

## 吲哚胺 2,3-二氧酶(IDO)与 CINⅢ及 宫颈癌 T 淋巴细胞的相关性研究

杜世华,胡传玉,鲁大伟,李燕,桑琳

**摘要** 目的 研究吲哚胺 2,3-二氧酶(IDO)表达对于宫颈癌患者 T 淋巴细胞活性的影响,进一步了解子宫颈癌的免疫逃逸机制。方法 选择子宫颈上皮内瘤变Ⅲ级(CINⅢ)组织 20 例(CINⅢ组),子宫颈癌患者组织 20 例(宫颈癌组),正常宫颈组织 20 例(正常组),采用流式细胞仪检测各组外周血中 CD3<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs 数量、CD4<sup>+</sup>T 细胞/CD8<sup>+</sup>T 细胞。采用 Western blot 法和半定量 RT-PCR 法检测各组子宫颈组织 IDO mRNA 及其蛋白表达,分析各组子宫颈组织中 IDO 的表达对宿主 T 淋巴细胞活性的影响。结果 正常组、CINⅢ组及宫颈癌组 3 组之间 IDO 蛋白表达强度差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。宫颈癌组 IDO 表达高于 CINⅢ和正常组( $P < 0.001$ ),CINⅢ组高于正常组( $P < 0.001$ )。宫颈癌组外周血中 CD3<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs 数量与正常组和 CINⅢ组差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。3 组中 IDO 蛋白表达与外周血中 CD3<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>T 细胞/CD8<sup>+</sup>T 细胞呈负相关性,与 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs 呈正相关性。结论 IDO 抑制外周血 T 淋巴细胞对肿瘤的杀伤效应,使子宫颈癌患者免疫功能低下,有利于肿瘤细胞免疫逃逸,从而使病情进展。

**关键词** 吲哚胺 2,3-二氧酶;子宫颈癌;CINⅢ;T 淋巴细胞  
**中图分类号** R 737.33

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2015)10-1497-04

子宫颈癌在全球妇女的癌症死因中高居第 2 位,世界上每年新发病例大约为 40 多万例,死亡率约为 50%<sup>[1]</sup>。子宫颈癌细胞通过调节宿主机体相关免疫反应引起免疫耐受,在机体对子宫颈癌的免疫监控中,细胞毒性 T 淋巴细胞发挥了十分重要的作用<sup>[2]</sup>。肿瘤细胞可以逃避免疫系统的清除,在肿瘤微环境修饰和自身免疫编辑的作用下,成为可以存活的休眠期肿瘤细胞,在恶性肿瘤的发生、发展过程中,免疫逃逸发挥了重要的作用<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>表明,吲哚胺 2,3-二氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)相对分子量为 42 000,由 403 个氨基酸组

成,是一种催化色氨酸吲哚环氧化裂解的限速酶,IDO 能在许多肿瘤的肿瘤浸润组织、间质中表达,在肿瘤的发生、发展以及转移过程中起到非常重要的作用。最近对 IDO 的研究<sup>[5]</sup>中,显示其对 T 细胞的诱导增殖作用,引起了广泛的关注,暗示 IDO 可能在肿瘤的侵袭和转移中发挥了重要的作用。目前国内外对 IDO 在子宫颈癌患者机体免疫系统的影响的具体机制研究较少,该课题研究 IDO 在 CINⅢ及宫颈癌组织中的表达,探讨其对 T 淋巴细胞活性的调控及在子宫颈癌发生、发展中的机制,以期为子宫颈癌预防和治疗寻求新途径。

### 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 随机选择 2012 年 2 月~2015 年 1 月因子宫平滑肌瘤在安徽医科大学附属合肥医院妇产科手术患者的正常子宫颈组织 20 例,年龄 41~62 岁,中位年龄 49.5 岁;同期在我科手术的子宫颈癌患者 20 例,年龄 41~68 岁,中位年龄 49 岁。同期 CINⅢ患者 20 例,年龄 40~72 岁,中位年龄 49 岁。各组之间年龄差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**1.2 主要仪器及试剂** FACS Calibur 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司);Biorad MJ Mini 梯度 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);小鼠抗人 IDO 抗体、鼠抗人 CD4FITC CD8PE/CD3PE-Cy5、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 细胞检测试剂盒(美国 Biolegend 公司);IDO 上、下游引物及 GAPDH 上、下游引物由上海捷瑞生物工程公司合成。

**1.3 取材方法** 对纳入标准的宫颈癌及 CINⅢ患者于阴道镜下取病变组织,约 100~140 mg,子宫肌瘤患者于子宫切除术后取宫颈组织,约 100~140 mg,并置于液氮罐中冷冻保存。

**1.4 实验方法** 对符合标准的患者于取标本的第 2 天抽取空腹静脉血约 1 ml 置于抗凝管中通过流式细胞仪检测各组外周静脉血中 CD3<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs 的数量及 CD4<sup>+</sup>T 细胞/CD8<sup>+</sup>T 细胞,步骤按说明书。采用半定量 RT-PCR 法检测各组子宫颈组织中 IDO mRNA 及其蛋白含量的表达:将 RNA 浓度调至相同

2015-06-25 接收

作者单位:安徽医科大学附属合肥医院妇产科,合肥 230011

作者简介:杜世华,女,副主任医师,责任作者,E-mail:13855195735@

163.com

浓度,RT-PCR 检测各宫颈组织中的 IDO。IDO 上游引物: 5'-TTCAGTGCTTT-GACGTCCTG-3', 下游引物: 5'-CCTTTGGCTTCAGTTTTGA-3', 扩增片段 305 bp; GAPDH 上游引物: 5'-CAGCCTCAAGATCAT-CAGCA-3', 下游引物: 5'-GTCTTCTGGGTGGCAGT-GAT-3', 扩增片段 134 bp。Western blot 法检测各宫颈组织中 IDO 表达: 取 20 ~ 70 mg 组织加 400  $\mu$ l 去污剂裂解液,裂解 30 min,取上清液,蛋白定量后取 20  $\mu$ g 总蛋白分离,电转移蛋白至聚偏二氟乙烯膜上,室温下用 5% 牛血清蛋白封闭,分别与小鼠抗人 IDO 抗体、抗 GAPDH 抗体杂交过夜,用过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 孵育。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 Tamhane 法进行组间比较,采用 Bivariate 法进行相关性分析。

**2 结果**

**2.1 各组半定量 RT-PCR 检测结果** 正常组、CIN III 组、宫颈癌组 3 组半定量 RT-PCR 检测 IDO mRNA 值分别为  $0.724 \pm 0.0704$ 、 $0.3211 \pm 0.2242$ 、 $0.6218 \pm 0.1421$ 。采用 Tamhane 法进行组间比较显示宫颈癌组表达高于 CIN III 组和正常组 ( $P < 0.001$ ),CIN III 组则高于正常组 ( $P < 0.001$ ),差异均有统计学意义。



图1 各组宫颈组织 IDO mRNA 表达  
M: Marker; 1: CINIII 组; 2、3: 宫颈癌组; 4、5: 正常组

**2.2 Western blot 法检测 IDO 蛋白表达** 本实验结果显示,正常组中 65% (13/20) 出现了目的条带的显示,35% (7/20) 未见明显目的条带的显示,仅

有 2 例 (2/20, 10%) IDO 相对积分光密度值  $> 0.1$ 。CIN III 组织中相对积分光密度值  $> 0.1$  的有 15 例 (15/20, 75%), 相对积分光密度值  $< 0.1$  的有 4 例 (4/20, 20%), 1 例 (1/20, 5%) 未见目的条带。宫颈癌组在 45 ku 处均可见目的条带的显示 (20/20, 100%), 相对光密度值  $> 0.1$ 。对未出现目的条带显示的子宫颈组织相对积分光密度值标记为 0。分析显示正常组、CIN III 组和宫颈癌组中 IDO 蛋白的表达量均不同,3 组 IDO 表达相对积分光密度值分别为  $0.0485 \pm 0.0347$ 、 $0.2905 \pm 0.2641$ 、 $0.5115 \pm 0.1538$ , 差异均有统计学意义 ( $F = 45.548, P < 0.001$ )。采用 Tamhane 法进行比较显示宫颈癌组 IDO 蛋白表达明显高于 CIN III 组和正常组 ( $P < 0.001$ ), 而 CIN III 组明显高于正常组 ( $P < 0.001$ ), 差异均有统计学意义。

**2.3 IDO 表达与外周静脉血 CD3<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs 数量及 CD4<sup>+</sup>T 细胞/CD8<sup>+</sup>T 细胞的相关性** 流式细胞仪检测显示外周静脉血 T 细胞亚群数量变化见表 1。宫颈癌组外周静脉血中 CD3<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>T 细胞数量均低于正常组 ( $P < 0.001, P < 0.001, P < 0.01$ ) 和 CIN III 组 ( $P < 0.001, P < 0.001, P < 0.05$ ), 正常组和 CIN III 组差异无统计学意义 ( $P = 0.288, 0.658, 0.524$ ), 宫颈癌组外周静脉血中 CD4<sup>+</sup>T 细胞/CD8<sup>+</sup>T 细胞显著低于正常组和 CIN III 组 ( $P < 0.001$ ), 正常组和 CIN III 组差异无统计学意义 ( $P = 0.964$ )。宫颈癌组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs 的数量显著高于 CIN III 组和正常组 ( $P < 0.001$ )。CIN III 组和正常组差异无统计学意义 ( $P = 0.086$ )。

**2.4 相关性分析** 采用 Bivariate 相关性分析结果显示,正常组 IDO mRNA 表达及其蛋白表达与 CD4<sup>+</sup>T 细胞/CD8<sup>+</sup>T 细胞 ( $r = -0.644, -0.686, P < 0.05$ )、CD3<sup>+</sup>T 细胞 ( $r = -0.547, -0.455, P < 0.05$ ) 呈负相关性; 与 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs ( $r = 0.477, 0.514, P < 0.05$ ) 呈正相关性。CIN III 组 IDO mRNA 表达及其蛋白表达与 CD3<sup>+</sup>T 细胞 ( $r =$

表1 外周静脉血 CD3<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>T 细胞及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs 数量的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	CD3 <sup>+</sup> T 细胞	CD8 <sup>+</sup> T 细胞	CD4 <sup>+</sup> T 细胞	CD4 <sup>+</sup> T 细胞/ CD8 <sup>+</sup> T 细胞	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> Tregs
正常	20	68.83 ± 7.44***	27.69 ± 3.93***	37.48 ± 4.73**	1.39 ± 0.21***	6.06 ± 1.45***
CIN III	20	66.74 ± 5.26***	21.78 ± 3.14***	37.40 ± 3.83*	1.38 ± 0.01***	7.02 ± 1.22***
宫颈癌	20	50.68 ± 6.18	24.64 ± 3.23	22.84 ± 5.96	0.96 ± 0.37	9.89 ± 2.47

与宫颈癌组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

-0.785、-0.768,  $P < 0.001$ ),  $CD4^+T$  细胞/ $CD8^+T$  细胞( $r = -0.778$ 、 $-0.771$ ,  $P < 0.001$ ) 呈负相关性; 与  $CD4^+CD25^+Foxp3^+Tregs$  ( $r = 0.843$ 、 $0.850$ ,  $P < 0.001$ ) 呈正相关性。宫颈癌组 IDO mRNA 及其蛋白表达与  $CD3^+T$  细胞( $r = -0.882$ 、 $-0.919$ ,  $P < 0.001$ ),  $CD4^+T$  细胞/ $CD8^+T$  细胞( $r = -0.871$ 、 $-0.733$ ,  $P < 0.001$ ) 呈负相关性; 与  $CD4^+CD25^+Foxp3^+Tregs$  ( $r = 0.886$ 、 $0.824$ ,  $P < 0.001$ ) 呈正相关性。

### 3 讨论

研究<sup>[6]</sup>显示,宿主免疫功能受到抑制的妇女是正常妇女患子宫颈癌大约 4~5 倍。细胞毒 T 淋巴细胞能有效识别和杀伤肿瘤细胞<sup>[7]</sup>。目前研究<sup>[8]</sup>表明,宿主外周 T 细胞亚群的数量与肿瘤的发生、发展、预后有着密切的相关性。IDO 的高表达是导致宿主对肿瘤细胞产生免疫逃逸的重要因素之一<sup>[9]</sup>。本研究采用流式细胞仪检测正常子宫颈组织, CIN III 和子宫颈癌 3 组患者外周静脉血中 T 淋巴细胞亚群的数量,采用 Western blot 法和半定量 RT-PCR 法检测上述 3 组子宫颈组织中 IDO mRNA 及其蛋白的表达量,分析各组子宫颈组织中 IDO 的表达对宿主外周静脉血 T 淋巴细胞的影响,初步探讨 IDO 在子宫颈癌的发生发展中的作用,同时了解 IDO 对机体免疫系统的影响。

研究<sup>[10]</sup>显示宫颈肿瘤组织中的 IDO 的表达量均显著高于邻近正常的组织。本研究结果显示宫颈癌组 IDO mRNA 表达高于 CIN III 和正常组,而 CIN III 组高于正常组。这提示随着肿瘤的发生、发展, IDO 引起的宫颈癌免疫抑制功能逐步增加。

陈婉玲等<sup>[11]</sup>发现 T 淋巴细胞是宿主抗肿瘤免疫的比较重要的部分,研究显示, T 淋巴细胞与宫颈癌的发展、预后有着较为密切的关系,正常时候 T 淋巴细胞及其亚群功能及数量相对稳定,假如发生机体免疫抑制,则较易发生肿瘤的免疫逃逸而引起肿瘤的发生、发展,机体预后则较差。本研究结果表明:宫颈癌患者外周静脉血中上述 T 细胞数量均显著低于 CIN III 组和正常组, CIN III 组和正常组却差异无统计学意义,宫颈癌组外周静脉血中  $CD4^+T$  细胞/ $CD8^+T$  细胞显著低于正常组和 CIN III 组。宫颈癌组  $CD4^+CD25^+Foxp3^+Tregs$  的数量显著高于正常组,这可能提示宫颈癌患者机体的免疫功能得到抑制。

Mumn et al<sup>[8]</sup>研究发现, IDO 可以抑制机体 T 淋

巴细胞及其亚群的发生、发展,从而可以促进 T 淋巴细胞及其亚群发生细胞凋亡。本实验中正常组 IDO mRNA 表达及蛋白表达与  $CD3^+T$  细胞、 $CD4^+T$  细胞/ $CD8^+T$  细胞呈负相关性; 与  $CD4^+CD25^+Foxp3^+Tregs$  呈正相关性。CIN III 组 IDO mRNA 表达及其蛋白表达与 T 淋巴细胞亚群数量呈负相关性,与  $CD4^+CD25^+Foxp3^+Tregs$  呈正相关性。宫颈癌组 IDO mRNA 及其蛋白表达与 T 淋巴细胞亚群数量呈负相关性,与  $CD4^+CD25^+Foxp3^+Tregs$  呈正相关性。结果提示宫颈癌患者机体中 IDO 的高表达可能是影响 T 细胞及其亚群数量及功能的重要原因。

### 参考文献

- [1] 蒋卫, 李宁丽. 人乳头瘤病毒的免疫逃逸机制 [J]. 细胞生物学杂志, 2008, 30(1): 25-9.
- [2] Carter J J, Koutsky L A, Hahes J P, et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection [J]. J Infect Dis, 2000, 181(6): 1911-9.
- [3] Gu T, Rowswell-Turner R B, Kilimc M O, et al. Central role of IFN gamma-indoleamine 2,3-dioxygenase axis in regulation of interleukin-12-mediated antitumor immunity [J]. Cancer Res, 2010, 70(1): 129-38.
- [4] Ferdinand L, Decaestecker C, Verset L, et al. Clinicopathological significance of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 expression in colorectal cancer [J]. Br J Cancer, 2012, 106(2): 141-7.
- [5] Inaba T, Ino K, Kajiyama H, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts impaired survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy [J]. Gynecol Oncol, 2010, 117(3): 423-8.
- [6] Chow Y, Miyamoto M, Kato K, et al.  $CD4^+$  and  $CD8^+T$  cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer Res, 2003, 63(7): 1555-9.
- [7] Samooski R, Gissmann L, Osen W. Codon optimized expression of HPV 16 E6 render target cells susceptible to E6-specific CTL recognition [J]. Immunol Lett, 2006, 107(1): 41-9.
- [8] Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoeediting from immune surveillance to immuneescape [J]. Immunology, 2007, 121(1): 1-4.
- [9] Mellor A L, Munn D H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism [J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(10): 762-74.
- [10] Karanikas V, Zamanakou M, Kerenide T, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in cancer [J]. Cancer Biol Ther, 2007, 6(7): 1258-62.
- [11] 陈婉玲, 杨承钢, 杨宏英, 等. 宫颈癌患者外周血 T 细胞亚群数量变化及临床意义 [J]. 武警医学院学报, 2011, 20(9): 694-7.

# 组织声学结构定量技术评估慢乙肝肝脏纤维化分级的研究价值

万颖, 郑慧, 李晓金, 王迪, 姚翀, 李朝密

**摘要** **目的** 评估组织声学结构定量技术(ASQ)与慢乙肝所致肝脏纤维化分级之间的关系。**方法** 对90例明确肝脏病理穿刺结果的慢乙肝患者及60例健康志愿者进行腹部常规超声检查和ASQ检查,收集图像,每一幅图像选定规定感兴趣区(ROI),用ASQ分析软件脱机分析,比较分析其 $\chi^2$ 直方图,计算红色曲线众数(Redmode)、红色曲线均值(Redave)、红色曲线标准差(Redsd)、蓝色曲线众数(Bluemode)、蓝色曲线均值(Blueave)、蓝色曲线标准差(Bluesd)及红蓝曲线下面积比(FD ratio)。比较相应肝脏穿刺结果,经统计分析后,研究各项参数与肝脏穿刺肝纤维化分级结果的统计学差异。**结果** 随着肝纤维化程度的增加,红蓝曲线分布由平滑、锐利变得粗糙、增宽,蓝色曲线下面积逐渐增大。其中,Redmode在正常对照组与S0-1、S1组;S0-1与S1组及

S1-2与S2组之间差异无统计学意义,其余各组之间差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。Redave在正常对照组与S0-1、S1组;S0-1与S1组及S1-2与S2组、S2-3组之间差异无统计学意义,其余各组之间差异均有统计学意义。Redsd、Blue-mode、Blueave及FD ratio在正常对照、S0-1、S1、S1-2、S2与S3组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),Bluesd在任意两组间差异均无统计学意义。**结论** ASQ技术作为一项无创性评价肝纤维化程度的技术,其红蓝曲线 $\chi^2$ 直方图及7个参数值对肝纤维化分级的评估具有重要价值,其中,Redmode及Redave参数意义最大。

**关键词** 组织声学结构定量技术;肝纤维化;慢性乙型肝炎

**中图分类号** R 512.6; R 445.11

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2015)10-1500-04

2015-06-29 接收

基金项目:安徽省高校自然科学基金重点项目(编号:KJ2013A166)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院超声科,合肥 230022

作者简介:万颖,女,硕士研究生;

郑慧,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: zhenghuiayfyesc@163.com

作为各种病因所致慢性肝病的共同病理过程,肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)成为慢性肝病发生发展至肝硬化的早期和必经阶段<sup>[1]</sup>,是肝炎-肝硬化-肝癌三步曲的中间环节。由于其缺乏特异性的临床症状,尚难以早期诊断。临床研究<sup>[2]</sup>表明,及时

## Correlation study between indoleamine 2,3-dioxygenase( IDO) and T lymphocytes in cervical cancer and CINIII

Du Shihua, Hu Chuanyu, Lu Dawei, et al

(Dept of Obstetrics and Gynecology, The Affiliated Hefei Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230011)

**Abstract** **Objective** To investigate the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase( IDO) how to effect on T lymphocyte activity, in order to understand the mechanism of immune escape of cervical cancer. **Methods** Selected 20 patients with CIN III, 20 cases with cervical cancer and 20 cases with normal cervical for comparison, used flow cytometry to detect the number of each group CD3<sup>+</sup>T, CD4<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>T, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Used semi-quantitative RT-PCR and Western blot to detect IDO mRNA and expression of IDO, and to analyze the effect on T lymphocyte active in cervical tissue. **Results** The expression of IDO was significantly different among the three group ( $P < 0.001$ ). The positive rate of IDO in cervical cancer was significantly higher than that in CIN III and normal cervical ( $P < 0.001$ ). The positive rate of IDO in CIN III was significantly higher than that in normal cervical ( $P < 0.001$ ). The number of CD3<sup>+</sup>T, CD4<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>T and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs was significantly different among the three group ( $P < 0.001$ ). The positive expression of IDO was negatively correlated with the number of CD3<sup>+</sup>T, CD4<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>T, and positively correlated with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs. **Conclusion** IDO inhibits T lymphocyte activity. Cervical cancer patients with low immune function can cause the tumor cells escape from immune surveillance, may lead to disease progression.

**Key words** indoleamine 2,3-dioxygenase; cervical cancer; CIN III; T lymphocytes