

[文章编号] 1000-4718(2006)11-2202-05

## 胃癌患者 PBMCs 中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞体外增殖及对 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 细胞增殖的影响

王凌云<sup>1</sup>, 陈梅<sup>2</sup>, 朱兆华<sup>1△</sup>, 彭辉<sup>3</sup>, 吴长有<sup>3</sup>(中山大学附属第二医院<sup>1</sup> 消化内科, <sup>2</sup> 检验科, 广东 广州 510120; <sup>3</sup> 中山大学基础医学院免疫教研室, 广东 广州 510180)

**[摘要]** 目的: 探讨胃癌患者外周血单个核细胞(PBMCs)中的 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞体外增殖及对 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 细胞增殖的影响。方法: 以免疫磁性分离方法(MACS)分选出胃癌患者外周血单个核细胞中的 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 及 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 细胞后,用流式细胞仪分析细胞的纯度及活力;再以小鼠抗人 CD3 单抗、小鼠抗人 CD28 单抗及 rh IL-2 作为共刺激因子,观察与 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 细胞共培养时,CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞对 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 细胞增殖的抑制效应。结果: (1)分选后健康对照组及胃癌患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞纯度分别为 83.8% ± 1.84%、84.13% ± 2.77%,两者相比,无显著差异( $P > 0.05$ );(2)经 MACS 分选后正常对照组与胃癌患者 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞活力分别为 98.52% ± 0.72%、97.80% ± 0.95%,两者相比,无显著差异( $P > 0.05$ );(3)无论是健康对照还是胃癌患者的 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 均具有明显抑制效应性 T 细胞如 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 细胞的增殖,随着 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞数的增加,这种抑制增殖的能力也相应增加,当 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 达 1:1 时,抑制率最大达到 50%。结论: MACS 分选法能够分选出高纯度及活力的 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞,分选后 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞在体外均能抑制 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 细胞增殖,且这种抑制效应呈一定靶比关系。

**[关键词]** 胃肿瘤; CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞; CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 细胞; 细胞增殖

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

### Proliferation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells from PBMCs of the gastric cancer patients and inhibitory effect on CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells *in vitro*

WANG Ling-yun<sup>1</sup>, CHEN Mei<sup>2</sup>, ZHU Zhao-hua<sup>1</sup>, PENG Hui<sup>3</sup>, WU Chang-you<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Department of Gastroenterology, <sup>2</sup> Department of Laboratory Diagnosis, The Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China. E-mail: zhuzhaohua@yahoo.com.cn; <sup>3</sup> Department of Immunology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the proliferation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells from PBMCs of the gastric cancer patients and the inhibitory effect on CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells *in vitro*. **METHODS:** Magnetic activated cell sorting (MACS) method was used to separate CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells from peripheral blood monocyte lymphocytes in the gastric cancer patients, and then the purity and activity of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells were analyzed with flow cytometer. After stimulated with anti-CD3 Ab, anti-CD28 Ab and rh IL-2, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells were cocultured. The inhibitory effect of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T on CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells was assayed by [<sup>3</sup>H] thymidine proliferation experiment. **RESULTS:** (1) After sorting, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells purity in healthy control and gastric cancer patients were 83.80% ± 1.84% and 84.13% ± 2.77%, respectively. No significant difference between the two groups ( $P > 0.05$ ) was observed. (2) The activity of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells in healthy control and the gastric cancer patients after sorting were 98.52% ± 0.72% and 97.80% ± 0.95%. There was no significantly difference between the two groups ( $P > 0.05$ ). (3) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells obviously inhibited the CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cell proliferation *in vitro*. The inhibition achieved to maximum in coculture of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells together with CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells (ratio of 1:1). **CONCLUSION:** The MACS system can effectively isolate CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells. After sorting, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells obviously inhibit the proliferation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells *in vitro* and the inhibitory effect display an effect-target ratio relationship.

**[KEY WORDS]** Stomach neoplasms; CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells; CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells; Cell proliferation

Sakaguchi 等<sup>[1,2]</sup> 报道 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞(CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells, Tr) 因具有独特的

[收稿日期] 2006-01-11

[修回日期] 2006-06-21

△通讯作者 Tel:020-81332490 或 020-81332598; E-mail: zhuzhaohua@yahoo.com.cn

作用方式和功能特征引起了人们的关注。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 细胞具有免疫无能性和免疫抑制性两大功能特征。其免疫无能性表现在对高浓度 IL-2 的单独刺激、固相包被或可溶性抗 CD3 单抗以及抗 CD3 单抗、抗 CD28 单抗的联合作用呈无应答状态。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 的免疫抑制性表现在经 T 细胞抗原受体(T cell antigen receptor, TCR)介导的信号刺激后能抑制 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞的活化和增殖。

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 细胞可能是通过细胞之间的直接接触的方式来抑制其它细胞的免疫功能, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 几乎抑制目前所有已知的所有先天的和继发的免疫反应, 被认为是迄今为止所发现的最重要的免疫抑制细胞, 在肿瘤的免疫抑制中发挥重要作用。

在正常人的外周血的 CD4<sup>+</sup>T 细胞约有 5% - 10% 的细胞持续高表达 CD25 分子, 根据本研究初步研究发现<sup>[3]</sup>, 胃癌患者外周血的 CD4<sup>+</sup>T 细胞约有 4.58% - 49.29% (19.40% ± 8.76%) 高表达 CD25 分子。本实验用免疫磁性分选方法(magnetic activated cell sorting, MACS)纯化出有活力和功能的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 细胞群并进行鉴定后, 体外观察 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞对 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 细胞增殖的影响, 拟探讨 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 细胞在胃癌发生中的可能机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

**1.1 对象** 均为经胃镜或手术病理证实的胃癌初治患者, 先前未经手术、化疗或放疗, 病例来源均为中山大学附属第二医院及中山大学肿瘤防治中心, 共 5 例, 其中男性 4 例, 女性 1 例; 年龄 42 - 62 岁, 平均(50.0 ± 6.5)岁; 正常对照组 5 例, 均男性, 年龄 22 - 24 岁, 均中山大学健康体检正常学生志愿者, 每例取血量约 50 - 100 mL。

**1.2 主要实验试剂** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>regulatory T cell isolation kit(德国 Miltenyi Biotec 公司)、单克隆抗人 CD28 抗体(美国 R&D 公司)、LEAF<sup>TM</sup>纯化抗人 CD3 抗体(美国 Biolegend 公司)、重组人 IL-2(美国 Peprotech EC 公司)、[甲基-<sup>3</sup>H]胸腺嘧啶核苷(TdR)(中国科学院上海核技术开发公司)、RPMI-1640(美国 Gibco 公司)、0.4% 台盼蓝染液、人淋巴细胞分离液(1.077、上海华精生物高科技有限公司)、异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗人 CD4 抗体及藻红蛋白(PE)标记抗人 CD25 抗体(美国 Biolegend 公司)、FITC 标记小鼠 IgG 同型对照及 PE 标记小鼠 IgG 同型对照(美国 Biolegend 公司)。

### 2 方法

**2.1 外周血单个核细胞的制备** 外周静脉血以枸橼酸钠抗凝, 以 RPMI-1640 稀释并充分混匀, 吸取人淋巴细胞分离液置于离心管中, 将抗凝的外周静脉血用滴管沿管壁缓慢叠加于分层液面上, 注意保持清楚的界面。2 000 r/min 离心 20 min, 离心后管内分为 3 层, 用弯头滴管小心吸取中间云雾层, 并移入另一管中, 加入足量体积的 RPMI-1640, 充分混匀, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入红细胞裂解液充分混匀, 静置约 5 min 后, 以 MACS buffer 洗涤两次, 1 800 r/min 离心 10 min, 200 目不锈钢滤网滤过待用。

**2.2 免疫磁珠分选法(MACS)分离 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞**

①阴性去除分选 分离 PBMCs, 细胞计数, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 以 10<sup>7</sup>cells/90 μL MACS buffer 比例重悬细胞, 以 10<sup>7</sup>cells/10 μL 比例加生物素-多种抗体混合物(包括抗 CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR, Glycophorin A), 充分混匀, 4 - 8 °C 孵育 10 min, 以 10<sup>7</sup>cells/20 μL 比例加入 anti-biotin microbeads, 充分混匀, 孵育, 4 - 8 °C 孵育 15 min, 加 1 - 2 mL MACS buffer 洗涤, 1 000 r/min 离心 10 min(4 - 8 °C), 弃上清, 500 μL 缓冲液重悬细胞, 2 mL 缓冲液湿润 LD(large-scale deplete)分离柱, 将所有细胞悬液注入柱上, 以 2 × 1 mL MACS 缓冲液洗柱, 收集洗脱液。

②阳性选择 将收集的洗脱液离心, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 90 μL MACS 缓冲液重悬细胞, 加入 CD25 microbeads 10 μL, 混匀, 4 - 8 °C 孵育 15 min, 加 10 - 20 倍体积 MACS 缓冲液, 洗涤, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 500 μL MACS 缓冲液重悬细胞, 500 μL MACS 缓冲液湿润 MS 分离柱, 将所有细胞悬液注入柱上, 3 × 500 μL MACS 缓冲液洗柱, 将柱子置于收集管上, 加 1 mL MACS 缓冲液于 MS(mini-separation)分离柱上, 快速推出活塞, 收集洗脱液。

**2.3 细胞活力检测** 以 0.4% 台盼蓝染色溶液进行活细胞染色和计数, 分别取 2 滴细胞悬液加入 1 滴 0.4% 台盼蓝溶液, 充分混匀 5 min 后, 镜检, 活细胞不着色, 而死亡细胞被染成蓝色。计数 200 个细胞, 算出活细胞的百分率。

**2.4 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞对 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 细胞体外增殖的影响** 用小鼠抗人 CD3 单抗(OKT<sub>3</sub> 5 mg/L) 4 °C 过夜包被 96 孔圆底培养板, PBS 洗 3 遍, 然后每孔各加入新鲜分离的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 细胞 5 × 10<sup>4</sup> 个, 小鼠抗人 CD28 单抗 5 mg/L 及 rh IL-2

1 × 10<sup>4</sup> U/L,再按照 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> 1:1、1:2、1:4 的比例加入不同数目的 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞,每组设 3 个复孔,用 10% FCS RPMI - 1640 作为培养基,每孔终体积 200 μL。置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 96 h。终止培养前 12 - 16 h,每孔加入 3.7 × 10<sup>4</sup> Bq [<sup>3</sup>H] TdR (50 μL)后继续培养,用 ZT - II 型多头细胞收集仪收集样品于玻璃纤维滤纸上,烤干后予 β 液闪计数器测量,记录每分钟脉冲数 (counts/min),算出 3 个复孔的  $\bar{x} \pm s$ 。

2.5 流式分析

①用 Becton Dikison FACS Calibur 流式细胞仪测定淋巴细胞表面各种荧光素的荧光强度,用空白对照和阴性对照消除自发荧光和非特异荧光,gate 圈出拟测定的淋巴细胞群,每次分析 10<sup>4</sup> 个细胞。荧光强度以二维 dot - plot 散点图储存于电子计算机中。自动分析结合某一单抗的阳性细胞个数和百分比,在 FITC - CD4/PE - CD25 双参数图上计算得到 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞的比例:CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞百分比 = CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞数 / CD4<sup>+</sup> T 细胞数 × 100%。

② MACS 分选后的细胞纯度 (%) =  $\frac{\text{分离产物中流式细胞仪计数测定的阳性细胞}}{\text{分离产物细胞总数}}$ 。

3 统计学处理

实验所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,统计学处理采用 SPSS 11.0 软件完成。各组间比较采用 *t* 检验。

结 果

1 流式细胞仪分析 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞纯度

分选前胃癌患者 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞纯度为 20.50% ± 7.86%,正常对照组 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞纯度为 9.28% ± 1.57%,胃癌患者 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞纯度较正常对照组明显升高 (*P* < 0.05);分选后正常对照组及胃癌患者 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞纯度分别为 83.80% ± 1.84% 及 84.13% ± 2.77%,两者相比,无显著差异 (*P* > 0.05);正常对照组及胃癌患者 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞纯度分选后较分选前均显著升高 (*P* < 0.01)。

2 MACS 分选后 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞及 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 细胞的活力分析

分选后健康对照组及胃癌患者 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞活力分别为 98.52% ± 0.72% 及 97.25% ± 0.84%,两者相比,无显著差异 (*P* > 0.05);分选后健康对照组及胃癌患者 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 细胞活力分别为 97.80% ± 0.95% 及 98.20% ± 0.74%,两者相比,无显著差异 (*P* > 0.05)。

表 1 流式细胞仪鉴定 MACS 分选前后人 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞纯度的比较

Tab 1 Comparison of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cell purity before and after MACS by FCM ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 5)

CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T cell purity (%)	Healthy control	Gastric cancer patients
Before MACS	9.28 ± 1.57	20.50 ± 7.86*
After MACS	83.80 ± 1.84	84.13 ± 2.77

\* *P* < 0.05 vs healthy control.

表 2 MACS 分选后人 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 与 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 细胞活力的比较

Tab 2 Comparison of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cell activity after MACS ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 5)

Cell activity (%)	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T cell	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T cell
Healthy control	98.52 ± 0.72	97.80 ± 0.95
Gastric cancer patients	97.25 ± 0.84	98.20 ± 0.74

3 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞对 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 细胞体外增殖的抑制作用

可以观察到 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 可明显抑制 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 的增殖,随着 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞数的增加,这种抑制增殖的能力也相应增加,当 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 达 1:1 时,抑制率最大 (表 3);而在 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 达 1:2 和 1:4 的条件下,胃癌患者 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 对 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 细胞的抑制率显著高于健康对照者 (*P* > 0.05)。

表 3 健康对照组与胃癌患者不同比例共同培养 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞与 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 细胞抑制率的比较

Tab 3 The inhibition rate of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cell in different coculture ratio (%).  $\bar{x} \pm s$ , *n* = 5)

Group	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T: CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T		
	1:1	1:2	1:4
Healthy control	50.21 ± 2.26	31.20 ± 9.75	13.02 ± 0.91
Gastric cancer	52.62 ± 1.11	34.94 ± 2.86**	20.90 ± 1.36**

\* *P* < 0.05 vs 1:1 coculture group; \*\* *P* < 0.05 vs healthy control.

讨 论

North<sup>[4]</sup>报道小鼠体内存在有一群免疫抑制功能的 T 细胞亚群,这群细胞导致了免疫耐受使得机体不能发挥正常的抗肿瘤免疫,而直到近年这群抑制性的细胞亚群才被鉴定出来,它是 CD4 和 CD25 共表达的 T 细胞,而且证实以前所描述的有免疫抑制功能的细胞亚群正是 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tr 亚群。实验证明,随着 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞的增多,机体对肿瘤的免疫反应随之下调。当肿瘤细胞被种植到

小鼠体内,肿瘤的生长开始是较缓慢的,后来才出现了有局部浸润和远处转移的快速生长。在肿瘤的快速生长和远处播散的时期,同时可见  $CD4^+CD25^+$  T 细胞快速增长,当这群细胞被细胞毒性物质诸如环磷酰胺、长春新碱等去除后,机体就表现出 T 细胞介导的肿瘤排斥反应<sup>[5, 6]</sup>。

免疫磁性分选法分离细胞是基于细胞表面抗原分子与连接有磁珠的特异性单抗相结合,在外加磁场的作用下,通过抗体与磁珠相连的细胞被吸引而滞留在磁场中;而无该种表面抗原的细胞由于不能与此种连接有磁珠的特异性单抗相结合,因而不带磁性,不在磁场中停留,从而使细胞得以分离。

MACS 技术是以使用 MACS 磁珠、MACS 分选柱和 MACS 分选器为基础的。MACS 微珠是与高度特异性单克隆抗体相偶联的超顺磁化微粒。微珠约 50 nm 大小,光学显微镜下不可见,可生物降解,不损伤细胞。分选后的细胞适用于细胞培养和体内实验,因为 MACS 磁珠是由铁和多聚糖组成,当细胞继续培养时,即可被生物降解,而且用 MACS 技术分选的细胞能保持良好的功能活性和活力。此外,由于 MACS 微珠仅如病毒大小,因此它们不影响分选后的细胞用流式细胞仪分析时的散射性,也不影响在显微镜下的可视性<sup>[7-9]</sup>。

本研究表明,MACS 分选前健康对照及胃癌患者中  $CD4^+CD25^+$  T 细胞的比例分别为  $9.28\% \pm 1.57\%$  及  $20.50\% \pm 7.86\%$ ,反映出胃癌患者与健康对照外周血中  $CD4^+CD25^+$  T 细胞所占的比例有显著差异,胃癌患者体内的  $CD4^+CD25^+$  T 细胞比例明显高于健康对照,但是外周血中  $CD4^+CD25^+$  T 细胞比例无论是胃癌患者还是健康对照均相对较低,难以进行进一步的功能研究。实验结果证实经过 MACS 系统分选后,胃癌患者及健康对照均可获得高纯度(分别为  $83.80\% \pm 1.84\%$  及  $84.13\% \pm 2.77\%$ )及活力均在 97% 以上  $CD4^+CD25^+$  T 细胞,可供进一步的体外实验需要。换句话说,无论  $CD4^+CD25^+$  T 细胞在外周血中的比例高与低,MACS 系统均可获得近似纯度 85% 的大量细胞满足功能研究的需要,这也意味着 MACS 系统是一个相当稳定、可靠的分选系统。

本研究发现,在体外实验中,可观察到  $CD4^+CD25^+$  T 细胞有抑制  $CD4^+CD25^-$  T 细胞增殖作用。值得注意的是,胃癌患者的  $CD4^+CD25^+$  T 细胞在较低比例(1:2 及 1:4)的条件下,对  $CD4^+CD25^-$  T 细胞增殖的抑制率显著高于健康对照组,这意味着胃癌患者的  $CD4^+CD25^+$  T 细胞对  $CD4^+CD25^-$  T 细胞有更强的抑制增殖能力,至于其作用机制如何,值得

深入研究。总之, $CD4^+CD25^+$  Tr 细胞具有明显抑制效应性 T 细胞如  $CD4^+CD25^-$  T 细胞增殖的能力,并且具有一定的效靶比例关系。而且胃癌患者外周血的  $CD4^+CD25^+$  Tr 细胞不但在数量上显著多于健康对照组,而且它对  $CD4^+CD25^-$  T 细胞增殖的抑制作用也较健康对照中的  $CD4^+CD25^+$  Tr 细胞要强(混合培养比例为 1:2 及 1:4 时),这种在量与质两方面的显著差异,必然会在胃癌患者免疫抑制功能低下的机制中发挥重要的作用。

$CD4^+CD25^+$  Tr 对机体有着利、害两方面的作用,一方面  $CD4^+CD25^+$  Tr 可防止自身免疫性疾病、炎症反应及移植耐受的发生;另一方面,  $CD4^+CD25^+$  Tr 相伴随地抑制肿瘤特异的 T 细胞反应,进而导致肿瘤的发生发展。因此, $CD4^+CD25^+$  Tr 的双重作用值得我们进行深入研究,特别是它在一些目前人类尚无法攻克的治疗方面开发的潜在价值<sup>[10,11]</sup>。

#### [参 考 文 献]

- [1] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunological 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] Sakaguchi S. The origin of FOXP3-expressing  $CD4^+$  regulatory T cells: thymus or periphery[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(9): 1310-1322.
- [3] 王凌云,陈映波,朱兆华,等. 胃癌患者外周血  $CD4^+CD25^+$  调节性 T 细胞的检测及临床意义[J]. *中国免疫学杂志*, 2005, 21(12): 59-61.
- [4] North RJ. The murine antitumor immune response and its therapeutic manipulation[J]. *Adv Immunol*, 1984, 35: 89-155.
- [5] North RJ, Bursucker I. Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I.  $Ly-1+2$ -suppressor T cells down-regulate the generation of  $Ly-1-2+$  effector T cells[J]. *J Exp Med*, 1984, 159(5): 1295-1311.
- [6] Baecher-Allan C, Vigliani V, Hafler DA. Inhibition of human  $CD4^+$   $CD25^+$  regulatory T cell function[J]. *J Immunol*, 2002, 169(11): 6210-6217.
- [7] 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.
- [8] Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human  $CD25^+$   $CD4^+$  T regulatory cells suppress naive and

memory T cell proliferation and can be expanded *in vitro* without loss of function[J]. J Exp Med, 2001, 193(11): 1295 - 1302.

[9] 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.

[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] Jonuleit H, Schmitt E. Regulatory T cells in antitumor therapy: isolation and functional testing of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells[J]. Methods Mol Med, 2005, 109: 285 - 296.

(上接第 2197 页)

试剂盒说明书操作。ELISA 试剂盒为美国 ADI 公司产品,通过上海太阳技术生物有限公司购买。采用 ELX800 全自动酶标仪测定,试剂盒标准曲线相关系数在 0.99 以上。

#### 4 统计学处理

实验结果用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,SPSS 10.0 软件处理,进行方差分析 *q* 检验及相关性分析。

### 结 果

1 各组资料经过正态性 D 检验符合正态分布,经 Bartlett  $\chi^2$  检验,示方差齐。

#### 2 血浆 TF 浓度

各组血浆 TF 浓度见表 1。

表 1 各组血浆 TF 浓度

Tab 1 The concentration of plasm TF in various groups ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	<i>n</i>	TF (ng/L)	Hb (g/L)	WBC ( $\times 10^9/L$ )	BPC ( $\times 10^9/L$ )
A	15	176.9 ± 46.5	146.4 ± 12.3	5.3 ± 1.3	111.2 ± 25.9
B	20	447.7 ± 173.5 <sup>△</sup>	216.0 ± 23.4 <sup>△</sup>	6.0 ± 1.6	79.8 ± 10.6*
C	19	258.4 ± 44.4 <sup>#</sup>	158.4 ± 16.9	6.0 ± 1.4	152.7 ± 76.3
D	20	219.3 ± 53.6	152.8 ± 16.7	6.2 ± 1.2	140.9 ± 46.4
E	14	285.6 ± 54.5 <sup>#</sup>	162.6 ± 17.5	6.0 ± 1.6	161.0 ± 78.6

<sup>△</sup>*P* < 0.01 vs other group; <sup>#</sup>*P* < 0.01 vs control group; \**P* < 0.05 vs other group. A: control group; B: HAPC; C: newcomers (>1year); D: tibetan natives; E: new comes (<1year).

#### 3 相关性分析

HAPC 组 TF 与 Hb 呈正相关, *r* = 0.608, *P* < 0.01, 与血小板计数呈负相关, *r* = -0.862, *P* < 0.01。其它各组与血红蛋白和血小板计数均无相关性。

### 讨 论

本研究结果显示 HAPC 组的 TF 水平明显高于其余各组 (*P* < 0.01), 移居组、急进组与西宁对照组比较也有升高 (*P* < 0.01)。所有研究对象 TF 与血小板计数无相关性, 但 HAPC 组 TF 与血小板计数呈负相关。结果说明在高原缺氧条件下血浆 TF 水平增高, HAPC 患者升高更为明显。TF 作为对外、内源凝血途径均有激活作用的重要凝血因子, 其在 HAPC 患者体内的过高表达将激活一系列凝血因子, 形成血栓前状态, 一方面容易并发血栓形成、DIC 等, 另一方面通过形成局部微小血栓, 导致微循环不良, 加重机体缺氧, 形成恶性循

环, 促进 HAPC 的发生发展。但 TF 的生理作用并不局限于凝血反应, 近年来越来越多的研究说明 TF 参与血管的发育及生成, 不仅影响胚胎时期血管发育, 且与肿瘤内血管的形成关系密切<sup>[5,6]</sup>。TF 在 HAPC 患者体内过高表达有可能促进血管增生, 改善缺氧, 延缓 HAPC 的发展, 它可能是机体缺氧时的代偿性保护机制之一。

在机体缺氧的不同阶段, 两方面影响的程度不一致。通过 TF 与血小板计数相关性分析可以看出, 在 HAPC 组, 两者具有负相关性, 而在移居及世居高原组, 两者无相关性。说明 TF 在缺氧早期即代偿缺氧阶段可能是以促进血管增生作用为主; 在缺氧失代偿阶段发生 HAPC 时, TF 可以促发凝血反应, 呈血栓前状态, 可能同时有促进 HAPC 发展作用。这对指导临床治疗有一定的意义, 早期阶段不宜采用干预 TF 表达的方式来防治 HAPC 的发生; 到了 HAPC 阶段有明显血栓前状态时, 可以通过抗 TF 单克隆抗体等的应用来干预 TF 的表达, 既可以纠正凝血机制的异常, 同时也达到干预 HAPC 的发展。

#### [参 考 文 献]

[1] Gruber A, Hanson SR. Factor XI - dependence of surface and tissue factor - initiated thrombus propagation in primates[J]. Blood, 2003, 102(3): 953 - 955.

[2] Abe K, Shoji M, Chen J, et al. Regulation of vascularendothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(15): 8663 - 8668.

[3] O'Rourke JF, Pugh CW, Bartlett SM, et al. Identification of hypoxically inducible mRNAs in HeLa cells using differential - display PCR. Role of hypoxia - inducible factor - 1[J]. Eur J Biochem, 1996, 241(2): 403 - 410.

[4] Nakanishi K, Tajima F, Nakata Y, et al. Tissue factor is associated with the nonbacterial thrombotic endocarditis induced by a hypobaric hypoxic environment in rats[J]. Virchows Arch, 1998, 433(4): 375 - 379.

[5] Carmeliet P, Machman N, Moons L, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development[J]. Nature, 1996, 383(6595): 73 - 75.

[6] Abdulkadir SA, Carvalhal GF, Kaleem Z, et al. Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma[J]. Hum Pathol, 2000, 31(4): 443 - 447.