

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.07.040

宫颈癌组织中 Th1/Th2 类细胞因子的漂移研究 *

李志杰¹ 啜俊波² 林楠¹ 刘磊¹ 王晶¹

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院妇产科 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 哈尔滨医科大学附属第四医院心外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:观察宫颈癌组织中 Th1/Th2 类细胞因子的漂移情况。**方法:**选以 IL-2 和 IFN- γ 代表 Th1 类细胞因子, IL-4 和 IL-6 代表 Th2 类细胞因子, 通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 25 例宫颈癌组织 Th1/Th2 类细胞因子 mRNA 的表达。**结果:**IIIB 期宫颈癌组织中, Th1 型细胞因子的表达显著低于 IB 期、IIA 期、IIB 期, Th2 型细胞因子的表达显著高于 IB 期、IIA 期、IIB 期, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。I 期和 II 期宫颈癌以 Th1 型细胞因子表达为主。25 例宫颈癌组织中, 13 例呈典型的 Th1 类细胞因子的强势表达, 7 例为 Th2 型, 5 例为 Th0 型, 随着宫颈癌分期的增高, 由 Th1 向 Th2 漂移($P<0.05$)。**结论:**IB 期、IIA 期、IIB 期宫颈癌患者组织中细胞因子呈 Th1 状态, IIIA 期呈 Th0 状态, IIIB 期呈 Th2 状态, 随着宫颈癌分期的增高, 由 Th1 向 Th2 漂移。

关键词:宫颈癌; Th1; Th2; 漂移

中图分类号:R737.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)07-1357-04

Shift of Th1/Th2 Type Cytokine in Patients with Cervical Cell Carcinoma*

LI Zhi-jie¹, CHUAI Jun-bo², LIN Nan¹, LIU Lei¹, WANG Jing¹

(1 Department of Obstetrics and Gynecology, Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China; 2 Department of cardiac surgery, Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To study the shift of Th1/Th2 in patients with cervical cell carcinoma. **Methods:** The mRNA expression of Th1/Th2 cytokines in 25 cervical cell carcinoma tissues were detected by RT-PCR using IL-2 and IFN- γ as Th1 cytokine genes and IL-4 and IL-6 as Th2 cytokine genes. **Results:** The mRNA expression of Th1 cytokines were significantly lower in the IIIB phase than those in the IB phase, IIA phase and IIB phase ($P<0.05$). The mRNA expression of Th2 cytokines were significantly higher in the IIIB phase than those in the IB phase, IIA phase and IIB phase ($P<0.05$). Th1 type cytokines were mainly expressed in the phase I and II cervical cell carcinoma, in 25 cases of cervical cell carcinoma, 13 cases showed strong expression of Th1 type cytokines typical of 25 cases of cervical carcinoma, 7 cases of type Th2, 5 cases of type Th0, the shift from Th1 to Th2 with the stage increased ($P<0.05$). **Conclusion:** The Th1 state was the cytokine IB stage, IIA stage, IIB stage patients with cervical cancer tissues, IIIA was Th0, IIIB was Th2, the shift from Th1 to Th2 with the stage increased.

Key words: Cervical cell carcinoma; Th1; Th2; Shift

Chinese Library Classification(CLC): R737.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)07-1357-04

前言

宫颈癌是危害妇女生命与健康的主要恶性肿瘤之一, 其发病率占女性生殖器恶性肿瘤首位, 在导致女性死亡的肿瘤中, 居第二位。宫颈癌的发生和发展是一个多步骤、多基因、多因素、多阶段、持续感染的过程^[1]。研究资料表明高危型人乳头瘤病毒(HR-HPV)感染导致 DNA 及其他细胞成分的损伤, 是引起宫颈上皮内瘤变(CIN)和子宫颈癌的主要原因^[2,3]。但最终只有 3% 的感染者会发展为宫颈癌, 从感染到宫颈癌发生平均需要 5-10 年, 这说明单独 HPV 感染不足以引起肿瘤发生, 还需要其他因素, 如机体免疫状态、遗传因素以及某些物理化学因素的协同作用, 其相互作用机制和致癌机理还需要进一步研究^[4,5]。肿瘤的发生与机体的免疫功能密切相关。如果机体免疫

功能低下、缺陷或受抑制则易患肿瘤; 而如果肿瘤活跃生长、浸润转移, 则机体免疫功能又会受抑制, 两者互为因果, 互相影响。有研究表明, 结直肠癌、胃癌、乳腺癌等多种肿瘤患者体内均存在 Th1 向 Th2 的漂移, 且随着肿瘤恶性程度的增加, 这种漂移也更加明显^[6-8]。本实验通过检测宫颈癌组织 Th1、Th2 类细胞因子的表达, 研究宫颈癌 Th1/Th2 的漂移情况, 旨在探讨 Th1/Th2 的漂移在宫颈癌生长过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源

标本来源于在我院住院的宫颈癌手术患者共 25 例, 患者年龄 29~53 岁, 平均 37.9 ± 3.71 岁, 其中鳞状细胞癌 23 例, 腺癌 3 例, 所有病例 FIGO 妇科恶性肿瘤分期标准见表 1。

* 基金项目: 黑龙江省教育厅资助项目(12511199)

作者简介: 李志杰(1978-), 女, 主治医师, 研究方向: 妇科肿瘤, E-mail: lizhijie1978@126.com

(收稿日期: 2013-08-14 接受日期: 2013-09-11)

表 1 25 例宫颈癌患者的 FIGO 妇科恶性肿瘤分期情况(例)

Table 1 FIGO gynecological malignant tumor staging of 25 cases of cervical cell carcinoma

IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB
0	3	2	12	3	5

1.2 试剂及仪器

引物设计按引物常规要求设计,为跨目的基因内含子、含两个外显子部分碱基的序列,并经 blastn 基因库搜索(南京金

斯瑞生物科技有限公司合成),RT-PCR 反应仪为美国 ABI 7700 (PE 公司)。

表 2 RT-PCR 检测 Th1/Th2 相关细胞因子的引物序列

Table 2 Primer sequences of Th1/Th2 related cytokines detected by RT-PCR

Cytokines	Sequences	Length (bp)
β -actin	5'ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTT3' 5'GTTAGTGTGAGATGATGCTTTGAC3'	456
IL-2	5'GACGGATCCGCCAGAGCAAGAATGTGTCAC3'	520
IFN- γ	5'GAGGGATCCTGGATCAGAACCTAACTGCAGGGC3' 5'ATGGGTCTCACCTCCCAACTGCT3'	452
IL-4	5'CGAACACTTTGAATATTCTCTCTCAT3'	
IL-6	5'ATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA3' 5'GTTTCGTATCTTCATTGTCAT3'	248

Trizol、5 $\times$ Strand buffer、0.1M DTT、SSR II (上海史瑞克生物科技有限公司),OligodT 由上海生物工程公司合成,M-MLV 逆转录酶(上海亨代生物仪器有限公司),含 GAPDH 基因上、下游引物和 VIC 标记探针的 20 $\times$ Human GAPDH、2 $\times$ PCR master mix、dNTPs(美国 PE 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本的获取 无菌手术切除新鲜癌组织大小约 0.2 cm $\times$ 0.2 cm $\times$ 0.2 cm,用生理盐水冲洗 2~3 遍,采用 Eppendorf 管收集,-70 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.3.2 组织总 RNA 的提取 采用异硫氰酸胍一步法提取。剪碎标本,按 100 mg/500 μ L GIT 变性液比例混匀,另加 2mM 醋酸钠、水饱和酚和氯仿,分别为 50 μ L、500 μ L、100 μ L;先混匀,1200 rpm 离心 10 min,加相同剂量异丙醇,-20 $^{\circ}$ C 留置 1h。4 $^{\circ}$ C 1200 rpm 离心 10 min,弃上清液。再加 100 μ L GIT 变性液方法同上混匀,离心、弃上清液;用 75%酒精冲洗一次,加 1 mL 无水酒精,-70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.3 逆转录反应 5~10 g 组织总 RNA 加入 5 $\times$ buffer 4 μ L,0.1 mol/LDTT 2 μ L,M-MLV 1 l(200U),4 $\times$ dNTP(10 mmol/L,每种)1 μ L,下游引物 P20.5 μ L(50pmol/L),总反应体积 20 μ L。37 $^{\circ}$ C 条件下放置 1 h,充分反应,95 $^{\circ}$ C 高温下灭活 M-MLV 10 min。

1.3.4 PCR 反应 在 20 μ L RT 反应产物中,加入 10 $\times$ buffer 10 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 8 μ L,4 $\times$ dNTP1 μ L,上游引物 P10.5 μ L(50 pmol/L),100 μ L 液体石蜡,95 $^{\circ}$ C 高温下 5 min,加入 Taq DNA 聚合酶 2 μ L(1U/l)。循环条件:94 $^{\circ}$ C 1 min,58 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延长 7 min。

1.3.5 琼脂糖凝胶电泳及其图像分析 采用 1.5%琼脂糖凝胶固定 PCR 产物后电泳,电泳条件:75V 恒压,时间 20~30min。拍

照后输入美国 Kodak 凝胶分析系统,参照物为 β -actin,强度以细胞因子 A 值 / 参照物 A 值表达,强度大小如下:① ≥ 0.75 :++++;② 0.74~0.5:+++;③ 0.49~0.25:++;④ ≤ 0.24 :+;⑤ 无表达:-。

1.3.6 Th1/Th2 漂移状态的判定 IL-2、IFN- γ 代表 Th1 类细胞因子,IL-4、IL-6 代表 Th2 类细胞因子,漂移状态表达如下:① Th1 状态:仅 IL-2、IFN- γ 表达强度高;② Th2 状态:仅 IL-4、IL-6 表达强度高;如果四种细胞因子均未表达或表达强度一致或类似,则为 Th0 型细胞因子表达。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同分期的宫颈癌组织中 IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-6 的表达情况

不同分期的宫颈癌组织中 IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-6 的表达情况见表 3。Th1 型细胞因子表达,IIIB 期比 IB 期、IIA 期、IIB 期低,均有显著性差异($P < 0.05$)。Th2 型细胞因子表达,IIIB 期比 IB 期、IIA 期、IIB 期高,均有显著性差异($P < 0.05$)。I 期和 II 期宫颈癌以 Th1 型细胞因子表达为主。

2.2 不同分期的宫颈癌组织中 Th1/Th2 的偏移状况

25 例宫颈癌组织中,13 例呈典型的 Th1 类细胞因子的强势表达,7 例为 Th2 型,5 例为 Th0 型,随着宫颈癌分期的增高,由 Th1 向 Th2 漂移。见表 4。

3 讨论

T 淋巴细胞介导的免疫应答在抗肿瘤免疫过程中发挥着

表 3 不同分期的宫颈癌组织中 Th1 和 Th2 类细胞因子的 mRNA 阳性率

Table 3 Positive rate of the mRNA of Th1 and Th2 types of cytokines in the different stages of cervical cancer

Stage	n	IL-2	IFN- γ	IL-4	IL-6
IB	3	2/3*	2/3*	1/3*	1/3*
IIA	2	2/2*	2/2*	0/2*	1/2*
IIB	12	10/12*	8/12*	2/12*	3/12*
IIIA	3	1/3	0/3	2/3	2/3
IIIB	5	0/5	1/5	5/5	4/5

注:* 与 IIIB 比较, $P < 0.05$ 。Note: compared with IIIB, $P < 0.05$.

表 4 不同分期的宫颈癌组织中 Th1/Th2 的偏移状况

Table 4 Shift of Th1/Th2 cytokines in different stages of cervical cancer

Shfit	n	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB
Th1	13	2/3*	2/2*	8/12*	1/3*	0/5
Th0	5	1/3	0/2	2/12	1/3	1/5
Th2	7	0/3*	0/2*	2/12*	1/3	4/5

注:* 与 IIIB 比较, $P < 0.05$ 。Note: compared with IIIB, $P < 0.05$.

重要作用。辅助性 T 淋巴细胞(helper T cell, Th)是指能帮助 B 细胞分化成抗体产生细胞和放大细胞免疫应答的一个细胞群,其表达 CD4 而不表达 CD8,是 CD4+Th 细胞。辅助性 T 淋巴细胞不仅能够直接杀死肿瘤细胞,还能诱导抗肿瘤的免疫应答以及维持免疫记忆^[9]。不同的抗原刺激,诱导辅助性 T 淋巴细胞分别分化成 Th1、Th2。其中 Th1 类细胞因子包括 IL-2、IFN- γ 等,主要功能为介导细胞免疫,增强细胞毒性,还能介导迟发型超敏反应;Th2 类细胞因子包括 IL-4、IL-6、IL-10 等,主要功能为介导体液免疫,生成新的抗体^[10]。Th1 和 Th2 细胞彼此进行相互交叉调节和相互抑制,故在免疫应答的起始阶段,如果机体免疫系统选择了某一亚群为主的应答,这种 Th 细胞就会正反馈的加强自身优势,抑制另一亚群分化,导致 Th1/Th2 的平衡失调,称为 Th1/Th2 的偏移。Th1/Th2 的偏移与许多疾病的发生、发展、治疗和转归有密切的关系^[11]。机体本身存在的抗肿瘤机能是以 Th1 介导的细胞免疫发挥着主要作用,当 Th1 向 Th2 漂移时,机体的抗肿瘤免疫功能将受到限制,形成免疫抑制,肿瘤逃避免疫^[12,13]。Th1 能转化为 Th2,但 Th2 不能直接转化为 Th1,需要 Th0 的过渡^[14,15]。

人乳头瘤病毒(HPV)与宫颈癌的发生关系密切^[16-17],研究表明,宫颈感染 HPV 后会出现 Th1 向 Th2 漂移现象,患者细胞免疫受到抑制,使肿瘤细胞逃避免疫反应,细胞基因变异、癌基因激活、端粒酶活性异常,最终导致宫颈癌的发生^[18-19]。因此, Th1/Th2 平衡失调在 HPV 诱发宫颈癌的过程中起着关键作用。Warrino 等^[20]的研究结果也表明,在宫颈癌的进展过程中,在功能性 CD4+T 细胞对两个新型 HPV-16E7 (一种 HPV 肿瘤蛋白)表位的应答中,存在 Th1 向 Th2 漂移。但 Pardo-Govea 等^[21]的研究发现不论 HPV 是否阳性,癌前病变患者中 Th1 型免疫应答占主导地位。本组研究显示,IIIB 期 Th1 型细胞因子的表达显著低于 IB 期、IIA 期、IIB 期,而 Th2 型细胞因子的表达显著高于 IB 期、IIA 期、IIB 期。I 期和 II 期宫颈癌以 Th1 型细胞

因子表达为主,癌组织中 Th1 类细胞因子的表达水平随着肿瘤临床 TNM 分期的增高而降低,提示宫颈癌患者可能由于 Th1 细胞受到抑制,细胞免疫功能不能有效地激活,抗肿瘤免疫能力下降,从而抑制了机体组织以细胞免疫为主的抗肿瘤免疫反应,使肿瘤细胞得以生长和增殖。

综上所述,随着宫颈癌分期的增加,组织中存在 Th1 类细胞因子向 Th2 类细胞因子的漂移。如果能采取措施使 Th2 向 Th1 逆转,将为肿瘤的免疫治疗提供一种新的方法^[22,23],一方面可应用 Th1 型细胞因子进行免疫治疗,另一方面应用抗 Th2 型细胞因子进行抗体治疗,增强机体的细胞免疫,封锁细胞的免疫逃避,杀灭残余的肿瘤细胞,减少肿瘤转移,提高宫颈癌的疗效。

参考文献(References)

- [1] Saslow D, Solomon D, Lawson HW, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(3): 147-172
- [2] Eide ML, Debaque H. HPV detection methods and genotyping techniques in screening for cervical cancer[J]. Ann Pathol, 2012, 32(6): e15-23
- [3] Wiwanitkit V. Cervista HPV HR Test Kit in Cervical Cancer Screening[J]. J Low Genit Tract Dis, 2013, 17(1): 99
- [4] Sasagawa T, Takagi H, Makinoda S. Immune responses against human papillomavirus(HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer[J]. J Infect Chemother, 2012, 18(6): 807-815
- [5] Schwarz TF, Spaczynski M, Schneider A, et al. Persistence of immune response to HPV-16/18 AS04-adjuvanted cervical cancer vaccine in women aged 15-55 years[J]. Hum Vaccin, 2011, 7(9): 958-965
- [6] Krohn M, Listing M, Tjahjono G, et al. Depression, mood, stress, and Th1/Th2 immune balance in primary breast cancer patients under-

- going classical massage therapy[J]. Support Care Cancer, 2011, 19(9): 1303-1311
- [7] Matsuda A, Furukawa K, Suzuki H, et al. Does impaired TH1/TH2 balance cause postoperative infectious complications in colorectal cancer surgery[J]. J Surg Res, 2007, 139(1): 15-21
- [8] Xu Y, Gao J, Su Z, et al. Downregulation of Hlx Closely Related to the Decreased Expressions of T-bet and Runx3 in Patients with Gastric Cancer May Be Associated with a Pathological Event Leading to the Imbalance of Th1/Th2[J]. Clin Dev Immunol, 2012, 2012: 949821
- [9] Diaconu CC, Neagu AI, Lungu R, et al. Plasticity of regulatory T cells under cytokine pressure[J]. Roum Arch Microbiol Immunol, 2010, 69(4): 190-196
- [10] Mosmann TR, Koebe JJ, Lee FE, et al. T helper cytokine patterns: defined subsets, random expression, and external modulation[J]. Immunol Res, 2009, 45(2-3): 173-184
- [11] Netea MG, Van der Meer JW, Sutmoller RP, et al. From the Th1/Th2 paradigm towards a Toll-like receptor/T-helper bias [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(10): 3991-3996
- [12] Lu K, Feng X, Deng Q, et al. Prognostic role of serum cytokines in patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. Onkologie, 2012, 35(9): 494-498
- [13] Hetland G, Johnson E, Lyberg T, et al. The Mushroom Agaricus blazei Murill Elicits Medicinal Effects on Tumor, Infection, Allergy, and Inflammation through Its Modulation of Innate Immunity and Amelioration of Th1/Th2 Imbalance and Inflammation [J]. Adv Pharmacol Sci, 2011, 2011: 157015
- [14] Wassink L, Vieira PL, Smits HH, et al. ICOS expression by activated human Th cells is enhanced by IL-12 and IL-23: increased ICOS expression enhances the effector function of both Th1 and Th2 cells[J]. J Immunol, 2004, 173(3): 1779-1786
- [15] Tazaki T, Minoguchi K, Yokoe T, et al. Allergen rush immunotherapy increases interleukin (IL)-12 production and IL-12 receptor beta2 chain expression in patients with allergic asthma [J]. Cell Immunol, 2004, 228(1): 20-26
- [16] Haesebaert J, Lutringer-Magnin D, Kalecinski J, et al. French women's knowledge of and attitudes towards cervical cancer prevention and the acceptability of HPV vaccination among those with 14-18 year old daughters: a quantitative-qualitative study[J]. BMC Public Health, 2012, 12: 1034
- [17] Ogilvie GS, Krajden M, van Niekerk DJ, et al. Primary cervical cancer screening with HPV testing compared with liquid-based cytology: results of round 1 of a randomised controlled trial - the HPV FOCAL Study[J]. Br J Cancer, 2012, 107(12): 1917-1924
- [18] Lee BN, Follen M, Shen DY, et al. Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated CD4⁺ T cells of women with human papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesions[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2004, 11(2): 239-244
- [19] Bais AG, Beckmann I, Lindemans J, et al. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions [J]. J Clin Pathol, 2005, 58(10): 1096-1100
- [20] Warrino DE, Olson WC, Knapp WT, et al. Disease-stage variance in functional CD4⁺ T-cell responses against novel pan-human leukocyte antigen-D region presented human papillomavirus-16 E7 epitopes[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(10): 3301-3308
- [21] Pardo-Govea T, Callejas D, Núñez-Troconis J, et al. Gamma interferon (IFN-gamma), tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukins 2, 4 and 6 (IL-2, IL-4, IL-6) in cervical-uterine cells of intraepithelial neoplasia: a preliminary report [J]. Invest Clin, 2005, 46(1): 5-13
- [22] Indrová M, Bieblová J, Bubeník J, et al. IL-12 immunotherapy of minimal residual disease in murine models of HPV16-associated tumours: induction of immune responses, cytokine production and kinetics of immune cell subsets[J]. Int J Oncol, 2008, 32(2): 499-507
- [23] Carpentier AF. Cancer immunotherapy with CpG-ODN [J]. MedSci (Paris), 2005, 21(73): 77