

Г.А. Жулай¹, Е.К. Олейник¹, А.А. Романов², В.М.Олейник¹, А.В. Чуров¹, П.Н. Кравченко¹

Циркулирующие регуляторные Т-клетки и изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов у больных колоректальным раком

¹ ФГБУН Института биологии Карельского научного центра РАН

² ГБУЗ «Республиканский онкологический диспансер», Петрозаводск

Представлены данные по содержанию и составу периферических Treg-клеток, их функциональной активности, а также связи Treg-клеток с изменением некоторых показателей клеточного иммунитета у 42 больных колоректальным раком (КРР) в сравнении с 34 здоровыми лицами (контроль). Оценку экспрессии молекулярных маркеров лимфоцитов проводили методом многоцветной проточной цитометрии. Показано увеличение количества Treg-клеток в крови больных КРР ($p < 0,05$). Отмечено, что CD4+CD25+FOXP3+ Treg-клетки могут играть более важную роль в начальный период формирования опухоли, а CD8+FOXP3+ Treg-клетки — на более поздних стадиях развития заболевания. В обследованной группе больных КРР наблюдали усиление функциональной активности Treg-клеток (CD4+CD25+CD127lo/-) по экспрессии ингибиторной молекулы CTLA-4 и маркера пролиферации клеток Ki-67. При оценке изменений в субпопуляционном составе лимфоцитов у больных КРР была обнаружена обратная корреляция содержания Treg-клеток и уровня экспрессии CTLA-4 с числом CD3+CD4+ Т-хелперов.

Ключевые слова: колоректальный рак, Treg-клетки, FOXP3, CTLA-4, Ki-67, иммунная супрессия

Развитие молекулярной биологии и иммунологии за последние десятилетия, обосновало новые подходы в терапии онкологических заболеваний. Недавние исследования обеспечили более глубокое понимание механизмов противоопухолевого иммунитета. Установлено, что применение созданных на их основе иммунотерапевтических подходов совместно со стандартным лечением (хирургическое вмешательство, химио- и лучевая терапия) продлевает общую выживаемость больных [12]. Все это свидетельствует о важной роли иммунной системы в патогенезе рака. Однако резистентность опухолевых клеток к механизмам иммунологической защиты организма является препятствием к более успешной иммунотерапии. Одним из таких механизмов являет-

ся индукция иммунной супрессии опухолевыми клетками. Подавление локального противоопухолевого иммунного ответа в микроокружении опухоли способствует ее росту и метастазированию. С развитием заболевания формируется системная иммунная супрессия, которая может способствовать появлению различных осложнений и ухудшать состояние больного [15]. Особую роль в индукции иммунной супрессии отводят популяции регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), которые в норме поддерживают иммунологическую толерантность к собственным антигенам посредством подавления функций широкого ряда иммунокомпетентных клеток.

К числу наиболее распространенных онкологических заболеваний принадлежит колоректальный рак (КРР). Заболеваемость КРР гораздо выше в индустриально развитых странах, чем в развивающихся [2]. Показано, что развитие КРР тесно связано с инфильтрацией опухоли клетками адаптивной иммунной системы [8,9]. Кроме того, в настоящее время активно обсуждается роль хронического воспаления как фактора, способствующего развитию КРР. Известно, что противовоспалительная терапия снижает склонность к развитию новообразований желудочно-кишечного тракта, а у больных с воспалительной болезнью кишечника увеличен риск возникновения КРР [7].

Роль Treg-клеток при развитии КРР в настоящее время четко не определена. С одной стороны, инфильтрация КРР клетками с маркером FOXP3 (forkhead box P3), ключевого транскрипционного фактора Treg-клеток, связана с благоприятным прогнозом для больных [8,9] в отличие от ряда других онкологических заболеваний [10,13,14]. Это предполагаемое положительное влияние Treg-клеток может быть связано со сдерживанием воспаления, возникающего в микроокружении опухоли. С другой стороны, они могут стимулировать опухолевую прогрессию, препятствуя специфическому иммунному ответу, что также продемонстрировано у больных КРР [4]. В связи с этим изучение показателей иммунной супрессии, в особенности функционирования Treg-клеток у больных КРР является важным

для понимания патогенеза этого заболевания и создания эффективных подходов в иммунотерапии. Целью настоящей работы явилось исследование содержания и состава периферических Treg-клеток, их функциональной активности и изучение связи Treg-клеток с изменением некоторых показателей клеточного иммунитета у больных КРР.

Материалы и методы

В работе исследовано 42 образца периферической крови больных КРР, (ср. возраст $65 \pm 12,4$ лет). В качестве контроля анализировали лимфоциты 30 здоровых доноров в возрасте $54,4 \pm 20,6$ лет. Диагноз КРР устанавливался на основании клинических, лабораторных, эндоскопических и морфологических методов исследования. Было диагностировано 6 человек с I стадией (14,3%), 15 – со II (37%), 12 – с III (28,6%) и 9 больных с IV стадией (20%). Экспрессию молекул клетками оценивали методом многоцветной проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500 («Beckman Coulter», США) с использованием моноклональных антител CD4-FITC, CD8-FITC, CD25-PC5, CD127-PC7, CTLA-4-PE («Beckman Coulter», Франция), CD3-PE, CD16-FITC, CD19-FITC (ООО «Сорбент», Россия), а также Ki-67-PE и FOXP3-PE (eBioscience, США) и соответствующих изотипических контролей. Анализ внутриклеточной экспрессии CTLA-4, Ki-67 и FOXP3 выполняли с применением набора буферов для фиксации и пермеабиллизации (eBioscience, США). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ «Statistica 6.0», достоверность различий между группами рассчитывали по критерию Манна-Уитни при уровне значимости $p < 0,05$. Для выявления и оценки характера связи между признаками использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Данные представлены в виде $M \pm SD$. Исследование выполнено с использованием приборной базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН (ЦКП ИБ КарНЦ РАН).

Результаты и обсуждение

Для идентификации Treg-клеток в настоящее время используют различные маркеры. Эта популяция лимфоцитов отличается высокой конститутивной экспрессией α -цепи рецептора к интерлейкину (IL)-2 (CD25) и отсутствием или низкой экспрессией CD127 (IL-7R α). Ключевым транскрипционным фактором Treg-клеток является FOXP3, который необходим для их развития и супрессорной функции [11]. В работе анализировали количество Treg-клеток с фенотипами CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} и CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. Полученные данные представлены в табл. 1.

Таблица 1. Содержание и состав популяции Treg-клеток у больных КРР*

Фракция	Контроль	Больные КРР	p
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo/-} , % от CD4 ⁺ Т-клеток	4,56±1,0	5,49±1,9	<0,05
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ , % от CD4 ⁺ Т-клеток	3,26±1,0	5,08±2,4	<0,001
CD8 ⁺ FOXP3 ⁺ , % от CD8 ⁺ Т-клеток	0,33±0,2	1,19±0,77	<0,001

Примечание. КРР – колоректальный рак; * M±SD

Показано, что количество CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} и CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg-клеток статистически выше у больных КРР (n=31) по сравнению с контролем (n=34). При исследовании экспрессии FOXP3 обнаружены более существенные различия. Причем более значительное увеличение этих клеток наблюдалось у больных на I-II стадиях развития КРР (рис. 1А).

Популяция Treg-клеток гетерогенна. Помимо Treg-клеток, несущих на своей поверхности

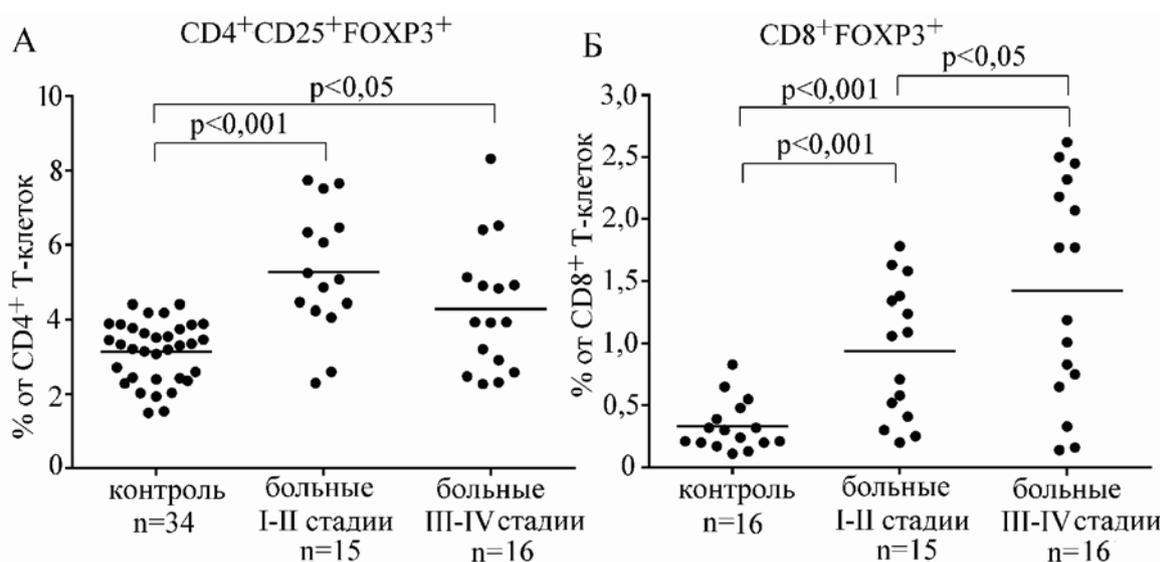


Рис.1. Содержание Treg-клеток в контроле и у больных с разной стадией КРР

Примечание. А – количество CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg-клеток, Б – количество CD8⁺FOXP3⁺ Treg-клеток. Горизонтальной чертой обозначено среднее количество клеток, КРР – колоректальный рак

антигены CD4, описаны CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие FOXP3 и способные подавлять иммунный ответ. При анализе CD8⁺FOXP3⁺ Treg-клеток нами, как и другими авторами [3], отмечено их низкое содержание в периферической крови. Показано, что у больных КРР (n=31) число CD8⁺ Treg-клеток составило 1,19±0,77% от CD8⁺ Т-клеток и было в 3,6 раза выше, чем в контроле (n=16, табл.1). Достоверные различия в содержании этих клеток были получены и у больных с разной стадией заболевания (рис. 1Б). При этом увеличение их содержания наблюдалось как на начальных этапах развития болезни (I-II стадии), так и на более поздних (III-IV стадии).

Функциональное состояние Treg-клеток у больных КРР (n=28) оценивали по уровню экспрессии CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} Treg-клетками антигена цитотоксических лимфоцитов 4 (CTLA-4) и маркера пролиферации клеток — ядерного белка Ki-67. Показано, что CTLA-4 играет важную роль в Treg-ассоциированной супрессии посредством взаимодействия с молекулами семейства B7 на поверхности клетки-мишени и ингибирования ее активации и пролиферации [11]. В результате анализа было показано, что экспрессия CTLA-4 Treg-клетками больных КРР выше, чем в контроле (n=13, рис. 2). Усиленная в равной мере экспрессия этой молекулы наблюдалась у больных на разных стадиях болезни по сравнению с контролем. Также отмечено, что активированные CD4⁺CD25⁺ Т-хелперы больных КРР экспрессировали CTLA-4 в большей степени (рис. 2). В связи с этим был проведен корреляционный анализ экспрессии CTLA-4 на CD4⁺

и CD4⁺CD25⁺ Т-клетках с уровнем экспрессии FOXP3⁺ на CD4⁺ Т-клетках. В результате у больных КРР обнаружена положительная корреляция между экспрессией этих молекул как для CD4⁺ (r=0,72, p<0,001), так и для CD4⁺CD25⁺ Т-хелперов (r=0,56, p<0,01), тогда как у здоровых доноров подобной корреляции выявлено не было.

Ядерный белок Ki-67 экспрессируется в активно пролиферирующих клетках, вышедших из состояния покоя, что позволяет, используя многоцветное окрашивание, оценить пролиферативную активность клеток. Установлено, что уровень экспрессии этого белка увеличен на клетках с фенотипом CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} по сравнению с активированными CD4⁺CD25⁺ Т-клетками как у здоровых доноров (p<0,01), так и у больных КРР (p<0,001). Активированные Т-хелперы больных КРР экспрессировали Ki-67 на уровне группы контроля, тогда как CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} Treg-клетки на всех стадиях болезни имели высокий уровень его экспрессии этого белка (рис. 2Б). Таким образом, полученные данные по изучению молекул CTLA-4 и Ki-67 свидетельствуют об усиленной функциональной активности популяции Treg-клеток у больных КРР уже на первых стадиях заболевания.

Важной характеристикой состояния иммунной супрессии является оценка содержания основных популяций лимфоцитов. Для этого у больных КРР (n=42) и здоровых доноров (n=20) было проанализировано относительное содержание Т-лимфоцитов и их субпопуляций, В-лимфоцитов и NK-клеток. Результаты представлены в табл. 2.

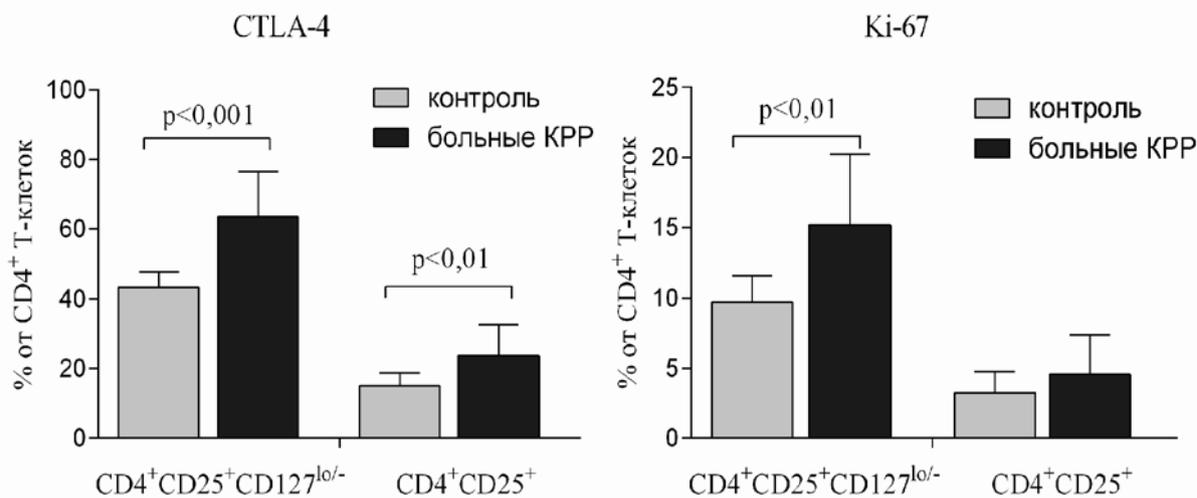


Рис. 2. Уровень экспрессии молекул CTLA-4 и Ki-67 лимфоцитами периферической крови в контроле и у больных КРР

Примечание. Данные представлены как M±SD; КРР – колоректальный рак

Таблица 2.
Содержание основных популяций лимфоцитов в периферической крови здоровых доноров и больных КРР (M±SD)

Фенотипы	Контроль (n=20)	Больные КРР			
		I-II стадии (n=21)	p	III-IV стадии (n=21)	p
CD3+ Т-лимфоциты	69,26±5,3	66,96±6,4	>0,05	64,02±6,4	<0,05
CD3+CD4+ Т-хелперы	42,39±6,4	32,80±9,5	<0,01	35,66±5,9	<0,01
CD4+CD25+ активированные Т-хелперы	10,74±5,2	6,46±2,7	<0,01	5,57±1,8	<0,01
CD3+CD8+ЦТЛ	21,98±4,7	31,45±6,1	<0,01	27,28±6,5	<0,01
CD3-CD19+ В-лимфоциты	11,15±3,0	8,13±4,3	<0,05	5,99±2,8	<0,01
CD3-CD16+ НК-клетки	14,84±5,7	13,39±4,8	>0,05	15,56±8,5	>0,05

Примечание. Содержание клеточных популяций представлено как % от общего числа лимфоцитов, КРР – колоректальный рак, ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты, НК – натуральные киллеры

Показано, что у больных КРР по сравнению с контролем снижено число В-лимфоцитов как на начальных стадиях развития заболевания, так и на поздних. В отношении НК-клеток (натуральные киллеры) у больных КРР достоверных различий по сравнению с контролем не выявлено. Количество циркулирующих CD3+ Т-лимфоцитов у больных КРР на I-II стадии развития опухоли не отличалось от контроля, тогда как у больных с III-IV стадиями КРР Т-клеток было меньше, чем у здоровых доноров (табл.2). На начальных стадиях развития опухоли также отмечено пониженное число CD4+ Т-хелперов и повышенное количество CD8+ ЦТЛ. Важную роль в противоопухолевом иммунном ответе играет цитотоксическая активность CD8+ Т-клеток [6].

При исследовании периферических CD8+ Т-клеток на более поздних стадиях заболевания обнаружено, что их содержание снижено по сравнению с больными I-II стадии (p<0,05), но оказалось несколько выше, чем в контроле. При этом у больных КРР наблюдалось пониженное содержание активированных CD4+CD25+ Т-клеток на всех стадиях развития болезни (табл. 2). Таким образом, результаты оценки изменений клеточного иммунитета свидетельствуют о возможном развитии вторичного иммунодефицита у больных КРР, особенно в отношении Т-лимфоцитов.

Далее было проведено сравнение количества циркулирующих Treg-клеток с содержанием CD3+ Т-лимфоцитов и их субпопуляций у больных КРР (n=32). В результате анализа обнаружили обратную корреляцию между содержанием CD3+CD4+ Т-клеток и числом Treg-клеток: для клеток с фенотипом CD4+CD25+CD127lo/- r = -0,47 при p<0,01, а для клеток CD4+CD25+FOXP3+ значение r составило

-0,54 при p<0,01. Также содержание CD3+CD4+ Т-клеток обратно коррелировало с уровнем экспрессии ингибиторной молекулы CTLA-4 на CD4+ Т-клетках (r = -0,47, p<0,01), но не с уровнем пролиферации CD4+CD25+CD127lo/- (по оценки экспрессии Ki-67).

В настоящее время установлено, что Treg-клетки играют важную роль в канцерогенезе [1,4,10,11,13-15]. Отмечается увеличение содержания Treg-клеток в периферической крови и опухолевой ткани различных локализаций, что ассоциируется с плохим прогнозом для большинства больных со злокачественными новообразованиями [10,13,14]. Однако, в случае с КРР роль Treg-клеток в патогенезе этого заболевания не полностью ясна, и в настоящее время этот вопрос требует дальнейшего изучения.

В результате настоящего исследования было выявлено повышенное содержание исследуемых популяций Treg-клеток у больных КРР (табл.1, рис.1). Особенно это было выражено для CD8+FOXP3+ Treg-клеток, увеличение которых наблюдалось на всех стадиях развития болезни, в особенности на III-IV стадиях заболевания. С другой стороны, для CD4+CD25+FOXP3+ Treg-клеток была отмечена тенденция к повышению их содержания только на начальных стадиях развития КРР (рис.1). В литературе отмечается, что рост опухоли может сопровождаться формированием условий для привлечения, индукции и генерации Treg-клеток [1,15]. Вероятно, CD4+CD25+FOXP3+ Treg-клетки играют более важную роль на периферии в начальный период развития опухоли [5], а CD8+FOXP3+ Treg-клетки – на более поздних стадиях.

Показано также, что у больных КРР на всех стадиях происходит усиление функциональной активности Treg-клеток (CD4+CD25+CD127lo/-), оценивавшейся по экспрессии ингибиторной молекулы CTLA-4 и по экспрессии маркера пролиферации Ki-67 (рис. 2).

О развитии системной иммуносупрессии у больных КРР свидетельствуют изменения клеточного иммунитета с признаками вторичного иммунодефицита, который выражается в снижении содержания CD3+, CD4+ Т-клеток и активированных CD4+CD25+ Т-клеток. Отмечено возможное вовлечение Treg-клеток в этот процесс, о чем свидетельствует обнаруженная обратная корреляция содержания CD4+ Т-хелперов с числом Treg-клеток в периферической крови больных, а также с уровнем экспрессии CTLA-4.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 13-04-98826) и за счет средств федерального бюджета на выполнение государственного задания № 0221-2014-0011.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жулай Г.А., Олейник Е.К. Регуляторные Т-клетки и канцерогенез // Иммунология. – 2013. – Т. 34. — №1. – С. 61-64.
2. Циммерман Я.С. Колоректальный рак: современное состояние проблемы // Росс. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2012. – Т. 22 №4. – С. 5-17.
3. Chaput N., Louafi S., Bardier A. et al. Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue // Gut. – 2009. – Vol. 58. — № 4. – P. 520-529.
4. Deng L., Zhang H., Luan Y. et al. Accumulation of foxp3+ T regulatory cells in draining lymph nodes correlates with disease progression and immune suppression in colorectal cancer patients // Clin Cancer Res. – 2010. – Vol. 16. — №16. – P. 4105-4112.
5. Elpek K.G., Lacelle C., Singh N.P., Yolcu E.S., Shirwan H. CD4+CD25+ T regulatory cells dominate multiple immune evasion mechanisms in early but not late phases of tumor development in a B cell lymphoma model // J. Immunol. – 2007. – Vol. 178. – P. 6840-6848
6. Ling K. L., Pratap S. E., Bates G. J., Singh B. et al. Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients // Cancer Immun. – 2007. – Vol. 7. — №7
7. Lutgens M.W., Vlegaar F.P., Schipper M.E. et al. High frequency of early colorectal cancer in inflammatory bowel disease // Gut. – 2008. – Vol. 57. — № 9. – P. 1246-1251.
8. Noshu K., Baba Y., Tanaka N. et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review // J Pathol. – 2010. – Vol. 222. — № 4. – P. 350-366.
9. Salama P., Phillips M., Grieu F. et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer // J Clin Oncol. – 2009. – Vol. 27. — № 2. – P. 186-192.
10. Schott A.K., Pries R., Wollenberg B. Permanent up-regulation of regulatory T-lymphocytes in patients with head and neck cancer // Int J Mol Med. – 2010. – Vol. 26. — № 1. – P. 67-75
11. Shevach E.M. Mechanisms of FoxP3+ T regulatory cell-mediated suppression // Immunity. – 2009. – Vol. 30. — № 5. – P. 636-645.
12. Vanneman M., Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment // Nat Rev Cancer. – 2012. – Vol. 12. — № 4. – P. 237-251
13. Watanabe M.A., Oda J.M., Amarante M.K., Voltarelli J.C. Regulatory T cells and breast cancer: implications for immunopathogenesis // Cancer Metastasis Rev. – 2010. – Vol. 29. — № 4. – P. 569-579.
14. Wicherek L., Jozwicki W., Windorbska W. et al. Analysis of Treg cell population alterations in the peripheral blood of patients treated surgically for ovarian cancer a preliminary report // Am J Reprod Immunol. – 2011. – Vol. 66. — № 5. – P 444-450.
15. Yang Z.Z., Ansell S.M. The role of Treg cells in the cancer immunological response // Am. J. Immunol. – 2009. – Vol. 5. — № 1. – P. 17-28.

Поступила в редакцию 31.07. 2015 г.

G.A.Zhulai¹, E.K.Oleinik¹, A.A.Romanov², V.M.Oleinik¹, A.V.Churov¹, P.N.Kravchenko¹

Circulating regulatory T cells and changes in the subpopulation composition of lymphocytes in colorectal cancer patients

¹Institute of Biology of Karelian Research Centre RAS
²Republican Cancer Dispensary
Petrozavodsk, Russia

Data on the frequency of peripheral Treg cells, their functional activity, as well as their relationship to changes in characteristics of cellular immunity in patients with colorectal cancer (CRC, n=42) and healthy donors (n=34) are presented in the article. Assessment of the expression of molecular markers of lymphocytes was performed by multicolor flow cytometry.

It was shown that the number of these cells is significantly increased in CRC patients (p<0,05). Probably CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg cells may play a more substantial role in the periphery during the initial period of tumor formation, whereas CD8⁺FOXP3⁺ Treg cells are important in the later stages of the disease. In CRC patients, the increase of the functional activity of Treg cells (CD4⁺CD25⁺CD127^{low}) on the expression of inhibitory molecules CTLA-4 and the marker of cell proliferation Ki-67 was observed. In patients with CRC, the frequency of peripheral Treg cells and the expression level of CTLA-4 were inversely correlated with the number of CD3⁺CD4⁺ T-helper cells.

Key words: colorectal cancer, Treg cells, FOXP3, CTLA-4, Ki-67, immune suppression