

讨 论

研究发现异烟酰异丙肼和丙咪嗪均具有振奋情绪、缓解抑郁的作用,并被证明能够提高 5-羟色胺(5-HT)和去甲肾上腺素(NE)在细胞外液中的浓度,作用机制是抑制其分解代谢酶的活性或阻断递质再摄取,故有研究者提出抑郁症可能是由于相关脑区中单胺类递质缺乏所致,这就是经典的单胺假说。单胺假说在近 50 多年来一直是抑郁症发病及治疗研究的核心内容。然而,这种仅因物质浓度变化就能导致复杂心境障碍的理论,已受到广泛的质疑,人们开始关注抗抑郁药作用于单胺系统后的下游改变(如基因表达、神经网络变化等)^[10]。

蔡兵等应用小鼠悬尾法、5-羟色胺酸诱发小鼠甩头法、阿扑吗啡诱导小鼠刻板行为法以及小鼠全脑单胺递质含量测量法等,综合评价巴戟天中的菊淀粉型低聚糖类 4 种单体成分的抗抑郁药理作用。实验结果表明它们在不影响小鼠自发活动的剂量下显著缩短小鼠悬尾抑郁模型的不动时间,并影响单胺类递质神经系统,初步表明这些寡糖的抗抑郁作用可能主要通过 5-羟色胺能神经系统起作用。

谭宝璇等研究发现,巴戟素可提高衰老大鼠学习、记忆能力,其作用可能与增强海马突触传递的 LTP 效应有关。林芳花等研究发现,巴戟甲素可提高正常雄性小鼠交配能力和免疫力,并且能显著增加正常小鼠体重和胸腺重量,提示巴戟甲素具有增强体质,提高机体免疫力的作用,并初步认为巴戟甲素为巴戟天补肾壮阳主要有效成分。

本实验结果显示,巴戟天水提液能显著提高自然衰老小鼠负重游泳时间,且在一定浓度范围内呈剂量

关系,并提高大鼠脑中能提高记忆的 NE、E、DA 的含量,同时降低能阻抑记忆的 5-HT 的含量,表明巴戟天水提液可以通过改变脑内单胺类神经递质的含量而益脑。

参考文献

- 1 林励,王素英,黎鸿华,等. 分光光度法测定巴戟天糖含量[J]. 江西中医学院学报, 1993, 5(2):20, 23
- 2 陈地灵,帅欧,林励,等. 炮制方法对巴戟天糖类成分的影响研究[J]. 中国药房, 2012, 23(1):167-169
- 3 肖凤霞,林励. 巴戟天补肾壮阳作用的初步研究[J]. 食品与药品, 2006, 8(5A):45-46
- 4 谭炳炎,郑琳,冯翔. 高效液相色谱/电化学法测定大鼠血液和脑组织中单胺类物质的含量[J]. 分析测试学报, 2006, 25(2):90-92
- 5 王晓良. 应用分子药理学[M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 2005:150
- 6 韩新功. 负重游泳实验小鼠接受刺五加多糖干预后生化学指标的变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(51):10300-10303
- 7 Kim C, Speisky MB, Kharouba SN. Rapid and sensitive method for measuring norepinephrine, dopamine, 5-hydroxytryptamine and their major metabolites in mt brain by high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr, 1987, 86: 25-35
- 8 Philip J, Gunasingh JM, Kirubakaran R, et al. The protective role of DL-a-lipoic acid in biogenic amine catabolism triggered by A β amyloid vaccination in mice [J]. Brain Research Bulletin, 2005, 65:361-367
- 9 周改莲,王莲婧,林励,等. 脑忆源片对大鼠脑组织中 5 种单胺类递质含量的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(1):72-75
- 10 郭雨欣,邢国刚. 抑郁症的生物学机制研究进展[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2012, 38(1):57-60

(收稿日期:2013-12-05)

(修回日期:2014-01-02)

肺癌患者外周血 Th17/Treg 细胞与维生素 D 检测的临床价值

王茂峰 王攀 应俊 陈德宝 蒋小伟 楼永刚 张巧红 万汝根

摘要 目的 探讨肺癌患者外周血 Th17、Treg 细胞与 25-羟基维生素 D 检测的临床价值。**方法** 收集笔者医院 2012 年

基金项目:浙江省金华市科学技术研究计划项目(2012-3-083)

作者单位:322100 浙江省东阳市人民医院检验科(王茂峰、陈德宝、蒋小伟、楼永刚、张巧红、万汝根);317700 浙江省台州市中心医院医学检验科(王攀);325035 温州医科大学检验学院(应俊)

通讯作者:王茂峰,电子信箱:wzmcmf@163.com

3月~2013年1月新入院肺癌患者78例,其中腺癌40例,鳞状细胞癌28例,小细胞癌10例,选取年龄和性别与其相匹配的50例健康体检者作为对照组。分析25-羟基维生素D与外周血Th17、Treg细胞在各组间的差异及其相关性。**结果** 肺腺癌患者外周血Treg细胞、Th17细胞百分比为 $(6.23\% \pm 1.27\%, 0.362\% \pm 0.067\%)$,肺鳞状细胞癌外周血Treg细胞、Th17细胞百分比为 $(4.95\% \pm 1.23\%, 0.402\% \pm 0.078\%)$,对照组外周血Treg细胞、Th17细胞百分比为 $(3.87\% \pm 1.21\%, 0.609\% \pm 0.097\%)$,肺癌患者外周血Treg细胞、Th17细胞百分比与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);肺癌患者血浆25-羟基维生素D浓度为 $24.5 \pm 6.8 \text{ ng/ml}$,低于健康对照组 $35.1 \pm 8.7 \text{ ng/ml}$,差异均有统计学意义($P < 0.05$);肺癌患者外周血Treg细胞、Th17细胞、Th17/Treg细胞比例与25-羟基维生素D没有明显相关性($r = -0.167, r = 0.389, r = 0.455, P < 0.05$)。**结论** 肺癌患者血浆25-羟基维生素D、Th17、Treg细胞比例异常,提示肺癌患者血浆25-羟基维生素D与Th17、Treg细胞检测对治疗和预后监测具有一定临床价值。

关键词 肺癌 25-羟基维生素D 调节性T细胞(Treg细胞) 辅助性T细胞

[中图分类号] R734 [文献标识码] A

Detection of Peripheral Blood T Helper Cell 17(Th17)/Treg Cell and 25(OH) Vitamin D in Patients with Lung Cancer and Its Clinical Value. Wang Maofeng, Wang Pan, Ying Jun, et al. Department of Clinical Laboratory Medicine, Dongyang People's Hospital, Zhejiang 322100, China

Abstract Objective To investigate peripheral blood Th17/Treg cell and 25(OH) vitamin D in patients with lung cancer and its clinical value. **Methods** From March 2012 to January 2013, 78 cases newly admitted patients with lung cancer in our hospital were enrolled, including 40 cases of adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, 28 cases, 10 cases of small cell carcinoma; age and sex matched 50 healthy volunteers were selected as a control group. 25(OH) vitamin D and Th17/Treg cell in the differences among the groups and their correlation were analyzed. **Results** Treg and Th17 cells percentage in the peripheral blood of lung adenocarcinoma cancer patients were $(6.23\% \pm 1.27\%, 0.362\% \pm 0.067\%)$, of lung squamous cell carcinoma were $(4.95\% \pm 1.23\%, 0.402\% \pm 0.078\%)$. Treg and Th17 cells percentage of control group were $(3.87\% \pm 1.21\%, 0.609\% \pm 0.097\%)$. Compare with the control group, the difference in Treg cells and Th17 cell percentage of lung cancer patients was statistically significant ($P < 0.05$). Plasma 25(OH) vitamin D concentration of lung cancer patients were $24.5 \pm 6.8 \text{ ng/ml}$, which was lower than the healthy control group ($35.1 \pm 8.7 \text{ ng/ml}$), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). There was correlation between peripheral blood Treg and Th17 cells percentage, Th17/Treg ratio and 25(OH) vitamin D in patients with lung cancer ($r = -0.167, r = 0.389, r = 0.455, P < 0.05$). **Conclusion** 25(OH) vitamin D concentration and Treg and Th17 cells percentage in Peripheral blood was abnormal in patients with lung cancer. Plasma 25(OH) vitamin D concentration and Treg and Th17 cells percentage detection are helpful for monitoring the treatment and prognosis of patients with lung cancer.

Key words Lung cancer; 25(OH) Vitamin D; Regulatory T cells, Treg cells; T helper cells

肺癌是发生率和病死率很高的恶性肿瘤之一,细胞免疫功能等多种因素影响肺癌的发生、发展。调节性T细胞(Treg细胞)具有免疫抑制功能,参与肿瘤免疫的调节,Treg细胞可以过度抑制效应T细胞,致使癌细胞逃脱机体的免疫监控而大量增殖^[1]。辅助性T细胞在机体免疫应答过程中也具有重要调节作用,辅助性T细胞17(Th17)及其分泌的众多细胞因子参与肿瘤免疫的调节,与机体抗肿瘤免疫有重要关系^[2]。维生素D除了调节体内钙、磷代谢之外,还具有诱导细胞分化、抑制细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡以及免疫调节作用,是癌症和其他慢性疾病风险的独立预示因子^[3]。因此,肺癌患者维生素D与Treg细胞、Th17细胞的关系值得探讨。本研究将收集临床肺癌外周血标本,采用电化学发光、流式细胞仪检测肺癌患者血浆25-羟基维生素D与Treg细胞、Th17细胞水平,并探讨两者的相关性及其临床价值,为肺

癌预防和干预提供科学依据。

对象与方法

1. 研究对象:收集笔者医院2012年3月~2013年1月新入院肺癌患者78例,年龄38~77岁,中位年龄57岁;其中男性41例,女性37例。纳入标准:经病理或细胞学、影像学检查确诊的肺癌患者,具有完整临床和病理资料,所有患者均无免疫相关性疾病和其他肿瘤病史,且无使用激素类药物及免疫抑制剂史。病理分型分类:腺癌40例,鳞状细胞癌28例,小细胞癌10例。健康对照组50名,均为笔者医院体检中心2010年6~8月健康体检者,其中男性26例,女性24例,年龄35~71岁,中位年龄57岁;均无糖尿病、类风湿、甲状腺功能亢进等自身免疫性疾病及免疫治疗史。所有研究对象均获得知情同意。

2. 研究方法:(1)主要试剂和仪器:CD45、CD3、CD4、CD25荧光标记单克隆抗体用于检测Treg细胞,CD3、CD8、IL-17荧光标记单克隆抗体用于检测Th17细胞,购自美国贝克曼库尔特有限公司,检测仪器为美国贝克曼库尔特FC500型流式细胞仪及配套前处理仪。25-羟基维生素D采用罗氏电化学

发光 Cobas 601 仪器检测,试剂、校准品、质控品均为罗氏原装配套产品。(2)样本采集:肺癌患者在治疗前取血,两组均在清晨空腹抽取外周静脉血两管,其中一管 EDTA - K2 抗凝 2ml,标本在 6h 之内测定 Treg 细胞,另一管非抗凝 5ml,离心分离血清后保存于 -80°C 冰箱待检。(3)检测方法:两组抗凝标本常规处理后,先用 FACS comp 调整流式细胞仪的电压及补偿,再进行设门选取分析(图 1)。每个样本用贝克曼公司配套软件分析 12000 个淋巴细胞。25 - 羟基维生素 D 检测按照电化学发光检测标准操作,在定标和质控均通过后检测样本。

3. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,正态分布和方差分析采用 *Shapiro - Wilk* 检验评估,正态分布资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间比较采用两独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。非正态分布资料采用中位数(四分位数间距)表示,两组间比较采用 *Mann - Whitney U* 检验。多组间比较采用 *Kruskal - Wallis H* 检验,相关分析采用

Spearman 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 肺癌患者外周血 Treg 细胞与 Th17 细胞水平:肺腺癌患者外周血 Treg 细胞百分比为 $6.23\% \pm 1.27\%$,肺鳞状细胞癌外周血 Treg 细胞百分比为 $4.95\% \pm 1.23\%$,对照组外周血 Treg 细胞百分比为 $3.87\% \pm 1.21\%$,肺癌患者外周血 Treg 细胞百分比高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。肺腺癌患者外周血 Th17 细胞百分比为 $0.362\% \pm 0.067\%$,肺鳞状细胞癌外周血 Th17 细胞百分比为 $0.402\% \pm 0.078\%$,对照组外周血 Th17 细胞百分比为 $0.609\% \pm 0.097\%$,肺癌患者外周血 Th17 细胞百分比低于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),详见图 1。

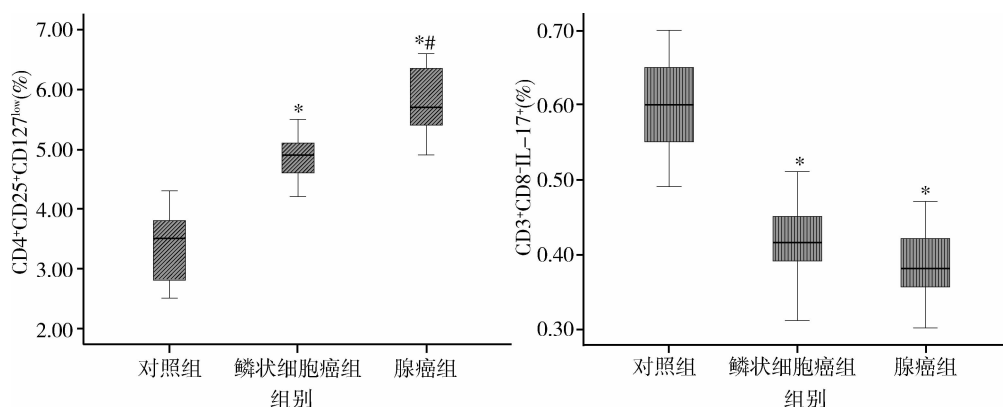


图 1 肺癌患者血浆 Th17 细胞相关因子检测结果

与对照组比较, * $P < 0.05$;与鳞状细胞癌组比较, # $P < 0.05$

2. 肺癌患者血浆 25 - 羟基维生素 D 水平与 Th17/Treg 细胞比例:肺癌患者血浆 25 - 羟基维生素 D 浓度为 $24.5 \pm 6.8\text{ng/ml}$,低于健康对照组 $35.1 \pm 8.7\text{ng/ml}$,差异有统计学意义($t = 4.251, P < 0.05$)。肺腺癌患者外周血 Th17/Treg 细胞比例为 0.067 ± 0.015 ,肺鳞状细胞癌外周血 Th17/Treg 细胞比例为 0.083 ± 0.024 ,对照组外周血 Th17/Treg 细胞比例为 0.186 ± 0.041 ,肺癌患者外周血 Th17/Treg 细胞比例低于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。血浆 25 - 羟基维生素 D 浓度、Th17/Treg 细胞比例在肺腺癌与肺鳞状细胞癌患者之间比较,差异没有统计学意义($P > 0.05$),详见图 2。

3. 肺癌患者外周血 Treg 细胞、Th17 细胞与 25 - 羟基维生素 D 相关性分析:经过 *Spearman* 相关分析,肺癌患者外周血 Treg 细胞、Th17 细胞、Th17/Treg 细胞比例与 25 - 羟基维生素 D 没有明显相关性($r =$

$-0.167, r = 0.389, r = 0.455, P < 0.05$)。

讨 论

本研究显示,肺癌患者外周血 Treg 细胞百分比高于健康对照组,肺腺癌患者 Treg 细胞比鳞状细胞癌患者有较高比例表达。有证据表明^[4],非小细胞肺癌患者外周血 Treg 细胞增加,Treg 细胞不仅在免疫耐受方面发挥重要作用,Treg 细胞也是有效的抗肿瘤免疫反应抑制剂。Treg 细胞选择性抑制宿主的免疫应答,并下调抗肿瘤免疫力,从而有助于肺癌的进展,这也可能是腺癌更容易进展和发生转移的原因^[5]。此外,本研究表明肺癌患者外周血 Th17 细胞百分比低于健康对照组。以往的研究也证实^[6],外周血 Th17 细胞在卵巢、肾和胰腺恶性肿瘤患者中均显著降低。这些研究均表明 Th17 细胞可能发挥抗肿瘤免疫的间接免疫效应的作用。可能与以下几个因素有关^[6]:首先,Th17 细胞可以表达几种效应细胞因

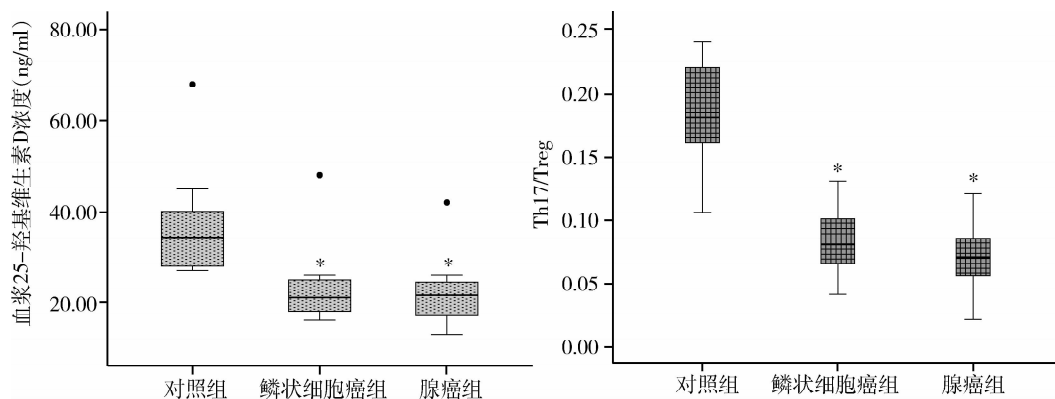


图2 肺癌患者血浆 25-羟基维生素 D 检测结果

与对照组比较, * $P < 0.05$

子,这表明与肿瘤相关的 Th17 细胞可能是功能性效应 T 细胞。其次, Th17 细胞与 $CD4^+$ T 和 $CD8^+$ T 细胞呈正相关而和 Treg 细胞呈负相关,本研究结果也证实了类似的结果。Martin - Orozco 等^[7]提供了直接证据, Th17 细胞在 IL - 17 缺陷小鼠中的抗肿瘤反应以一定的保护作用存在。因此, Th17 细胞降低在肺癌患者中可能促进肿瘤的生长,说明 Treg 细胞和 Th17 细胞参与的免疫系统可能影响肺癌的发生发展。肺癌患者外周血 25 - 羟基维生素 D 水平低于健康对照组,且存在维生素 D 缺乏者约占 60%。既往研究也证实了相似的结果, Grant^[8]对美国人群的研究提示太阳紫外线辐射(增加维生素 D)和肺癌病死率呈负相关。Mohr 等^[9]研究了多个国家的肺癌发生率,发现紫外线照射量与肺癌的发生率有关。这些研究均表明维生素 D 与肺癌存在密切关系。

进一步研究表明,肺癌患者外周血 Treg 细胞、Th17 细胞、Th17/Treg 细胞比例与 25 - 羟基维生素 D 没有明显相关性。有报道显示维生素 D 能促进树突状细胞产生 IL - 10,后者作为免疫抑制细胞因子,可以抑制 Th1 细胞产生 IL - 12,已证实维生素 D 在体外能抑制 T 细胞增殖和细胞周期从 G_{1a} 期向 G_{1b} 期的进展,它还能影响 T 细胞产生细胞因子^[10]。本研究属于横断面研究,样本例数也相对较少,未能全面说明维生素 D 与 Treg 细胞、Th17 细胞之间的关系,但是维生素 D 与 Treg 细胞、Th17 细胞之间的相互关系值得更深入地研究。总之,维生素 D 缺乏和 Treg 细胞、Th17 细胞异常可能增加肺癌患者的风险,检测维生素 D 和 Treg 细胞、Th17 细胞对肺癌患者具有一定

的临床价值,为肺癌预防和干预提供科学依据。

参考文献

- 余晓洋,王彩虹,李小峰. 树突状细胞对 Th17/Treg 免疫平衡调节的研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2013, 33(3):227 - 230
- 朱雪梅,刘素芳,刘小柳,等. 骨髓增生异常综合征患者调节性 T 细胞和 Th17 细胞水平[J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(6):548 - 549
- 钟慧,洪建国. 维生素 D 与肺部疾病[J]. 中华内科杂志, 2012, 51(2):159 - 161
- Erfani N, Mehrabadi SM, Ghayumi MA, *et al.* Increase of regulatory T cells in metastatic stage and CTLA - 4 over expression in lymphocytes of patients with non - small cell lung cancer (NSCLC) [J]. Lung Cancer, 2012, 77(2):306 - 311
- Schneider T, Kimpfler S, Warth A, *et al.* Foxp3(+) regulatory T cells and natural killer cells distinctly infiltrate primary tumors and draining lymph nodes in pulmonary adenocarcinoma[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(3):432 - 438
- Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(4):248 - 256
- 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
- Grant WB. Does solar ultraviolet irradiation affect cancer mortality rates in China? [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2007, 8(2):236 - 242
- Mohr SB, Garland CF, Gorham ED, *et al.* Could ultraviolet B irradiance and vitamin D be associated with lower incidence rates of lung cancer? [J]. J Epidemiol Community Health, 2008, 62(1):69 - 74
- Goettel JA, Scott Algood HM, Olivares - Villagómez D, *et al.* KSR1 protects from interleukin - 10 deficiency - induced colitis in mice by suppressing T lymphocyte interferon - γ production[J]. Gastroenterology, 2011, 140(1):265 - 274

(收稿日期:2013 - 12 - 02)

(修回日期:2013 - 12 - 25)