

调节性T细胞及白细胞介素17在子宫内膜癌患者中的表达及意义

唐婷婷 赵曼曼

沈阳市第四人民医院妇产科,辽宁沈阳 110031

[摘要] 目的 研究调节性T细胞及白细胞介素17(IL-17)在子宫内膜癌患者中的表达及意义。方法 选取2013年1月~2016年1月我院收治的20例子宫内膜癌患者作为子宫内膜癌组,另选取同期20名健康志愿者作为对照组,应用流式细胞术检测两组外周血中调节性T细胞水平。采用realtime-PCR及ELISA检测调节性T细胞转录因子Foxp3、抑制性细胞因子白细胞介素10(IL-10)及炎性细胞因子IL-17的水平。结果 子宫内膜癌患者外周血中调节性T细胞的水平及Foxp3表达水平显著高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.01$)。同时子宫内膜癌患者IL-10及IL-17的分泌水平也显著高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.01$)。结论 子宫内膜癌患者调节性T细胞/Th17细胞间的平衡被打破,调节性T细胞可能通过分泌IL-10参与调控子宫内膜癌的病理进程。

[关键词] 子宫内膜癌;调节性T细胞;白细胞介素17;白细胞介素10

[中图分类号] R737.33

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-9701(2019)27-0033-03

Expression and significance of regulatory T cells and interleukin 17 in the patients with endometrial cancer

TANG Tingting ZHAO Manman

Department of Gynecology and Obstetrics, Shenyang Fourth People's Hospital, Shenyang 110031, China

[Abstract] Objective To study the expression and significance of regulatory T cells and interleukin 17(IL-17) in the patients with endometrial cancer. Methods 20 patients with endometrial cancer who were admitted to our hospital from January 2013 to January 2016 were selected in the endometrial cancer group. Another 20 healthy volunteers during the same period of time were selected in the control group. Flow cytometry was used to detect regulatory T cell levels in peripheral blood of both groups. Real-time PCR and ELISA were used to detect the levels of regulatory T cell transcription factor Foxp3, inhibitory cytokine interleukin 10(IL-10) and inflammatory cytokine IL-17. Results The levels of regulatory T cells and the expression level of Foxp3 in peripheral blood of patients with endometrial cancer were significantly higher than those in the control group, and the differences were statistically significant($P<0.01$). At the same time, the secretion levels of IL-10 and IL-17 in the patients with endometrial cancer were significantly higher than those in the control group, and the difference was statistically significant($P<0.01$). Conclusion The balance between regulatory T cells/Th17 cells in the patients with endometrial cancer is broken. Regulatory T cells may be involved in the regulation of the pathological process of endometrial cancer by secreting IL-10.

[Key words] Endometrial cancer; Regulatory T cells; Interleukin 17(IL-17); Interleukin 10 (IL-10)

子宫内膜癌发生于子宫内膜上皮组织,是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一^[1]。有研究显示大量的免疫细胞及相关炎性因子浸润到肿瘤组织间质中,对子宫内膜癌的病理进程发挥调控作用^[2]。其中调节性T细胞最为引人关注。有研究者发现在子宫内膜癌患者肿瘤局部CD4⁺CD25⁺Treg比例增高,并认为这种升高在一定程度上归因于患者的年龄或绝经后状态^[3]。研究证实Treg细胞表面分子GITR在肿瘤组织中的表达明显高于外周血中的表达^[4]。同时研究人员还发现子宫内膜癌患者中调节性T细胞/杀伤性T细胞比例高者,预后较差,无病生存期明显缩短,提示调节性T

细胞可能是子宫内膜癌的独立预后因素^[5]。

辅助性Th17型细胞以分泌白细胞介素17(IL-17)为特征,可通过诱导产生多种炎性细胞因子,参与构成肿瘤微环境^[6]。现有研究显示Th17细胞与子宫内膜癌存在相关性,但其具体作用机制尚未阐明。尽管有研究显示Th17细胞的数量及特异性细胞因子的水平随肿瘤的进展始终维持在高水平^[7],但也有研究证实子宫内膜癌患者外周血血清中IL-17的水平并没有显著升高^[8]。因此Th17在子宫内膜癌患者中的表达及作用有待进一步确证。同时调节性T细胞在子宫内膜癌中的作用及其与Th17免疫反应中的相互关系亟待研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选自沈阳市第四人民医院 2013 年 1 月–2016 年 1 月就诊子宫内膜癌患者 20 例,且经病理学检查确诊。年龄 32~59 岁,平均(42.8±9.0)岁,均未进行过放、化疗及激素或免疫等抗肿瘤治疗。对照组根据年龄匹配选取 20 名健康志愿者,年龄 36~55 岁,平均(44.6±8.5)岁。两组年龄差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

本研究获医院伦理委员会批准,所有被检者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术检测调节性 T 细胞水平 采集各组研究对象外周血 2.5 mL,置于 EDTA 抗凝管中,加入淋巴细胞分离液,离心,分离获得 PBMC,计数。取 1×10^6 PBMC,加入 anti-CD4-FITC 及 anti-CD25-APC 进行细胞表面染色,4℃,2 h。破膜固定后,加入 anti-Foxp3-PE 进行胞内染色,清洗,重悬细胞,上机检测。anti-CD4-FITC、anti-CD25-APC 及 anti-Foxp3-PE 均购自美国 BD bioscience 公司。

1.2.2 realtime-PCR 检测组织 Foxp3 的表达水平 患者行切除术后,取 1 cm×1 cm×1 cm 新鲜肿瘤组织,液氮保存。对照组取诊刮后子宫内膜,PBS 清洗后,液氮保存。Trizol 法提取组织块总 RNA,应用 Takara RT kit 将 RNA 逆转录为 cDNA,应用 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪检测肺组织中细胞因子 Foxp3 mRNA 的表达水平。引物设计合成由大连宝生物公司提供: Foxp3 上游引物 5'-CCACCTGGAAGAACGCCAT-3', 下游引物 5'-CACTTCTTGGTCCCTGTGGG-3'。β-actin 上游引物 5'-CATTCCAAATATGAGATGCGTTGT-3', 下游引物 5'-GCTATCACCTCCCTGTGTG-3'。

1.2.3 酶联免疫吸附法(ELISA)检测 IL-17、IL-10 的分泌水平 抽取各组研究对象外周血,室温静置 2 h,1500 rpm,离心 30 min,分离上清,-70℃保存,待测。取 100 μL 稀释的血清样品或梯度稀释的标准品,加入预先包被好的 96 孔板中。室温孵育 2 h,PBS 洗板 3 次。加入检测抗体 100 μL,室温孵育 2 h,PBS 洗板 3 次。加入 Streptavidin-HRP 100 μL,避光孵育 20 min,洗板 3 次。加底物避光室温孵育 30 min,加终止液 50 μL。利用酶标仪,在 450 nm 处读板计算蛋白浓度。

1.3 观察指标

记录对比两组标本中的调节性 T 细胞、Foxp3、IL-17 及 IL-10 的表达水平,并分析上述指标与子宫内膜癌的密切关系。

1.4 统计学分析

采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数±标准差表示,利用两组独立样本 t 检验进行组间比较, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞及特异性转录因子 Foxp3 表达水平比较

为证实调节性 T 细胞在子宫内膜癌病理进程中是否发挥作用,采用流式细胞术检测患者外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞水平,同时进一步采用实时定量荧光 PCR 检测调节性 T 细胞特异性转录因子 Foxp3 的表达水平。结果表明,子宫内膜癌患者外周血中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例及子宫内膜癌患者局部组织中 Foxp3 的 mRNA 表达水平较对照组均显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表 1。

表 1 两组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞及特异性转录因子 Foxp3 表达水平比较($\bar{x}\pm s$,%)

组别	n	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	Foxp3 mRNA 表达水平
对照组	20	3.9190±1.0386	1.6985±0.1179
子宫内膜癌组	20	11.5595±1.7361	7.5325±1.0373
t 值		16.89	24.99
P 值		<0.01	<0.01

2.2 两组外周血中 IL-17 及 IL-10 分泌水平比较

酶联免疫吸附法检测对照组及患者外周血血清中细胞因子的分泌水平。结果显示,子宫内膜癌患者血清中 IL-17 及 IL-10 的分泌水平较对照组均明显升高,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。见表 2。

表 2 两组外周血中 IL-17 及 IL-10 分泌水平比较($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	n	IL-10	IL-17
对照组	20	18.0923±2.0596	188.0850±20.8809
子宫内膜癌组	20	121.5575±17.3663	551.4960±60.5891
t 值		23.02	25.71
P 值		<0.01	<0.01

3 讨论

子宫内膜癌作为最常见的女性生殖系统恶性肿瘤之一,其致死率仅次于卵巢癌和宫颈癌,居妇科恶性肿瘤的第三位^[9]。近年来,研究显示子宫内膜癌间质中浸润有大量的免疫细胞,免疫细胞与其所分泌的细胞因子共同构成了肿瘤的微环境,同时它们在子宫内膜癌的发生发展过程中也发挥举足轻重的作用,但其具体调控机制尚不十分清楚^[10]。

调节性T细胞是一类具有免疫抑制功能的T细胞亚群,以表达CD4、CD25及Foxp3为特征性表型,不仅能对抗外源性抗原,还可以抑制自身抗原的免疫应答,从而辅助肿瘤细胞逃避机体免疫系统的识别及清除^[11]。同时有研究表明调节性T细胞在妇科肿瘤的发生发展中也发挥了重要的作用。有研究显示调节性T细胞介导宫颈癌的免疫逃逸^[12-13],同时在卵巢癌、胃癌、肺癌等多种肿瘤患者外周血中调节性T细胞的比例也显著升高^[14-16],但调节性T细胞对子宫内膜癌的作用研究尚不足。

本研究中子宫内膜癌患者外周血中调节性T细胞的数量及功能均有明显升高,表明调节性T细胞参与调控了子宫内膜癌的病理进程。进一步检测调节性T细胞功能性转录因子Foxp3的表达水平,发现子宫内膜癌患者病灶组织中Foxp3的表达水平显著升高,提示调节性T细胞不仅在数量上显著增加,而且其免疫调节功能也明显上调。IL-10作为调节性T细胞,是发挥免疫抑制功能的主要细胞因子,参与调控多种肿瘤的发生发展。在子宫内膜癌患者外周血中,IL-10的分泌水平显著增加,表明调节性T细胞可能同样通过分泌IL-10来发挥其对子宫内膜癌病理进程的调控作用。另一方面,以分泌IL-17为主要特征的Th17型免疫细胞被证实参与子宫内膜的多种炎症发生过程。本研究中子宫内膜癌患者外周血中IL-17的分泌水平显著升高,提示Th17型炎症反应在子宫内膜癌患者中被大量诱导。调节性T细胞和Th17细胞均显著增加,意味着调节性T细胞和Th17细胞间相互平衡被打破,形成了有利于肿瘤发展的免疫炎性微环境。

综上所述,通过本文研究结果及临床报道结果显示,子宫内膜癌患者血清调节性T细胞及IL-17水平较正常人群明显升高,调节性T细胞及IL-17水平检测有助于对子宫内膜癌诊断及其治疗,并且对病情发展程度判断亦有一定的临床价值。

[参考文献]

- 陈晓斐,王鹏飞,刘晨晨,等. FIGO I 期子宫内膜癌患者 159 例愈后影响因素[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26 (6):416-420.
- 吕巧英,赵洪波,陈晓军,等. 子宫内膜癌肿瘤微环境的免疫调控进展[J]. 复旦学报, 2016, 43(4):475-478.
- Sawan S, Burt DJ, Stern PL, et al. Circulating regulatory T cells in endometrial cancer: A role for age and menopausal status[J]. Immunol Invest, 2011, 40(1):62-75.

- Chang WC, Li CH, Huang SC, et al. Clinical significance of regulatory T cells and CD8⁺ effector populations in patients with human endometrial carcinoma[J]. Cancer, 2010, 116(24):5777-5788.
- Yamagami W, Susumu N, Tanaka H, et al. Immunofluorescence-detected infiltration of CD4⁺FOXP3⁺regulatory T cells is relevant to the prognosis of patients with endometrial cancer[J]. Int J Gynecol Cancer, 2011, 21(9):1628-1634.
- Ariaifar A, Faghah Z, Zeighami S, et al. 967-Double positive IFN γ /IL17 CD4⁺ lymphocytes play a pathogenic role in bladder cancer[J]. European Urology Supplements, 2017, 3(16): e1685-e1686.
- Guéry L, Hugues S. Th17 Cell plasticity and functions in cancer immunity[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015:314620.
- Punt S, Fleuren GJ, Kritikou E, et al. Angels and demons: Th17 cells represent a beneficial response, while neutrophil IL-17 is associated with poor prognosis in squamous cervical cancer[J]. Oncoimmunology, 2015, 4(1):e984539.
- 刘睿倩. 乳腺癌基因-1 和 CA125 在子宫内膜癌患者中的表达及意义[J]. 中华全科医学, 2017, 15(1):88-92.
- Dossus L, Lukanova A, Rinaldi S, et al. Hormonal, metabolic, and inflammatory profiles and endometrial cancer risk within the EPIC cohort—a factor analysis[J]. Am J Epidemiol, 2013, 177(8):787-799.
- 王凯阳,隋晓露,陈继红. 细胞亚群与 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞及 Foxp3 mRNA 在肾移植大鼠急性排斥反应中的作用[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2017, 3 (31):218-223.
- 肖菊. 调节性 T 细胞在宫颈癌患者肿瘤组织中的浸润情况和临床意义[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(1):27-29.
- 张慧莉, 鲍引娣, 王书琴, 等. Th17/Treg 细胞与宫颈癌 HPV 感染类型的关系[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(17): 4018-4021.
- 戴然, 桑秀丽. 调节性 T 细胞在不同分期卵巢癌患者中的临床意义[J]. 实用癌症杂志, 2018, 33(10):1590-1592.
- Xu Liu, Danhua Xu, Chen Huang, et al. Regulatory T cells and M2 macrophages present diverse prognostic value in gastric cancer patients with different clinicopathologic characteristics and chemotherapy strategies[J]. Journal of Translational Medicine, 2019, 17(192):2-11.
- 付承林, 赵秀敏, 陈灵斌, 等. HBV 感染型原发性肝癌患者肿瘤微环境中 T 细胞亚群及 VEGF 表达水平及临床意义[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 7(27):1490-1494.

(收稿日期:2019-06-10)