恶性肿瘤的分子诊断 文章编号:0253-3626(2011)06-0660-03

皮肤鳞癌及癌前病变中 Foxp3 蛋白的表达

刘 千,黄 琨,李 惠
(重庆医科大学附属第一医院皮肤科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨正常皮肤和不同表皮肿瘤组织中叉头状转录因子 p3(Forkhead box p3,Foxp3)的表达与临床意义。方法:应用免疫组化法检测 15 例日光性角化症(Actinic keratosis,AK),28 例鲍温病(Bowen's disease,BD),26 例皮肤鳞癌(Squamous cell carcinoma,SCC)和 8 例正常表皮组织(Normal epidermal tissue,NET)中 Foxp3 的表达。结果:$Foxp3^+$调节性 T 细胞和 Foxp3 在皮肤癌前病变和恶性肿瘤中均有表达,在正常表皮组织中未见表达。其中,在肿瘤实质细胞中,Foxp3 蛋白在 AK、BD 和 SCC 中的表达阳性率分别为 46.7%、100%和 100%。Foxp3 蛋白在 BD 和 SCC 上的表达率均高于 AK(P 值均小于 0.05),而在 BD 和 SCC 的表达率则无显著差异($P>0.05$)。结论:Foxp3 蛋白的表达在正常表皮、癌前病变、恶性肿瘤中的表达呈现逐渐增高的趋势,与表皮肿瘤的发展相关。

【关键词】皮肤肿瘤;叉头状转录因子 p3;免疫逃逸
【中国图书分类法分类号】R739.5 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-31

Expression of Foxp3 protein in epidermis neoplasms and precancerous lesions

LIU Gan, HUANG Kun, LI Hui
(*Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression and clinical significance of Foxp3 in normal skin and tissues of different epidermis neoplasms and to identify the underlying relation between Foxp3 expression and clinico-pathological characteristics of epidermis neoplasms. *Methods*: Immunohistochemical staining was applied to detect the expression of Foxp3 in tissue samples of 15 cases of actinic keratosis, 28 cases of Bowen's disease, 26 cases of cutaneous squamous cell carcinoma, and 8 cases of normal epidermal tissue. *Results*: $Foxp3^+$ regulatory T cells and Foxp3 were both expressed in epidermis neoplasms and precancerous lesions but not in the normal epidermal tissue. There was no significant difference of Foxp3 expression between the SCC and BD samples ($P>0.05$), while in the samples of AK, Foxp3 expression was significantly lower than that in BD and SCC samples ($P<0.05$). *Conclusion*: The expression level of Foxp3 in normal skin, precancerous lesions and malignant tumors, is in ascending order and is correlated with the development of epidermis neoplasms.

【Key words】epidermis neoplasms; forkhead box p3; immune evasion

日光性角化症和鲍温病二者均为表皮内的皮肤肿瘤,有发展为浸润性鳞状细胞癌的潜在可能性,主要发生于长期暴露于日光的部位[1]。调节性 T 细胞(Regulatory T cells,Tregs)在维持机体免疫耐受状态,防止自身免疫性疾病的发生、抗移植物排斥反应以及肿瘤免疫中发挥着重要作用[2]。叉头状转录因子 p3(Forkhead box p3,Foxp3)是叉头状转录因子家族中的成员之一[3],早期被发现特异性地表达于 $CD4^+CD25^+$ Tregs,与其发育和功能发挥密切相关,在一定程度上可反映 $CD4^+CD25^+$Tregs 的水平和功能状态,被视为 $CD4^+CD25^+$Tregs 的特异性标记物[4]。而随后的研究发现,Foxp3 在黑色素瘤[5]、胰腺导管细胞癌[6]、食道鳞状细胞癌[7]等的肿瘤实质细胞上均有表达。目前对 Foxp3 的研究主要集中在 $Foxp3^+$Tregs 的免疫学调节能力和自身免疫疾病的关系上,而对 Foxp3 在皮肤表皮肿瘤的表达情况鲜有报道。本研究应用免疫组化法观察皮肤表皮肿瘤中 Foxp3 的表达情况,及其与皮肤表皮肿瘤临床病理特征的关系,探讨其在皮肤肿瘤中的生物学意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 浓缩型兔抗人 Foxp3 多克隆抗体购于北京博奥森公司,二抗及 DAB 显色试剂盒购自武汉博士德公司。

作者介绍:刘 千(1985-),男,硕士,
研究方向:皮肤免疫与病理。
通信作者:李 惠,女,教授,Email:lihui131128@vip.163.com。

1.1.2 病人资料 本实验共收集重庆医科大学附属第一医院皮肤科自 2007-2010 年皮肤标本 77 例，包括正常表皮，日光性角化，鲍温病和皮肤鳞状细胞癌，所有标本均经病理学诊断证实，并有详细的临床资料，研究对象的特点见表 1。患者在诊断前均未行放、化疗及生物免疫治疗。

1.2 方法

Foxp3 免疫组化采用二步法，所有皮肤组织均常规固定、石蜡包埋、4 μm 连续切片后置经过多聚赖氨酸处理的载玻片上。切片脱蜡后，内源性过氧化物酶的活性用 3%的双氧水 20 min 阻断，随后用柠檬酸盐缓冲液做抗原修复，复温后PBS 洗 3 次，正常山羊血清室温封闭 20 min，倾去，勿洗。然后滴加浓度为 1:100 兔抗人 Foxp3（一抗），4℃过夜。PBS 洗 3 次，用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 30 min；PBS 洗 3 次，滴加 3-3,-二氨基邻苯胺（3-3,-diaminobenzidine，DAB）显色工作液，显微镜下控制显色；自来水冲洗终止染色，苏木精复染，返蓝，切片经过梯度乙醇干燥，设阴性、阳性对照。PBS 代替一抗作为阴性对照，脾脏组织切片作为阳性对照。

Foxp3 表达阳性信号为胞内出现棕黄色或棕褐色颗粒，结合染色强度和阳性细胞数分级。选取表达最强的部位，按着色程度分级：基本未着色，染色与背景相似者记 0 分；着色浅、略高于背景者记 1 分；中度着色，明显高于背景者记 2 分；强染，着色深棕色记 3 分。视野下阳性细胞数<5%记 0分，5%~25%记 1 分，26%~50%记 2 分，51%~75%记 3 分，>75%记 4 分。2 项计分相加分为 4 级：0~1 分为（-），2 分为（+），3 分为（++），4 分以上为（+++）。

1.3 统计学处理

应用统计分析软件 SPSS13.0 进行统计分析，等级资料采用 Kruskal-wallis H 秩和检验，阳性率比较采用卡方检验及 Fisher 确切概率法检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 Foxp3 在 AK、BD、SCC 中的表达情况

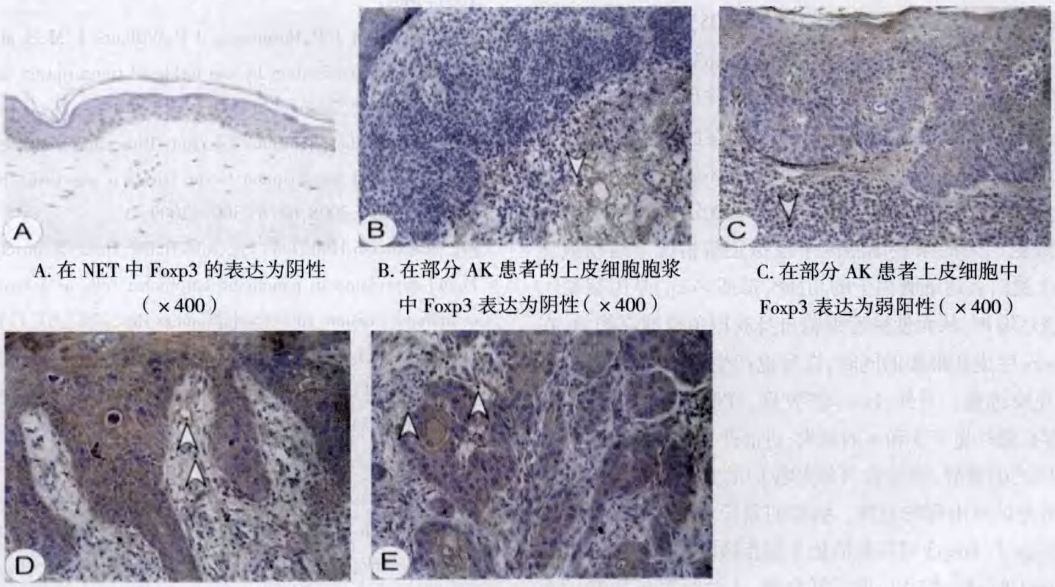
Foxp3 在 NET 中未见表达，在癌前病变 AK 的上皮细胞胞质中仅部分表达，而在浸润性的 BD 和 SCC 的癌性上皮细胞上高表达（图 A、B、C、D、E，表 2）。另在病变组织周围可观察到的 $Foxp3^+$淋巴细胞（箭头所示，见图 B~E）。4 组间经 Kruskal-wallis H 秩和检验，Hc=57.662 0，P<0.005。两两比较采用扩展的 t 检验，表皮病变上皮细胞中 Foxp3 的表达阳性率均高于正常皮肤组织，差异具有统计学意义（P<0.05）。Foxp3 蛋白的表达与患者的年龄、性别、发病部位、病程无显著相关（P>0.05）。

2.2 Foxp3 在 AK、BD、SCC 上皮细胞上表达率的比较

AK、BD 和 SCC 组间 Foxp3 蛋白表达率差异有统计学意义，χ^2=35.577 0，P<0.005。BD、SCC 组肿瘤细胞上 Foxp3 蛋白表达率均高于 AK 组（P<0.05），BD、SCC 组 Foxp3 蛋白表达无统计学差异（P>0.05）。

3 讨 论

Tregs细胞是一类具有独特的抑制功能的 T 细胞亚群，具有免疫抑制和免疫无能两大功能特征[8,9]。Foxp3 由 Brunkow 等[10]于 2001 年首次报道，研究发现其对 Tregs 的发育及功能发挥起重要作用[11]，是 Tregs 获得免疫调节特性的关键转录因子[12]。虽然个别研究发现 Foxp3 在少量的 $CD4^+CD25^-$T 细



A. 在 NET 中 Foxp3 的表达为阴性（×400）

B. 在部分 AK 患者的上皮细胞胞浆中 Foxp3 表达为阴性（×400）

C. 在部分 AK 患者上皮细胞中 Foxp3 表达为弱阳性（×400）

D. 在 BD 患者肿瘤细胞中，Foxp3 表达为强阳性（×400）

E. 在 SCC 患者肿瘤细胞中，Foxp3 表达为强阳性（×400）

空心箭头所指为病变周围 Foxp3 阳性的淋巴细胞

图 1 Foxp3 在各组织中的表达情况

表 1 研究对象的年龄与性别状况

诊断	例数	年龄	性别（男:女）
NET	8	67 ± 9	5:3
AK	15	64 ± 15	8:7
BD	28	73 ± 11	15:13
SCC	26	68 ± 16	16:10

表 2 Foxp3 在 NET、AK、BD 及 SCC 组织中的表达

分组	例数	Foxp3的表达				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
NET	8	8	0	0	0	0
AK	15	8	5	2	0	46.7%
BD	28	0	0	4	24	100%
SCC	26	0	0	7	19	100%

胞和 $CD8^+$T 细胞也有表达[13]，但目前 Foxp3 仍被认为是 $CD4^+CD25^+$Tregs 的最特异标记物。研究发现，肺癌[14]、卵巢癌[15]、胃癌[16]以及肝癌[17]等多种实体肿瘤患者外周血和肿瘤局部微环境中，Tregs 比例增高，且数目与患者肿瘤的进展程度和预后、生存率呈负相关[18]。去除 Tregs 或封闭其抑制功能，可增强抗肿瘤免疫反应[19]。越来越多的证据表明 Tregs 可能在肿瘤的免疫逃逸中起了关键作用。

在以往的研究中人们还发现，在胰腺导管细胞癌[6]、黑色素瘤[5]、食道鳞癌[7]等肿瘤的癌细胞中，均有 Foxp3 阳性表达。另外，在肺癌、乳腺癌、结肠癌等细胞株上也观察到有 Foxp3 的表达[20]。本次实验中，$Foxp3^+$Tregs 和 Foxp3 在皮肤癌前病变和恶性肿瘤中均有表达，在正常表皮上未见表达。而且，Foxp3 在皮肤肿瘤细胞上呈阳性表达，且阳性率与皮肤肿瘤的恶性程度呈现相关性。BD 作为一种早期皮肤原位鳞癌，SCC 是皮肤表皮细胞的一种恶性肿瘤，我们的研究结果显示Foxp3 在 BD 和 SCC 中表达无显著性差别（$P>0.05$），提示原位癌中的肿瘤细胞可能已经获得了异常表达 Foxp3 的蛋白的能力，Foxp3 在 BD 发展过程中可能起着一定的作用。考虑到 Foxp3 对 Tregs 功能发挥的关键性作用，Foxp3 在肿瘤上的表达可能代表肿瘤抑制免疫反应，从而逃避破坏的新机制。而其形成的分子机制目前尚不明确，可能是采取分子模拟的形式，由肿瘤细胞产生的某些细胞因子模拟正常情况下启动或促进 Foxp3 蛋白表达细胞因子的功能[6]，抑或 Foxp3基因突变[5]，Foxp3 表达增加，从而使肿瘤细胞自身获得免疫抑制能力，在诱导 Tregs 生成和聚集的同时，自身也产生免疫抑制效果，进而发生免疫逃逸。另外，Lisa 等[5]发现，在肿瘤细胞上表达的 Foxp3 存在着外显子 3 和 4 的缺失，进而产生 Foxp3 蛋白存在氨基酸序列的差异，而这也可解释我们的实验结果与徐艳静等[21]的研究结果出现的差异。结构的差异对功能也产生着影响，在 Tregs 上 Foxp3 可以和活化 T 细胞核因子（Nuclear factor of activated T cells，NFAT）形成复合物，从而调控包括 IL-2在内的多种目的基因的转录[22]，Foxp3 赋予 Tregs 免疫抑制表型就是通过下调 T 细胞刺激性靶基因来实现的[23]，而在对黑色素瘤和胰腺癌的研究中发现，肿瘤细胞表达的 Foxp3 仅能抑制 T 细胞的增殖，但不能抑制 T 细胞的激活，这有别于 Tregs，但具体机制尚不清楚。在实验中还发现，Foxp3 在肿瘤细胞中位于细胞质，和在淋巴细胞上位于细胞核不一样，这种亚细胞转位可能与转录后修饰有关[24]。然而，Zuo 等[25]却发现 Foxp3 在正常乳腺上皮细胞有表达，而在乳腺癌却因 Foxp3 转录水平下降或 Foxp3 位点的缺失而致表达下调，并且 Foxp3 导入肿瘤细胞可下调 HER-2/ErbB2 致癌基因的表达。综上，$Foxp3^+$Tregs 和 Foxp3 在不同肿瘤中发挥的具体作用有所不同，Foxp3 与肿瘤免疫的关系有待进一步明确。

相信随着越来越多的 Foxp3 在肿瘤细胞上表达的发现，Foxp3 的表达和功能将不再局限于 Tregs，而在生物学领域扮演更加广泛的角色，比如赋予肿瘤细胞免疫抑制能力。这些发现将使通过阻遏肿瘤细胞表达 Foxp3 而增加肿瘤的免疫原性和应用针对变异的 Foxp3 蛋白的疫苗来治疗肿瘤可能性增加，从而使 Foxp3 得到更广泛的应用。

参 考 文 献

[1] Pascale Quatresooz, Claudine Piérara-Franchimont, Philippe Paquet, et al. Crossroads between actinic keratosis and squamous cell carcinoma, and novel pharmacological issues[J]. Eur J Dermatol, 2008, 18(1): 6-10.

[2] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, et al. Immunologic tolerance maintained by $CD25^+$ $CD4^+$ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance[J]. Immunol Rev, 2001, 182(1): 18-32.

[3] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3[J]. Science, 2003, 299(5609): 1057-1061.

[4] Fontenot J D, Rasmussen J P, Williams L M, et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3[J]. Immunity, 2005, 22(3): 329-341.

[5] Lisa M. Eber, Bee Shin Tan, Judy Browning, et al. The Regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells [J]. Cancer Res, 2008, 68(8): 3001-3009.

[6] Sebastian Hinz, Laia Pagerols-Raluy, Hans-Heinrich Oberg, et al. Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(17): 8344-8350.

[7] Xue L, Lu H Q, He J, et al. Expression of FOXP3 in esophagial squamous cell carcinoma relating to the clinical data[J]. Dis Esophagus, 2010, 23(4): 340-346.

[8] Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(4): 263-274.

[9] Shevach E M, DiPaolo R A, Andersson J, et al. The lifestyle of naturally occurring $CD4^+CD25^+$ $Foxp3^+$ regulatory T cells[J]. Immunol Rev, 2006, 212(1): 60-73.

[10] Brunkow M E, Jeffery E W, Hjerrild K A, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in thefatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse[J]. Nat. Genet, 2001, 27(1): 68-73.

神经病学研究 文章编号：0253-3626（2011）06-0663-04

葛根素对缺氧缺血脑损伤后学习记忆能力及 NMDA 受体的影响

盛志强，肖 农，许 蓓，张晓萍
（重庆医科大学附属儿童医院康复中心，重庆 400014）

【摘 要】目的：观察葛根素（Puerarin，Pue）对新生鼠缺氧缺血后学习记忆的远期影响及其可能机制。方法：7 d 龄 SD 大鼠随机分为 3 组：假手术组（Sham 组）；对照组（Con 组）；葛根素组（Pue 组）。各组分别于 8 周龄时 Morris 水迷宫检测其学习记忆能力，于 3、4 周和 8 周龄时采用免疫组化方法检测各组 NR2A 和 NR2B 在海马 CA1 区的表达。结果：①8 周时 Con 组比 Sham 组平均潜伏期明显延长（$P<0.05$），穿越平台次数显著减少（$P<0.01$）；与 Con 组相比，Pue 组的平均潜伏期和穿越平台次数均得到明显改善（$P<0.05$）。②Con 组 3、4 周和 8 周时海马 CA1 区 NR2A 和 NR2B 的表达均明显低于 Sham 组（$P<0.01$）；Pue 组 NR2A蛋白在 3 周和 8 周时的表达比同一时间点 Con 组明显增多（$P<0.05$），NR2B 蛋白在 3 周和 4 周时的表达明显比 Con 组增多（$P<0.05$）。结论：Pue 能提高缺氧缺血新生大鼠年长后的学习记忆能力，其保护作用可能和 Pue 增加海马 CA1 区 NR2A 和 NR2B 的表达有关。

【关键词】葛根素；缺氧-缺血；N-甲基-D-天冬氨酸受体；学习记忆
【中国图书分类法分类号】R338.64 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-12-24

作者介绍：盛志强（1983- ），男，硕士，
研究方向：儿科学神经康复。
通信作者：肖 农，男，教授，Email：xiaonongwl@163.com。
基金项目：重庆市卫生局科研资助项目（编号：2009-2-260）。

[11] Hori S，Sakaguchi.Foxp3:a critical regulator of the development and function of regulatory T cells[J].Microbes Infect，2004，6(8)：745-751.

[12] Chen W，Jin W，Hardegen N，et al.Conversion of peripheral CD4$^+$CD25$^-$ naive T cells to CD4$^+$CD25$^+$ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3[J].J Exp Med，2003，198(12)：1875-1886.

[13] Roncador G，Brown P J，Maestre L，et al.Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4$^+$CD25$^+$ regulatory T cells at the single-cell level[J].Eur J Immunol，2005，35(6)：1681-1691.

[14] Shimizu K，Nakata M，Hirami Y，et al.Tumorinfiltrating Foxp3$^+$ regulatory T cells are correlated with cyclooxygenase-2 expression and are associated with recurence in resected non-small cell lung cancer [J].J Thorac Oncol，2010，5(5)：585-590.

[15] Wolf D，Wolf A M，Rumpold H，et al.The expression of the regulatory T cell specific forkhead box transcriptionfactor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovariancancer[J].Clin Cancer Res，2005，11(23)：8226-8229.

[16] Mizukami Y，Kono K，Kawaguchi Y，et al.Localisation pattern of Foxp3$^+$ regulatory T cells is associated with clinicalbehaviour in gastric cancer[J].Br J Cancer，2008，98(1)：148-153.

[17] Zhou J，Ding T，Pan W，et al.Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients[J].Int J Cancer，2009，125(7)：1640-1648.

[18] Hiraoka N，Onozato K，Kosuge T，et al.Prevalence of FOXP3$^+$ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions[J].Clin Cancer Res，2006，12(18)：5423-5434.

[19] Nagai H，Horikawa T，Hara I，et al.In vivo elimination of CD25$^+$ regulatory T cells leads to tumor rejection of B16F-10 melanoma，when combined with interleukin-12 genetransfer[J].Exp Dermatol，2004，13(10)：613-620.

[20] Vaios Karanikas，Matthaios Speletas，Maria Zamanakou，et al.Foxp3 expression in human cancer cells[J].Journal of Translational Medicine，2008，6(1)：19.

[21] 徐艳静，郭淑兰.FOXP3 在正常人皮肤和表皮肿瘤中的表达及意义[J].山东大学学报，2010，48(3)：149-151.

[22] Wu Y，Borde M，Heissmeyer V，et al.FOXP3 controls regulatory T-cell function through cooperation with NFAT[J].Cell，2006，126(2)：375-387.

[23] Marson A，Kretschmer K，Frampton G，et al.Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulition[J].Nature，2007，445(7130)：931-935.

[24] Chen C，Rowell E A，Thomas R M，et al.Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation[J].J Biol Chem，2006，281(48)：36828-36834.

[25] Zuo T，Wang L，Morrison C，et al.FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene[J].Cell，2007，129(7)：1275-1286.

（责任编辑：关蕴良）