li-xin (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the levels of $CD4^+$ and $CD25^+$ regulatory T cells (Treg) and its clinical significance in gastric cancer patients. **Methods** Tumor tissue, para-gastric lymph nodes and peripheral blood were used to detect the levels of Treg with immunofluorescence and flowcytometry. Another 10 samples of lymph nodes from benign gastric diseases served as control. The Treg expression levels were analyzed with clinical pathological information. **Results** $CD4^+$ and $CD25^+$ cells were observed in all gastric tissues and lymph nodes from gastric patients and controls. The expression level of Treg in control peripheral blood was (4.1±5.7)%, much lower than that [(16.8±7.9)%] of gastric cancer patients. Treg level in gastric cancer tissue and lymph nodes were (6.5±7.2)% and (8.4±7.2)%, both higher than that [(1.8±2.2)%, (1.5±3.1)%] in control. The expression level of Treg in gastric cancer peripheral blood and lymph node were correlated negatively with lynph node metastasis and TNM classification. **Conclusion** Treg level rose significantly in gastric cancer tissues and correlated with clinical informations, indicating the immune state of gastric cancer patients.

Key words: stomach carcinoma; T regulatory cell

调节性T细胞(T regulatory cells,Treg)是1995年Sakaguchi等[1]首先报道,在小鼠外周组织淋巴组织(脾脏、肠系膜淋巴结)等部位中存在具备特殊负调节功能的淋巴细胞,表达IL-2受体α链(CD25),占$CD4^+$ T细胞比例约为5%~10%,能以抗原非特异方式抑制效应T细胞活化,被称为"天然发生的抑制性细胞"(natural accruing T regulatory cells)。此后发现人外周血中存在免疫表型特点为$CD4^+$ $CD25^+$ $CD45RO^+$的Treg[2]。研究表明,Treg有维持免疫稳态的重要作用,其数量和功能的异常可能对机体造成严重影响。系统性红斑狼疮、溃疡性结肠炎等自身免疫性疾病可伴随Treg表达降低[3,4],而肺癌、卵巢癌、结肠癌及食管癌等患者外周血中Treg表达增高[5]。但目前文献中尚少见Treg在胃癌组织、胃癌淋巴结表达的报道,也少见胃癌Treg表达临床意义的报道。我们采用荧光抗体冰冻切片染色、单克隆抗体流式细胞仪技术检测了胃癌患者外周血、肿瘤组织及肿瘤周围淋

作者简介:雷 晓(1970-),男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事胃肠肿瘤外科治疗方面的研究。电话:(023)65416909, E-mail: lei_xiaoxiao@mail.yahoo.com.cn
通讯作者:余佩武,电话:(023)68754161,E-mail:yupeiwu01@sina.com
收稿日期:2005-06-13;修回日期:2005-09-01

巴结中 $CD4^+CD25^+$ Treg 表达，分析其与临床病理关系，以期对 Treg 在胃癌患者的表达状况及意义进行初步分析。

1 材料与方法

1.1 临床资料

对照组血标本取自本院血站健康成人献血者，共 30 例。其中男性 19 例，女性 11 例，年龄（38 ± 12.8）岁。抽取外周静脉血1 ml肝素抗凝送检。胃癌外周血标本取自 2003 年 4 月至 2005 年 3 月我科住院手术患者，共获 45 例。其中男性 37 例，女性 8 例，年龄（54 ± 10.2）岁。术后病理检查发现，肿瘤位于胃底部 21 例，胃体部 15 例，胃窦部 9 例；肿瘤分化程度上，高分化 4 例，中分化 19 例，低分化（包括低分化腺癌和黏液腺癌）22 例；肿瘤浸润深度上，浸润黏膜及黏膜下层 3 例，肌层 16 例，浆膜面 26 例；肿瘤淋巴转移阳性者 39 例，阴性 6 例；TNM 分期上，Ⅰ期 2 例，Ⅱ期 7 例。Ⅲ期 15 例，Ⅳ期 21 例。采血方法同对照组。

胃癌组织标本于术中切取，避开坏死、出血及脂肪组织，取肿瘤 1 cm^3 组织 2 块，生理盐水冲洗送检。取远离肿瘤病灶的正常胃黏膜为对照组组织。胃癌淋巴结标本取自术中切下胃癌标本，每例于胃标本网膜中摘取淋巴结 3 枚，生理盐水冲洗送检。共 45 例。对照组淋巴结取自同期因非肿瘤性疾病行胃大部切除标本中的淋巴结，共 10 例。其中胃溃疡穿孔 5 例，胃良性溃疡 2 例，十二指肠球部溃疡 3 例；男 8 例，女 2 例，年龄（41 ± 12.5）岁。取材及处理方法与胃癌标本相同。

1.2 方法

1.2.1 胃癌组织、癌周淋巴结及对照组 Treg 表达荧光显微镜观察 胃癌组织及对照组胃黏膜、胃癌周围淋巴结及对照组淋巴结均以液氮冻结、冰冻切片机切 8 μm 片，室温干燥 1 h，4 ℃丙酮固定 10 min，PBS 洗涤后滴加 FITC-labeled Anti-Human CD4 及 PE-labeled Anti-Human CD25 各 5 μl（Immunotech），37 ℃、避光 15 min，PBS 洗涤 5 min × 3 次，荧光显微镜观察。

1.2.2 外周血、肿瘤组织及淋巴结 Treg 流式细胞仪检测

抗凝外周血 100 μl 以红细胞裂解液处理，PBS 洗涤；肿瘤组织剪碎，37 ℃消化 2 h（含 1 mg/ml 胶原酶、2.5 U/ml 透明质酸酶、0.1 mg/ml DNase），尼龙网过滤、淋巴细胞分离液离心，吸取界面层细胞，PBS 洗涤；淋巴结在无菌钢网（100 目）内研磨成细胞悬液，尼龙网过滤，PBS 洗涤。上述细胞加入 FITC-anti human CD4、PE-anti human CD25 各 5 μl，振荡混匀，室温避光 15 min。对照加入等量 FITC-anti human IgG、PE-anti human IgG，PBS 稀释，上机检测。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计程序进行独立样本 t 检验及 spearman 等级资料相关性分析。

2 结果

2.1 胃癌与对照组的胃组织、外周血、淋巴结中 Treg 表达对比

镜下观察发现，在胃癌组织和对照组胃组织、胃癌周围淋巴结和对照组淋巴结中有明显 $CD4^+$ 细胞荧光，也有 $CD25^+$ 细胞荧光表达。胃癌组织中 $CD4^+$ 细胞荧光的数量和强度与对照组胃组织类似，而 $CD25^+$ 细胞荧光的数量和强度均高于对照组胃组织（图 1）。观察也发现，胃癌周围淋巴结中 $CD4^+$ 细胞荧光的数量与强度与对照组胃淋巴结类似，而 $CD25^+$ 细胞荧光的数量和强度均高于对照组淋巴结（图 2）。

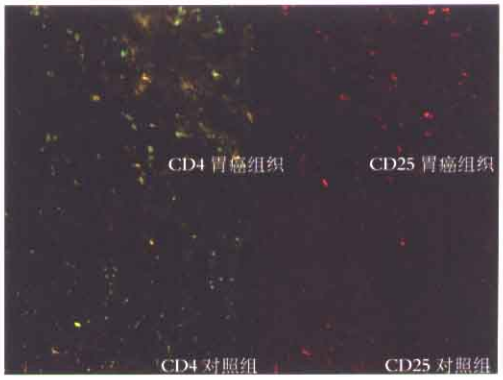


图 1 胃癌组织（低分化腺癌）与对照组胃组织 $CD4^+$ 及 $CD25^+$ 细胞荧光表达 （免疫荧光 × 400）

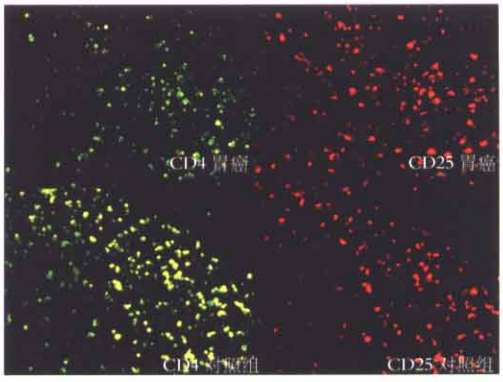


图 2 胃癌（低分化腺癌）周围淋巴结与对照组淋巴结 $CD4^+$ 及 $CD25^+$ 细胞荧光表达 （免疫荧光 × 400）

流式细胞仪检测发现，胃癌患者外周血 $CD4^+CD25^+$ Treg 表达率为（16.8 ± 7.9）%，健康对照组外周血 Treg 表达率为（4.1 ± 5.7）%。胃癌患者外周血 Treg 表达率较健康对照组外周血 Treg 表达率增高非常显著（$t = 3.728$，$P < 0.01$）。检查发现，胃癌组织中 Treg 表达率为（6.5 ± 7.2）%，对照组胃组织中 Treg 表达率为（1.8 ± 2.2）%。胃癌组织中 Treg 表达率较对照组胃组织 Treg 率增高非常显著（$t = 3.628$，$P < 0.01$）。胃癌周围淋巴结中 Treg 表达率为（8.4 ± 7.2）%，对照组淋巴结中 Treg 表达率为（1.5 ± 3.1）%。胃癌周围淋巴结 Treg 表达率较对照组淋巴结 Treg 表达率增高非常显著（$t = 3.691$，$P < 0.01$）。

2.2 胃癌各部位 Treg 表达水平的临床意义

将胃癌各部位 Treg 表达率与胃癌患者的年龄、性别、肿瘤部位、病理分化程度及肿瘤浸润深度情况间进行分析，结果显

示胃癌 Treg 表达在不同年龄、性别、肿瘤部位、病理类型及肿瘤浸润深度间无显著差异。

进一步分析发现，胃癌 Treg 表达高低与胃癌淋巴结转移有关，有淋巴结转移者，胃癌外周血 Treg 表达率显著高于无淋巴结转移者（$P<0.05$）。胃癌淋巴结和胃癌组织 Treg 表达率在不同淋巴结转移情况间未见差异显著性（表 1）。

胃癌患者外周血及胃癌周围淋巴结 Treg 表达率在Ⅲ期、Ⅳ期胃癌患者，Treg 表达率均显著高于Ⅱ期 + Ⅰ期胃癌患者（$P<0.05$）。相关性分析显示，胃癌患者外周血及淋巴结 Treg 表达，与胃癌 TNM 分期显著相关（$r=0.529$，$P<0.05$），TNM 分期越晚，Treg 表达越高。进一步分析胃癌患者外周血与胃癌淋巴结中 Treg 表达率相关性，结果显示二者相关性非常显著（$r=0.742$，$P<0.01$）（表 1）。

表 1　胃癌不同病理情况间 Treg 表达率分析[$(\bar{x}\pm s)\%$]

	肿瘤淋巴结转移		TNM 分期		
	阳性	阴性	Ⅰ + Ⅱ期	Ⅲ期	Ⅳ期
外周血	17.2 ± 9.6^a	14.5 ± 11.3	13.7 ± 5.1^b	15.8 ± 4.7	18.4 ± 5.7
周围淋巴结	16.9 ± 10.4	15.1 ± 11.7	14.2 ± 7.6^c	16.2 ± 5.2	18.2 ± 9.5

a：$t=2.57$，$P<0.05$，与阴性比较；b：$t=-1.63$，$P<0.05$，与Ⅲ期比较，$t=-2.78$，$P<0.05$，与Ⅳ期比较；c：$t=-1.24$，$P<0.05$，与Ⅲ期比较，$t=-3.27$，$P<0.05$，与Ⅳ期比较

3　讨论

研究表明，正常情况下机体内 Treg 的免疫学意义是维持机体免疫稳态，其作用方式是动态调节机体免疫平衡，有防止免疫反应无限制扩大及抑制自身免疫反应发生的作用。体内 Treg 的数量和功能状态对机体免疫稳态的维持有重要意义，理论上 Treg 数量过少或功能不足，会导致免疫反应无法有效控制，出现相应的免疫性损害，甚至出现自身免疫性疾病。这种情况已在很多疾病中得到证实。但 Treg 数量过多或功能过强的情况不多，目前还主要在肿瘤患者上有报道。

虽然 Treg 与恶性肿瘤免疫抑制的关系尚不明确。但研究表明，体内对抗 Treg 的处理措施，明显有益于机体抗肿瘤免疫。在动物肿瘤模型研究中发现，经抗 CD25 单抗预处理的小鼠，可显著减少种植后骨髓瘤、肉瘤的生长率。但如果肿瘤种植 2 d 后，再使用单抗对肿瘤生长不产生影响。已有肿瘤生长的小鼠，如果再剔除 $CD4^+$、$CD25^+$ T 细胞后，小鼠脾脏细胞中可产生强烈的抗肿瘤特异性 $CD8^+$ T 细胞及非特异 NK 细胞[6,7]。因此。Treg 在肿瘤情况下表达增高，显然存在有不利于机体抗肿瘤免疫的作用。研究 Treg 在机体中的表达情况，对于机体尤其是带瘤机体的免疫状况有一定的说明意义。

Treg 在机体内应该是维持一定水平的，因此在正常人外周血中能够检测到 Treg 表达，其表达水平可在一定程度上反映机体的免疫状况。但是，即使对于健康成人外周血的 Treg 水平，目前尚没有进行大规模普查，不同作者报道的表达值不尽相同，Dieckmann[8] 报道为 2.8% ~ 17.2%，Ichihara 等[9] 报道为 7.2%，Jonuleit 等[10] 报道 0.7% ~5.5%。Baecher-Allan 等[2] 报道为 10%，且认为 Treg 可以进一步划分为 CD25 高表达和 CD25 低表达两类，CD25 高表达 Treg 大约占 $CD4^+$ T 细胞 1% ~2%，CD25 低表达 Treg 最高大约占到 $CD4^+$ T 细胞的 16%。这些报道均存在检测样本量较少的缺点，其数值不能代表 Treg 的正常值，只能说明其大致范围和相对变动情况。因为 Treg 在体内是处于动态平衡，可能随内外环境变化而出现较大范围的变动。为了解 Treg 在健康成人的外周血中表达情况，我们检测了 30 例健康成人外周血的 Treg 表达率，结果为 0.9% ~9.7%（4.1 ±5.7）%，与其他研究者报道类似，说明本研究所得结果基本属于正常表达范围，可以作为深入研究的对照基础。

为了解肿瘤局部的免疫状况，对于胃癌患者，我们分别研究了 Treg 在肿瘤组织及肿瘤引流淋巴结中的表达情况，结果显示，相对于健康成人、非肿瘤性病变胃周淋巴结及正常胃黏膜组织，胃癌患者外周血、胃癌引流淋巴结及胃癌组织中 Treg 表达率增高非常显著。这一结果说明，胃癌患者可能存在较广泛的 Treg 表达增高现象，也间接地说明 Treg 在胃癌免疫中可能有重要的意义，值得深入研究。联系患者基本资料及病理资料进行统计分析，结果显示，不同的患者年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤分化程度和肿瘤浸润深度间，未能发现各部位 Treg 表达的显著性差异。这一结果说明，以上情况可能不是影响胃癌患者 Treg 表达水平的主要因素。

由于胃癌患者淋巴结转移情况对胃癌患者预后可能存在显著影响[11]，因此我们对不同胃癌淋巴结转移情况间的 Treg 表达进行对比研究，结果显示淋巴结转移阳性者 Treg 表达率显著高于淋巴结转移阴性者。目前对 Treg 的肿瘤情况下分布研究很少，本研究表明，胃癌肿瘤组织中经过酶消化、提取淋巴细胞进行 Treg 分析发现较正常黏膜显著增高。以上结果说明，Treg 可能在胃癌肿瘤组织局部和胃癌周围淋巴结中大量表达，对胃癌局部免疫有一定影响。

对于胃癌各部位 Treg 表达与临床病理资料进行相关性分析，首先我们注意到，胃癌患者外周血 Treg 表达与淋巴结 Treg 表达间存在显著相关性，二者呈现同步增高现象。该结果进一步说明胃癌患者存在淋巴

循环，其全身淋巴结在 Treg 表达率上可能具备统一性，也间接说明实验研究中因淋巴结选取部位不同造成的 Treg 表达率误差可能性较小，其结果较为可信。其次，分析还显示，虽然胃癌淋巴结转移阳性患者引流淋巴结 Treg 表达率相对于转移阴性者无明显差异，但淋巴结转移阳性者其外周血 Treg 表达显著增高。这一结果可能说明，胃癌局部引流淋巴结中 Treg 表达已经达到一定的平台期，淋巴结转移这一肿瘤进展因素，未能进一步促使其 Treg 表达水平增高。但外周血 Treg 表达却随淋巴结转移而增高，说明肿瘤还是对全身的免疫影响随疾病进展有加重的趋势。最后，我们发现 Treg 表达与胃癌 TNM 分期呈显著相关性，TNM 分期越晚，外周血及淋巴结 Treg 表达都有明显增高趋势。说明随着胃癌的进展，以胃癌 Treg 为标志的患者局部和全身的免疫状况变化非常显著。因此，Treg 的表达情况，一定程度上反应患者胃癌的进展情况，可以作为免疫指标进行临床应用。

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] BAECHER-ALLAN C, BROWN J A, FREEMAN G J, *et al*. $CD4^+$ CD25 high regulatory cells in human peripheral blood[J]. J Immunol, 2001, 167(3): 1245 - 1253.

[3] FUJIO K, OKAMOTO A, TAHARA H, *et al*. Nucleosome-specific regulatory T cells engineered by triple gene transfer suppress a systemic autoimmune disease[J]. J Immunol, 2004, 173(3): 2118 - 2125.

[4] MAKITA S, KANAI T, OSHIMA S, *et al*. CD4 + CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells[J]. J Immunol, 2004, 173(5): 3119 - 3130.

[5] WOLF A M, WOLF D, STEURER M, *et al*. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(2): 606 - 612.

[6] ONIZUKA S, TAWARA I, SHIMIZU J, *et al*. Tumor rejection by *in vivo* administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody[J]. Cancer Res, 1999, 59(13): 3128 - 3133.

[7] SHIMIZU J, YAMAZAKI S, SAKAGUCHI S, Induction of tumor immunity by removing $CD25^+$ $CD4^+$ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity[J]. J Immunol, 1999, 163(10): 5211 - 5218.

[8] DIECKMANN D, PLOTTNER H, BERCHTOLD S, *et al*. *Ex vivo* isolation and characterization of $CD4^{(+)}CD25^{(+)}$ T cells with regulatory properties from human blood[J]. J Exp Med, 2001, 193(11): 1303 - 1310.

[9] ICHIHARA F, KONO K, TAKAHASHI A, *et al*. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(12): 4404 - 4408.

[10] JONULEIT H, SCHMITT E, STASSEN M, *et al*. Identification and functional characterization of human $CD4^{(+)}CD25^{(+)}$ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood[J]. J Exp Med, 2001, 193(11): 1285 - 1294.

[11] KIM J, CHEONG J H, HYUNG W J, *et al*. Predictors of long-term survival in pN3 gastric cancer patients[J]. J Surg Oncol, 2004, 88(1): 9 - 13.

[12] 郑峻松，吴 军，易绍萱，等. $CD4^+CD25^+T_{reg}$细胞调节T细胞的作用机制分析[J]. 第三军医大学学报，2003，25(21)：1181 - 1184.

（编辑 陈聪连）

参考文献类型及标识

根据 GB 3469 规定，以单字母方式标识以下各种参考文献类型：

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献，其文献类型标识建议采用单字母"A"；对于其他未说明的文献类型，建议采用单字母"Z"

对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献，建议以下列双字母作为标识：

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部