

## 肺癌患者外周血调节性T细胞和IL-10的检测及其意义

翟晋芳 杜凤兰 绳晋雅 郭志娟

**摘要 目的:**探讨肺癌患者外周血调节性T细胞和IL-10检测的诊断意义及与临床特征相关性。**方法:**采用流式细胞仪检测60例肺癌患者外周血中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞的表达水平,同时采用ELISA法检测IL-10的表达水平。并随机选30例健康体检者作为对照组。**结果:**肺癌患者外周血中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞和IL-10的表达水平明显高于健康对照组( $P < 0.05$ );CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞与IL-10的检测结果呈正相关;肺癌患者外周血中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞和IL-10的表达水平与临床分期有关( $P < 0.05$ ),与病理类型无关( $P > 0.05$ )。**结论:**检测肺癌患者外周血中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞和IL-10的表达水平,有助于肺癌患者病情的评估和治疗。

**关键词** 肺癌 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞 IL-10

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.06.007

### Detection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Cells and IL-10 in Peripheral Blood of Lung Cancer Patients ant Its Significance

Jin Fang ZHAI, Feng Lan DU, Jin Ya SHENG, Zhi Juan GUO

Correspondence to: Jin Fang ZHAI, E-mail: lwg666lw@163.com

The First Department of Respiratory Medicine, Shanxi Provincial Tumor Hospital, Taiyuan 030013, China

**Abstract Objective:** This study discusses the relationship of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T-cells and IL-10 in the peripheral blood of lung cancer patients with clinicopathologic features. **Methods:** The amounts of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T-cells in the peripheral blood samples from 60 patients were measured using flow cytometry, whereas the amounts of IL-10 were measured using enzyme-linked immunosorbent assay. Blood samples from 30 healthy volunteers were also collected and examined. **Results:** The amounts of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T-cells and IL-10 in the peripheral blood samples from lung cancer patients were significantly higher than those from the healthy volunteers ( $P < 0.05$ ). Moreover, the amounts of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T-cells and IL-10 were positively correlated. Finally, the amounts of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T-cells and IL-10 were correlated with the clinical stage of the disease ( $P < 0.05$ ) but were not associated with the pathological classification ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Determining the amounts of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cells and IL-10 may help in the assessment and therapy of lung cancer patients.

**Keywords:** Lung cancer; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cells; IL-10

免疫功能低下有利于肿瘤的发展,而肿瘤发展又会进一步抑制机体的免疫功能。调节性T细胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T)为1995年由Sakaguchi等<sup>[1]</sup>首次报道的免疫抑制细胞。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞在维持机体免疫自稳、调控免疫应答方面起着重要作用,尤其在肿瘤免疫耐受机制中发挥的作用备受瞩目。白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)是一种具有多向性生物活性的强免疫抑制因子,能通过自分泌或旁分泌的方式促进肿瘤生长,并能抑制细胞程序性死亡,调节宿主微环境,影响肿瘤的转移<sup>[2-4]</sup>。到目前为止,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞具体发挥免疫作用的机制并不十分清楚。本研究通过检测中晚期肺癌患者血清中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞和IL-10的情况,进一步探讨其发挥免疫抑制功能的作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 临床资料 本组60例肺癌患者均为2008年5月至2008年12月在山西省肿瘤医院初发治疗前往

院患者,均经病理确诊为肺癌,且无急性感染及免疫性疾病。男48例,女12例,年龄38~81岁,中位年龄63岁。按TNM分期(AJCC 6th, 2002),Ⅱ期16例,Ⅲ期24例,Ⅳ期20例。其中鳞癌19例,腺癌23例,小细胞癌13例,大细胞癌5例。对照组30例,为本院体检健康者,男18例,女12例,年龄34~69岁,中位年龄51岁。

1.1.2 主要试剂及仪器 FAS Calibur 流式细胞仪(美国BD公司)、加样器(法国GILSON)、孵箱(日本Forma Scientific)、ELISA试剂盒(北京晶美生物工程有限公司)

#### 1.2 方法

1.2.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞的检测方法 于清晨空腹抽取静脉血2 mL,EDTA抗凝。取50 μL于流式管中,加抗体12.5 μL;混匀,暗处孵育20 min;加裂解液2 mL,充分裂解红细胞;1 500转/min离心,洗涤2次;加200 μL PBS混匀,置暗处4℃待上机,用流式细胞仪检测后记录结果。

1.2.2 IL-10的检测方法 于清晨空腹抽取静脉血2 mL,加入到抗体包被板条的相应孔中,37℃孵箱孵育90 min。洗板4次;加入生物素化抗体工作液,37℃孵箱孵育60 min。洗板4次,加入酶结合物工作液。37℃孵箱孵育30 min。洗板4次;加入显色剂,避光37℃孵箱孵育10~15 min;加入终止液,混匀后即刻测量OD<sub>450</sub>值。

### 1.3 统计学方法

实验数据为计量资料,进行数据的组间比较时,若满足正态性、方差齐性,则两组比较采用 $t$ 检验,多组比较采用方差分析;如果不满足正态性、方差齐性,组间比较采用秩和检验;CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞为百分比资料,不符合正态性分布,故采用中位数(四分位数间距)进行统计描述。进行相关性分析时,若两组数据不满足双变量正态分布,进行等级相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞和IL-10的检测结果

肺癌患者外周血的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞和IL-10的表达水平分别高于对照组(表1、2)。

表1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞在肺癌患者和健康人外周血的表达 Me(QR)

Table 1 Differences of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg expression in peripheral blood between lung cancer patients and control group

组别	例数	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T细胞(%)	U	P
肺癌	60	18.64(14.62)	3.5	<0.05
健康	30	4.36(3.27)		

表2 IL-10在肺癌患者和健康人外周血的表达 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Differences of IL-10 expression in peripheral blood between lung cancer patients and control group

组别	例数	IL-10(pg/mL)	t	P
肺癌	60	28.63 ± 3.34	6.59	<0.05
健康	30	19.17 ± 2.45		

### 2.2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞与IL-10的相关性分析

肺癌患者外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞和IL-10的表达水平进行秩相关分析( $r_s=0.843, P<0.05$ ),提示CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T和IL-10呈正相关。

### 2.3 肺癌患者外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T和IL-10与病理类型的关系

肺癌患者外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T和IL-10的表达水平与病理类型无关( $P$ 均>0.05,表3)。

### 2.4 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T和IL-10与临床分期的关系

肺癌患者外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T和IL-10的表达水平与临床分期有关,IV期高于III期,III期高于II期(表4)。

表3 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T、IL-10与病理类型的关系 Me(QR)

Table 3 The relationship of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg and IL-10 expression with pathological types

病理类型	n	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T(%)	IL-10(pg/mL)
鳞癌	19	17.45(13.92)	29.035 ± 4.151
腺癌	23	19.03(16.71)	28.117 ± 3.222
大细胞癌	5	16.93(14.28)	29.289 ± 5.224
小细胞癌	13	18.52(15.37)	28.678 ± 3.265

表4 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T、IL-10与临床分期的关系 Me(QR)

Table 4 The relationship of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg and IL-10 expression with clinical staging

临床分期	n	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T(%)	IL-10(pg/mL)
II	16	15.97(14.28)	25.462 ± 3.721
III	24	18.37(16.17)	28.371 ± 4.172
IV	20	21.93(15.38)	31.466 ± 3.613

## 3 讨论

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T占外周CD4<sup>+</sup>T细胞总数的5%~10%,是一种具有免疫抑制作用的细胞,在维持机体免疫耐受的同时,又可以防止自身免疫疾病的发生。但在免疫监视方面,由于肿瘤抗原是体内的自身抗原,因此CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T可以一定程度的逃避免疫系统的监视,进而会影响对肿瘤细胞的清除。Cureil等<sup>[5]</sup>研究发现,卵巢癌患者中有CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T增多的现象,而在正常的卵巢组织中仅存在少量的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T。Udaya等<sup>[6]</sup>发现肺癌、乳腺癌和胰腺癌患者肿瘤内调节性T细胞也明显增多。本研究通过对60例肺癌患者和30例健康人外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T比例的检测,发现肺癌患者CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T水平显著高于健康人( $P<0.05$ ),从而抑制免疫监视系统<sup>[7]</sup>。

IL-10不仅抑制炎症反应,而且还能促进肿瘤生长,抑制细胞凋亡<sup>[8]</sup>。有文献报道,黑色素瘤、结肠癌等多种恶性肿瘤组织中均有IL-10的表达,患者血清IL-10水平也呈现升高趋势<sup>[9-10]</sup>。

本研究采用ELISA方法对本标进行检测,结果显示肺癌患者血清IL-10水平明显高于健康对照组( $P<0.05$ ),与以上研究结论相符,表明IL-10与肺癌有关。推断IL-10可能是肺癌细胞的自分泌因子,在肿瘤微环境中产生,并释放到外周血中。Fortis等<sup>[11]</sup>报道支气管肺癌的组织匀浆中IL-10水平升高,免疫组化证实IL-10源于肿瘤细胞。亦证实了本研究的推断。

大量的研究发现,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T在体内的抑瘤作用途径依赖于细胞因子<sup>[12-16]</sup>。本研究结果中发现,肺癌患者外周血中,随着CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T数量的增

高,IL-10的表达水平也逐渐增高,可能是肿瘤细胞通过产生大量的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T抑制肿瘤免疫,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T又通过某种方式使机体产生一定量的IL-10,共同发挥免疫抑制作用。

本研究还发现,肺癌患者的TNM分期越晚,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T和IL-10的表达水平越高( $P<0.05$ )。这种变化表明:CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T和IL-10水平随着肿瘤浸润转移程度的增加而升高,从而进一步改变宿主对肿瘤细胞的反应,使肿瘤细胞逃避机体的免疫杀伤作用。

目前,免疫治疗恶性肿瘤的实验主要集中于发现最有效提呈肿瘤抗原给特异性T细胞的方法(如DC疫苗),体内、体外用刺激性细胞因子如IL-2、IL-12或IFN- $\alpha$ 来增强机体的抗肿瘤免疫应答,或过继性输入体外大量扩增的TIL细胞,但临床总体效果不令人满意,主要原因之一在于肿瘤组织产生大量的、正常组织也同样表达的抗原(如CEA、AFP、PSA和MA GE等),反馈调节机制产生的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T就会强有力抑制有“破坏性”作用的免疫应答。因此,将减少患者CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T数量或干预其功能作为一种提高机体抗肿瘤免疫治疗效果的策略,在未来的防治肿瘤方面可能有重要意义。

早已用于临床的抗肿瘤药环磷酰胺也能清除CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T。有研究发现,对9例发生转移的实体肿瘤患者低剂量反复给予环磷酰胺后,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T发生明显的选择性的减少,且化疗药物对CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T的抑制作用使T细胞,NK细胞作用恢复<sup>[17]</sup>。因此,联合应用化疗和免疫治疗对抗肿瘤具有重要意义<sup>[18]</sup>。但确切评价血清CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T和IL-10的水平在肺癌诊断和治疗中的价值,仍需要进行反复实验,积累更多的临床资料进行深入研究。

#### 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 Huang M, Lindahl R. Non-small cell lung cancer-derived soluble mediators and prostaglandin E: enhance peripheral blood lymphocyte IL-10 transcription and protein production[J]. J Immunol, 1993, 89: 150.
- 3 Romagani S, Alexander HR, Fong M, et al. Human Th1 and Th2 subsets; doubt no more[J]. Immunol Today, 1991, 12: 256.
- 4 Romagnan S. Type1 T helper and type2 T helper cells: function, regulation and role in protection and disease[J]. Intl Clin, Lab. Res, 1991, 21: 152.
- 5 Cureil TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts

reduced survival[J]. Nat Med, 2004, 10(9): 942-949.

- 6 Udaya K L, Todd T M, Hong G J, 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.
- 7 Seo N, Hayakawa S, Takigawa M, et al. Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of CD4(+) T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity[J]. Immunology, 2001, 103(4): 449-457.
- 8 Yue FY, Dummer R, Geertsens R, et al. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules[J]. Int J Cancer, 1997, 71(4): 630-637.
- 9 Boyano MD, Garcia-Vazquez MD, Lopez Michelena T, et al. Soluble interleukin-2 receptor, intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-10 serum levels in patients with melanoma[J]. Br J Cancer, 2000, 83(7): 847-852.
- 10 Galizia G, Lieto E, De Vita, et al. Circulating levels of interleukin-10 and interleukin-6 in gastric and colon cancer patients before and after surgery: relationship with radicality and outcome[J]. J Interferon Cytokine Res, 2002, 22(4): 473-482.
- 11 Fortis C, Foppoli M, Gianotti L, et al. Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumours. Cancer Lett, 1996; 104(1): 1-5.
- 12 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.
- 13 Sempowski G D, Cross S J, Heinly C S, et al. CD7 and CD28 are required for murine CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>regulatory T cell homeostasis and prevention of thyroiditis[J]. J Immunol, 2004, 172(2): 787-794.
- 14 Piccirillo C A, Letterio J J, Thornton A M, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness[J]. J Exp Med, 2002, 196(2): 237-246.
- 15 Ito T, Amakawa R, Inaba M, et al. Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs[J]. J Immunol, 2004, 172(7): 4253-4259.
- 16 Peng Y, Laouar Y, Li M O, et al. TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>regulatory T cells responsible for protection against diabetes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(13): 4572-4577.
- 17 Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients[J]. Cancer Immunol Immunother, 2007, 56(5): 641-648.
- 18 Motoyoshi Y, Kaminoda K, Saitoh O, et al. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide[J]. Oncol Rep, 2006, 16(1): 141-146.

(2011-12-26收稿)

(2011-02-02修回)

(贾树明校对)