

· 短篇论著 ·

肾癌患者外周血 Th1/Th2 和 Tc1/Tc2 细胞因子的表达

赵晴 赵善斌 王艳峰 严文伟 丁弋 宋东 苏文

【摘要】 目的 检测不同临床分期肾癌患者外周血 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞中细胞因子的表达水平,分析 Th1/Th2 及 Tc1/Tc2 漂移对肾癌发生和转移的临床意义。方法 用流式细胞仪检测 60 例不同分期肾癌患者和 40 例正常对照者外周血 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞分泌的 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、IL-4、IL-6 和 IL-10 的表达水平。结果 与正常对照组相比,无症状型肾癌患者各细胞因子的表达无明显差异,而局限型患者 Th1、Tc1 类细胞因子 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 分泌水平降低($P < 0.01$),局部进展型和转移型肾癌患者 Th1、Tc1 类细胞因子 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 分泌水平明显下降($P < 0.01$);而 Th2、Tc2 类细胞因子 IL-4、IL-6 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 分泌水平升高。结论 Th1/Th2 偏移和 Tc1/Tc2 偏移促进了晚期肾肿瘤的进展和转移。T 淋巴细胞亚群改变导致免疫功能失调,使肿瘤细胞发生免疫逃逸。

【关键词】 肾肿瘤; Th1 细胞; Th2 细胞; T 淋巴细胞,细胞毒性; 细胞因子类

肾细胞癌亦称肾癌,约占成人恶性肿瘤的 3%,在肾恶性肿瘤中,肾细胞癌约占 85% 左右,在肾肿瘤中最为常见。确诊时多数患者已属中晚期或发生远处转移。肿瘤的发生发展及其预后与机体的免疫监视及免疫清除功能密切相关,若免疫状态下,则为肿瘤的复发、转移埋下隐患。在抗肿瘤免疫中,细胞免疫尤其是 T 淋巴细胞的作用更为重要。T 淋巴细胞参与机体的抗肿瘤免疫应答,其亚群的数量是反映机体免疫功能的重要指标之一。在本实验中,我们从肾肿瘤患者细胞因子的表达水平方面研究 Th1/Th2 的漂移与临床分期之间的关系,通过检测外周血 T 细胞内细胞因子分泌模式,探讨 T 淋巴细胞亚群的变化在肾癌发生、发展中的意义。

一、材料与与方法

1. 一般资料:收集自 2008 年 1 月至 2010 年 6 月在山西省肿瘤医院泌尿外科确诊的肾肿瘤患者 60 例,男 43 例,女 17 例,平均年龄(57.44 ± 8.9)岁,未经手术及免疫治疗,采用 TNM 临床分期诊断标准^[1],其中无症状型、局限型(临床 I、II 期)、局部进展型(III 期)和转移型(IV 期)4 组各 15 例。对照组 40 例健康成人,男 22 例,女 18 例,平均年龄(53.37 ± 8.76)岁,一般情况无统计学差异。

2. 设备与试剂:FACS Aria 型流式细胞仪(美国 BD 公司); Thermo Scientific CO₂ 培育箱(美国); TDSA 型离心机(长沙湘仪); Cytodetect™ 试剂盒(荷兰 Immimo Qual Products 公司); RPMI1640 培养液、胎牛血清(美国 Gibco 公司); 淋巴细胞分离液(上海华精生物高科技有限公司)。

3. 实验方法:所有患者均晨起空腹抽取静脉血,肝素抗凝,采用 Cytodetect™ 试剂盒提供的方法。分离外周血淋巴细胞:采用 Ficoll 密度梯度离心法常规分离外周血淋巴细胞,所分离的淋巴细胞用 RPMI1640 培养液稀释为 1×10^6 个/ml,加入刺激物(佛波脂、离子霉素及莫能霉素)刺激细胞,多聚甲醛固定细胞,置入 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养 6 h。收获细胞后,固定(透膜)处理细胞,多色荧光素染色,标记细胞表面抗原(PerCP-CD3)和胞内细胞因子(FITC-IFN- γ /PE-IL-4; PE-TNF- α /FITC-IL-2; FITC-IL-6/PE-IL-10),进行流式细胞仪分析。

4. 统计学分析:数据用 SPSS 16.00 软件包进行统计学分析,所有数据经正态分布检验,用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)及组间多重比较。

二、结果

1. 外周血中 CD4⁺ T 细胞分泌细胞因子的水平(表 1,图 1):无症状型肾癌患者与正常对照组相比,外周血 CD4⁺ T 细胞分泌的各细胞因子无明显差异,而局限型、局部进展型和转移型肾癌患者 CD4⁺ T 细胞中 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 表达水平,与对照组相比均降低,有统计学差异($P < 0.01$),且局部进展型和转移型患者 CD4⁺ T 细胞中 IL-4、IL-6 表达水平较对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2. 外周血中 CD8⁺ T 细胞分泌细胞因子的水平(表 2,图 1):与正常对照组相比,无症状型、局限型肾癌患者外周血 CD8⁺ T 细胞分泌的各细胞因子无明显差异,而局部进展型与转移型肾癌患者 CD8⁺ T 细胞分泌的 IFN- γ 水平下降($P < 0.01$),IL-2 明显下降($P < 0.05$),局部进展型与转移型患者 IL-4 明显升高($P < 0.05$),IL-6 也明显升高($P < 0.01$),差异均有统计学意义。

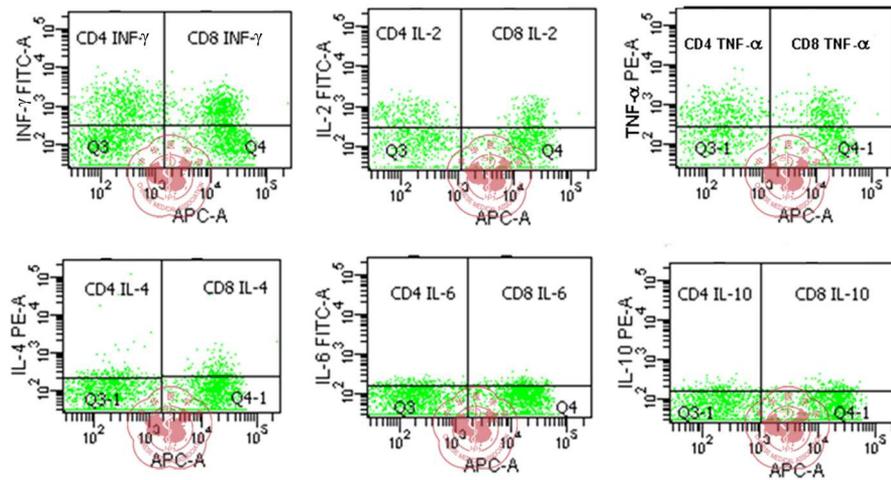


图1 各期肾癌患者外周血CD4⁺、CD8⁺ T细胞分泌细胞因子流式细胞分析图

表1 各期肾癌患者外周血 CD4⁺ T 细胞分泌 Th1 和 Th2 细胞因子水平比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Th1 细胞因子			Th2 细胞因子		
		IFN- γ	IL-2	TNF- α	IL-4	IL-6	IL-10
对照组	40	8.20 \pm 2.35	9.80 \pm 4.10	4.90 \pm 2.02	2.30 \pm 0.38	2.06 \pm 0.70	1.83 \pm 0.58
无症状型	15	8.04 \pm 2.62	8.03 \pm 2.55	4.90 \pm 1.52	2.26 \pm 0.13	2.11 \pm 0.44	1.92 \pm 0.36
局限型	15	6.73 \pm 3.60 ^a	4.95 \pm 2.37 ^a	3.27 \pm 0.46 ^a	2.31 \pm 0.44	2.56 \pm 0.13	2.01 \pm 0.64
局部进展型	15	6.89 \pm 0.84 ^a	4.87 \pm 2.63 ^a	2.16 \pm 0.23 ^a	3.59 \pm 0.56 ^a	3.84 \pm 2.35 ^a	2.10 \pm 0.35
转移型	15	5.33 \pm 1.92 ^a	3.90 \pm 2.57 ^a	2.06 \pm 0.87 ^a	3.62 \pm 0.47 ^a	3.69 \pm 0.53 ^a	1.99 \pm 0.79

注:与对照组比较,^aP < 0.01

表2 各期肾癌患者外周血 CD8⁺ T 细胞分泌 Tc1 和 Tc2 细胞因子水平比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Tc1 细胞因子			Tc2 细胞因子		
		IFN- γ	IL-2	TNF- α	IL-4	IL-6	IL-10
对照组	40	8.03 \pm 3.23	1.79 \pm 1.14	2.26 \pm 1.41	1.10 \pm 0.69	1.02 \pm 0.69	0.91 \pm 0.49
无症状型	15	8.22 \pm 3.56	1.76 \pm 1.20	2.31 \pm 1.23	1.22 \pm 0.47	1.02 \pm 0.39	0.90 \pm 0.22
局限型	15	7.27 \pm 2.19	1.82 \pm 1.14	1.84 \pm 1.55	1.04 \pm 0.67	1.03 \pm 1.07	0.96 \pm 0.66
局部进展型	15	5.78 \pm 1.24 ^a	1.34 \pm 0.25 ^b	1.69 \pm 0.34	1.86 \pm 0.27 ^b	1.23 \pm 0.52 ^a	1.05 \pm 0.24
转移型	15	5.83 \pm 1.13 ^a	1.21 \pm 0.65 ^b	1.52 \pm 0.61	1.75 \pm 0.21 ^b	1.44 \pm 0.71 ^a	1.01 \pm 0.22

注:与对照组比较,^aP < 0.01, ^bP < 0.05

三、讨论

恶性肿瘤是危害人类健康的严重疾病,它的发生、发展与多种因素有关。当宿主的免疫功能低下或缺陷时,肿瘤发生率增高,而在肿瘤进展时,肿瘤患者的细胞免疫功能受到抑制,两者可互为因果,双方各因素的相互作用对肿瘤的发展起着重要的作用。结合以往的文献资料可以看出,多数肾癌患者体内细胞免疫功能紊乱,细胞因子构成的改变,打破了机体免疫细胞所处的平衡状态,不能有效地清除癌细胞从而导致肿瘤发生^[2]。

人类 T 淋巴细胞按功能不同分为辅助性 T 细胞(helper T, Th) 和杀伤性 T 细胞(cytotoxic T, Tc)^[3,4]。1986 年研究人员在研究小鼠 CD4⁺ 细胞克隆时发现了两种不同的细胞因子产生模式:Th1 细胞分泌 IL-2、IFN- γ 、IL-12 和 TNF- β ;Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10。Th1 细胞主导细胞介导的免疫反应和迟发型超敏反应,并可刺激产生抗体;Th2 细胞主导机体的体液免疫反应。Th1/Th2 来自于同一来源的前体细胞,即能够产生多种细胞因子和早期活化的 Th 细胞,称为 Th0 细胞^[5]。Th1 和 Th2 是 Th0 发展的两种极化形式,IL-4 和 IL-12 是 Th0 分化的两种主要刺激因子。在初始阶段,若同时加入 IL-4 和 IL-12,则 Th0 向 Th2 的方向发展。反之,若加入抗 IL-4 单抗,则促使 IL-12 细胞因子表达,促进 Th0 向 Th1 分化,Th1/Th2 平衡的改变与许多免疫相关性疾病的转归和预后关系密切^[6,8]。Nascimbeni 等^[9]发现,根据分泌细胞因子的不同,CD8⁺ T 细胞有 Tc1 和 Tc2 两种亚型,但诱导其转化的细胞因子相同,Tc1 与 Th1 均分泌 IL-2、IFN- γ 等 I 型细胞因子,而 Tc2 与 Th2 均分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10 等 II 型细胞因子,但 Tc1 和 Tc2 之间不发生逆转^[10]。Tc1 和 Tc2 的细胞毒性相似,都是通过 Ca²⁺/穿孔素的机理起

作用^[11-12]。在初始阶段, Tc 细胞较 Th 细胞需要更高剂量的 IL-4 才能诱使其分化为 Tc2 群细胞^[13]。Tc 细胞在分化为 Tc1 或 Tc2 形式后, 互相均不发生逆转^[14-16]。目前其机制尚未完全明确, 相关的报道较少。

本研究表明, 与对照组相比, 局限型患者 Th1 类细胞因子分泌水平降低, 与国内袁孔华等^[17]报道一致; 同时随着肾癌(分期)的加重, 局部进展型和转移型肾癌患者 Th1 类细胞因子分泌水平降低, 表现为 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 分泌水平明显下降, 而 Th2 类细胞因子分泌上升, 表现为局部进展型和转移型患者 IL-4、IL-6 分泌水平升高, 说明 Th1/Th2 偏移和 Tc1/Tc2 偏移与晚期肾肿瘤的进展和转移关系密切。有研究表明^[18], 胃癌患者外周血 Th1 及 Tc1 类细胞减少, 提示患者机体抗肿瘤细胞免疫功能下降, Th2、Tc2 细胞百分率升高, Th1/Th2 类细胞及 Tc1/Tc2 类细胞比例降低, 提示患者体内出现 Th1 向 Th2、Tc1 向 Tc2 漂移, 呈现 Th2 优势表达, 提示发生肿瘤免疫监视逃逸的可能性增大。本研究与以往相关报道相符合, 提示癌细胞本身可能有在自分泌功能导致 Tc1/Tc2 漂移, 细胞免疫功能下降, 不能有效地清除癌细胞从而导致肿瘤的发生或复发。关于肾癌细胞是否通过自分泌功能产生 Th、Tc 细胞功能极化异常, 以及细胞免疫状态在不同病理分型, 不同治疗方法中是否有差异等, 这些方面仍需进一步研究探讨。

Th1 向 Th2 漂移是恶性肿瘤的特有现象, Th2 型细胞因子的优势状态将导致机体抗肿瘤免疫功能的减弱, 保护肿瘤细胞逃逸免疫监视和免疫攻击, 这可能是肾癌发生发展的免疫机制之一^[19]。本研究通过对肾癌患者 Th1/Th2、Tc1/Tc2 平衡漂移的研究, 观察其与病程及病情的关系, 有助于进一步了解肾癌这一疾病的细胞免疫与免疫保护和(或)免疫损伤的关系, 为肾癌的治疗和监控提供新的方法和思路, 即使肾癌细胞或机体免疫细胞由 Th2 向 Th1 型逆转, 纠正失衡的 Th1/Th2 细胞因子网络, 逆转肿瘤细胞或其宿主机体细胞的 Th1/Th2 的异常漂移, 将有利于以细胞免疫为主的抗肿瘤免疫功能的恢复, 对预防肿瘤复发、转移, 提高长期生存率, 达到治愈肾癌的治疗目的有着重要的意义。

参 考 文 献

- [1] 那彦群. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南手册. 北京: 人民卫生出版社, 2009.
- [2] Tatsumi T, Herrem CJ, Olson WC, et al. Disease stage variation in CD4⁺ and CD8⁺ T-cell reactivity to the receptor tyrosine kinase EphA2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 2003, 63:4481-4489.
- [3] Sheu BC, Lin RH, Lien HC, et al. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol*, 2001, 167:2972-2978.
- [4] Shedlock DJ, Whitmire JK, Tan J, et al. Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*, 2003, 170:2053-2063.
- [5] Vukmanovic-Stejić M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, et al. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood*, 2000, 95:231-240.
- [6] 亢澜涛, 张桂荣. 411 例恶性肿瘤患者 T 细胞亚群的检测分析. *实用肿瘤学杂志*, 2007, 21:362-365.
- [7] Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. Two type of murine helper T cell clone I definition to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 2005, 175:5-14.
- [8] 姚金晶, 陈宜涛. Th1/Th2 平衡调节与疾病发生的研究进展. *现代生物医学研究进展*, 2009, 9:2597-2600.
- [9] Nascimbeni M, Shin EC, Chiriboga L, et al. Peripheral CD4(+) CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood*, 2004, 104:478-486.
- [10] Ito N, Suzuki Y, Taniuchi Y. Prognostic significance of T helper 1 and 2 and T cytotoxic 1 and 2 cells in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*, 2005, 25:2027-2031.
- [11] Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim JJ, et al. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS) stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin (IL-1). *J Immunol*, 2005, 175:5569-5574.
- [12] Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med*, 2002, 8:567-573.
- [13] Sun J, Pearce EJ. Suppression of early IL-4 production underlies the failure of CD4 T cells activated by TLR-stimulated dendritic cells to differentiate into Th2 cells. *J Immunol*, 2007, 178:1635-1644.
- [14] Huang H, Hao S, Li F, et al. CD4⁺ Th1 cells promote CD8⁺ Tc1 cell survival, memory response, tumor localization and therapy by targeted delivery of interleukin 2 via acquired pMHC I complexes. *Immunology*, 2007, 120:148-159.
- [15] Badovinac VP, Haring JS, Harty JT. Initial T cell receptor transgenic cell precursor frequency dictates critical aspects of the CD8 T cell response to infection. *Immunity*, 2007, 26:827-841.
- [16] Harty JT, Badovinac VP. Shaping and reshaping CD8 T-cell memory. *Nature Rev Immunol*, 2008, 8:107-119.
- [17] 袁孔华, 燕美玉, 李立新, 等. 肾癌患者手术治疗前后细胞免疫功能变化的观察. *临床泌尿外科杂志*, 1994, 9:44-45.
- [18] 乔治, 李荣, 徐迎新, 等. Th1/Th2 及 Tc1/Tc2 在胃癌患者外周血中的漂移及意义. *世界华人消化杂志*, 2009, 17:1238-1240.
- [19] Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 2005, 54:721-728.

(收稿日期: 2011-05-25)

(本文编辑: 戚红丹)