



永安市宫颈癌患者外周血 Th17 与 Treg 细胞的表达

林联韵 高丽丹 江峰 (福建中医药大学第五附属第一医院 三明市第二医院 福建永安 366000)

摘要:目的 探讨 Th17 细胞、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞 (Treg) 在宫颈癌发生发展中的作用。方法 36 例宫颈癌患者、50 例 (HPV 阳性) 妇女和 50 例健康体检者 (HPV 阴性) 为对照组。采用流式细胞术检测各组外周血中 Th17、Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例, 用 ELISA 方法检测相关细胞因子 IL-17 和 TGF- β 的水平。结果 宫颈癌患者、HPV 阳性组外周血中 Th17、Treg 细胞比例明显高于健康对照组, 比较有明显差异 ($P < 0.05$)。结论 Th17、Treg 细胞比例升高及比例失衡可能是宫颈癌发生发展的重要原因之一。

关键词: 永安 宫颈癌 Th17 细胞 Treg 细胞

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-5187 (2018) 07-015-02

宫颈癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一, 在世界范围内导致女性死亡的恶性肿瘤中位居第二位^[1]。宫颈癌的病因多种, 一般认为与早婚、多产、性生活紊乱、子宫颈裂伤、包皮垢及感染等因素有关, 尤其与人类乳头状瘤病毒的感染有关。在肿瘤发生发展过程中, 免疫系统功能异常发挥重要作用。近来的研究发现 Th17 细胞及 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞是一种不同于 Th1 和 Th2 的新型 CD4⁺T 细胞亚类, 二者比例失衡在动脉粥样硬化性疾病、类风湿性关节炎等慢性炎症性疾病和自身免疫性疾病的发生发展中起重大的作用^[2, 3]。本研究通过检测三组患者外周血 Th17、Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例及其相关细胞因子的水平, 探讨其在宫颈癌发生发展中的作用, 为临床免疫治疗宫颈癌提供一定的实验依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择 2015 年 9 月至 2017 年 9 月三明市第二医院收治 36 例宫颈癌患者, 所有患者均经病理学和影像学诊断; 另外选取与宫颈癌组相应的 50 例 (HPV 阳性) 妇女和 50 例健康体检者 (HPV 阴性) 为对照组。所有患者标本和数据均获得三明市第二医院伦理委员会的批准。

1.2 仪器与试剂

FACS Caliber 流式细胞检测仪; Hema3200 基因扩增仪; DA8000 全自动核酸分子杂交仪; 抗人 IL-17-PE; 抗人 Foxp3-PE; FITC 标记抗人 CD4 抗体、APC 标记的抗人 CD25 抗体; 固定液、穿膜液; RPMI1640 培养液; 人乳头瘤病毒基因分型检测试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 HPV 检测: 用专用的宫颈刷提取妇科分泌物标本, 严格按照 HPV 检测试剂盒的操作步骤, 进行 PCR 扩增; 扩增后的 PCR 标本进行杂交: 杂交-结合-洗膜-显色。肉眼观察检测结果, 阳性点为清晰可见的蓝紫色圆点。

1.3.2 ELISA 检测: 应用 ELISA 试剂盒对三组患者外周血中 IL-17 和 TGF- β 的水平进行检测, 严格按照说明书操作, 用酶标仪读取相应的 OD 值, 计算出相应的浓度值。

1.3.3 流式细胞术检测 Treg 细胞水平: 标抗体 (加抗体) 向 100ul 全血中加入 20ul FITC 标记抗人 CD4 抗体、APC 标记的抗人 CD25 抗体, 混匀后震荡 30min, 加 1ml 红细胞裂解液震荡混匀, 避光 10min, 离心 2000r/5min, 去上清加 50ul PBS 震荡后离心 2000r/5min; 加入固定液 500ul, 现配, 避光 30min, 加 500ul 穿膜液, 震荡后离心 2000r/5min 后去上清, 加 50ul 穿膜液, 在实验组和对照组分别加入 20ul PE 标记抗人 Foxp3 抗体以及 PE 标记兔 IgG2a 作为同型对照, 震荡过夜加 500ul 穿膜液, 震荡离心 2000r/5min; 加 500ul 穿膜液上流式细胞仪检测, 细胞计数应用 Cellquest 软件分析。

1.3.4 流式细胞术检测 Th17 细胞水平: 用 Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMC, 将全血体积相等的 PBS 加到全血中, 上下颠倒混匀, 然后缓慢加到淋巴细胞分离液中, 离心

2200r/30min, 吸出淋巴细胞, 后加入 PBS 洗两遍, 待用。吸上清, 加入 150ul 10% RPMI1640 培养液重悬, 铺入 96 孔板加试剂 (PMA; 离子霉素; BFA 每次取 0.1ul) 刺激 4-6h 后收细胞。收集细胞根据计数分为测定管和同型对照管; 收的细胞加 300ul PBS, 振荡离心 2000r/5min, 去上清后加 500ul 胞内固定液半小时后再加 500ul 胞内穿膜液离心 2000r/5min, 去上清后给予细胞因子染色。测定管加入 PE 标记的 IL-17 单抗 5ul, 对照管加入 5ul PE 标记兔 IgG 同型对照后振荡过夜。加 50ul 胞内穿膜液振荡离心 2000r/5min, 去上清加 300ul 胞内穿膜液, 应用流式细胞仪进行检测, 细胞计数用 Cellquest 软件进行分析。

1.4 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计学软件分析, 检测结果以均值 \pm 标准差表, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组外周血中的水平

ELISA 检测表明宫颈癌组 IL-17、TGF- β 浓度水平明显高于 HPV (阳性) 组, 而 HPV (阳性) 组相关细胞因子水平也高于健康对照组差异明显 ($P < 0.05$), 见表 1

表 1: 三组外周血中 IL-17 和 TGF- β 水平 (pg/ml)

组别	例数	IL-17 (pg/ml)	TGF- β (pg/ml)
宫颈癌组	36	34.26 \pm 5.62	404.25 \pm 140.35
HPV (阳性) 组	50	23.62 \pm 3.26	360.62 \pm 130.23
健康对照组	50	12.51 \pm 0.94	223.42 \pm 105.27

(宫颈癌组) VS (HPV 阳性组) VS (健康对照组) ($P < 0.05$)

2.2 三组外周血中 Treg/CD4⁺T 细胞、Th17/CD4⁺T 细胞百分比及 Treg/Th17 见表 2

由表 2 宫颈癌组 Treg/CD4⁺T 细胞、Th17/CD4⁺T 细胞百分比及 Treg/Th17 明显高于 HPV (阳性) 组, 而 HPV (阳性) 组与健康对照组比较, 也有明显差异明显 ($P < 0.05$), 见表 2

表 2: 三组外周血中 Treg、Th17 细胞表达水平及 Treg/Th17 比例

组别	例数	Treg 细胞	Th17 细胞	Treg/Th17
宫颈癌组	36	32.03 \pm 3.25	1.03 \pm 0.35	33.0
HPV (阳性) 组	50	10.25 \pm 2.22	0.65 \pm 0.22	18.2
健康对照组	50	3.38 \pm 1.22	0.49 \pm 0.15	6.9

(宫颈癌组) VS (HPV 阳性组) VS (健康对照组) ($P < 0.05$)

3 讨论

大量的研究表明, 肿瘤的发生与机体的免疫状态息息相关, 其中免疫耐受和免疫缺陷在肿瘤患者发病的过程中发挥重要的作用。机体免疫力缺陷或是低下时肿瘤的发病率较高, 而在肿瘤生长和进展时患者体内的免疫功能受到抑制, 两者互为因果, 对肿瘤的发展起着重要的作用。Th17 细胞是一个重要介导炎症的细胞, 许多自身免疫性疾病、感染性疾病与其相关, 白介素 17 (IL-17) 是其诱导炎症反应最主要的炎



症介质。Th17 细胞具有诱导血管形成、招募炎性细胞和激活转录因子,促进肿瘤细胞的生长增殖及抗凋亡能力,从而促进肿瘤的形成。在肿瘤发展过程中 Th17 则参与其中,并且 IL-17 具有促血管生成作用,有利于肿瘤生长、浸润、转移的发生^[4-7]。Numasaki 等^[5]研究发现,通过转染 IL-17 至非小细胞肺癌肿瘤细胞中,并将此细胞种植到 SCID 小鼠体内,结果发现 IL-17 选择性增强血管生成趋化因子的分泌,促进肿瘤血管分布,加速肿瘤的生长、浸润及转移。ZhanB 等人发现, Th17 细胞在胃癌患者的外周血和引流淋巴液中升高^[9],其升高程度与临床分期有关,认为 Th17 细胞可能促进了胃癌的发展。这与我们的研究宫颈癌组病人的结果相一致,与 HPV 阳性组和健康对照组相比,宫颈癌组病人 Th17 细胞的比例及相关细胞因子 IL-17 明显升高,这预示着 Th17 细胞可能促进宫颈癌的发生和发展。

Treg 细胞通过分泌 IL-10 和 TGF- β 等细胞因子抑制效应细胞功能,分泌颗粒酶和穿孔素杀伤效应细胞,干扰效应细胞的代谢功能,以及通过调控树突状细胞影响 Treg 细胞的分化和增殖等抑制机体免疫细胞的功能^[10]。Treg 细胞对 T 细胞主导的肿瘤细胞杀伤作用,具有强烈的抑制效果,减少对肿瘤细胞的攻击,诱导肿瘤细胞呈现免疫耐受而逃脱免疫系统杀伤。Treg 细胞主要发挥免疫抑制作用,与许多肿瘤的发生呈正相关,包括乳腺癌、宫颈癌等,外周血中 Treg 细胞的百分率升高与肿瘤的分期、大小及淋巴转移呈正相关^[11-12]。我们的研究发现 HPV 阳性组 Treg 细胞比例及相关细胞因子较健康对照组明显升高,而宫颈癌组较 HPV 阳性组 Treg 细胞比例及其因子又大大提高,这提示我们在宫颈癌组病人免疫防御功能受到抑制,其机体的免疫环境可能有利于宫颈癌的发生和发展。

综上所述, Th17 细胞与 Treg 细胞存在平衡状态,宫颈癌患者 Treg/Th17 比例变化,导致机体免疫功能紊乱,而且这种紊乱可能是宫颈癌发生及发展的重要原因。更加深入探讨宫颈癌的免疫损伤机制,将有助于对宫颈癌更好的开展多方面的治疗、预防。

参考文献

[1] Singel R, Naishadham D, Jemal A(2013) Cancer Statistics,

(上接第 13 页)

脾肾阴虚证型为 (6.3 \pm 1.67), 气阴两虚证型为 (8.7 \pm 1.74) 分。由此可分析,与脾肾气虚证、气阴两虚证相比,肝肾阴虚证发展程度更高。

综上,肾小球肾炎中医辨证与检验指标,存在关联性,为临床诊疗提供可靠依据。但是,本次研究样本例数不多,代表性不强,因此,关于小球肾炎中医辨证和检验指标的相关意义,还需临床进一步研究。

参考文献

[1] 瞿毅. 肾小球肾炎中医辨证与检验指标相关意义分析[J]. 检

(上接第 14 页)

管及颅脑疾病的患者不宜施行此手术;手术时间较长,麻醉较复杂,费用较贵;并发症发生率较高,如牙齿松动或脱落、软腭黏膜损伤等。因此,对于简单型声带息肉,若患者耐受好,无手术禁忌,推荐电子、纤维喉镜治疗;复杂型声带息肉推荐支撑喉镜治疗。

笔者经验认为,无论何种方式的手术均应注意以下几点,①患者的正确选择很重要,这一方面既要考虑患者的经济状况,更要依据患者的病情。②常规送检十分重要,既可预防漏诊和误诊,做到早发现,早治愈,也是我们医务工作者自我保护的措施之一。

参考文献

[1] 尹中普. 支撑喉镜与纤维喉镜下手术治疗声带息肉的比较研

2013. CA Cancer J Clin63:11-30. doi:10.3322/caac.21166.

[2] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会,中国心肌病诊断与治疗建议工作组. 心肌病诊断与治疗建议[J]. 中华心血管杂志, 2007, 35(1):5-16.

[3] Xie Y, Chen R, Zhang X et al. The role of Th17 cells and regulatory T cells in Cocksackievirus_{B3}-induced myocarditis. Virology 2011, 421:72-84.

[4] 戴娟, 张光波, 高楠, 等. 炎症性肠病患者外周血辅助性 T 细胞 1 和辅助性 T 细胞 17 水平及其临床意义[J]. 中华内科杂志, 2013, 52(5):375-378.

[5] 齐文慧, 黄小娟, 王俊艳. Th17 细胞与肿瘤微环境关系的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2013, 32(5):297-300.

[6] Chang H, Hanawa H, Yoshida T, et al. Alteration of IL-17 related protein expressions in experimental autoimmune myocarditis and inhibition of IL-17 by IL-10-Ig fusion gene transfer. Circ J, 2008, 72(5):813-819.

[7] Yuan J, Cao AL, Yu M, et al. Th17 cells facilitate the humoral immune response in patients with acute viral myocarditis[J]. Clin Immunol, 2010, 30(2): 226-234.

[8] Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, et al. IL 17en-hances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis[J]. J Immunol, 2005, 175(9):6177-6189.

[9] Zhang B, Rong G, Wei H, et al. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374(3): 533-537.

[10] 于益芝, 曹雪涛, 调节性 T 细胞在肿瘤免疫和肿瘤免疫治疗中的作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, 17(1):1-6.

[11] Shang B, Liu Y, Jiang SJ, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3 regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis[J]. Sci Rep, 2015, 5:15179.

[12] Luo Q, Zhang S, Wei H, et al. Roles of FoxP3 in the occurrence and development of cervical cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(8): 8717-8730.

验医学与临床, 2013, (24):3332-3333.

[2] 刘纯洁, 彭海洪. 肾小球肾炎中医辨证与检验指标相关意义探讨[J]. 中国中医药现代远程教育, 2014, (20):109-110.

[3] 刘鹏. 肾小球肾炎中医辨证与检验指标相关意义探讨[J]. 医学信息, 2016, 29(8):360-361.

[4] 马秋生. 肾小球肾炎中医辨证和检验指标的相关意义分析[J]. 中医临床研究, 2015, 7(36):26-27.

[5] 季存峰. 肾小球肾炎中医辨证与检验指标相关意义[J]. 中国卫生标准管理, 2016, 7(14):135-136.

究[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(7):75-78.

[2] 黄钦辉, 阙镇如, 冉骞, 张智斌, 蔡继壹. 显微支撑喉镜与纤维喉镜下 YAG 激光手术治疗声带息肉的疗效研究[J]. 中国医学装备, 2015(12):114-117.

[3] 邓素云. 支撑喉镜和纤维喉镜下手术治疗声带息肉的疗效评估[J]. 海南医学院学报, 2017, 23(1):113-115.

[4] 景鹏, 王飞娟. 全麻支撑喉镜术与局麻纤维喉镜术治疗声带息肉的疗效对比分析[J]. 中国医刊, 2017, 52(6):54-55.

[5] 纪东, 桂晓钟, 蒋传亚, 王节. CO₂ 激光喉显微手术与电子喉镜手术治疗声带息肉效果比较[J]. 安徽医学, 2015, 36(9):1095-1097.

[6] 孙素潭, 任广理, 贾凤亭, 丁鹏. 表麻联合右美托咪定无插管与全麻插管支撑喉镜下声带息肉摘除术对心血管反应的影响[J]. 河北医药, 2017, 39(2):233-235.