

Th17/Treg 平衡失调及其相关因子在乳腺癌浸润转移的相关性研究

李晓勇¹⁾, 李建¹⁾, 樊华¹⁾, 赵利平¹⁾, 张雯²⁾, 刘宇宏²⁾

(1) 延安大学附属医院普外科; 2) 血液免疫科, 陕西延安 716000)

[摘要] **目的** 研究乳腺癌患者外周血中 Th17 细胞、Treg 细胞及相关细胞因子的表达水平, 探讨其表达与淋巴结转移的关系. **方法** 运用流式细胞分析技术 (FACS) 检测 35 例术前乳腺癌患者 Th17 细胞、Treg 细胞的比例, 采用 ELISA 法检测相关细胞因子 IL-23、IL-10、IL-35、TGF- β 的表达水平. **结果** 乳腺癌外周血中 Th17 细胞和 Treg 细胞的比例均高于健康对照组 ($P < 0.05$), 淋巴结转移组 Th17 细胞和 Treg 细胞比例均高于无淋巴结转移组 ($P < 0.05$), 且 Treg 细胞比 Th17 细胞升高的更为明显, 淋巴结转移患者的 Th17/Treg 的比值低于无淋巴结转移者 ($P < 0.05$), 相关细胞因子 IL-23、IL-10、TGF- β 水平较健康对照组升高, IL-35 水平下降, 但 IL-23 在乳腺癌淋巴结转移和非淋巴结转移组无明显差异 ($P > 0.05$), 而 IL-10、TGF- β 、IL-35 水平在淋巴结转移组和无淋巴结转移组存在差异 ($P < 0.05$). **结论** 细胞因子 IL-23、IL-10、TGF- β 和 Th17 细胞和 Treg 细胞的变化趋势相一致, IL-35 和 Treg 细胞的升高呈负相关, 说明细胞因子参与了肿瘤微环境的调节, Th17/Treg 平衡失调或许是导致肿瘤进展的因素之一.

[关键词] Th17 细胞; Treg 细胞; 乳腺癌; IL-23; IL-10; TGF- β ; IL-35

[中图分类号] R737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 08-0089-04

The Imbalance of Th17/Treg Cells and Related Cytokines in Breast Cancer and Its Relationship with Infiltration and Metastasis

LI Xiao-yong¹⁾, LI Jian¹⁾, FAN Hua¹⁾, ZHAO Li-ping¹⁾, ZHANG Wen²⁾, LIU Yu-hong²⁾

(1) Dept. of Surgery; 2) Dept. of Hematology, The Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an Shanxi 716000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate expression of the Th17 cells and Treg cells in breast cancer tumor and related cytokines in the peripheral blood, and study its relationship with lymphatic metastasis. **Methods** Flow cytometry was applied to test Th17 cells and Treg cells in the peripheral blood of both 35 cases of breast cancer and 20 controls. ELASA method was used to test the expression cytokines of IL-23, IL-10, IL-35 and TGF- β . **Results** The frequency of Th17 cells and Treg cells in breast cancer was significantly higher that in healthy volunteers ($P < 0.05$). The frequency of Th17 cells and Treg cells in patients of lymphatic metastasis was significantly higher that in patients of non-lymphatic metastasis ($P < 0.05$), then Treg cells increased more obviously than Th17 cells. The radio of Th17/Treg cells in patients of lymphatic metastasis was significantly lower than in patients of non-lymphatic metastasis ($P < 0.05$). IL-23, IL-10 and TGF- β expression levels were higher than those in healthy control group ($P < 0.05$), but IL-35 expression levels were lower. There was no significant difference in IL-23 expression between lymphatic metastasis group and non-lymphatic metastasis group ($P > 0.05$), while there were significant differences in expression of IL-10, TGF- β and IL-35 between two groups ($P < 0.05$). **Conclusions** The trend of changes in the related cytokines IL-23, IL-10 and TGF- β is in agreement

[基金项目] 陕西省卫生厅科研基金资助项目 (2012D19)

[作者简介] 李晓勇 (1975~), 男, 陕西黄陵县人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事普外科临床工作.

[通讯作者] 刘宇宏. E-mail: sxlyh514@163.com

with that of Th17 cells and Treg cells in the peripheral blood of breast cancer. The rise of IL-35 and Treg cells shows a negative correlation. The imbalance of Th17/Treg may be one of the factors leading to tumour progression.

[Key words] Th17 cell; Treg cell; Breast cancer; IL-23; IL-10; TGF- β ; IL-35

乳腺癌是妇女目前最常见的恶性肿瘤之一, 它的发生与发展是由于机体的免疫功能低下, 对肿瘤细胞缺乏强有力的免疫监视或杀灭, 致使肿瘤细胞增殖、形成局部侵害和远处转移, 其中肿瘤微环境中的非肿瘤成分参与调节^[1]. 近年来发现的 T 辅助细胞 (T helper 17 cell, Th17) 细胞在炎症、自身免疫性疾病发挥重要作用, 其分泌的白介素 17 在肿瘤的免疫反应中发挥的重要作用日渐重视^[2]. 调节 T 细胞 (Treg) 是一类具有免疫调节功能的 T 细胞亚群, 具有低反应性和免疫抑制性两大特点, 在恶性肿瘤的发生进展过程中, Treg 的免疫抑制作用或为肿瘤细胞的免疫逃逸提供了条件. Foxp3 是 Treg 细胞的特异性转录因子, 可调控 Treg 的功能. Th17、Treg 在维持肿瘤微环境中存在一种平衡关系, 各亚群分泌的细胞因子网络相互作用, 但在不同肿瘤组织中如何作用结论不一. 本实验通过检测乳腺癌患者及健康志愿者外周血中细胞因子的表达水平, 分析 Th17、Treg 分别占 CD3⁺T 细胞及 CD4⁺T 细胞的比例, 探讨在乳腺癌中是否存在 Th17/Treg 失衡现象, 以及与乳腺癌浸润转移的相关性, 以期深入了解 Th17 和 Treg 在乳腺癌浸润转移中的作用.

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集 2012 年 12 月至 2013 年 12 月延安大学附属医院普外科三病区拟接受手术治疗的 35 例患者术前外周血, 肝素钠抗凝. 所有患者术前未接受放化疗及免疫治疗, 所有患者术前检查均排除免疫性及感染性疾病. 经术后明确诊断为乳腺癌, 淋巴结转移的 27 例, 未转移的 8 例. 入组患者均为女性, 年龄 22~70 岁, 平均 (46 \pm 3.75) 岁. 正常对照组 20 例, 均为女性健康志愿者, 年龄 24~63 岁, 平均 (42 \pm 5.45) 岁. 流式细胞术分别检测 Th17、Treg 在外周血淋巴细胞中的比例.

1.2 主要试剂和仪器

藻红蛋白 (PE) 标记的 anti-IL-17-PE, anti-Foxp3-PE 和 anti-CD3 PE-Cy5 单抗, 藻红蛋白偶连物 (PE-cy5), 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的 anti-CD4-FITC 单抗, anti-CD8-FITC, APC (Allophycocyanin, 别藻蓝素) 标记的 anti-CD25 单

抗, 离子霉素 (Ionomycin), 莫能霉素 (Monensin) 均购自 (美国 eBioscience, San Diego, CA). 人淋巴细胞分离液 (天津 TBD 公司), RPMI 1640 培养基 (天津协科生物股份有限公司), 人调节性 T 细胞染色试剂盒 (美国 eBioscience 公司). 流式细胞仪为美国 BD 公司, 美国伯乐 EVOLIS 全自动酶标仪.

1.3 流式细胞术分析

所有病例在入院时采静脉血 4 mL, 予 EDTA-K2 抗凝送检, 从 4 mL 肝素钠抗凝全血中取出 200 μ L 用于 Th17 细胞的检测, 剩余的血液分离 PBMCs 用于 Treg 细胞的检测, 分别加入相应抗体, 流式细胞仪检测.

1.4 ELISA 法检测外周血 IL-23、IL-10、IL-35、TGF- β 的水平

采用双抗体夹心 ELISA 方法, 检测血清 IL-23、IL-10、IL-35、TGF- β 水平, 实验过程设置空白对照孔及标准品孔, 均做复孔, 绘出标准曲线. 将实验酶标板置于 450 nm 波长下测定样品孔吸光度 (A) 值, 通过标准曲线计算样品中各细胞因子的浓度.

1.5 统计学处理

应用 SPSS18.0 软件进行统计分析, 数据结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示. 组间比较采用 *t* 检验. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 乳腺癌患者外周血 Th17 占 CD3⁺T 细胞的比例

FACS 结果显示, 乳腺癌患者外周血中 Th17 占 CD3⁺T 细胞的比例为 (3.10 \pm 0.96)%, 显著高于健康对照组 (1.67 \pm 0.62)%, 2 组间有统计学差异 ($P < 0.01$). 淋巴结转移的乳腺癌患者外周血中, Th17 占 CD3⁺T 细胞的比例为 (3.29 \pm 0.98)%, 显著高于无淋巴结转移患者 (2.44 \pm 0.53)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1.

2.2 乳腺癌患者外周血 Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例

FACS 显示, 乳腺癌患者外周血中 Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例为 (6.81 \pm 1.87)%, 显著高于健康对照组 (4.40 \pm 0.57)%, 2 组间差异有统计学

意义 ($P < 0.01$)。淋巴结转移的乳腺癌患者外周血中, Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例为 $(7.51 \pm 1.44)\%$, 显著高于无淋巴结转移患者 $(4.46 \pm 1.07)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 2。

2.3 Th17/Treg 细胞在乳腺癌患者中的变化

乳腺癌患者中 Th17/Treg 的比值 $(0.46 \pm 0.18)\%$, 显著高于健康对照组 $(0.35 \pm 0.08)\%$,

差异有显著统计学意义 ($P < 0.05$); 淋巴结转移患者的 Th17/Treg 的比值 $(0.43 \pm 0.16)\%$ 低于无淋巴结转移者 $(0.57 \pm 0.18)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

Th17、Treg 相关细胞因子 IL-23、IL-10、IL-35、TGF- β 在乳腺癌外周血中的表达, 见表 1。

表 1 外周血中细胞因子 IL-23、IL-10、IL-35、TGF- β 的表占 (pg/mL)

Tab. 1 Expression of IL-23, IL-10, IL-35 and TGF- β in peripheral blood in breast cancer patients (pg/mL)

细胞因子	健康志愿者 (n = 20)	无淋巴结转移乳腺癌 (n = 8)	淋巴结转移乳腺癌 (n = 27)
IL-23	62.5 \pm 5.1*	96.7 \pm 7.8	103.1 \pm 6.4
IL-10	90.3 \pm 9.8*	112.4 \pm 11.3	135.4 \pm 16.3 Δ
IL-35	125.6 \pm 13.8*	105.4 \pm 10.7	84.4 \pm 15.5 Δ
TGF- β	225.6 \pm 21.8*	225.6 \pm 21.8	317.6 \pm 23.4 Δ

与有、无淋巴结转移组比较, * $P < 0.05$; 与无淋巴结转移组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

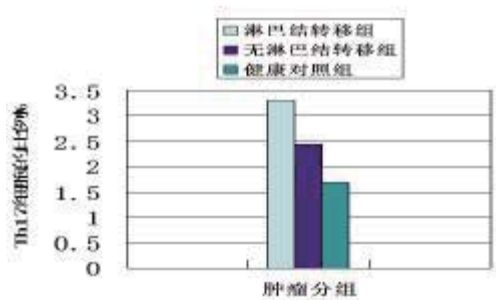


图 1 乳腺癌淋巴结转移组和因淋巴结转移组Th17 细胞比例

Fig. 1 The proportion Th17 cells in metastasis of breast cancer with or without lymph node metastasis group

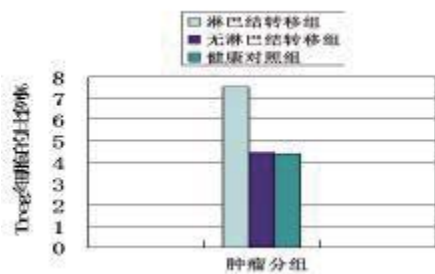


图 2 乳腺癌淋巴结转移组和因淋巴结转移组Treg 细胞比例

Fig. 2 Treg cell ratio in metastasis of breast cancer with or without lymph node metastasis

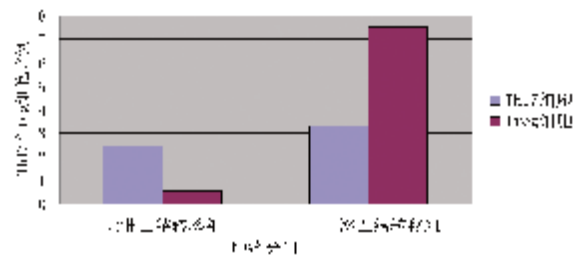


图 3 乳腺癌淋巴结转移组和因淋巴结转移组Th17/Treg 细胞变化

Fig. 3 Th17/Treg changes in metastasis of breast cancer with or without lymph node metastasis group Th17/Treg

3 讨论

乳腺癌肿瘤内的免疫状态与肿瘤的预后有关。机体免疫系统通过识别并杀伤肿瘤细胞来抑制肿瘤的发展, 肿瘤细胞主动地释放免疫抑制细胞、细胞因子及肽段到肿瘤微环境及外周血中, 作用于具有抗肿瘤功能的免疫细胞或抗体, 从而削弱抗肿瘤免疫。

较多研究表明 Th17/Treg 在自身免疫性疾病及炎症中多存在偏向 Th17 - 侧的失衡现象。Larmonier 等^[3]在胃癌患者中的研究发现, Treg 和 Th17 都有增多, 且 Treg 较 Th17 的增多更明显 (即 Th17/Treg 较正常降低)。结合实验结果笔者推测, 在乳腺癌的早期阶段, Th17 可能发挥了促炎作用,

抑制肿瘤细胞的生长,但是随着病程的进展, Treg 的增多发挥了免疫抑制,进一步为肿瘤细胞逃避机体免疫监视提供了条件,加之 Th17 的促血管生成作用,促进了肿瘤的浸润转移及扩散;本实验结果显示, Th17 比例与 Treg 比例之间在正常人具有良好的相关性,而在乳腺癌患者中两者的平衡被打破, Th17/Treg 比值变化与淋巴结转移相关, Th17/Treg 的平衡失调可能在乳腺癌的浸润转移中起着很重要的作用。

肿瘤细胞、纤维母细胞和抗原提呈细胞等分泌一系列细胞因子 IL-23、IL-10、IL-6、IL-21、TGF- β 形成一个效应因子网络系统,通过网络系统调节 Th17 细胞的增殖与分化,其中以分泌浸润性细胞因子为 IL-17 为主要特征^[9]。有报道^[9], IL-17 在结肠直肠癌、乳腺癌中的表达均显著高于同源性正常组织。它促进鼠成纤维细胞和纤维肉瘤细胞产生血管内皮生成因子 (VEGF) 和前列腺素 E2 (PGE2),增加血管内皮趋化,从而促进肿瘤微血管的生成,利于肿瘤的生长、转移和浸润^[9]。本实验结果表明, Th17 细胞在乳腺癌微环境中的聚集在肿瘤的早期阶段,随着肿瘤的进展, Th17 呈进一步聚集的态势。目前肿瘤相关研究显示 Treg 细胞的存在有利于肿瘤细胞生长繁殖以及浸润转移。如: Sonia A 等^[7]发现乳腺癌患者外周血中 Treg 细胞数占 CD4⁺T 细胞总数比例明显高于正常女性外周血所含 Treg 细胞百分比。Okita 等^[8]也证实了乳腺癌患者外周血中 Treg 细胞明显升高,并推测外周血中升高的 Treg 细胞可能参与抑制效应细胞抗肿瘤作用。进一步实验发现去除该细胞后,机体抗乳腺癌肿瘤免疫能力得以提升^[9]。这与本实验的 Treg 分布结果一致。

本实验还显示,在乳腺癌外周血中,细胞因子 IL-23、IL-10、TGF- β 水平较健康对照组升高, IL-35 水平下降,但 IL-23 在乳腺癌淋巴结转移和非淋巴结转移组无明显差异。初始 CD4⁺T 细胞分化为 Th17 细胞并不需要 IL-23 参与,但它可促进 Th17 细胞增殖,参与炎症反应和自身免疫性疾病。IL-10、TGF- β 在乳腺癌淋巴结转移和非淋巴结转移组存在差异,提示 IL-10、TGF- β 和肿瘤的进展有关。高表达的 TGF- β 诱导血管形成,引起上皮-间质转化,促进乳腺癌发生发展,也是乳腺癌预后不良的重要因素之一^[10]。也有研究证明^[11]Treg 分泌的 IL-35 是 Treg 发挥免疫负调控的细胞分子,也参与 Treg 的分化。随着肿瘤进展, Treg 增高, IL-35 的表达下降。

总之,通过对 Th17 和 Treg 细胞及相关细胞因子检测,明确了 Th17、Treg 细胞在不同乳腺癌患者中的表达情况,说明了 Th17/Treg 平衡失调或许是导致肿瘤进展的因素之一,对了解乳腺癌患者的免疫状态有一定的指导意义。

[参考文献]

- [1] COLOTTA F, ALLAVENA P, SCIA A, et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability [J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(1): 073 - 1081.
- [2] KORN T, BETTELLI E, OUKKA M, et al. IL-17 and Th17 Cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 485 - 517.
- [3] LARMONIER N, MARRON M, ZENG Y, et al. Tumor-derived CD4⁺CD25⁺regulatory T cell suppression of dendritic cell function involves TGF- β and IL-10. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(1): 48 - 59.
- [4] SU X, YE J, HSUEH E C, et al. Tumor microenvironment direct the recruitment and expansion of human Th17 cells [J]. *J Immunol*, 2010, 184(3): 1630 - 1641.
- [5] LE GS, BASTUJI-GARIN S, ALOLOU N, et al. High prevalence of Foxp3 and IL-17 in MMR-proficient colorectal carcinomas [J]. *Cut*, 2008, 57(6): 772 - 779.
- [6] NUMASAKI M, FUKUSHI J, ONO M, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth [J]. *Blood*, 2003, 101(7): 2620 - 2627.
- [7] SONIA A, Perez, Michael V, Karamouzis, Dimosthenes V, Skarlos, et al. CD4⁺CD25⁺Regulatory T-Cell Frequency in HER-2/neu (HER)-Positive and HER-Negative Advanced-Stage Breast Cancer Patients [J]. *J Clin Cancer Res*, 2007, 13(9): 2714 - 2721.
- [8] OKITA R, SAEKI T, TAKASHIMA S, et al. CD4⁺CD25⁺regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non small cell lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2005, 14(5): 1269 - 1273.
- [9] ANDREW J, RECH, ROSEMARIE MICK, et al. Homeostasis of peripheral Foxp3⁺ CD4⁺ regulatory T cells in patients with early and late stage breast cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2010, 59: 599 - 607.
- [10] CARDILLO M R, YAP E, Castagna G. Molecular genetic analysis of TGF β 1 in breast cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 1997, 16(1): 57 - 63.
- [11] MAIE J C, LETTERIO J J, GAVIN M A, et al. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺regulatory T cells [J]. *J Exp Med*, 2005, 201: 1061 - 1067.

(2014-05-19 收稿)