



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.027

http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.027

Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(4):604-607.

· 简要论著 ·

# 胃癌患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞与 TGF- $\beta$ 1 检测的意义

代辉<sup>1</sup>, 黄强<sup>1</sup>, 向毓明<sup>2</sup>, 张诗锐<sup>3</sup>, 戴冀斌<sup>4</sup>

(湖北民族学院附属民大医院 1. 普通外科 2. 感染科 3. 急诊外科, 湖北 恩施 445000; 4. 武汉大学基础医学院 人体解剖学系, 湖北 武汉 430071)

## 摘要

**目的:** 探讨胃癌患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs) 以及血清 TGF- $\beta$  1 水平的变化及意义。

**方法:** 检测并比较 42 例胃癌患者 (胃癌组) 与 24 例健康体检者 (对照组) 外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs 与血清 TGF- $\beta$  1 水平, 分析两者水平与胃癌患者临床病理因素的关系。

**结果:** 胃癌组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs 和 TGF- $\beta$  1 水平均明显高于对照组 (均  $P < 0.05$ )。胃癌患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs 水平与 TNM 分期、淋巴结转移有关 (均  $P < 0.05$ ) , 而血清 TGF- $\beta$  1 的表达水平与 TNM 分期、分化程度、淋巴结转移有关 (均  $P < 0.05$ ) ; 胃癌组患者外周血内 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs 的表达水平与血清内 TGF- $\beta$  1 的表达水平呈明显正相关 ( $r = 0.801$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** 胃癌患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs 水平及血清 TGF- $\beta$  1 水平升高, 检测两者水平有助于患者病情与预后的判断。

## 关键词

胃肿瘤; T 淋巴细胞, 调节性; 转化生长因子  $\beta$  1

中图分类号: R735.2

消化系统中, 胃癌是最为常见的一种恶性肿瘤, 其较高的发病率以及致死率对人类的健康构成了严重的威胁<sup>[1]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs) 具有调节免疫抑制和免疫耐受的作用<sup>[2]</sup>, 在肿瘤免疫中扮演重要的角色<sup>[3]</sup>。转录因子叉头状转录因子p3 (Foxp3) 是Tregs的标志性分子, 与CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs的功能、发育以及外周表达均有密切联系<sup>[4]</sup>。转化生长因子  $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1) 作为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs中主要的调节细胞因子之一, 其对于肿瘤生长, 在早期起抑制作用<sup>[5]</sup>, 而在进展期却起促进作用<sup>[6]</sup>。本文旨在通过对胃癌患者的外周血内CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs以及TGF- $\beta$  1表达水平的测定, 探讨上述细胞在胃癌中的表达意义, 为早期诊断以及免疫治疗胃癌

提供一定的理论基础。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选择2013年2月—2014年9月在我院接受手术治疗的42例胃癌患者 (胃癌组)。患者均经组织病理学确诊为胃癌的初治患者, 其中女15例, 男27例, 所有入选者均无放化疗史。另外选取24例健康体检者作对照组, 依据体检报告排除伴有肺、肝、心、胃等的重要脏器疾病者以及肝功能异常患者。

### 1.2 研究方法

主要试剂: CD25、CD4、Foxp3免疫组化一抗以及SP-9001免疫组化染色试剂盒、DAB显色剂 (北京中杉金桥生物技术有限公司), 人全血Tregs检测试剂盒 (eBioscience公司), 人TGF- $\beta$  1 ELISA检测试剂盒 (上海源叶生物科技有限公司)。

收稿日期: 2014-12-16; 修订日期: 2015-03-09。

作者简介: 代辉, 湖北民族学院附属民大医院主治医师, 主要从事普外科、创伤外科方面的研究。

通信作者: 戴冀斌, Email: 641310632@qq.com

主要仪器: coulter Epics XL型流式细胞仪 (BECKMAN COUNLTER公司, 美国), SZ-1 型快速混匀机 (江苏金坛市金城国胜实验仪器厂), LC-4012低速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

所有被观察对象均于清晨空腹采集静脉血 2 mL, 流式细胞术 (FCM) 检测胃癌患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs水平。按流式细胞仪说明书和人全血Tergs检测试剂盒严格执行操作: (1) 取 100 μL混匀后的血液标本置于12 mm×75 mm的采样管内; (2) 加入各20 μL的抗人CD25-APC和抗人CD4-FITC, 充分混匀后于室温下孵育30 min, 立即将红细胞裂解液2 mL加入其中, 再次混匀后于室温下孵育10 min; (3) 以1 500 r/min的速度离心5 min后去除上清液; (4) 将FBS液2 mL加入其中, 再次以1 500 r/min的速度离心5 min后去除上清液, 反复2次; (5) 配制Foxp3固定/破膜液; (6) 将 (4)操作重复2次; (7) 将100 μL的抗人Foxp3-PE加入其中, 于4 ℃、避光条件下孵育30 min; (8) 重复操作(4); (9) 将0.5 mL左右的FBS重悬细胞加入其中后上机检测, 将CD4<sup>+</sup>Tergs筛选出, 且分选出该细胞中Foxp3阳性的Tergs和CD25阳性细胞。计算CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs/CD4<sup>+</sup>Tergs的比值, 作为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs的表达水平的代表。

ELISA法检测胃癌患者血清TGF-β 1表达水平。按ELISA检测试剂盒的相关要求严格执行操作: (1) 稀释洗涤缓冲液; (2) 将350 μL的洗液注入每孔内, 浸泡1 min后洗涤5次, 完成自由洗板; (3) 往标准品孔 (6个) 中加入各50 μL的浓度为 (0、3、6、12、24、48 ng/mL) 的标准品; (4) 选取样本孔, 除空白孔外均加入10 μL的待测样本和40 μL的样本稀释液; (5) 将100 μL的辣根过氧化物酶HRP所标记的待测抗体加入样本孔和标准品孔中, 将板膜及反应孔封住, 于37 ℃下水浴1 h; (6) 将孔内液体去除, 用吸水纸将其吸干, 然后将洗涤液加满每孔, 于室温下静置1 min, 将洗涤液甩干后, 再用吸水纸吸干, 反复5次此过程; (7) 将各50 μL的底物A和B加入每孔中, 于37 ℃、避光条件下孵育15 min; (8) 终止反应后, 在波长450 nm处检测每孔OD值; (9) 将标准曲线 ( $r \geq 0.9995$ ) 绘制出, 依据标准曲线计算各样本浓度。

### 1.3 统计学处理

本研究中的数据均采用SPSS 19.0软件进行分析。数据计量以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 形式表示, 比较采用t检验和  $\chi^2$  检验。P<0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 一般资料

本研究共纳入研究对象66例, 其中胃癌组42例, 对照组24例。两组一般资料包括性别、年龄、BMI的组间比较差异无统计学意义 (P>0.05), 而胃癌组CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs和TGF-β 1水平均明显高于对照组 (均P<0.05)。

表1 两组一般资料的比较

指标	胃癌组 (n=42)	对照组 (n=24)	t/χ <sup>2</sup>	P
性别 [n (%)]				
女	15 (35.7)	10 (41.7)	0.230	0.632
男	27 (64.3)	14 (58.3)		
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.7 ± 3.2	21.5 ± 3.1	0.247	0.806
年龄 [岁, n (%)]				
< 55	18 (42.9)	11 (15.8)	0.055	0.815
≥ 55	24 (57.1)	13 (54.2)		
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> Tergs (%)	6.97 ± 1.33	3.92 ± 1.10	19.03	<0.05
TGF-β 1 (ng/mL)	15.68 ± 3.72	10.33 ± 2.78	25.40	<0.05

### 2.2 胃癌组患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs 的表达水平

胃癌组患者外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs水平与TNM分期以及有无淋巴结转移有关 (均P<0.05); 而与胃分化程度、肿瘤部位以及肿瘤直径无明显关系 (均P>0.05); 对TNM分期组别中两两分析发现, I+II期与III期、I+II期与IV期、III期与IV期均存在统计学差异 (均P<0.05) (表2)。

### 2.3 胃癌组患者外周血内 TGF-β 1 的表达水平

胃癌组患者外周血内TGF-β 1的表达水平与胃癌TNM分期、有无淋巴结转移以及分化程度有关 (均P<0.05), 而与肿瘤直径、肿瘤部位无关 (均P>0.05); 对TNM分期组别中两两分析发现, I+II期与III期、I+II期与IV期均有统计学差异 (P<0.05), III期与IV期间无统计学差异 (P>0.05); 通过对分化程度组别中两两分析发

现,低分化与中分化、中分化与高分化间无统计学差异(均 $P>0.05$ ),而低分化与高分化间有统计学差异( $P<0.05$ )(表3)。

表2 胃癌相关参数与胃癌组患者外周血内CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs的表达水平的关系(%, $\bar{x}\pm s$ )

项目	<i>n</i>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> Tergs	<i>t/F</i>	<i>P</i>
TNM 分期				
I+II	12	5.79 ± 0.84	24.38	<0.01
III	21	6.98 ± 0.71		
IV	9	8.47 ± 1.21		
分化程度				
高分化	7	5.99 ± 1.38	2.785	0.074
中分化	12	7.12 ± 1.57		
低分化	23	7.19 ± 0.91		
淋巴转移				
有	27	7.44 ± 1.23	4.296	<0.05
无	15	5.98 ± 0.61		
肿瘤直径（cm）				
< 5	20	6.81 ± 0.93	1.073	0.290
≥ 5	22	7.21 ± 1.41		

表3 胃癌相关参数与胃癌组患者外周血内TGF-β1的表达水平的关系( $\bar{x}\pm s$ , ng/mL)

项目	<i>n</i>	TGF-β 1	<i>t</i> / <i>F</i>	<i>P</i>
TNM 分期				
I+II	12	12.38 ± 3.18	12.45	<0.05
III	21	16.98 ± 2.79		
IV	9	18.59 ± 3.63		
分化程度				
高分化	7	12.19 ± 3.81	5.600	<0.05
中分化	12	15.59 ± 4.43		
低分化	23	16.99 ± 2.43		
淋巴转移				
有	27	17.31 ± 3.20	4.214	<0.05
无	15	13.11 ± 2.89		
癌肿部位				
贲门及胃底	10	14.48 ± 3.85	1.396	0.260
胃体	10	15.49 ± 3.59		
幽门及胃窦	22	16.71 ± 3.50		
癌肿直径 ( cm )				
< 5	20	16.29 ± 3.42	0.774	0.444
≥ 5	22	15.41 ± 3.90		

## 2.4 相关性分析

相关性分析结果显示,胃癌组患者外周血内CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs的表达水平与血清内TGF-β1的表达水平呈明显正相关( $r=0.801$ ,  $P<0.05$ )。

## 3 讨论

本研究通过FCM法检测两组受试者外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs水平,结果用CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs/CD4<sup>+</sup>Tergs的比值表示。结果显示,胃癌患者外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs水平明显比对照组高,提示在胃癌发病的过程中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs可能发挥着一定的作用<sup>[7]</sup>。且通过对该细胞的表达水平与胃癌的分化程度、TNM分期、癌肿部位、癌肿直径以及淋巴结转移的关系的分析发现,胃癌患者的外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs水平与胃癌有无淋巴结转移以及TNM分期的关系密切,同时还发现TNM分期中,I+II期以及III期均与IV期有统计学差异,提示CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs的表达水平不仅与胃癌TNM分期关系密切,且在TNM分期中呈逐渐上升的趋势,这可以作为胃癌TNM分期间接判断的基础<sup>[8]</sup>。本研究的结果提示CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs的表达量与胃癌的淋巴结转移、局部浸润以及远处器官转移均相关<sup>[9]</sup>,且其出现的可能性随着CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs的表达水平的上升而增大,说明肿瘤的侵袭性也在增大,故可以通过检测胃癌患者的外周血内CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs的表达量对肿瘤TNM分期进行间接地判断,对手术和预后发挥指导性作用,并可以达到早发现、早治疗的目的<sup>[10]</sup>。

通过ELISA对两组受试者外周血中TGF-β1表达水平的检测发现,胃癌组患者的TGF-β1表达量明显比对照组高,且胃癌组患者血清内TGF-β1的表达水平与胃癌分化程度、TNM分期、有无淋巴结转移的关系密切;此外,TNM分期中I+II期与III期、I+II期与IV期均存在统计学差异,而IV期和III期却无统计学差异,在对胃癌TNM分期的直接判断上,敏感性比不上CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs,但是其可以作为灵敏度不强的胃癌早、晚期的间接指标<sup>[5,11]</sup>。且随着胃癌TNM分期的加深,TGF-β1的表达水平也逐渐上升<sup>[12]</sup>。而在分化程度的组别比较中发现,低分化与中分化、高分化与中分化间无统计学差异,但低分化与高分化间有统计学差异,提示胃癌只有在低分化阶段才会表现出较高的转移趋势和侵袭性<sup>[13]</sup>。胃癌组患者外周血内CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tergs的表达水平与血清内

TGF-β1的表达量呈正相关,且上述两种细胞均参与了胃癌的远处器官转移和淋巴结转移的过程<sup>[13]</sup>,但是血清内的TGF-β1的表达水平与肿瘤的分化程度关系密切,而CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs的表达量却与肿瘤的分化程度无显著的差异<sup>[14]</sup>,提示TGF-β1的表达水平对胃癌的分化程度可能有影响,并对胃癌局部浸润有直接的影响<sup>[15]</sup>。

综上所述,胃癌患者外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs水平、血清TGF-β1的水平均与肿瘤TNM分期以及淋巴结转移相关,即均与患者潜在生存期相关<sup>[16]</sup>。且对两种细胞间关联性的分析发现,检测外周血内CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs的表达量对胃癌分期进行间接判断,可以达到早期治疗和诊断以及评估预后的目的<sup>[17]</sup>。而检测血清内TGF-β1的表达水平可以达到对胃癌分期进行粗略评估的目的<sup>[10]</sup>。两者共同为免疫治疗胃癌提供一定的理论指导<sup>[18]</sup>。

## 参考文献

- [1] Zhao L, Li W, Zang W, et al. JMJD2B promotes epithelial-mesenchymal transition by cooperating with β-catenin and enhances gastric cancer metastasis[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(23):6419-6429.
- [2] 张育超,王惠英,吕永添,等.胃癌患者围手术期CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞的变化及其意义[J].中国普通外科杂志,2008,17(5):504-505.
- [3] Peng LS, Zhuang Y, Shi Y, et al. Increased tumor-infiltrating CD8(+) Foxp3(+) T lymphocytes are associated with tumor progression in human gastric cancer[J]. Cancer Immunol Immunother, 2012, 61(11):2183-2192.
- [4] Ma GF, Miao Q, Zeng XQ, et al. Transforming growth factor-beta1 and -beta2 in gastric precancer and cancer and roles in tumor-cell interactions with peripheral blood mononuclear cells in vitro[J]. PLoS One, 2013, 8(1):e54249. doi: 10.1371/journal.pone.0054249.
- [5] 王宽松,文继舫,李景和,等. TGFβ对胃癌细胞浸润、转移的影响及其作用机制研究[J].中国普通外科杂志,2008,17(10):988-992.
- [6] Deng B, Zhu JM, Wang Y, et al. Intratumor hypoxia promotes immune tolerance by inducing regulatory T cells via TGF-beta1 in gastric cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(5):e63777. doi: 10.1371/journal.pone.0063777.
- [7] Matsuoka J, Yashiro M, Doi Y, et al. Hypoxia stimulates the EMT of gastric cancer cells through autocrine TGFβ signaling[J]. PLoS One, 2013, 8(5):e62310. doi: 10.1371/journal.pone.0062310.
- [8] Wang P, Wang YC, Chen XY, et al. CTHRC1 is upregulated by promoter demethylation and transforming growth factor-β1 and may be associated with metastasis in human gastric cancer[J]. Cancer Sci, 2012, 103(7):1327-1333.
- [9] 胡忠良,王湘,文继舫,等. TGIF拮抗TGF-β诱导胃癌细胞的凋亡[J].中国普通外科杂志,2010,19(4):379-382.
- [10] Zhang H, Liu L, Wang Y, et al. KLF8 involves in TGF-beta-induced EMT and promotes invasion and migration in gastric cancer cells[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139(6):1033-1042.
- [11] 刘英,文继舫,丁矢,等.应用SELDI-TOF-MS技术筛选TGF-β1刺激胃癌细胞分泌蛋白的研究[J].中国普通外科杂志,2009,18(10):1030-1034.
- [12] Jiang CG, Lv L, Liu FR, et al. Connective tissue growth factor is a positive regulator of epithelial-mesenchymal transition and promotes the adhesion with gastric cancer cells in human peritoneal mesothelial cells[J]. Cytokine, 2013, 61(1):173-180.
- [13] Chang WW, Zhang L, Su H, et al. An updated meta-analysis of transforming growth factor-β1 gene: three polymorphisms with gastric cancer[J]. Tumour Biol, 2014, 35(4):2837-2844.
- [14] Kannan A, Krishnan A, Ali M, et al. Caveolin-1 promotes gastric cancer progression by up-regulating epithelial to mesenchymal transition by crosstalk of signalling mechanisms under hypoxic condition[J]. Eur J Cancer, 2014, 50(1):204-215.
- [15] Tsukada T, Fushida S, Harada S, et al. The role of human peritoneal mesothelial cells in the fibrosis and progression of gastric cancer[J]. Int J Oncol, 2012, 41(2):476-482.
- [16] Kim YM, Kim IH, Nam TJ. Capsosiphon fulvescens glycoprotein reduces AGS gastric cancer cell migration by downregulating transforming growth factor-β1 and integrin expression[J]. Int J Oncol, 2013, 43(4):1059-1065.
- [17] Hu JL, Yang Z, Tang JR, et al. Effects of gastric cancer cells on the differentiation of Treg cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(8):4607-4610.
- [18] Wang YQ, Li YM, Li X, et al. Hypermethylation of TGF-β1 gene promoter in gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(33):5557-5564.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式:代辉,黄强,向毓明,等.胃癌患者CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>调节性T细胞与TGF-β1检测的意义[J].中国普通外科杂志,2015,24(4):604-607. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.027  
Cite this article as: DAI H, HUANG Q, XIANNNG YM, et al. Significance of detection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and TGF-β1 in patients with gastric cancer[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(4):604-607. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.027