

[文章编号] 1000 - 4718(2007)08 - 1512 - 04

核转录因子 FOXP3 在肺癌组织中的表达及意义

张晓菊, 张劲农, 金 阳, 张建初, 陶晓南, 白 明
(华中科技大学同济医学院附属协和医院呼吸科, 湖北 武汉 430022)

[摘要] 目的: 检测核转录因子 FOXP3 在不同病变肺组织中的表达, 分析 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞在不同病变肺组织中的浸润情况, 并进一步探讨不同病理类型的肺癌组织中 FOXP3 表达的异同。方法: 使用 RT - PCR 及 Western blotting 方法, 检测 21 例肺癌、7 例支气管扩张、5 例炎性假瘤、3 例结核球以及 15 例病灶旁手术切除正常肺组织共 153 份标本中 FOXP3 mRNA 及蛋白的表达。结果: 肺癌、肺良性病变及病灶旁正常肺组织 FOXP3 mRNA 及蛋白的表达阳性分别为 41/63、8/45、0/45 ($P < 0.05$), 肺癌与肺良性病变组织均有 FOXP3 mRNA 及蛋白表达, 分析其平均吸光度 A 值之间有显著差异 ($P < 0.01$)。病灶旁正常肺组织 FOXP3 mRNA 及蛋白无表达。不同病理类型肺癌组织中均有 FOXP3 mRNA 及蛋白的表达, 分析其平均吸光度 A 值之间无显著差异 ($P > 0.05$)。结论: FOXP3 可作为 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的一种标志物。肺癌与肺良性病变组织均有 FOXP3 mRNA 及蛋白表达, FOXP3 在肺癌组织中表达强于肺良性病变组织。

[关键词] CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞; 肺肿瘤; 转录因子 FOXP3

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Expression of FOXP3 in human lung cancer tissue and its biological role

ZHANG Xiao - ju, ZHANG Jin - nong, JIN Yang, ZHANG Jian - chu, TAO Xiao - nan, BAI Ming

(Department of Pulmonary Medicine, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430022, China. E - mail: phd - kang@hotmail.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To localize the expression of forkhead/winged helix transcription factor (FOXP3) gene in different types of pathological lung tissues and explore its biological role in pathogenesis of human lung cancer. **METHODS:** By using RT - PCR and Western blotting, the expressions of FOXP3 mRNA and related protein in 153 samples including lung cancer ($n = 63$), lung benign lesion ($n = 45$) and normal lung tissues ($n = 45$) were analyzed. **RESULTS:** The positive expressions of FOXP3 mRNA and its protein were observed in lung cancer and in benign lesion lung tissue samples with significant difference ($P < 0.01$). No positive expression of FOXP3 in normal lung tissue and in the tissues closing to benign lesions was observed. All pathological types of lung cancer tissues showed positive expression of FOXP3 mRNA and its protein without significant difference in the expression levels ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** FOXP3 is a biomarker of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell. They are expressed both in lung cancer and benign lesion lung tissues, but not in normal lung tissue. The expression of FOXP3 is more intensive in cancer tissues than that in benign lesions.

[KEY WORDS] CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells; Lung neoplasms; Transcription factor FOXP3

FOXP3 (forkhead/winged helix transcription factor) 或称叉状头/翅膀状螺旋转录因子, 在调控 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的发育上起很重要的作用。FOXP3 最初是在研究自身免疫性疾病过程中发现的一种转录因子^[1]。Hori 等^[2]证明转导了 FOXP3 的 CD4⁺ CD25⁺ 细胞可在淋巴细胞减少小鼠阻止诱导自身免疫性结肠炎和自身免疫性胃炎的发生, 并在体外抑制幼稚 T 细胞的增殖。最新研究发现 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞活化后转录因子 FOXP3 表达明显增加^[3], 用 FOXP3/MIGR1 构建病毒载体,

转染 CD4⁺ CD25⁻ T 细胞后可以使阳性转染的细胞呈现出类似 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的功能^[4], CD4⁺ CD25⁻ T 细胞激活后不表达 FOXP3, 淋巴细胞减少小鼠通过自身的启动子驱动的转基因过度表达 FOXP3 后比野生型小鼠产生更多的 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞^[5], 进一步证明 FOXP3 在调节性 T 细胞发育中起重要作用的证据是在小鼠中转导 FOXP3 基因入 CD4⁺ CD25⁺ 细胞, 使 CD4⁺ CD25⁺ 这一群体细胞不再过度增殖, 并可抑制 CD8⁺ T 细胞的增殖^[6], 故而认为 FOXP3 是调控 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞

[收稿日期] 2005 - 11 - 28 [修回日期] 2006 - 03 - 27

Tel: 027 - 62656309; 027 - 85726289; E - mail: phd_kang@hotmail.com

生长发育的标志性转录因子。本实验的目的在于探讨肺癌组织中 FOXP3 的表达分布,分析 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞在不同病变肺组织中的浸润情况,并进一步探讨不同病理类型的肺癌组织中 FOXP3 表达的异同,进而为研究 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞在肺癌发病机制中的作用提供部分实验基础。

材 料 和 方 法

1 病例资料及实验试剂

153 份冻存标本取自我院住院的 36 例手术患者,其中男性 19 例,女性 17 例,年龄 22 - 73 岁,平均 (51 ± 7) 岁,肺癌患者 21 例,肺良性病变 15 例(7 例支气管扩张,5 例炎性假瘤,3 例结核球),病灶旁正常组织 15 例。肺癌按 1997 年的 TMN 分期方法进行分期^[7],其中 I 期 4 例、II 期 3 例、III 期 14 例,无 0 期和 IV 期病例,按病理形态学分:鳞状细胞癌 12 例,腺癌 9 例。良、恶性病变组织取自肿块非坏死部分,病灶旁组织取自肺良性病变远离病灶 3 cm 以上的正常肺组织,手术切除后无菌条件下清洗血迹,放入液氮内速冻后, - 80 °C 冰箱内冻存备用。

Trizol™ 试剂盒、RT - PCR 试剂盒、DNA marker (DL2000)、蛋白酶抑制剂 PMSF、BCA 蛋白定量试剂盒;ECL 试剂盒、抗 FOXP3 多克隆抗体、抗 β - actin 多克隆抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔 IgG 均购自武汉凌飞生物技术公司。

2 逆转录聚合酶链式反应 (RT - PCR)

各组取肺组织 50 - 100 mg,加入 1 mL Trizol™ 溶液在玻璃匀浆器中彻底匀浆,用 PBS 洗 2 次,离心后吸去上清。加入 Trizol 试剂 1 mL,混匀后再加入氯仿 0.2 mL,振荡 15 s,置室温 2 - 3 min 后,按 12 000 r/min 4 °C 离心 10 min。吸取上层水移至另一 Ep 管中,加 0.5 mL 异丙醇,置室温 10 min,再按 12 000 r/min 4 °C 离心 10 min,吸去上清,加入 75% 乙醇 1 mL,充分洗涤沉淀,按 8 000 r/min 4 °C 离心 5 min,弃上清,真空干燥后,沉淀重悬于无 RNase 水中,取 5 μL 于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,以检验提取的 RNA 是否降解,用紫外分光光度计 (A_{260} , A_{280}) 测定 RNA 的浓度和纯度。参考《PCR 技术实验指南》的方法,略作修改进行逆转录,简介如下:反应体系中各加入 2.5 mmol/L 浓度的 dNTP 溶液 4 μL、RNA 酶抑制剂 (RNasin) 20 U、Oligo (dt) 0.3 μg、0.1 mol/L DDT 2.5 μL,提取的 RNA 5 μg,加水至 19 μL,上述混合物 70 °C 加热 5 min 后,冰上冷却。然后加入 M - MLV 逆转录酶 200 U,5 × 逆转录酶缓冲液 5 μL,终体积为 25 μL,简短离心、混匀后 37 °C 水浴 60 min,最后 90 °C 5 min 灭活 M - MLV 活性,冰上冷却后即完成 cDNA 的合成。

根据 GenBank 中 FOXP3 序列 NM - 054039 设计

FOXP3、β - actin 引物序列:由上海生工生物工程技术公司合成。

FOXP3 上游引物:5' - GTCTTGCCAAGCTGGAAGAC - 3';下游引物:5' - CCACAGTGGAGAGCTGATGC - 3';扩增产物大小为 309 bp。β - actin 上游引物:5' - ATCATGTTTGAGACCTTTCAACA - 3';下游引物:5' - CACCTCTTTGCTCCGAAGTCCAA - 3';扩增产物大小为 660 bp。

在 25 μL 反应体系中含有 2.5 mmol/L dNTP 2 μL,40 pmol/L 上下游引物各 1 μL,cDNA 1 μL、DMSO 0.75 μL、PfuDNA 聚合酶 1.25 U、5 × PfuDNA 聚合酶缓冲液 2.5 μL,去离子水 17.5 μL。反应条件为:FOXP3:94 °C 变性 45 s,53 °C 30 s,72 °C 45 s,共 30 个循环。

电泳及凝胶分析:取 10 μL RT - PCR 产物及 10 μL DNA marker 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 30 min (80 V),采用美国 MUVF 公司的凝胶成像系统 (美国 ULTRA - LUM 公司) 进行摄像分析。结果用 FOXP3/β - actin 半定量表示 FOXP3 mRNA 的相对水平。

3 Western blotting 检测 FOXP3 蛋白表达

取 50 - 400 mg 组织置玻璃匀浆器内,立即加入预冷的裂解液 50 mmol/L Tris - HCl (pH 7.5),150 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,0.25% 脱氧胆酸钠,1% Triton X - 100,0.1% SDS,1 mmol/L NaF,1 mmol/L Na₃VO₄,加蛋白酶抑制剂 10 μg/mL aprotinin,1 mmol/L PMSF。再补足裂解液至 100 - 120 μL,振荡 10 s,冰上约 10 min。然后超声破碎细胞,60 W,3 - 5 次,每次约 3 s。接着 12 000 × g,4 °C 离心 10 - 15 min。将提取液的蛋白含量调整为 2 g/L,各取 50 μg 蛋白经 10% 十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转移法转膜,用含 5% 脱脂奶粉、0.02% 的叠氮钠的 PBS 缓冲液封闭 1 - 2 h,加入 I 抗,37 °C 孵育 1 - 2 h,与辣根过氧化物酶共价偶联二级免疫球蛋白共温育 1 h 后,用 DAB 显色。

4 统计学处理

数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 χ^2 检验、*t* 检验及方差分析行统计学处理,全部统计资料采用 SPSS 13.0 软件完成。

结 果

1 肺癌、肺良性病变及病灶旁肺组织 FOXP3

FOXP3 mRNA 及蛋白的表达阳性,分别为 41/63、8/45、0/45 ($P < 0.05$),检测结果表明,肺癌与肺良性病变组织均有 FOXP3 mRNA 及蛋白表达,分析其平均吸光度 *A* 值之间有显著差异 ($P < 0.01$),如表 1 所示。病灶旁正常肺组织 FOXP3 mRNA 及蛋白无表达,见图 1、2。

表 1 不同病变肺组织 FOXP3 mRNA 及蛋白的表达

Tab 1 Expression of FOXP3 gene in different types of pathological lung tissues (A value. $\bar{x} \pm s$)

Group	mRNA	Protein	Ratio
Cancer (n = 63)	0.4523 ± 0.0790	0.0872 ± 0.0019	65.1% (41/63)
Benign lesion (n = 45)	0.0630 ± 0.0014*	0.0076 ± 0.0010*	17.9% (8/45)*
Normal tissues (n = 45)	0	0	0

* P < 0.01 vs cancer group.

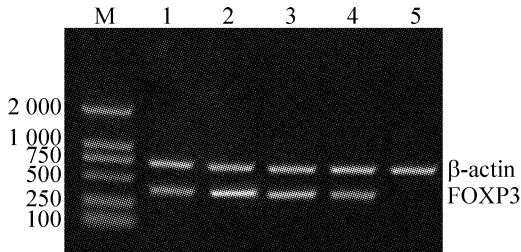


Fig 1 Expression of FOXP3 mRNA gene in different types of pathological lung tissues. M: marker; 1: adenocarcinoma; 2,3: squamous carcinoma; 4: benign lesion; 5: normal lung tissue.

图 1 不同病变肺组织 FOXP3 mRNA 的表达

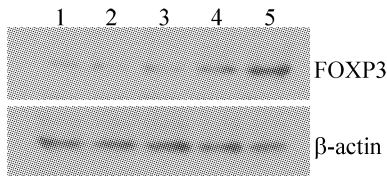


Fig 2 Expression of FOXP3 protein in different types of pathological lung tissues. 1: normal lung tissue; 2: benign lesion; 3: adenocarcinoma; 4,5: squamous carcinoma.

图 2 不同病变肺组织 FOXP3 蛋白的表达

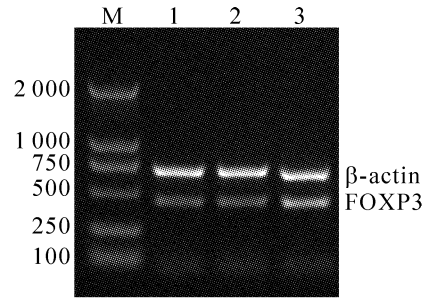


Fig 3 Expression of FOXP3 mRNA in lung cancer tissue of different stages. M: marker; 1: I stage; 2: II stage; 3: III stage.

图 3 不同分期肺癌组织 FOXP3 mRNA 的表达

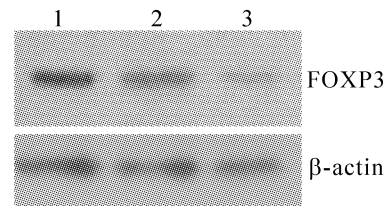


Fig 4 Expression of FOXP3 protein in lung cancer tissue of different stages. 1: III stage; 2: II stage; 3: I stage.

图 4 不同分期肺癌组织 FOXP3 蛋白的表达

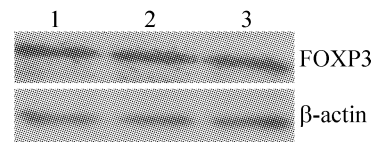


Fig 5 Expression of FOXP3 protein in lung cancer tissue of different pathological styles. 1: adenocarcinoma; 2, 3: squamous carcinoma.

图 5 不同病理分型肺癌组织 FOXP3 蛋白的表达

2 肺癌组织 FOXP3 mRNA 表达强度与 TNM 分期、病理分型的关系

FOXP3 mRNA 表达强度用平均吸光度 A 值表示,不同病理类型的肺癌组织中均有 FOXP3 mRNA 的表达,A 值越高表达强度越强。腺癌和鳞癌 A 值分别为 0.413 ± 0.031 和 0.647 ± 0.018 ,两组间经 t 检验无显著差异 ($P > 0.05$)。经方差分析检验, I 期、II 期和 III 期 A 值分别为 0.192 ± 0.010 、 0.383 ± 0.053 和 0.957 ± 0.036 , I 期、II 期之间差异无显著 ($P > 0.05$),但 II 期和 III 期 A 值差异显著 ($P < 0.05$),见图 3。

3 肺癌组织 FOXP3 蛋白表达强度与 TNM 分期、病理分型的关系

对肺癌组织 FOXP3 蛋白表达的强度(吸光度 A 值)进行了比较,腺癌和鳞癌 A 值分别为 0.0765 ± 0.0012 和 0.0658 ± 0.0042 ,两组间经 t 检验无显著差异 ($P > 0.05$)。I 期、II 期和 III 期肺癌组织 FOXP3 蛋白表达强度 A 值分别为 0.0324 ± 0.0021 、 0.0383 ± 0.0043 和 0.1083 ± 0.0360 ,经方差分析检验, I 期、II 期之间 A 值无显著差异 ($P > 0.05$), II 期和 III 期 A 值差异显著 ($P < 0.05$),见图 4、5。

讨论

CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞是新近被鉴定的一种新型免疫抑制细胞,其免疫机制目前尚未完全清楚^[8]。现有的实验资料表明 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞既可以来源于胸腺,又可以由外周幼稚 T 细胞接触高浓度抗原分化而来^[9], CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞具有低反应性及免疫抑制 2 大功能特征,经细胞表面 T 细胞受体 (TCR) 激活后,可以通过分泌抑制性细胞因子、细胞接触、竞争抑制等方式发挥免疫抑制功能^[10]。转录因子 FOXP3 已被证明是调控 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞发育和维持功能的重要基因,已经证实 FOXP3 的 mRNA 及其编码蛋白只特异性表达于 Treg 细胞,而其它 CD4⁺ T 细胞亚群包括静息

CD4⁺ T 细胞、活化的 Th1/ Th2、甚至 NK T 细胞均极少表达 FOXP3,充分表明 FOXP3 是控制 Treg 发育及其功能效应的关键基因^[11],同时也揭示外周 Treg 来源有 2 种可能:(1)外周原初 T 细胞有可能分化为 Treg 细胞;(2)胸腺中可能产生具有类似 Treg 细胞功能的 CD25⁺ 细胞,这种细胞活化以后有可能转化为 CD25⁺ Treg 细胞。

我们在肺组织的检测发现,41/63 份肺癌组织病理标本 FOXP3 表达阳性,在 8/45 份肺良性实质性病变组织病理标本 FOXP3 表达亦阳性,但病灶旁正常肺组织无阳性表达。对肺癌组织中 FOXP3 的检测,无论从 mRNA 或蛋白质水平,均提示有 FOXP3 基因表达,表明肺癌组织中有 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的渗入,成为肿瘤浸润淋巴细胞的一组分。肺部良性病变组织也检测到 FOXP3 mRNA 或蛋白微弱的表达,表明在肺部良性病变组织亦有 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞免疫机制的参与,以 A 值为准比较肺癌与肺部良性病变组织 FOXP3 mRNA 或蛋白表达强度,肺癌组织表达明显增强,差异显著($P < 0.01$)。可见肺癌与肺部良性病变局部的免疫机制是有区别的,肺癌组织中有更强的 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞机制参与。但部分肺癌标本中未检测到 FOXP3 mRNA 或蛋白质阳性表达,分析其原因可能是标本的采集问题,或免疫细胞多分布在肿瘤组织周边,肿瘤组织内部缺乏浸润淋巴细胞。

尽管 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞分泌 IL - 10, IL - 4 及 TGF - β_1 等具有一定免疫抑制作用的细胞因子^[12],但是它主要通过直接接触发挥作用,我们检测到肺癌组织局部有大量的 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞浸润,亦是上述论点的一个旁证。我们检测到的 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的分布同肺癌的病理类型无明显相关。无论鳞癌抑或腺癌,其 FOXP3 mRNA 及蛋白的表达无明显差异,但均高于对照组。Liyanage 等^[13]发现 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞在肿瘤组织和外周均有升高。Woo 等^[14]比较了 NSCLC 同正常个体 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的表达,结果发现 NSCLC 瘤组织内有明显的升高。对这种现象的解释可能为肿瘤诱导的 Treg 的增殖,或 Treg 对肿瘤抗原刺激的生理性增殖。对于不同分期的肺癌,其 FOXP3 的表达亦有所不同,提示随着肺癌的进展,免疫系统受抑制的状况越来越明显,随着肿瘤细胞增多,无论是通过细胞直接接触或通过分泌调节性细胞因子,使更多的 T 细胞表现出 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的功能特征,具体机制有待于进一步研究。总之可视为 T 调节细胞降低了机体对肿瘤细胞的免疫监视,从而可能在肿瘤的发展过程中发挥作用。

[参 考 文 献]

[1] Bluestone JA, Tang Q. How do CD4⁺ CD25⁺ regulatory T

cells control autoimmunity? [J]. *Curr Opin Immunol*, 2005, 17(6): 638 - 642.

- [2] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 [J]. *Science*, 2003, 299(5609): 1057 - 1061.
- [3] Albert MH, Liu Y, Anasetti C, et al. Antigen - dependent suppression of alloresponses by Foxp3 - induced regulatory T cells in transplantation [J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35(9): 2598 - 2607.
- [4] Chen Z, Benoist C, Mathis D. How defects in central tolerance impinge on a deficiency in regulatory T cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(41): 14735 - 14740.
- [5] Fujishima M, Hirokawa M, Fujishima N, et al. TCR alpha beta repertoire diversity of human naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells [J]. *Immunol Lett*, 2005, 99(2): 193 - 197.
- [6] Jarvis LB, Matyszak MK, Duggleby RC, et al. Autoreactive human peripheral blood CD8⁺ T cells with a regulatory phenotype and function [J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35(10): 2896 - 2908.
- [7] Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer [J]. *Chest*, 1997, 111(6): 1710 - 1717.
- [8] 肇静娴, 曾耀英, 李海仙, 等. 佛波醇酯加离子霉素诱导脐血和成人外周血 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞分泌 IL - 2 的相关机制研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(6): 1133 - 1137.
- [9] Coutinho A, Caramalho I, Seixas E, et al. Thymic commitment of regulatory T cells is a pathway of TCR - dependent selection that isolates repertoires undergoing positive or negative selection [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005, 293(1): 43 - 71.
- [10] 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.
- [11] Yagi H, Nomura T, Nakamura K, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells [J]. *Int Immunol*, 2004, 16(11): 1643 - 1656.
- [12] Masuyama J, Kaga S, Kano S, et al. A novel costimulation pathway via the 4C8 antigen for the induction of CD4⁺ regulatory T cells [J]. *J Immunol*, 2002, 169(7): 3710 - 3716.
- [13] Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma [J]. *J Immunol*, 2002, 169(5): 2756 - 2761.
- [14] Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al. Regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells in tumors from patients with early - stage non - small cell lung cancer and late - stage ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(12): 4766 - 4772.