

- [J]. 中国肿瘤, 2012, 21(9): 670-672.
- [3] Macsween KF, Crawford DH. Epstein-Barr virus-recent advance [J]. Lancet Infect Dis, 2003, 3(3): 131-140.
- [4] 宗永生, 杨伟民, 张昌卿, 等. 用原位杂交技术探讨 EB 病毒在鼻咽癌发生中的作用[J]. 中华病理杂志, 1993, 22(6): 330-333.
- [5] 周涛, 邓永高. EB 病毒三项血清学联合检测与鼻咽癌诊断的相关性探讨[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2011, 5(11): 3308-3309.

- [6] 蒋陵岚, 李启宇. 71 例婴幼儿 EB 病毒感染的临床特征分析[J]. 实用预防医学, 2010, 17(7): 1369-1370.
- [7] 王亚军, 王尚昆. 519 例小儿 EB 病毒感染临床分析[J]. 中国医学工程, 2011, 19(1): 128.
- [8] 蒋卫红, 赵素萍, 尹志华, 等. 定量和定位检测 EB 病毒在鼻咽癌组织中的感染状态[J]. 癌症, 2005, 24(7): 796-800.

(收稿日期: 2015-10-26)

• 临床研究 •

宫颈癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞与白细胞介素-17 水平及其相关性研究

周勇军, 李龙平, 王新华

(益阳市中心医院检验科, 湖南益阳 413000)

摘要:目的 探讨外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞(Tr 细胞)和白细胞介素-17(IL-17)水平在宫颈癌患者中的变化及其相关性。方法 选取 2014 年 1 月至 2015 年 3 月该院确诊宫颈癌患者 60 例(宫颈癌组)和查体的健康女性 60 例(健康对照组), 采用流式细胞仪检测外周血 Tr 细胞数量及占 CD4⁺细胞百分比, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 IL-17 水平。结果 宫颈癌组外周血 Foxp3⁺Tr、Tr、CD4⁺T 淋巴细胞百分比, Foxp3⁺Tr/Tr、Tr/CD4⁺T 淋巴细胞比值及血清 IL-17 水平均较健康对照组明显升高, 而 IL-17/Tr 比值明显下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。宫颈癌组患者外周血 CD4⁺CD25⁺Tr 细胞水平与血清 IL-17 水平呈正相关($r = 0.768, P < 0.05$)。结论 宫颈癌患者存在细胞免疫功能紊乱, IL-17 与 Tr 细胞比值失衡可能在宫颈癌发病机制中起一定的作用。

关键词: 宫颈癌; CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞; 白细胞介素-17

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.05.049

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)05-0685-03

宫颈癌是妇科常见的生殖系统恶性肿瘤之一, 其发病率仅次于乳腺癌。越来越多的研究表明, 肿瘤的发生、发展与肿瘤免疫逃逸密切相关, CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞(Tr 细胞)是一种新型免疫抑制细胞, 能维持自身耐受和免疫稳定, 同时抑制免疫系统对肿瘤的免疫应答, 其独特的免疫抑制作用可能在肿瘤免疫逃逸中起了“主干”作用^[1]。有研究表明, 宫颈癌患者体内存在 CD4⁺CD25⁺Tr 细胞比例失调, 肿瘤负荷与宫颈癌患者体内 CD4⁺CD25⁺Tr 细胞水平有关, 提示 CD4⁺CD25⁺Tr 细胞表达异常参与了宫颈癌的发生、发展^[2]。炎症和肿瘤之间可能存在一定的关系, 慢性感染和炎症能介导一系列炎性介质(如细胞因子、酶、趋化因子等)一起造成炎症微环境, 被认为是宫颈癌发生、发展的重要原因之一。白细胞介素-17(IL-17)是辅助性 T 淋巴细胞 17(Th17)分泌的前炎性细胞因子, 作为细胞核心的炎性因子具有强有力的诱导能力, 可促进细胞增殖和血管生成, 从而发挥促进慢性炎症和肿瘤生长的作用^[3]。本研究通过检测 60 例, 宫颈癌患者外周血中 CD4⁺CD25⁺Tr 细胞及 IL-17 水平的表达, 旨在进一步探讨 IL-17 和 CD4⁺CD25⁺Tr 细胞在宫颈癌发生、发展中的作用及其发病机制, 为宫颈癌的临床免疫调节治疗提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 1 月至 2015 年 3 月本院妇科收治的经临床妇科检查诊断和活检后病理确诊的初次就诊宫颈癌患者 60 例, 纳入宫颈癌组, 年龄 32~79 岁, 平均(40.57±15.62)岁, 所有患者无其他系统恶性肿瘤及转移性肿瘤, 未经放、化疗治疗及内分泌治疗和免疫治疗, 取材前 3 d 内无阴道冲洗及阴道用药史。另选取本院查体的健康女性 60 例作为健康对照组, 年龄 26~75 岁, 平均(38.73±12.23)岁, 均有性生活史, 均为非妊娠状态, 均无子宫切除和宫颈手术史, 均排除近期感染

和自身免疫病史, 均未使用糖皮质激素和非甾体类药物。所有标本的收集均经患者或其家属同意, 签署知情同意书。两组年龄比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 具可比性。

1.2 仪器与试剂 荧光素标记的单克隆抗体: 异硫氰酸荧光素标记 CD4(CD4-FITC)、藻红蛋白标记 CD25(CD25-PE)、异硫氰酸荧光素标记 IgG1(IgG1-FITC)和藻红蛋白标记 IgG1(IgG1-PE)均购自美国 BD 公司; 淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品有限公司; 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购自美国 Linco 公司。Beckman Coulter EP-ICS XL 流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司。

1.3 方法

1.3.1 外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tr 细胞检测 取健康女性查体当日和患者入院第 2 天清晨静脉新鲜血液 5 mL, 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝, 以淋巴细胞分离液得淋巴细胞, 取分离的 T 淋巴细胞悬液 100 μ L, 分别加入抗 CD4-FITC、抗 CD25-PE 的单克隆抗体各 20 μ L, 同型对照分别为 IgG1-FITC、IgG1-PE, 混匀, 避光孵育 25~30 min。1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清。加入 2 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)混匀, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。将细胞悬浮于 0.5 mL PBS 中, 振荡混匀后待测。应用流式细胞仪检测宫颈癌组和健康对照组外周血单个核细胞(PBMC)中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tr 细胞。

1.3.2 IL-17 检测 所有受试者清晨空腹抽取静脉血 5 mL, 3 000 r/min 离心 5 min, 血清分离后放 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。采用 ELISA 试剂盒测定血清 IL-17 水平, 严格按试剂说明书进行测定。

1.3 统计学处理 采用的 SPSS16.0 统计学软件进行数据处理与统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用完全随机设计的 t 检验, 组内比较采用配对 t 检验; 相关分析采用 Pear-

son 相关分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组外周血 Tr 细胞及血清 IL-17 水平比较 宫颈癌组外周血 Foxp3⁺ Tr、Tr、CD4⁺ T 淋巴细胞百分比及 Foxp3⁺ Tr/

Tr、Tr/ CD4⁺ T 淋巴细胞比值及血清 IL-17 水平均较健康对照组明显升高,而 IL-17/Tr 比值明显下降,差异有统计学意义(P<0.05)。见表 1。

表 1 两组外周血 Tr 细胞及血清 IL-17 水平比较(̄x±s)

组别	n	Foxp3 ⁺ Tr(%)	Tr(%)	Foxp3 ⁺ Tr/Tr	CD4 ⁺ T(%)	Tr/ CD4 ⁺ T	IL-17(pg/mL)	IL-17/Tr
健康对照组	60	3.38±0.52	5.25±0.85	0.65±0.10	37.50±3.24	0.14±0.03	6.82±1.61	1.29±0.14
宫颈癌组	60	16.49±1.51	20.11±2.20	0.82±0.12	48.82±5.11	0.41±0.09	15.05±1.90	0.75±0.09
t		63.97	48.80	8.43	14.49	22.05	25.60	25.13
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.2 宫颈癌组外周血 Tr 细胞表达与血清 IL-17 水平的相关性分析 将 Tr 细胞表达水平与血清 IL-17 水平进行相关性分析,宫颈癌组患者血清 IL-17 水平越高,外周血 CD4⁺ CD25⁺ Tr 细胞表达水平越高,二者呈正相关(r=0.768,P<0.05)。

3 讨 论

宫颈癌是发生在宫颈鳞状上皮细胞和宫颈管内膜柱状上皮细胞交界处的最常见的恶性肿瘤之一,其发病率有明显上升趋势,发病年龄呈现年轻化趋势。相关研究显示,宫颈癌的发生、发展是多因素共同作用导致的,经常规肿瘤细胞减灭术及化疗得以有效缓解,但依然有相当一部分患者存在复发和远处转移的可能,从而影响卵巢癌的治疗疗效与预后,其中肿瘤免疫逃逸起“关键”作用,肿瘤在发生、发展过程中演化出逃避免疫监视的方式,导致宿主不能有效清除肿瘤。近年来的研究表明,CD4⁺ CD25⁺ Tr 细胞是一群具有免疫抑制功能的 T 淋巴细胞亚群,其主要通过细胞与细胞接触、细胞溶解、竞争性抑制、分泌抑制性细胞因子、间接抑制等方式发挥作用,在维持机体免疫稳定、调控免疫应答方面起重要作用,Tr 细胞的免疫无能 and 免疫抑制使得肿瘤免疫逃逸,可能是肿瘤免疫逃逸中的关键因素^[4-5]。近年来研究表明,肝癌、乳腺癌、胃癌等多种癌症患者外周循环血中均发现 Tr 细胞增多,Tr 细胞可通过抑制体内的 T 淋巴细胞活化从而抑制抗肿瘤免疫反应,在维持肿瘤免疫耐受中发挥重要作用,Tr 细胞与肿瘤进展及不良预后密切相关^[6]。Foxp3 表面分子是叉头翼状螺旋转录因子的总称,特异性表达在 Tr 细胞上,是 Tr 细胞的一个特异性标志,Tr 细胞活化可导致其表达 Foxp3 增加,Foxp3 表达在 Tr 细胞的发育和功能上起重要作用^[7]。IL-17 是近年来发现的一种促炎细胞因子,是由活化的人 CD4⁺ T 淋巴细胞产生的重要细胞因子,作为一种独特的多效性细胞因子,晚期肿瘤患者的外周血及肿瘤组织中均可查见分泌 IL-17 的细胞,IL-17 能促进细胞增殖,并发挥着促进新生血管生成的作用,通过促进血管生成及肿瘤细胞的增殖,参与肿瘤的发生与发展。虽然,目前已经有大量的研究证实 Tr 细胞能够抑制 T 淋巴细胞的免疫应答,导致肿瘤细胞的免疫逃逸,但是关于宫颈癌患者 Tr 细胞与 IL-17 表达水平的变化及两者相互作用关系的研究报道较少。本研究通过检测宫颈癌患者 Tr 细胞与血清 IL-17 表达水平的变化,深入研究宫颈癌患者的免疫抑制机制,以期宫颈癌患者寻找高效的免疫治疗方案提供一定的理论依据。

本研究发现,宫颈癌组患者外周血 Foxp3⁺ Tr、Tr、CD4⁺ 细胞百分比,Foxp3⁺ Tr/Tr、Tr/ CD4⁺ T 比值,以及血清 IL-17 水平均较健康对照组明显升高,而 IL-17/Tr 明显下降,差异有统计学意义(P<0.05)。宫颈癌患者外周血中 CD4⁺ CD25⁺ Tr

细胞数量升高可以反映肿瘤患者免疫系统存在抑制状态,由此可能导致机体自身有效的免疫抑制功能增强,减弱了免疫监视作用,在肿瘤的逃逸机制中发挥作用,可以保护肿瘤细胞,提示宫颈癌的发生与机体免疫状态密切相关,尤其是 T 淋巴细胞介导的免疫反应,宫颈癌机体处于一种潜在的免疫抑制状态^[8]。有研究发现,IL-17 基因低甲基化导致 IL-17 高表达,IL-17 能诱导肿瘤特异性杀伤性 T 淋巴细胞的活性及功能增强,同时诱导抗肿瘤保护性免疫应答的形成,从而发挥其抗肿瘤活性^[9]。宫颈癌患者外周血 Foxp3⁺ Tr 细胞与 Tr 细胞的比值较对照组明显升高,表明 Foxp3⁺ Tr 在宫颈癌细胞免疫逃逸中发挥着重要作用,对宫颈癌的发生、发展起重要推动作用。有研究发现,FoxP3 表达在宫颈癌组织中增高,并与 P16INK4a(人乳头瘤病毒整合到宿主细胞的关键标志)表达相关,与肿瘤大小呈正相关,表明 FoxP3 在宫颈癌的发生中发挥重要作用^[10],与本研究相符。有研究表明,FoxP3⁺ Tr 介导的宫颈癌免疫逃逸与前列腺素 E2(PGE2)密切相关,PGE2 能诱导白细胞介素-10(IL-10)的产生并抑制白细胞介素-12(IL-12)的产生,IL-10 具有免疫抑制功能,而 IL-12 具有增强机体抗肿瘤免疫效应功能,从而打破了免疫抑制与免疫效应之间的平衡,使机体的免疫监视功能下降,提示 FoxP3 的功能性高表达可能为导致宫颈癌发病的原因之一^[11]。相关性分析结果表明,IL-17 表达水平与 CD4⁺ CD25⁺ Tr 细胞表达水平呈正相关,IL-17 水平越高,CD4⁺ CD25⁺ Tr 细胞表达水平越高,表明血清 IL-17 在宫颈癌发病机制上发挥重要作用。Th17 的主要效应因子是 IL-17,IL-17 细胞和 Tr 细胞之间存在着反向分化的机制,Tr 细胞的表达较 IL-17 细胞的表达升高更明显,呈现优势表达,导致了 IL-17/Tr 比值呈下降趋势,说明在宫颈癌患者中这种免疫平衡状态被打破,导致了 Th17 细胞和 Tr 细胞表达水平升高,并且随着肿瘤的发展而逐渐升高,这可能是宫颈癌发生的机制之一^[12-13]。

综上所述,CD4⁺ CD25⁺ Tr 细胞和 IL-17 水平的升高可能参与了宫颈癌的发生、发展,机体的免疫调节功能异常加剧 IL-17/Tr 失衡,从而导致宫颈癌的发生,在外周血中的水平可能成为监测患者体内细胞免疫状态和机体抗肿瘤免疫应答的指标,在疾病的诊断、预后和肿瘤免疫治疗中有很好的应用前景。

参考文献

[1] 樊敏,霍介格. 调节性 T 细胞与肿瘤免疫逃逸相关性及中医药治疗研究进展[J]. 浙江中医药大学学报,2013,37(6):826-829.
 [2] 章圣辉,韩义香,吴建波,等. 子宫颈癌患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127lo/-调节 s 性 T 淋巴细胞的含量及肿瘤免疫水平检测

[J]. 中华妇产科杂志, 2007, 42(6): 419-420.

[3] 陈曦, 朱波, 陈正堂. IL-17/IL-17R 与恶性肿瘤[J]. 免疫学杂志, 2010, 26(4): 366-369.

[4] 于益芝, 曹雪涛. 调节性 T 细胞在肿瘤免疫和肿瘤免疫治疗中的作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, 17(1): 1-6.

[5] 余鲜艳, 周畔. CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞在肿瘤免疫逃逸机制中的作用研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2009, 29(2): 100-103.

[6] Dowlatshahi M, Huang V, Gehad AE, et al. Tumor-specific T cells in human Merkel cell carcinomas; a possible role for Tregs and T-cell exhaustion in reducing T-cell responses[J]. J Invest Dermatol, 2013, 133(7): 1879-1889.

[7] Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, et al. Scurfin (Foxp3) acts as a receptor of transcription and regulatory T cell activation[J]. J Biol Chem, 2001, 276(40): 37672-37679.

[8] Aarts-Riemens T, Emmelot ME, Verdonck LF, et al. Forced over-expression of either of the two common human Foxp3 isoforms can induce regulatory T cells from CD4(+)CD25(-) cells[J]. Eur J Immunol, 2008, 38(5): 1381-1390.

[9] Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, et al. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity[J]. Immunity, 2009, 31(5): 787-798.

[10] Zeng C, Yao YH, Jie W, et al. Up-regulation of Foxp3 participates in progression of cervical cancer[J]. Cancer Immunol Immunother, 2013, 62(3): 481-487.

[11] Edwards JP, Emens LA. The multikinase inhibitor sorafenib reverses the suppression of IL-12 and enhancement of IL-10 by PGE2 in murine macrophages[J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10(10): 1220-1228.

[12] Martinez GJ, Zhang Z, Reynolds JM, et al. Smad2 positively regulates the generation of Th17 cells[J]. J Biol Chem, 2010, 285(38): 29039-29043.

[13] Chen Z, Ding J, Pang N, et al. The Th17/Treg balance and the expression of related cytokines in Uygur cervical cancer patients[J]. Diagn Pathol, 2013, 8(1): 61.

(收稿日期: 2015-09-20)

• 临床研究 •

2014 年某市婴幼儿腹泻 A 群轮状病毒检测结果分析

朱中华¹, 张茂海¹, 张 斌²

(1. 大冶市人民医院检验科, 湖北黄石 435100; 2. 大冶市妇幼保健医院, 湖北黄石 435100)

摘要:目的 分析大冶市 2014 年婴幼儿腹泻患儿 A 群轮状病毒检测结果并探讨其发病规律。方法 采用胶体金免疫层析法对 2014 年 1~12 月 3 459 例门诊腹泻婴幼儿粪便进行 A 群轮状病毒抗原检测, 并对结果进行统计分析。结果 检出腹泻婴幼儿 A 群轮状病毒阳性 775 例, 阳性率为 22.40%; 其中 6 个月至小于 2 岁为 A 群轮状病毒感染的高发年龄段, 阳性率为 35.77%; 1、4、10~12 月为 A 群轮状病毒感染的高发时间。男女患儿 A 群轮状病毒感染阳性率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。小于 6 个月腹泻婴幼儿中, 母乳喂养者 A 群轮状病毒感染阳性率 (4.85%) 低于人工喂养者 (27.73%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 轮状病毒是引起婴幼儿腹泻的主要病原体之一, 该病的发生以 6 个月至小于 2 岁婴幼儿为主, 应根据其易感人群、传播途径、流行时间做到早预防、早检测、早诊断、早治疗。

关键词: 婴幼儿; 腹泻; 轮状病毒

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.05.050

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)05-0687-02

小儿急性感染性胃肠炎(简称腹泻)是仅次于呼吸道感染的儿童常见多发病, 其发病率在发达国家与发展中国家都较高, 我国人群每年约为 1.76 次/人, 其病原体主要有细菌、病毒、原虫等, 其中以病毒最为多见, 尤其是轮状病毒^[1]。为了解本地区婴幼儿腹泻轮状病毒感染情况, 笔者回顾性分析 2014 年 3 459 例婴幼儿腹泻 A 群轮状病毒检测结果, 具体结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 所有标本来自 2014 年 1~12 月 3 459 例门诊腹泻患儿, 男 1 958 例, 女 1 501 例; 年龄均小于 5 岁, 其中年龄小于 6 个月者 428 例, 6 个月至小于 2 岁者 1 465 例, 2~<3 岁者 1 023 例, 3~<5 岁者 543 例; 年龄小于 6 个月的患儿中, 母乳喂养者 309 例、人工喂养者 119 例。

1.2 方 法

1.2.1 检测方法 留取患儿粪便进行常规检测和轮状病毒检测。大便常规检测严格按照《全国临床检验操作规程》(第 3 版)^[2]进行, 轮状病毒检测采用胶体金免疫层析技术, 试剂由深圳市惠安生物科技有限公司提供。取适量粪便(约 50 mg)样品放入装有稀释液的瓶内, 搅拌混匀后, 加入 3 滴(约 120 μ L)粪便上清液, 室温平置, 10~20 min 内判读结果。

1.2.2 结果判断 测试卡出现 2 条红色线则判为阳性, 即标本中含有轮状病毒; 只出现红色质控线则判为阴性, 即标本中未检出轮状病毒; 测试卡不出现红色质控线则判为无效, 应重新检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理与统计分析, 计数资料以例数或百分率表示, 采用 χ^2 检验进行比较分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同性别腹泻患儿 A 群轮状病毒感染阳性率比较 1 958 例男性腹泻患儿中 A 群轮状病毒感染阳性 450 例, 阳性率为 22.98%(450/1 958); 1 501 例女性腹泻患儿中 A 群轮状病毒感染阳性 325 例, 阳性率为 21.65%(325/1 501)。男女患儿 A 群轮状病毒感染阳性率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各年龄段腹泻患儿 A 群轮状病毒感染阳性率 各年龄段腹泻患儿 A 群轮状病毒感染阳性率存在差异, 6 个月至小于 2 岁患儿阳性率较高。见表 1。

2.3 小于 6 个月患儿不同喂养方式者 A 群轮状病毒感染阳性率比较 母乳喂养患儿 A 群轮状病毒感染阳性率为 4.85%(15/309), 人工喂养患儿感染阳性率为 27.73%(33/119), 两