

FoxP₃ mRNA 在胃癌患者 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞中的表达及其临床意义

付泽娴*, 孟繁杰, 李保东, 李冬斌, 谢绍建, 陈小贺, 范晓燕, 蔡建辉

Clinical Significance of FoxP₃ mRNA Expression in CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Isolated from Patients with Gastric Cancer

FU Ze-xian, MENG Fan-jie, LI Bao-dong, LI Dong-bin, XIE Shao-jian, CHEN Xiao-he, FAN Xiao-yan, CAI Jian-hui

Department of Gastrointestinal Surgery, The Second Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China (* Present: Department of General Surgery, The Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering)

Corresponding Author: CAI Jian-hui, E-mail: jianhuicai@yahoo.com

Abstract: **Objective** To investigate the contents of CD4⁺ CD25⁺ T cells and the expression of FoxP₃ mRNA in these Treg cells in peripheral blood of the patients with gastric cancer and to characterize their clinical significance. **Methods** By using flow cytometry, the levels of CD4⁺ CD25⁺ T cells in peripheral blood of 20 preoperative patients with gastric cancer were determined. RT-PCR techniques were used to detect the expression of FoxP₃ mRNA in these Treg cells, and the results were analyzed statistically in comparison with that of 20 healthy volunteers. **Results** The percentage of CD4⁺ CD25⁺ T cells in total CD4⁺ T cells isolated from the patients with gastric cancer was (12.76 ± 0.46)%, in comparison, it was (6.81 ± 0.66)% in those from healthy volunteers. It was obviously different between Treg cells amount of gastric patients and that of volunteers ($P < 0.01$). The FoxP₃ mRNA expression of Treg cells in the patients with gastric cancer (0.84 ± 0.02)% was significantly higher than that in healthy volunteers [(0.76 ± 0.03)%], ($P < 0.05$). **Conclusion** The levels of CD4⁺ CD25⁺ T cells in peripheral blood and the FoxP₃ mRNA expression of Treg cells in gastric cancer patients were increasing significantly. FoxP₃ genes may play a pivotal role in regulating the function of Treg cells in self-tumor immunity of the patients with gastric cancer.

Key words: Regulatory T cell; Gastric cancer; FoxP₃ mRNA; Flow cytometry

摘要: **目的** 探讨胃癌患者体内 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的含量及 FoxP₃ mRNA 在 Treg 中的表达情况及其临床意义。 **方法** 应用流式细胞术 (FCM) 测定 20 例胃癌患者外周血中 Treg 细胞含量, 同时采用 RT-PCR 技术检测其 FoxP₃ mRNA 的表达情况, 并与 20 例健康志愿者的外周血进行对比研究和统计学分析。 **结果** 胃癌患者外周血中 Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞总数的 (12.76 ± 0.46)%, 显著高于健康对照组的 (6.81 ± 0.66)%, ($P < 0.01$); FoxP₃ mRNA 在胃癌患者外周血 Treg 细胞中呈现高表达 (0.84 ± 0.02)%, 明显高于其在健康对照组中表达 (0.76 ± 0.03)%, ($P < 0.05$)。 **结论** 胃癌患者外周血中 Treg 的数量较正常人明显增高, 同时伴随有 FoxP₃ mRNA 高表达, 提示 FoxP₃ 基因可能对 Treg 有重要的调节功能, 从而影响胃癌病人的抗肿瘤自身免疫功能。

关键词: 调节性 T 细胞; 胃癌; FoxP₃ mRNA; 流式细胞术

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)12-0935-02

0 前言

调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 是存在于正常机体内的一类同时具有免疫无能性和抑制性的免

疫细胞, 具有独特的免疫调节作用^[1-2]。转录因子 FoxP₃ (Forkhead box P₃) 能够通过影响 Treg 细胞的发育从而对其进行调节^[3]。本研究应用流式细胞技术和 RT-PCR 技术, 对胃癌患者外周血中 Treg 的含量及 FoxP₃ mRNA 的表达情况进行检测分析, 从而探讨转录因子 FoxP₃ 和 Treg 细胞在胃癌中的表达及其意义, 为临床通过调控 Treg 细胞提高免疫治疗疗效的进一步深入研究提供试验数据和理论依据。

收稿日期: 2006-12-26; 修回日期: 2007-08-10
作者单位: 050000 石家庄, 河北医科大学第二医院胃肠外科 (* 现工作单位: 056000 邯郸, 河北工程大学附属医院普外科)

通讯作者: 蔡建辉, E-mail: jianhuicai@yahoo.com
作者简介: 付泽娴 (1980-), 男, 硕士, 住院医师, 主要从事胃肠道肿瘤的免疫治疗研究

1 资料与方法

1.1 资料 选择我院 2005 年 7~9 月住院的胃癌患者 20 例(男 14 例,女 6 例)。年龄 40~65 岁,中位年龄 52 岁。所有胃癌患者术前均经活检及病理组织学明确诊断,根据 1985 年 UICC 的 TNM 分期标准按胃癌病理分期(PTNM)属 期~ A 期,均行胃癌根治术,且试验开始前未行放、化疗。健康对照组为我院门诊体检健康者。所有研究对象近期内均无急、慢性感染、HIV 及病毒性肝炎并且未使用过免疫抑制剂;无自身免疫性疾病史。

1.2 试剂 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的鼠抗人 CD4(克隆号 JM1CD4)/藻红荧光素(PE)标记的鼠抗人 CD25(克隆号 7G7B6)双标抗体购于晶美生物公司,同型对照分别为 FITC 和 PE 标记的鼠抗人 IgG1 免疫球蛋白;淋巴细胞分离液(Histopaque,密度 1.077g/ml)购于 Sigma-Aldrich 公司。RosetteSep CD4⁺ T cell Enrichment Cocktail、RosetteSep CD4⁺ CD25⁺ T cell Enrichment Cocktail 购自 StemCell Technologies Inc; Trizol 购自 Invitrogen 公司。cDNA 第一链反应试剂盒购自 Fermentas 公司。PCR 引物序列由上海生工生物工程公司合成。

1.3 FACS 检测外周血 Treg 含量 观察对象均于清晨空腹抽取静脉血 1 ml 加 EDTA 抗凝,取 100 μl 抗凝血和 20 μl CD4(FITC)/CD25(PE)标记抗体加入流式管混匀,室温避光孵育 20 min;加入红细胞裂解液 2 ml 振荡混匀后避光放置 10 min 至液体透亮;1 200 g 离心 5 min,2 ml PBS 重悬后洗涤 1 遍;再加入 0.5 ml PBS 重悬,流式细胞仪检测,Cellquest 软件数据分析,记录阳性细胞百分率。

1.4 Treg 细胞的分离及细胞总 RNA 提取 取外周血 20 ml,利用密度梯度离心法,获取 PBMCs,按照磁珠分选细胞方法的操作步骤逐步分选并纯化得到 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞(流式检测分选率 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞达 88.5%,CD4⁺ CD25⁺ T 达 86.3%),然后按照 Trizol 细胞裂解法操作说明书提取组织样本总 RNA(液氮保存)备用。

1.5 逆转录-多聚合酶链反应(RT-PCR) 紫外分光光度计定量总 RNA,调整浓度为:1 μg/μl。按 cDNA 第一链反应试剂盒说明书采用随机引物法合成 cDNA。用 GAPDH 作为内参照行 PCR 检测。FoxP3 引物序列为:上游:5'-GCTGGTCGGGAGAA GAGGAAA-3',下游:5'-CAGTATCCACGGAAATAACCT-3',扩增长度:433bp。GAPDH 引物序列为:上游:5'-AACGGATTGTGTCGTA TTG-3',下游:5'-GGAA GATGGTGA T-

GGATT-3',扩增长度:208 bp。PCR 参数:94 5 min 变性;94 35 s,52 40 s,71 55 s,38 个循环;72 延伸 7 min。PCR 产物于 2%琼脂糖电泳,电压 60 V,55 min。Gel ID 凝胶图像分析系统摄片并测定分析其光密度。计算各个样本 FoxP3 表达水平,表达量的相对值(Relative expression value)=待测基因扩增条带的灰度值/GAPDH 基因扩增条带的灰度值。

1.6 统计学方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Graph-Pad Prism 4.0 统计软件对各组数据行 t 检验。P<0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌患者外周血中 Treg 细胞的水平 见表 1。

表 1 胃癌患者外周血 Treg 细胞水平(%)

组别	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺
对照组	20	70.55 ±0.32	6.81 ±0.66
试验组	20	69.16 ±0.63	12.76 ±0.46 ^①

^①试验组 VS 对照组, t=7.441, P<0.01

2.2 FoxP3 mRNA 在外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞中的表达 见表 2。

表 2 胃癌患者外周血 Treg 细胞中 FoxP3mRNA 表达水平

组别	n	GAPDH 平均密度	FoxP3 平均密度	相对值 (%)
对照组	20	194.89 ±0.90	148.63 ±5.76	0.76 ±0.03
试验组	20	187.44 ±0.55	158.42 ±3.01	0.84 ±0.02 [*]

^{*}试验组 VS 对照组, t=2.229, P<0.05

3 讨论

FoxP3 基因是转录因子 Forkhead/ wingedhelix 家族中少部分与免疫功能相关的成员之一^[4]。人类该基因的改变与自身疾病的发生有着密切关系^[5-6]。该基因能够在 T 细胞胸腺发育过程中行使调节作用,指导 T 细胞分化^[7-8]并介导 Treg 细胞的免疫抑制功能^[9]。

本研究结果发现在胃癌患者的外周血中调节性 T 细胞所占的比例明显增高,同时研究还发现其 Treg 细胞中 FoxP3 基因 mRNA 呈现高表达,这与国外的研究结果相一致^[10]。胃癌患者肿瘤内部 Treg 细胞数量的增加和功能的增强,抑制了识别自身肿瘤细胞抗原的效应细胞的发育和活化,直接介导了患者体内自身免疫效应细胞对肿瘤的免疫耐受,使肿瘤能够逃避机体的免疫监视而无限制地生长和转移^[11]。FoxP3 基因的高表达,表明在胃癌的发展过程中,转录因子 FoxP3 能够通过某种机制调

(下转第 948 页)



参考文献:

[1] White A, Lamb PW, Barrett JC, et al. Frequent downregulation of the KAI1 (CD82) metastasis suppressor protein in human cancer cell lines [J]. *Oncogene*, 1998, 16(24): 3143-3149.

[2] Kauffman EC, Robinson VL, Stadler WM, et al. Metastasis suppressor: the evolving role of metastasis suppressor genes for regulating cancer cell growth at the secondary site [J]. *Jurrol*, 2003, 169 (3): 1122-1134.

[3] Farhadieh, RD, Smee R, Ow k, et al. Down-regulation of KAI1/ CD82 protein expression in oral cancer correlates with reduced disease free survival and overall patient survival [J]. *Cancer Lett*, 2004, 213 (1): 91-98.

[4] Jee B, Jin K, Hahn J H, et al. Metastasis-suppressor KAI1/ CD82 induces homotypic aggregation of human prostate cancer cells through Src-dependent pathway [J]. *Exp Mol Med*, 2003, 35 (1): 30-37.

[5] Liu FS, Dong J T, Chen J T, et al. KAI1 metastasis suppressor protein is down - regulated during the progression of human endometrial cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9 (4): 1393-1398.

[6] Eline E Hanekamp, Susanne C J P Gielen, Ellen Smid- Koopman, et al. Consequences of loss of progesterone receptor expression in development of invasive endometrial cancer [J]. *Clinical Cancer Research*, 2003, 9 (9): 4190-4199.

[7] 汪保和. 核受体超家族介导基因调控的分子机制[J]. *生理科学进展*, 2003, 34(4): 369-372.

[8] 曹泽毅. *中华妇产科学* [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 1805-1806.

[9] 李斌, 吴令英, 李淑敏, 等. 子宫内膜癌的预后影响因素分析 [J]. *癌症*, 2004, 23 (9): 1085-1088.

[10] Zhang XA, He B, Zhou B, et al. Requirement of the p130CAS-Crk coupling for metastasis suppressor KAI1/ CD82-mediated inhibition of cell migration [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (29): 27319-27328.

[11] Bandyopadhyay, S, Zhan R, choudhuri A, et al. Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression [J]. *Nat Med*, 2006, 12 (8): 933-938.

[12] Iizumi, M, Bandyopadhyay S, Watabe k. Interaction of Duffy antigen receptor for chemokines and KAI1: a critical step in metastasis suppression [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (4): 1411-1414.

[13] 汤洁, 施达仁, 杨文涛, 等. 上皮性卵巢癌转移抑制基因 KAI1 的表达及预后意义 [J]. *中华医学杂志*, 2005, 85 (2): 115-118.

[14] Schindl M, Birner P, Bachtiry B, et al. The impact of expression of the metastasis suppressor protein KAI1 on prognosis in invasive squamous cell cervical carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20 (6B): 4551-4555.

[编辑校对:周永红]

(上接第 936 页)

控诱导了患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的增殖, 并且增强了 Treg 细胞对自身免疫系统的抑制功能, 从而参与机体对肿瘤的免疫耐受^[12]。这一结果表明 FoxP₃ 基因的高表达及伴随出现的 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞增殖在胃癌的发生发展过程中起着重要的调节作用。

本研究结果提示, 在抗胃癌的免疫治疗中通过对转录因子 FoxP₃ 表达进行调控, 以期达到限制 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞功能从而增强免疫细胞功能, 进而找到一条打破肿瘤免疫耐受、提高肿瘤免疫治疗疗效的新途径。

参考文献:

[1] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic 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] Takahashi T, Sakaguchi S. The role of regulatory T cells in controlling immunologic self-tolerance [J]. *Int Rev Cytol*, 2003, 225 (3): 1-32.

[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] Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, et al. Disruption of a new forkhead/ winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse [J]. *Nature Genetics*, 2001, 27 (1): 68-73.

[5] Owen CJ, Jennings CE, Imrie H, et al. Mutational analysis of the Foxp3 gene and evidence for genetic heterogeneity in the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy syndrome [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88 (12): 6034-6039.

[6] Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome [J]. *J Med Genet*, 2002, 39 (8): 537-545.

[7] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky A Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells [J]. *Nature Immunol*, 2003, 4 (4): 330-336.

[8] Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, et al. Regulatory T cell Lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3 [J]. *Immunity* 2005, 22 (3): 329-341.

[9] Fantini MC, Becker C, Monteleone G, et al. TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4⁺ CD25⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7 [J]. *J Immunol*, 2004, 172 (9): 5149-5153.

[10] Needham DJ, Lee JX, Beilharz MW. Intra-tumoural regulatory T cells: a potential new target in cancer immunotherapy [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 343 (3): 684-691.

[11] Wolf AM, Wolf D, Steurer M, et al. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9 (2): 606-612.

[12] El Andaloussi A, Lesniak MS. CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T-cell infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with tumor grade in human gliomas [J]. *J Neurooncol*, 2007, 83 (2): 145-152.

[编辑:刘红武;校对:周永红]