

喉鳞状细胞癌患者 Th1/Th2 转录因子与细胞因子的表达及其临床意义探讨

邓刚¹ 杨成章² 陈望燕¹

【摘要】 目的:从转录因子与细胞因子的角度分析喉鳞状细胞癌患者 Th1/Th2 细胞分化趋势,探讨 T-bet/GATA3 与 p53 的相关性,了解其与肿瘤转移之间的关系。**方法:**利用荧光定量 PCR 技术检测 49 例喉鳞状细胞癌患者(实验组)及 30 例正常人(正常对照组)外周血单个核细胞(PBMC)中 T-bet、GATA3 和 IFN- γ 、IL-4 mRNA 的水平;应用免疫组织化学法检测实验组中 p53 的表达状况。**结果:**实验组 T-bet、GATA3、IFN- γ 、IL-4 的表达率依次为 42.86%(21/49)、71.43%(35/49)、26.53%(13/49)、63.27%(33/49)。定量 PCR 结果显示,实验组的 T-bet 和 IFN- γ 的表达明显低于正常对照组($P<0.05$),而 GATA3 和 IL-4 的表达则明显高于正常对照组($P<0.05$)。在 p53 阳性的患者中,T-bet 的表达量较低,而 GATA3 的表达量较高,且 T-bet 和 GATA3 的表达与 p53 具有相关性。**结论:**喉鳞状细胞癌患者有明显的 Th2 漂移现象,且 T-bet 与 GATA3 可作为反映肿瘤转移的参考指标。

【关键词】 喉鳞状细胞癌;Th1/Th2;转录因子;细胞因子

【中图分类号】 R739.6 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1001-1781(2012)06-0270-04

Expression of Th1/Th2 transcription factors and cytokines in laryngeal squamous cell carcinoma and its clinical significance

DENG Gang¹ YANG Chengzhang² CHEN Wangyan¹

(¹Department of Otorhinolaryngology, Chinese and Western Medicine Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030, China; ²Department of Otorhinolaryngology, the Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology)

Corresponding author: CHEN Wangyan, E-mail: dgang2000@163.com

Abstract Objective: To study the differentiation of Th1/Th2 on the levels of transcription factors and cytokines production in patients with laryngeal squamous cell carcinoma in peripheral blood mononuclear cells(PBMC). In addition, the relation of p53 and T-bet, GATA3 expression was discussed for understanding the role of T-bet and GATA3 in metastasis. **Method:** The gene expression of Th1/Th2 type transcription factors T-bet, GATA3 and cytokines IFN- γ , IL-4 were determined by RT-PCR and realtime RT-PCR from 49 patients with laryngeal squamous cell carcinoma and 30 normal controls. The expression of p53 was analyzed by immunohistochemistry. **Result:** Predominant expression of Th2 type cytokines was detected in 49 laryngeal squamous cell carcinoma patients. The expression rates of T-bet, GATA3, IFN- γ and IL-4 was 42.86%(21/49), 71.43%(35/49), 26.53%(13/49), 63.27%(33/49) respectively. The expression rates of T-bet and IFN- γ in patients were lower than in control group ($P<0.05$), but the results of GATA3 and IL-4 were opposite ($P<0.05$). The similar results were obtained by realtime PCR. The expression of p53 in patients was accompanied with lower expression of T-bet mRNA and higher expression of GATA3 mRNA. **Conclusion:** There is predominant expression of Th2 type transcription factors and cytokines in PBMC of laryngeal squamous cell carcinoma patients. T-bet and GATA3 can be used as reference indicators for the metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma.

Key words laryngeal squamous cell carcinoma; Th1/Th2; transcription factors; cytokines

喉鳞状细胞癌在我国一直是死亡率较高的恶性肿瘤,且患者死亡的主要原因之一是术后转移。机体在正常状态下 Th1 和 Th2 细胞功能处于动态

平衡,以维持正常的细胞免疫和体液免疫功能,而肿瘤发生时机会出现 Th1/Th2 失衡^[1]。肺癌、骨髓瘤、淋巴瘤、黑色素瘤、绒毛膜癌、乳腺癌、肾癌、结直肠癌患者的外周血淋巴细胞、肿瘤浸润淋巴细胞或肿瘤细胞及组织大多有 Th2 类细胞因子的优势表达^[2],但在喉鳞状细胞癌患者 Th1/Th2 失衡的现象还未被证实。我们通过检测喉鳞状细胞癌患者外周血单个核细胞(PBMC)中,T-bet、

¹ 华中科技大学同济医学院附属中西医结合医院(武汉市第一医院)耳鼻咽喉科(武汉,430030)

² 华中科技大学同济医学院附属协和医院耳鼻咽喉科
通信作者:陈望燕, E-mail: dgang2000@163.com

GATA3、IFN- γ 、IL-4 mRNA 的表达来观察 Th1/Th2 的平衡状态;检测癌组织 p53 的表达,探讨 T-bet、GATA3 与喉鳞状细胞癌转移间的相关性。

1 材料与方法

1.1 标本收集

选取华中科技大学同济医学院附属中西医结合医院及协和医院耳鼻咽喉科 2009-07—2010-03 期间 49 例喉鳞状细胞癌患者新鲜 EDTA 抗凝全血 4 ml 以及手术切除癌组织(实验组)。其中男 32 例,女 17 例;年龄 38~79 岁,平均(60.6 $\pm$ 15.3)岁。所有病例术前均未行放疗或化疗。正常对照组为 30 例健康体检者,年龄 33~72 岁,平均(56.3 $\pm$ 11.2)岁。

1.2 主要试剂

Ficoll-泛影葡胺购于中国医学科学院生物工程医学研究所,鼠抗 p53 试剂盒由北京中山生物技术有限公司提供,Trizol、RT-PCR 试剂购自 Invitrogen 公司,T-A 克隆试剂盒、凝胶回收试剂盒为 promega 公司产品,质粒小量提取试剂盒购自德国 Macherey-Nagel 公司,限制性内切酶购自 PVUII(Takara 公司)。

1.3 PBMC 的分离

用 PBS 以 1:1 的比例稀释抗凝血,置于等体积 Ficoll-泛影葡胺上,2000 r/min 常温离心 20 min 后取上清,以 PBS 洗 2 遍备用。

1.4 IL-4、IFN- γ 、T-bet、GATA3 mRNA 表达水平的检测

所有引物皆由上海生工合成,各引物序列及扩增长度见表 1。以 GAPDH 为内参照作 realtime RT-PCR。

1.4.1 总 RNA 提取和逆转录 分别在患者和正常人 PBMC 中加入 Trizol 试剂,提取总 RNA,并按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,每 20 μ l 逆转录体系中含 4 μ g 总 RNA、1 μ l OligodT、2 μ l 10 $\times$ Buffer、2 μ l MgCl₂ (5 mmol/L)、2 μ l DTT

(0.1 mol/L)、1 μ l dNTPs(10 mmol/L)及 1 u Super-script Reverse Transcriptase II。

1.4.2 RT-PCR 反应体系 5 μ l 5 $\times$ PCR Buffer、0.5 μ l cDNA 模板、2.5 μ l dNTPs(2.5 mmol/L)、2.0 μ l MgCl₂ (25 mmol/L),上下游引物各 0.5 μ l (10 μ mol/L),40 U Taq 聚合酶 0.2 μ l,用双蒸水补足至 25 μ l。

1.4.3 T-A 克隆 使用 T-A 克隆试剂盒,将纯化后的 PCR 产物连接入 pGEM-T 载体,转化入 DH5a 感受态菌,筛选阳性克隆,经扩菌后,提取质粒,用 PvuII 限制性内切酶酶切鉴定。

1.4.4 定量 PCR 标准曲线绘制 用 Eppendorf Biophotometer 测定质粒浓度并计算质粒数,稀释成 10⁹~10⁴ 梯度浓度,做定量 PCR,测定并绘制标准曲线。

1.4.5 Realtime PCR 反应体系 5 μ l 5 $\times$ 定量 PCR 缓冲液、0.5 μ l cDNA 模板、2.5 μ l dNTP (2.5 mmol/L)、MgCl₂ (25 mmol/L) 2.0 μ l,引物各 0.5 μ l(10 μ mol/L)及 40 U 定量 Taq 聚合酶,1 μ l Sybergreen I (1:2000 稀释),用双蒸水补足至 25 μ l。

1.5 免疫组织化学检测

采用 Envision 法检测喉鳞状细胞癌组织中 p53 的表达。用已知的阳性组织切片作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。结果判断标准:p53 的表达以细胞核呈清晰的棕色或胞核、胞浆同时呈棕色为阳性。光镜下随机选取 5 个高倍视野,共计数 500 个细胞,算出阳性细胞的百分数,将阳性染色的癌细胞数 $\leq$ 25%定为阴性表达,>25%为阳性表达,即过表达。

1.6 统计学方法

采用 *t* 检验进行 2 组间的比较,采用 χ^2 检验分析 T-bet、GATA3 与 p53 的相关性,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列及扩增长度

	Sequence	Amplicon
GAPDH	For:GGATTTGGTGGTATTGGG Rev:GGAAGATGGTGTATGGGATT	205 bp
T-bet	For:GTTCCCATTCCTGTCAATTTACT Rev:TCTCCGTCGTTCACTCAA	279 bp
IFN- γ	For:TATTCGGTAACTGACTTC Rev:AATCACATAGCCTTGC	388 bp
GATA3	For:GTAGCTGTAAGGCATGAAGGATG Rev:ACTGGTGAACGGTAACACTGATT	339 bp
IL-4	For:CCCCTCTGTTCTTCTCTGCTA Rev:ACTCTGGTTGGCTTCTTCA	368 bp

2 结果

2.1 实验组与正常对照组 T-bet、GATA-3 和 IFN- γ 、IL-4 mRNA 表达率

喉鳞状细胞癌患者 PBMC 中 T-bet、GATA-3、IFN- γ 和 IL-4 mRNA 的表达率依次为 42.86% (21/49)、71.43% (35/49)、26.53% (13/49) 和 63.27% (33/49); 正常人 PBMC 上述指标依次为 56.67% (17/30)、46.67% (14/30)、50.00% (15/30) 和 43.33% (13/30)。

2.2 实验组与正常对照组 T-bet、GATA-3、IFN- γ 和 IL-4 mRNA 表达量的比较

实验组与正常对照组 T-bet、GATA-3、IFN- γ 和 IL-4 mRNA 表达量的比较见表 2。

2.3 实验组 p53 的表达及其与 T-bet、GATA-3 表达的相关性

在 49 例喉鳞状细胞癌患者中, 有 26 例患者 p53 表达阳性 (图 1, 2), 在 p53 阳性组中 T-bet mRNA 的表达量较阴性组明显下调 ($P < 0.05$), 而 GATA3 mRNA 的表达量明显上调 ($P < 0.05$)。见表 3、4。

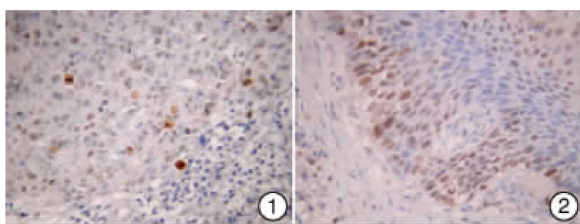


图 1 p53 表达阴性的喉鳞状细胞癌组织 苏木精-伊红染色 $\times 400$; 图 2 p53 表达阳性的喉鳞状细胞癌组织 苏木精-伊红染色 $\times 400$

3 讨论

喉鳞状细胞癌是目前危害人类健康的严重疾病之一, 它的发生、发展与多种因素有关, 其中包括机体的免疫功能失衡, 在该状态下肿瘤细胞逃避免疫细胞监控, 发生免疫逃逸导致肿瘤发生。机体抗肿瘤免疫的主要方式是细胞免疫, 其中 T 细胞是最主要的效应细胞。Th1 细胞是参与细胞免疫的重要正向调节细胞, 其产生和分泌的 IFN- γ 不仅调节着效应性 T 细胞的功能, 而且具有直接效应或激发和促进 NK 细胞的杀瘤作用。由此推测 Th1/Th2 细胞平衡向 Th2 细胞偏移, 势必削弱机体的抗肿瘤免

疫功能, 有助于肿瘤细胞的免疫逃逸和组织转移。Th1 和 Th2 细胞的共同前体为 Th0 细胞, Th0 细胞受到抗原激发后按一定比例分别向 Th1 和 Th2 细胞分化, 其中转录因子 T-bet 正向调控 Th1 细胞的分化发育, GATA3 则正向调控 Th2 细胞, 两者共同作用的结果最终决定着 Th0 细胞的分化方向^[3-5]。

在喉鳞状细胞癌中 Th1/Th2 的平衡状态不很清楚, 并且既往常常在细胞因子水平分析 Th1/Th2 平衡。而新近研究证实转录因子 (T-bet/GATA3) 更能提供较细胞因子更可靠的信息^[6]。本研究从 Th 细胞特异性转录因子及其细胞因子的角度, 证实在喉鳞状细胞癌患者 Th1/Th2 漂移现象。从我们的研究结果可以看出, 喉鳞状细胞癌患者体内 Th1 细胞特异性转录因子 T-bet 及其细胞因子 IFN- γ 的表达率和 mRNA 表达量明显下调而 Th2 细胞特异性转录因子 GATA3 与细胞因子 IL-4 表达率和 mRNA 表达量表达明显上调, 这表明喉鳞状细胞癌患者体内呈典型的 Th2 漂移。然而喉鳞状细胞癌患者 T-bet 的表达水平降低, GATA3 表达上调以及因此导致的 Th2 细胞分化、IFN- γ 分泌减少等现象, 究竟是喉鳞状细胞癌发生的原因还是癌症产生的后果, 尚需进一步研究。

肿瘤转移是喉鳞状细胞癌患者主要的死亡原因之一, 也是治疗中面临的难题, 它是一个复杂过程, 表现为多阶段性、多基因参与、多种转录因子调控。近年来研究发现, 一些转录因子在转移相关基因的表达调控中起重要、甚至是关键性的作用。有国外学者报道, T-bet 敲除的小鼠体内癌细胞扩散的速度远超过正常小鼠^[7]。在人体我们选取 p53 这一与转移密切相关的基因作为转移的观察指标。p53 是重要的抑癌基因, 定位于 17P13.1, 全长 16~20 kB, 含有 11 个外显子, 转录 2.8 kB 的 mRNA, 编码蛋白质为 p53, 是一种核内磷酸化蛋白。p53 基因是迄今为止发现的与人类肿瘤相关性最高的基因, 其主要功能是调节细胞对 DNA 损伤的反应, 通过引导细胞周期阻滞和凋亡, 引起生长抑制, 在保持细胞核稳定性或促细胞凋亡方面起到重要作用。正常组织中野生型 p53 半衰期短, 容易被水解, 细胞中不能测出。免疫组织化学所检测的主要为突变型 p53^[8], 突变型 p53 可能使细胞出现失控生长, 对细胞凋亡呈抑制作用, 使肿瘤细胞的

表 2 实验组与正常对照组 T-bet、GATA-3、IFN- γ 和 IL-4 mRNA 的表达量

$\bar{x} \pm s$

组别	T-bet/NADPH	GATA-3/NADPH	IFN- γ /NADPH	IL-4 mRNA/NADPH
正常对照组	0.49 $\pm$ 0.08	0.03 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.01
实验组	0.11 $\pm$ 0.04 ¹⁾	0.21 $\pm$ 0.04 ¹⁾	0.02 $\pm$ 0.02 ¹⁾	0.05 $\pm$ 0.03 ¹⁾

与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 3 喉鳞状细胞癌患者 p53 阳性与阴性组 T-bet 与 GATA-3 mRNA 的表达量 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	T-bet mRNA	GATA3 mRNA
p53(+)	26	0.07±0.04	0.28±0.17
p53(-)	23	0.15±0.06 ¹⁾	0.15±0.09 ¹⁾

与 p53(+)组比较,¹⁾ $P<0.05$ 。

表 4 喉鳞状细胞癌患者 p53 与 T-bet、GATA-3 表达的相关性 例

组别	p53	
	+	-
T-bet		
+	3	18
-	23	5
GATA-3		
+	22	13
-	4	10

侵袭力增加,因而易发生转移。在喉鳞状细胞癌中已有研究证实 p53 的表达与其转移高度相关^[9]。本观察发现,喉鳞状细胞癌患者 P53 阳性组 T-bet mRNA 的表达量较 p53 阴性组明显下调,而 GATA3 mRNA 的表达量较 p53 阴性组明显上调;另相关分析显示喉鳞状细胞癌患者 p53 与 T-bet 及 GATA3 的表达有相关性,由此推测喉鳞状细胞癌患者体内 Th2 漂移(T-bet 表达下调及 GATA3 表达上调)与肿瘤的转移相关。

本观察表明,喉鳞状细胞癌的发生和转移过程中存在明显的 Th2 漂移现象(T-bet 表达下调、GATA3 表达上调),纠正这种免疫失衡有助于疾病的控制。喉鳞状细胞癌患者 Th1/Th2 漂移现象与喉鳞状细胞癌的发生和转移密切相关,T-bet 与 GATA3 可作为临床反映肿瘤转移的参考指标。

参考文献

[1] TAN J Q, XIAO W, WANG L, et al. Type I natural killer T cells: naturally born for fighting[J]. Acta Pharmacol Sin,2010,31:1123-1132.

[2] ITO N, NAKAMURA H, TANAKA Y, et al. Lung carcinoma: analysis of T helper type 1 and 2 cells and T cytotoxic type 1 and 2 cells by intracellular cytokine detection with flow cytometry[J]. Cancer, 1999,85: 2359-2367.

[3] STABO S J, KIM S T, COATA B L, et al. A novel transcription actor, T-bet, directs Th1 lineage commitment[J]. Cell,2000,100:655-559.

[4] SUNDRUD M S, NOLAN M A. Synergistic and combinatorial control of T cell activation and differentiation by transcription factors[J]. Curr Opin Immunol, 2010,22:286-292.

[5] RENGARAJAN J, SZABO S J, GLIMCHER L H. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization[J]. Immunology Today,2000,21:479-483.

[6] KAWASHIMA M, MIOSEC P. mRNA quantification of T-bet, GATA-3, IFN- γ , IL-4 shows a defective Th1 immune response in the peripheral blood from rheumatoid arthritis patients; link with disease activity[J]. J Clin Immunol,2005,25:209-214.

[7] PENG S L, TOWNSEND M J, HECHT J L, et al. T-bet regulates metastasis rate in a murine model of primary prostate cancer[J]. Cancer Res,2004,64:452-455.

[8] 李漫雪,蔡群峰. 声门上型喉癌手术边缘的分子学研究[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2009,23(17): 802-804.

[9] 强笔,马纪清,邱杰,等. HPV16/18-E6, P53 和 MDM2 蛋白在人喉鳞癌中的表达及相关性研究[J]. 第二军医大学学报,2006,27(12):1320-1323.

(收稿日期:2011-10-09)

读者·作者·编者

文题的规范

文题是论文的必要组成部分,它是读者识别论文并判断是否需要阅读的主要依据。因此,文题的作用十分重要,务必字斟句酌,细心推敲。文题的用字要求简洁、明了,能概括论文主要内容,并便于标引和检索。一般使用充分反映文章主题内容的短语,不使用具有主、谓、宾结构的完整语句,不使用标点。中文题名一般不宜超过 20 字,如语意未尽,则可借助于副标题(可在总标题之后用圆括号括出,也可在副标题前加破折号示之)予以补充。文题应避免使用非公知公认的缩略语、字符和代号,尽量不出现结构式和数学式等,也不宜将原形词和缩略语同时列出。虚词应尽可能不用,避免使用“……的研究”、“……的探讨”、“……的体会”、“……的报告”等非特定词。说明文题的重要信息不应遗漏,可在文题右上角加“*”号,然后在文题页下方划一横线,与作者信息一起,予以注释。