

· 基础研究 ·

叉头蛋白 3 在鼻咽非角化性鳞状细胞癌组织中的表达及意义*

张志兴, 马 韵[△], 刘懿霄, 徐 华

(广西医科大学第一附属医院病理科, 南宁 530021)

摘要:目的 观察叉头蛋白 3(FoxP3)在鼻咽非角化性鳞状细胞癌中的表达情况,以探讨调节性 T(Treg)细胞在鼻咽癌发生、发展中的意义。方法 通过免疫组织化学(SP)法检测 FoxP3 在 57 例鼻咽非角化鳞状细胞癌和 22 例鼻咽部黏膜慢性炎症中的表达情况及 CD8 在鼻咽癌中的表达。结果 在鼻咽癌组中 FoxP3 阳性 Treg 细胞数(105.05±52.22)显著高于鼻咽部黏膜慢性炎症(6.35±6.06),二者的差异有统计学意义($P<0.05$)。FoxP3 阳性 Treg 细胞的数量与患者性别及肿瘤分化程度有关($P<0.05$)。结论 在鼻咽非角化鳞状细胞癌中,FoxP3 阳性 Treg 细胞的增殖可能抑制机体的抗肿瘤免疫功能,并为肿瘤细胞的免疫逃逸提供良好的环境。

关键词:鼻咽肿瘤;黏膜慢性炎;调节性 T 细胞;叉头蛋白 3;CD8⁺T 淋巴细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.27.026

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)27-3272-03

Expression and significance of FoxP3 in non-keratinizing squamous cell carcinoma of nasopharynx*

Zhang Zhixing, Ma Yun[△], Liu Yixiao, Xu Hua

(Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of FoxP3 in nasopharyngeal non-keratinizing squamous cell carcinoma and the significance of regulatory T(Treg) cell in the occurrence and development of nasopharyngeal carcinoma. **Methods** The immunohistochemistry staining method(SP) was used to detect the expression of FoxP3 in 57 cases of nasopharyngeal non-keratinizing squamous cell carcinoma and 22 cases of nasopharyngeal mucosa with chronic inflammation, and the expression of CD8 in nasopharyngeal carcinoma. **Results** The number of Treg cell with positive FoxP3 in the nasopharyngeal carcinoma group was 105.05±52.22, which was significantly higher than 6.35±6.06 in the nasopharyngeal mucosa with chronic inflammation, the difference between them showed statistical significance($P<0.05$). The number of T cells with positive FoxP3 was relevant to gender and the differentiation degree of carcinoma($P<0.05$). **Conclusion** The proliferation of Treg cells with positive FoxP3 can inhibit the anti-tumor immunologic function of the patients with nasopharyngeal non-keratinizing squamous cell carcinoma and provide the favorable environment for the immunologic escape of tumor cells.

Key words: nasopharyngeal neoplasms; mucosa with chronic inflammation; regulatory T cell; FoxP3; CD8⁺T lymphocyte

调节性 T(Treg)细胞是一类具有免疫抑制调节功能的 CD4⁺T 细胞亚群,对机体的免疫稳态的调节十分重要,其介导的免疫抑制是肿瘤免疫逃逸的关键机制。叉头蛋白 3(FoxP3)是 Treg 细胞的特异性转录因子,也是参与 Treg 分化和发育的关键调节因子。近年来研究发现,在肝癌、大肠癌、乳腺癌等恶性肿瘤性疾病中 Treg 细胞的数量增加^[1-3]。Dannull 等^[4]针对 Treg 细胞的功能和作用,应用地尼白细胞介素治疗转移性肾细胞癌的患者以达到消除 Treg 细胞介导的抗肿瘤免疫作用,为抗肿瘤免疫治疗提供了新策略。而且有文献报道 FoxP3 在淋巴瘤、卵巢癌、大肠癌等疾病中的表达对于提示疾病的预后具有重要价值^[5-7]。本研究运用免疫组织化学(SP)法探索 FoxP3 在鼻咽癌组织中的表达情况及意义,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2008 年 8 月到 2011 年 3 月本院病理科初诊鼻咽癌病例 57 例为实验组,组织学类型为非角化性鳞状细胞癌,包括分化型 38 例,未分化型 19 例。年龄 13~78 岁,平均 47 岁;男 40 例,女 17 例。按照年龄和性别匹配原则收集 22 例鼻咽部黏膜慢性炎症作为对照组。

1.2 试剂和方法 采用 SP 法。FoxP3(克隆号:236A/E7,美国 Abcam 公司),工作液浓度为 1:100;CD8(型号:ZA0508,

北京中杉金桥试剂公司),工作液浓度为 1:100。兔/鼠通用型 Streptavidin-HRP 试剂盒购于北京康为世纪公司,按试剂盒说明书操作。抗原修复方式为乙二胺四乙酸(EDTA)高温高压。以慢性扁桃体炎作为阳性对照,磷酸盐缓冲液(PBS)替代一抗作为空白对照。

1.3 结果判定 SP 染色阳性反应为棕黄色,FoxP3 阳性信号定位于细胞核,呈均匀黄褐色颗粒,CD8 阳性信号定位于细胞膜。两人双盲法观察切片,分两种方法计数阳性细胞数:(1)选取 5 个高倍视野计数阳性细胞个数,取其平均值代表每个高倍视野阳性细胞数。(2)分别计数 5 个高倍视野单位面积下癌巢、间质内阳性细胞的个数,各取其平均值进行统计学分析。

1.4 统计学处理 所有数据采用 SPSS13.0 统计软件处理。正态分布数据采用 *t* 检验,非正态分布数据采用秩和检验。不同组间比较采用 χ^2 检验;相关性分析用 Pearson 检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

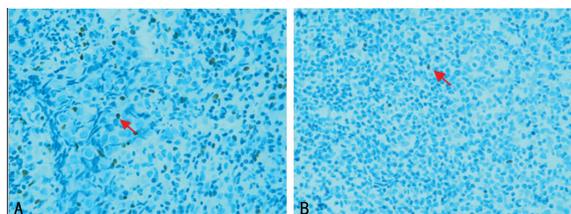
2.1 FoxP3⁺Treg 细胞在鼻咽癌组和黏膜慢性炎组中的表达 在鼻咽癌组,FoxP3⁺Treg 细胞散在分布于癌巢及间质中,细胞小~中等大小,细胞核不规则(图 1A)。在鼻咽部黏膜慢性炎症组中,FoxP3 阳性细胞零散分布于滤泡间区,部分病例

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160255)。 作者简介:张志兴(1987~),硕士在读,主要从事淋巴造血系统疾病诊断方面的研究。 △ 通讯作者, Tel:(0771)5356534; E-mail:yunandama@hotmail.com。

的黏膜上皮内有数个阳性细胞存在(图 1B)。鼻咽癌组中 FoxP3 阳性的细胞数为(105.05±52.22),显著高于黏膜慢性炎症组(6.35±6.06),二者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 鼻咽癌中 FoxP3⁺Treg 细胞与 CD8⁺T 细胞分布特点

FoxP3⁺Treg 细胞主要散在分布于癌巢和间质中。CD8⁺T 细胞主要分布于间质,癌巢内可见 CD8⁺T 细胞,在靠近间质的癌巢内 CD8⁺T 细胞较癌巢中心多,细胞大小不等。秩和检验结果得出,CD8 在间质、癌巢中的表达差异有统计学意义($P<0.05$)。在癌巢、间质中 FoxP3 的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。经 Pearson 相关分析可知,间质中 FoxP3 和 CD8 表达不相关($P>0.05$)。



A:鼻咽非角化鳞状细胞癌;B:鼻咽部黏膜慢性炎症。

图 1 FoxP3 在鼻咽部表达(SP ×400)

2.3 鼻咽癌中 FoxP3⁺Treg 细胞和 CD8⁺T 淋巴细胞的表达和临床病理参数之间的关系 分别以 FoxP3⁺Treg 细胞数量和 CD8⁺T 细胞数量的中位数为分界值,分为高表达组和低表达组。在鼻咽癌癌巢及间质内,FoxP3⁺Treg 细胞数量与患者性别和癌的分化程度有关($P<0.05$),与年龄、肿瘤分期、淋巴结转移以及临床分期无关($P>0.05$);CD8⁺T 细胞数量与性别、年龄、肿瘤分期、淋巴结转移、分化程度以及临床分期均无关($P>0.05$),见表 1。分别比较鼻咽癌癌巢、间质内的 FoxP3 和 CD8 阳性细胞数量与临床病理参数之间的关系,均无相关性($P>0.05$),见表 2。

表 1 癌巢及间质内 FoxP3⁺Treg、CD8⁺T 细胞表达与临床病理参数间的关系[n(%)]

| 项目 | n | FoxP3 | | P | CD8 | | P |
|--------------|----|----------|----------|------|----------|----------|------|
| | | 高表达组 | 低表达组 | | 高表达组 | 低表达组 | |
| 年龄(岁) | | | | | | | |
| <47 | 30 | 14(46.7) | 16(55.3) | 0.50 | 17(56.7) | 13(43.3) | 0.38 |
| ≥47 | 27 | 15(55.6) | 12(44.4) | | 12(44.4) | 15(55.6) | |
| 性别 | | | | | | | |
| 男 | 40 | 16(40.0) | 24(60.0) | 0.01 | 20(50.0) | 20(50.0) | 0.84 |
| 女 | 17 | 13(76.5) | 4(23.5) | | 9(52.9) | 8(47.1) | |
| 肿瘤分期 | | | | | | | |
| T1~T2 | 10 | 3(30.0) | 7(70.0) | 0.28 | 7(70.0) | 3(30.0) | 0.28 |
| T3~T4 | 23 | 12(52.2) | 11(47.8) | | 11(47.8) | 12(52.2) | |
| 淋巴结转移 | | | | | | | |
| N0~N1 | 18 | 8(44.4) | 10(55.6) | 0.73 | 9(50.0) | 9(50.0) | 0.73 |
| N2~N3 | 15 | 8(53.4) | 7(46.7) | | 9(60.0) | 6(40.0) | |
| 组织学类型 | | | | | | | |
| 分化型 | 38 | 14(36.8) | 24(63.2) | 0.00 | 20(52.6) | 18(47.4) | 0.71 |
| 未分化型 | 19 | 15(78.9) | 4(21.1) | | 9(47.4) | 10(52.6) | |
| 临床分期 | | | | | | | |
| I~II | 9 | 3(33.3) | 6(66.7) | 0.43 | 6(66.7) | 3(33.3) | 0.69 |
| III~IV | 24 | 13(35.1) | 11(46.9) | | 13(54.2) | 11(45.8) | |

表 2 鼻咽癌间质内 FoxP3⁺Treg、CD8⁺T 细胞与临床病理参数的关系[n(%)]

| 项目 | n | FoxP3 | | P | CD8 | | P |
|--------------|-------|----------|----------|------|----------|----------|------|
| | | ≥11.67 | <11.67 | | ≥35.6 | <35.6 | |
| 年龄(岁) | | | | | | | |
| <47 | 30/57 | 13(43.3) | 17(56.7) | 0.23 | 15(50.0) | 15(50.0) | 0.90 |
| ≥47 | 27/57 | 16(59.3) | 11(40.7) | | 14(51.9) | 13(48.1) | |
| 性别 | | | | | | | |
| 男 | 40/57 | 19(47.5) | 21(52.5) | 0.27 | 20(50.0) | 20(50.0) | 0.84 |
| 女 | 17/57 | 10(58.8) | 7(41.2) | | 9(52.9) | 8(47.1) | |
| 肿瘤分期 | | | | | | | |
| T1~T2 | 10/33 | 6(60.0) | 4(40.0) | 0.71 | 6(60.0) | 4(40.0) | 0.71 |
| T3~T4 | 23/33 | 11(47.8) | 12(52.2) | | 11(47.8) | 12(52.2) | |
| 淋巴结转移 | | | | | | | |
| N0~N1 | 18/33 | 9(50.0) | 9(50.0) | 1.00 | 8(44.4) | 10(55.6) | 0.50 |
| N2~N3 | 15/33 | 8(53.3) | 7(46.7) | | 9(60.0) | 6(40.0) | |
| 分化程度 | | | | | | | |
| 分化型 | 38/57 | 16(42.1) | 22(57.9) | 0.06 | 20(52.6) | 18(47.4) | 0.78 |
| 未分化型 | 19/57 | 13(68.4) | 6(31.6) | | 9(47.4) | 10(52.6) | |
| 临床分期 | | | | | | | |
| I~II | 9/33 | 5(55.6) | 4(44.4) | 1.00 | 6(66.7) | 3(33.3) | 0.69 |
| III~IV | 24/33 | 12(50.0) | 12(50.0) | | 13(54.2) | 11(45.8) | |

3 讨论

肿瘤组织内浸润的淋巴细胞是机体对肿瘤免疫应答的体现。而在许多肿瘤性疾病中,对免疫应答起负性调节作用的 Treg 细胞发生增殖,介导了机体对肿瘤细胞的免疫作用且有助于肿瘤细胞免疫逃逸。Treg 细胞的抑制功能是通过分泌抑制性细胞因子,如白细胞介素-10,转化生长因子-β 和白细胞介素-35,或者直接通过细胞和细胞间作用从而抑制初始 T 细胞和效应性 T 细胞的增生来实现的^[8]。

本实验结果显示,鼻咽癌组中 FoxP3 阳性细胞数量远高于鼻咽部黏膜慢性炎症组,证实了在鼻咽癌组织中也存在高水平 FoxP3⁺Treg 细胞表达。同时提示了鼻咽癌的发生可能与 FoxP3⁺Treg 细胞的增殖有着密切关系。由此可推测,在鼻咽癌组织中,癌细胞可能通过某种途径促进了 FoxP3⁺Treg 细胞的增殖,而增多的 Treg 细胞又为肿瘤细胞逃避免疫攻击提供了优势环境。

通过观察鼻咽癌组织中的 FoxP3 和 CD8 阳性细胞的分布状态,发现 FoxP3⁺Treg 细胞在癌巢和间质呈现散在分布的特点(FoxP3 阳性细胞在鼻咽癌组织的癌巢、间质中的表达无差异, $P>0.05$),故推测,癌细胞可能既可以诱导 FoxP3⁺Treg 细胞在癌巢内的原位增殖,又可以促进 FoxP3⁺Treg 细胞从远处向肿瘤间质内转移。而 Christian 等^[9]提出恶性黑色素瘤细胞通过分泌 H-铁蛋白诱导 Treg 细胞扩增,Tyler 等^[10]曾提出肿瘤细胞可以过 CCL22/CCR4 吸引 Treg 细胞向肿瘤组织迁移。由此可推测,在鼻咽癌组织内可能也存在着同样的调控机制。在鼻咽癌中,CD8⁺T 细胞主要分布在间质和靠近间质的癌巢内,这样的分布特点提示 CD8⁺T 细胞可能是通过某种趋化因子的作用从间质内向肿瘤组织迁移,与肿瘤细胞充分接

触,进而发挥其免疫杀伤作用。

本研究还发现,在鼻咽癌中女性患者 FoxP3⁺ Treg 数量高于男性患者,这提示了不同个体间激素差异可能影响 FoxP3 合成或表达。从肿瘤细胞的分化程度上来看,分化型鼻咽癌组以 FoxP3 低表达为主,而未分化型鼻咽癌组以 FoxP3 高表达为主,这提示分化型癌细胞和未分化型癌细胞可能通过不同的机制影响 FoxP3⁺ Treg 细胞的增殖,而且,未分化型鼻咽癌患者体内的免疫抑制状态较分化型鼻咽癌更强,更有利于癌细胞逃避机体的抗肿瘤免疫作用,从而促进肿瘤的进一步发展。此外,本研究还发现,FoxP3⁺ Treg 细胞数量与临床分期无关,提示了 FoxP3⁺ Treg 细胞介导的免疫抑制作用可能是在肿瘤发生的早期,而随着疾病的进展,Treg 细胞的作用并非是维持肿瘤免疫逃逸或促进其继续发展的决定性因素。

本实验结果中鼻咽癌的癌巢、间质中 FoxP3⁺ Treg 细胞与 CD8⁺ T 细胞表达不相关,差别无统计学意义($P>0.05$)。这与 Zhang 等^[11]和 Yip 等^[12]在鼻咽癌中的研究结果相一致。而张艳芳等^[13]提出在食管癌的间质中 FoxP3⁺ Treg 细胞与 CD8⁺ T 细胞表达呈负相关。由此可以推测,在不同器官的肿瘤组织中,FoxP3⁺ Treg 细胞与 CD8⁺ T 细胞之间作用机制可能不同。

综上所述,本研究证实了 FoxP3⁺ Treg 细胞增加现象存在于鼻咽癌组织中,且与患者性别和癌组织分化程度相关,但 FoxP3⁺ Treg 细胞与 CD8⁺ T 细胞数量并未对患者临床分期及转移等参数产生影响,也未见 FoxP3⁺ Treg 细胞与 CD8⁺ T 细胞数量之间存在简单的数量对应关系。因鼻咽部与外界环境密切接触,可能有其他因素如空气污染或感染等因素影响癌组织中 FoxP3⁺ Treg 细胞与 CD8⁺ T 细胞数量及功能状态,故应扩大研究样本量以及增加观察参数指标,并采用更为科学准确的定量研究方法,进一步深化研究 FoxP3⁺ Treg 细胞在鼻咽癌发生和发展中的作用。

参考文献:

- [1] Sasaki A, Tanaka F, Mimori K, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3⁺ regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2008, 34(2): 173-179.
- [2] Paul S, Michael P, Fabienne G, et al. Tumor-infiltrating FoxP3⁺ regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(2): 186-192.
- [3] Raoul D, Inti Z, Ergin K, et al. Differential pattern and prognostic significance of CD4⁺, FoxP3⁺ and IL-17⁺ tumor infiltrating lymphocytes in ductal and lobular

breast cancers[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 134.

- [4] Dannull J, Su Z, Rizzieri D, et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(12): 3623-3633.
- [5] Alexandar T, Cecile M, Petra H, et al. Correlation of high numbers of intratumoral FoxP3⁺ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma [J]. *Haematologica*, 2008, 93(2): 193-200.
- [6] Ninke L, Marloes J, Gooden M, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(3): 449-459.
- [7] Sylvain L, Francois M, Francois G, et al. Prognostic role of FoxP3⁺ regulatory T cells infiltrating human carcinomas, the paradox of colorectal cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60(7): 909-918.
- [8] Cao XF. Regulatory T cells and immune tolerance to tumors [J]. *Immunol Res*, 2010, 46(1/3): 79-93.
- [9] Christian P, Paolo A, Peter H, et al. Association of increased levels of heavy-chain ferritin with increased CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell levels in patients with melanoma [J]. *Clinical Cancer Research*, 2003, 9(7): 2551-2559.
- [10] Curiel TJ, Coukos G, Iou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege reduced survival [J]. *Nature Medicine*, 2004, 10(9): 942-949.
- [11] Zhang YL, Li J, Mo HY, et al. Different subsets of tumor infiltrating lymphocytes correlate with NPC progression in different ways [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 4.
- [12] Yip WK, Abdullah MA, Yusoff SM, et al. Increase in tumour-infiltrating lymphocytes with regulatory T cell immunophenotypes and reduced Zeta-chain expression in nasopharyngeal carcinoma patients [J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 155(3): 412-422.
- [13] 张艳芳, 李印, 郭伟华, 等. CD8⁺ T 细胞和调节性 T 细胞在食管癌中表达及与预后的关系 [J]. *中华实验外科杂志*, 2008, 25(12): 1615-1617.

(收稿日期: 2013-03-20 修回日期: 2013-05-22)

(上接第 3271 页)

- OD, et al. Metastasis is strongly reduced by the matrix metalloproteinase inhibitor Galardin in the MMTV-PymT transgenic breast cancer model [J]. *Molecular cancer therapeutics*, 2008, 7(9): 2758-2767.
- [10] 万钟, 姚月华, 钟瑜, 等. 长春瑞滨联合卡培他滨治疗难治性鼻咽癌的临床观察 [J]. *中国实用医药*, 2009, 4(34): 30-31.
- [11] Hao JL, Nagano T, Nakamura M, et al. Galardin inhibits

collagen degradation by rabbit keratocytes by inhibiting the activation of pro-matrix metalloproteinases [J]. *Exp Eye Res*, 1999, 68(5): 565-572.

- [12] 兰菁, 吴宜林. GM6001 对宫颈鳞癌 HCE1 多细胞球体浸润人脐静脉内皮细胞的影响 [J]. *中南大学学报*, 2010, 35(8): 868-874.

(收稿日期: 2013-03-12 修回日期: 2013-05-22)