

Treg、CD8⁺T 细胞在食管胃交界部腺癌中的分布及其与临床病理参数的关系

张舒平¹, 徐阿曼^{1,2}, 韩文秀¹, 王岳君³, 汪礼坤², 黄雷¹

摘要 目的 探讨调节性 T 细胞(Treg)和 CD8⁺T 细胞在食管胃交界部腺癌(AEG)组织中的分布情况,分析两者与 AEG 的发生发展和临床病理资料的相关性。方法 实验组:收集 68 例 AEG 癌组织病理蜡块;对照组:选用本院收治的 20 例胃溃疡患者的病理蜡块。应用免疫组织化学方法对实验组以及对照组的胃溃疡组织进行染色,以 Foxp3 作为 Tregs 的标记,检测其和 CD8⁺T 细胞的表达水平,并对两者在实验组中和对照组的分布水平与 TNM 分期、分化程度、淋巴转移、肿瘤的部位的关系等组别内进行分析。结果 ① 实验组中 Foxp3、CD8⁺T 细胞分布阳性率明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。② 实验组中有淋巴结转移组 Foxp3⁺ 的分布阳性率高于无淋巴结转移组($P < 0.05$)。肿瘤组织学分级为低分化组 Foxp3⁺ 的分布阳性率显著高于组织学分级为高-中分化组($P < 0.01$)。肿瘤的 TNM 分期较晚(Ⅲ)组要明显高于 TNM 分期较早(I~II)组($P = 0.001$)。③ 肿瘤组织中 Foxp3 和 CD8 在 AEG 中的分布呈负相关($r = -0.314, P = 0.01$)。结论 Foxp3⁺Treg 的表达水平与 AEG 的发生发展密切相关,AEG 肿瘤组织中 Treg 和 CD8⁺T 细胞的分布呈负相关,Treg 可能通过抑制 CD8⁺T 细胞的功能,促进肿瘤的发展。

关键词 食管胃交界部腺癌; 肿瘤免疫; Foxp3; 调节性 T 细胞

中图分类号 R 730.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)07-0966-04

近年来食管胃交界部腺癌(adenocarcinoma of the esophagogastric junction, AEG)的发病率快速升高,在过去的 30 年里西方国家的 AEG 发病率增长了 6 倍^[1]。目前 AEG 的根治性治疗方法是手术切除,化疗疗效不理想。WHO 肿瘤分类(2000)也将 AEG 单独列出。相对于远端胃癌和食管上段癌,AEG 具有特殊的生物学行为,且 5 年存活率较低,

在美国,AEG 的总体 5 年生存率仅为 10%~15%,其早期局限性病变 5 年生存率为 25%~30%^[2]。近期,调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)与胃癌的转移和预后的关系成为研究热点。不仅参与自身免疫性疾病、感染性疾病和移植耐受,而且在肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用^[3]。但是对 AEG 与 Treg 的关系目前没有研究,该研究通过利用免疫组织化学方法分析 68 例 AEG 患者肿瘤组织中 Treg 与 CD8⁺T 细胞的分布的相关性,联合评价 Foxp3⁺Treg 与 CD8⁺T 细胞的分布对 AEG 肿瘤的发生和发展之间的关系。

1 材料与方法

1.1 临床及随访资料 收集 2004 年 2 月~2006 年 11 月期间在安徽医科大学第一附属医院行 D2 根治术并达到 R0 切除的 68 例 AEG 患者病历资料,其中男 52 例,女 16 例,年龄 41~76 岁,中位年龄 59 岁,患者术前均未行放化疗。采用 2010 年国际抗癌联盟/美国癌症联合委员会(UICC/AJCC)TNM 分期标准,I~II 期 33 例,Ⅲ期 35 例;高中分化 23 例,低分化 45 例;Swert 分型 II 型 30 例,Ⅲ型 38 例。对照组 20 例,均为胃溃疡组织。

1.2 实验方法 采用免疫组化 SP 法,标本均经多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,连续切片(4 μm),常规行 HE 染色核实病理诊断。采用免疫组化 SP 法分别对 Foxp3、CD8 进行染色,鼠抗人 CD8 单克隆抗体购于福州迈新生物科技有限公司,鼠抗人 Foxp3 单克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,DAB 显色剂、免疫组化试剂盒均购自北京中衫金桥生物技术有限公司。免疫组化染色步骤均按 SP 试剂盒操作说明进行,工作液浓度均为 1:200。

1.3 结果判定 Foxp3 以胞核出现黄色或黄褐色颗粒为阳性,CD8 以胞质出现黄色或棕褐色颗粒为阳性。在高倍镜视野下(×400),每张切片随机观察 5 个视野的肿瘤细胞,计算 200 个细胞/视野染色阳性的细胞比,共计 1 000 个,采用半定量积分法判定,根据阳性细胞和着色深度共同计分。阳性细胞所占比例:≤5% 为 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~

2014-04-02 接收

基金项目:安徽省 2012 年度第三批科技计划(编号:12070403061)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院普通外科一病区,合肥 230022

安徽医科大学第四附属医院²普通外科,³病理科,合肥 230022

作者简介:张舒平,男,硕士研究生;

徐阿曼,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: xuaman166@sina.com

50%为2分, 51%~75%为3分, >75%为4分。阳性细胞表达的着色深度: 基本不着色为0分, 浅黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分。将两项积分相乘: 0~2分为阴性(-), 3~4分为弱阳性(+), 5~8分为中度阳性(++), 9~12分为强阳性(+++)。染色结果均由两位病理科医师采用双盲法分别阅片核实。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, Fopx3、CD8 与各种临床病理因素的关系采用 χ^2 检验分析, 对 Fopx3、CD8 分布之间相关性分析则采用 Pearson 列联分类变量法分析。

2 结果

2.1 Fopx3、CD8⁺T 细胞在 AEG 组织中的分布

Fopx3 在 Treg 细胞中为胞核染色, CD8⁺T 细胞为胞质染色, 见图 1。Fopx3 在 AEG 实验组和对照组中的阳性分布率分别为 75% (51/68) 和 10% (2/20); CD8 在 AEG 肿瘤组和对照组中的阳性分布率分别为 61.8% (42/68) 和 30% (6/20)。与对照组相比, 实验组 Fopx3 和 CD8 的阳性分布率明显上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2 Fopx3、CD8⁺T 细胞在 AEG 组织中分布的相关性 在 AEG 肿瘤组织免疫组化染色切片中, Fopx3 和 CD8⁺T 细胞分布呈负相关 ($r = -0.314, P = 0.01$) ,见表 1。

表 1 肿瘤组织标本中的 Fopx3 和 CD8 的相关性分析 (n)

CD8 表达	Fopx3 表达		总计
	-	+ ~ +++	
-	2	24	26
+ ~ +++	15	27	42
总计	17	51	68

2.3 Fopx3、CD8⁺T 细胞在 AEG 组织中的表达与临床病理参数的关系 Fopx3 分布阳性率与患者的年龄、性别以及 Swerit 分型无关 ($P > 0.05$) ; 在淋巴结转移阳性组和淋巴结转移阴性组中差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ,TNM 分期较早的 (I ~ II 期) 与分期较晚的 (III ~ IV 期) 组之间差异具有统计学意义 ($P < 0.01$) ,肿瘤分化程度较高组 (高、中分化) 与肿瘤分化较低组 (低分化) 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) ; CD8⁺T 细胞与患者年龄、性别、组织学分级、Swerit 分型以及肿瘤 TNM 分期、有无淋巴结转移差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) ,见表 2。

3 讨论

本研究是首次专门论证 Fopx3 和 CD8⁺T 细胞

表 2 Fopx3、CD8 在实验组中的分布与临床病理资料的关系

项目	n	Fopx3 表达		χ^2 值	P 值	CD8 表达		χ^2 值	P 值
		+ ~ +++	-			+ ~ +++	-		
性别									
男	52	38	14	2.915	0.088	32	20	0.159	0.690
女	16	13	3			10	6		
年龄 (岁)									
≤50	25	17	8	1.033	0.309	16	9	0.084	0.772
>50	43	34	9			26	17		
组织学分级									
高、中	23	12	11	9.685	0.002	13	10	0.405	0.525
低	45	39	6			29	16		
淋巴结转移									
有	37	32	5	5.711	0.017	22	15	0.183	0.669
无	31	19	12			20	11		
TNM 分期									
I ~ II	33	19	14	10.382	0.001	20	13	0.360	0.849
III	35	32	3			22	13		
Swerit 分型									
II	30	21	9	0.716	0.398	22	8	3.042	0.081
III	38	30	8			20	18		

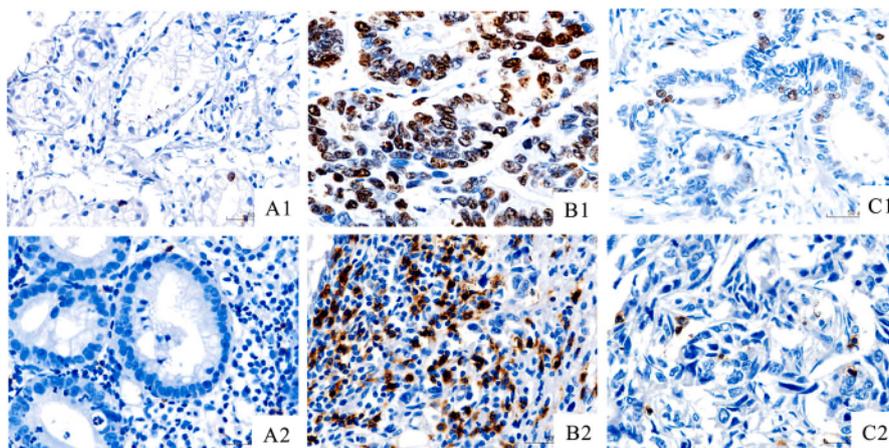


图 1 Fopx3 和 CD8 在实验组和对照组中的表达 SP × 400

A: 对照组中的分布情况; B: 实验组中高表达情况; C: 实验组中低表达情况; 1: Fopx3; 2: CD8

在食管胃交界部这一特殊区域的腺癌中表达情况，并表明了 Foxp3 和 CD8⁺T 细胞在 AEG 中的表达均高于对照组 其中 Foxp3 的表达量与肿瘤的分期、组织学分级、有无淋巴结转移均密切相关，但与 AEG 的 Swerit 分型以及年龄和性别表达差异无统计学意义。这也符合 Shen et al^[4] 的早期研究结果。

Tregs 是一种具有免疫抑制作用的 T 细胞亚群，自从 20 世纪后期，人们就发现小鼠和人体内存在由肿瘤引发的 T 淋巴细胞亚群抑制抗肿瘤免疫反应。此后日本学者^[5] 首先鉴别出一类高表达 CD25 的 CD4⁺ T 细胞亚群，即现在所谓的 Treg。目前认为转录因子 Foxp3 是 Treg 的特异性标志物^[6-8]。Foxp3⁺ Treg 具有对体外刺激无应答的特征，经细胞接触和细胞依赖方式抑制 CD4⁺ CD25⁻ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、树突状细胞、NK 细胞和 B 细胞，通过分泌 TGF-β 和 IL-10 发挥免疫抑制作用，而对于胃癌的研究^[9] 显示，肿瘤组织内 Foxp3⁺ Treg 数目 ≥6 个与胃癌患者血管和淋巴管浸润密切相关，是胃癌根治术后患者生存的不利因素，可以作为胃癌患者新的标志物。最新研究^[10] 显示胃癌患者前哨淋巴结内 Foxp3⁺ Treg 数量与前哨淋巴结和非前哨淋巴结发生癌转移相关，并且是非前哨淋巴结发生癌转移的独立预测因子，Treg 可能是控制胃癌转移的治疗靶点。

本研究 Pearson 列联分类变量法相关分析显示 AEG 肿瘤组织中 Foxp3 和 CD8 的表达呈负相关。汪礼坤等^[11] 研究发现在小鼠肝癌局部引流淋巴结内 Treg 弥散分布在 CD8⁺ T 细胞区域，但是肿瘤引流淋巴结内 CD8⁺ T 细胞在体外刺激下分泌 IFN-γ 的功能可恢复。由此推测在 AEG 肿瘤组织中 Treg 可能通过抑制 CD8⁺ T 细胞的功能促进肿瘤的发展。这对 AEG 预后的预测有一定价值；联合清除 Foxp3⁺ Treg 和刺激 CD8⁺ T 细胞的增殖可能有利于抑制 AEG 的发展，为后期探索治疗 AEG 提供新方法和理论依据。

参考文献

- [1] Parfitt J R , Miladinovic Z , Driman D K. Increasing incidence of adenocarcinoma of the gastroesophageal junction and distal stomach in Canada-an epidemiological study from 1964 - 2002 [J]. Can J Gastroenterol , 2006 20(4) : 271 - 6.
- [2] Jemal A , Siegel R , Ward E , et al. Cancer statistics , 2008 [J]. CA Cancer J Clin , 2008 58(2) : 71 - 96.
- [3] Beyer M , Schultze J L. Regulatory T cells in cancer [J]. Blood , 2006 108(3) : 804 - 11.
- [4] Shen Z , Zhou S , Wang Y , et al. Higher intratumoral infiltrated Foxp3⁺ Treg numbers and Foxp3⁺ /CD8⁺ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol , 2010 136(10) : 1585 - 95.
- [5] 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 - 64.
- [6] Walker L S , Chodos A , Eggena M et al. Antigen-dependent proliferation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells *in vivo* [J]. J Exp Med , 2003 198(2) : 249 - 58.
- [7] Yamazaki S , Iyoda T , Tarbell K , et al. Direct expansion of functional CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells [J]. J Exp Med , 2003 198(2) : 235 - 47.
- [8] Shen L S , Wang J , Shen D F , et al. CD4(+) CD25(+) CD127 (low / -) regulatory T cells express Foxp3 and suppress effector T cell proliferation and contribute to gastric cancers progression [J]. Clin Immunol , 2009 131(1) : 109 - 18.
- [9] Perrone G , Ruffini P A , Catalano V , et al. Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer [J]. Eur J Cancer , 2008 44(13) : 1875 - 82.
- [10] Lee H E , Park D J , Kim W H , et al. High FOXP3⁺ regulatory T-cell density in the sentinel lymph node is associated with downstream non-sentinel lymph-node metastasis in gastric cancer [J]. Br J Cancer , 2011 105(3) : 413 - 9.
- [11] 汪礼坤 , 匡 铭 , 彭宝刚 , 等. Tregs 调节小鼠肝癌局部引流淋巴结内免疫效应细胞的功能 [J]. 中国病理生理杂志 , 2010 26(5) : 922 - 7.

The expression of Foxp3 and CD8 in adenocarcinoma of esophagogastric junction (AEG) and their clinicopathological parameters meaning

Zhang Shuping¹ , Xu A' man^{1 2} , Han Wenxiu¹ , et al

(¹ Dept of General Surgery , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022;

² Dept of General Surgery , The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the expression of regulatory T cell (Treg) and CD8⁺ T cell in tissues of adeno-

稳定期 COPD 患者营养状况与血清脂联素、肺功能、CAT 评分的关系

李玉群 梁贤球 何 晟 林 敏 康闪闪 肖桂华 魏立平

摘要 目的 探讨稳定期慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者血清脂联素水平、肺功能、慢性阻塞性肺病评估测试(CAT)得分与营养状况的关系。方法 收集稳定期 COPD 患者 77 例,利用 CAT 评分评估患者临床症状严重程度,40 例同期的体检健康者作为正常对照组,按简易营养评价精法(MNA-SF)将其分为营养不良组(49 例)和非营养不良组(28 例),各组均行空腹血清脂联素浓度及肺功能检测。结果 正常对照组脂联素浓度最高,非营养不良组血清脂联素浓度低于营养不良组,但各组间差异无统计学意义($P > 0.05$);营养不良组患者的第一秒用力呼气容积(FEV1)、用力肺活量(FVC)、FEV1/FVC(用力最大肺活量百分比)、FEV1%占预计值百分比(FEV1% pred)较非营养不良组均有显著下降,差异具有统计学意义($P < 0.01$);营养不良组 CAT 评估得分较非营养不良组明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$);MNA-SF 得分与 FEV1、FVC、FEV1/FVC 以及 FEV1% pred 呈显著正相关,与 CAT 得分呈显著负相关,与脂联素浓

度无明显相关性。结论 稳定期 COPD 患者的营养状况与 FEV1/FVC、FEV1、FVC、FEV1% pred 及其临床症状严重程度存在显著相关性,因而提高患者的营养状况有助于改善患者的预后和生存质量;而脂联素是否参与了 COPD 稳定期患者的营养不良的发生,此次研究结果尚未得到证实。

关键词 COPD; 营养不良; 脂联素浓度; 肺功能; CAT; MNA-SF

中图分类号 R 563.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)07-0969-04

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary diseases, COPD)是一种呼吸科常见慢性病,发生率居高不下,造成了极大的社会负担和经济负担。营养不良是 COPD 常见而重要的并发症之一,可与 COPD 相互促进从而影响患者的病程和预后。但目前 COPD 患者营养不良的发生机制尚未明确阐明,而糖脂代谢是引起营养不良的主要因素^[1],近年来作为与糖脂代谢作用密切相关的新型细胞因子脂联素逐渐受到重视。该研究主要分析了 77 例不同营养状况的稳定期 COPD 患者和 40 例正常对照者的血清脂联素浓度、肺功能水平以及临床症状严重程

2014-03-20 接收

基金项目:广东省科技计划项目(编号:63090)

作者单位:广州医科大学附属第三医院呼吸内科,广州 510150

作者简介:李玉群,女,硕士研究生;

魏立平,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: weilp8@hotmail.com

carcinoma of esophagogastric junction (AEG), and analyze their correlation with carcinogenesis and tumor progression. **Methods** A total of 68 AEG tissues were collected, with 20 peptic ulcer tissues selected as control. We dyed the tissues using immunohistochemistry, evaluating the expression of CD8⁺ T cell with Foxp3 and Tregs as markers, and studying their relationship with TNM classification, differentiated degree, lymphatic metastasis and tumor location. **Results** The positive rate of Foxp3 and CD8⁺ T cell in AEG group was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). The distribution of Foxp3⁺ in experimental group with lymph node metastasis was higher than that without lymph node metastasis ($P < 0.05$), the positive rate of poorly differentiated was significantly higher than high-differentiated group on Foxp3 ($P < 0.01$), and TNM stage late (III) group was significantly higher than earlier TNM stage (I ~ II) group ($P = 0.001$). The expression of Foxp3 was closely relate with the clinical stages, grades of the masses, the rate of lymphatic metastasis, and significantly higher in group with lymphatic metastasis, poorer differentiation, later stage, while not significantly correlated with the position, age and gender of the patients ($P > 0.05$). Foxp3 was negatively correlated with CD8 in malignant tissues ($r = -0.314, P = 0.01$). **Conclusion** The expression of Foxp3⁺ Treg is significantly associated with AEG carcinogenesis and progression. Tregs in AEG tissues possibly promote tumor progression via inhibiting function of CD8⁺ T cells.

Key words AEG; Tumor immunity; Foxp3; Tregs