

引用本文:田馨莉,张妍,李岚,等.宫颈癌中单核细胞对Th17细胞分化的影响[J].安徽医药,2023,27(6):1245-1248.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.06.043.



◇临床医学◇

## 宫颈癌中单核细胞对Th17细胞分化的影响

田馨莉,张妍,李岚,陈芳

作者单位:潍坊市人民医院妇科,山东 潍坊 261000

通信作者:陈芳,女,主任医师,硕士生导师,研究方向为妇科肿瘤,Email:Chenfangwf@126.com

**摘要:** 目的 检测宫颈癌病人外周血中Th17细胞的比例及相关细胞因子白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6的表达水平,探讨宫颈癌外周血中单核细胞对Th17细胞分化的影响及机制。方法 2019年6月至2020年12月在潍坊市人民医院妇科收治的宫颈癌病人(宫颈癌组)39例,对照组(30例)为健康志愿者及因良性疾病在潍坊市人民医院妇科就诊的病人,流式细胞仪检测宫颈癌组、对照组外周血中Th17细胞的比例;实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测宫颈癌病人、对照组外周血中IL-1 $\beta$ 、IL-6的表达水平;分离健康志愿者外周血中的初始CD4<sup>+</sup>T细胞,分别与对照组、宫颈癌组外周血中分离出的单核细胞进行共培养,并分别加入anti-IL-1 $\beta$ 、anti-IL-6中和抗体,流式细胞仪检测Th17细胞的比例。结果 宫颈癌组外周血中,Th17细胞比例(3.5 $\pm$ 1.4)%、IL-1 $\beta$  0.457(0.078, 1.193)、IL-6 0.094(0.043, 0.272)的表达水平明显高于对照组(2.3 $\pm$ 1.6)%、0.279(0.017, 0.686)、0.038(0.019, 0.112)。初始CD4<sup>+</sup>T细胞与宫颈癌组外周血中的单核细胞共培养,Th17细胞分化的比例(1.77 $\pm$ 0.61)%显著高于对照组(0.90 $\pm$ 0.39)%;与对照组相比(1.82 $\pm$ 0.47)%,加入中和抗体后,Th17细胞的分化比例均下降,且加入anti-IL-1 $\beta$ 组(0.76 $\pm$ 0.23)%与加入anti-IL-6(1.06 $\pm$ 0.34)%组比,前者Th17细胞分化比例下降更为明显。结论 宫颈癌病人外周血中的单核细胞更能促进Th17细胞的分化。在Th17细胞分化的过程中,IL-1 $\beta$ 、IL-6起到重要作用,且IL-1 $\beta$ 在促进Th17细胞分化的过程中诱导作用更强。

**关键词:** 宫颈肿瘤; 细胞分化; Th17细胞; 单核细胞; 白细胞介素-1 $\beta$ ; 白细胞介素-6

### The role of monocytes on Th17 cell differentiation in cervical cancer

TIAN Xinli,ZHANG Yan,LI Lan,CHEN Fang

Author Affiliation:Partment of Gynecology, People's Hospital of Weifang, Weifang, Shandong 261000, China

**Abstract:** **Objective** To explore of the effect of monocytes in peripheral blood of cervical cancer on the differentiation of Th17 cells by assessing the ratio of Th17 cells in cervical cancer patients(CC), the expression levels of relevant cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6, and by changing the concentrations of IL-1 $\beta$  and IL-6 secreted by monocytes in the microenvironment.**Methods** Flow cytometry was used to detect the proportions of Th17 cells in the peripheral blood of CC patients and the healthy control group (HC). qRT-PCR was applied to detect the expression levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 in CC patients and the HC group. The isolated initial CD4<sup>+</sup>T cells from the peripheral blood of the HC group were respectively co-cultured with monocytes isolated from the HC group and CC patients, and different neutralizing antibodies were added, such as anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-6 and anti-IL-1 $\beta$ +anti-IL-6. The ratio of Th17 cells was measured by flow cytometry.**Results** In the peripheral blood of CC patients, the ratio of Th17 cells (3.5 $\pm$ 1.4) % and the concentrations of IL-1 $\beta$  0.457 (0.078, 1.193) and IL-6 0.094 (0.043, 0.272) were markedly increased compared with those of the HC group (2.3 $\pm$ 1.6) %, 0.279 (0.017, 0.686), 0.038 (0.019, 0.112). The initial CD4<sup>+</sup> T cells were respectively cultured together with monocytes from the peripheral blood of CC patients and HC group, higher Th17 cells ratio was observed in CC patients (1.77 $\pm$ 0.61) % vs. (0.90 $\pm$ 0.39) %. After adding neutralizing antibodies, the differentiation ratio of Th17 cells decreased compared with the control group (1.82 $\pm$ 0.47) %, and when added to the anti-IL-1 $\beta$  group (0.76 $\pm$ 0.23) %, the differentiation ratio of Th17 cells decreased more significantly than the anti-IL-6 group (1.06 $\pm$ 0.34) %.**Conclusions** The monocytes in the peripheral blood of CC patients can significantly promote the differentiation of Th17 cells. IL-1 $\beta$  and IL-6 both play an important role in the process of Th17 cell differentiation, and IL-1 $\beta$  has a stronger inducing effect than IL-6.

**Key words:** Uterine cervical neoplasms; Cell differentiation; Th17 cell; Monocyte; Interleukin-1 $\beta$ ; Interleukin-6

宫颈癌是感染型肿瘤,研究已证实高危型人乳头瘤病毒(human papillomas virus, HPV)的持续感染是其发病的根本原因<sup>[1]</sup>,高危型HPV持续感染后所

致的炎症反应及氧化应激在宫颈癌的发生发展中发挥重要的作用,感染导致肿瘤局部的固有免疫发生变化,免疫细胞及其分泌的各种免疫因子参与

瘤的进展<sup>[2]</sup>。

Th17细胞是近年来发现的一类辅助型T细胞,通过表达转录因子维A酸相关孤儿受体 $\gamma$ t、分泌特征性的白细胞介素(IL)-17发挥其生物学效应<sup>[3]</sup>。研究发现该细胞既具有促进肿瘤的作用,也有抗肿瘤的作用<sup>[4-5]</sup>。在宫颈癌中,外周血及肿瘤局部微环境中该细胞的表达明显升高,在伴有淋巴结转移的病人中,该细胞的表达比例均明显升高,提示在宫颈癌的进展中Th17细胞可能起到促进作用<sup>[6]</sup>。但是Th17细胞在宫颈癌中的分化机制研究甚少。单核细胞在免疫应答中发挥重要作用,能够监视病原体的入侵,并作为抗原提呈细胞诱导效应T细胞发挥功能<sup>[7]</sup>。研究发现IL-1、IL-6、IL-23、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )等细胞因子是诱导Th17细胞分化的关键因子,而单核细胞系IL-1、IL-6的重要分泌来源<sup>[8-9]</sup>,因此我们推测,单核细胞可能影响Th17细胞的分化。本研究旨在探讨宫颈癌中单核细胞对Th17细胞分化的影响,进而为宫颈癌的免疫治疗提供研究基础。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2019年6月至2020年12月在潍坊市人民医院妇科收治的宫颈癌病人(宫颈癌组)39例,均通过手术病理证实,年龄(50 $\pm$ 5.8)岁。对照组为健康志愿者及因良性疾病在潍坊市人民医院妇科就诊的病人,共30例,年龄(48 $\pm$ 4.9)岁,对照组宫颈液基细胞学及宫颈HPV均无异常。两组年龄差异无统计学意义( $P>0.05$ )。排除合并心血管疾病、高血压病、糖尿病、妊娠、活动性或慢性感染、结缔组织疾病病人或有恶性肿瘤病史的病人。宫颈癌组病人均未经过放化疗、免疫治疗或中医中药治疗。病人或其近亲属知情同意,本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

**1.2 主要试剂及仪器** 初始CD4<sup>+</sup>T细胞及CD14<sup>+</sup>单核细胞磁珠分选试剂盒、磁力架、均购自德国Miltenyi公司。anti-IL-6、anti-IL-1 $\beta$ 、Anti-CD3、anti-CD28、IL-2(均购自Peprotech公司。percp/cy5.5-CD4, AlexaFluor647-anti-IL-17(均购自美国Biolegend公司);佛波酯、离子霉素、莫能霉素(购自联科生物公司)。IL-1 $\beta$ 、IL-6及IL-23基因引物由BioSune生物公司合成。RPMI1640培养液购自Gibco公司,人的淋巴细胞分离液(购自TBD公司),RNA核酸提取试剂盒(购自Invitrogen公司),逆转录试剂盒(购自Takara)。采用美国BD Bioscience PharMingen Calibur流式细胞仪检测,采用美国ABI公司RT-PCR仪(7600)检测。

## 1.3 试验方法

**1.3.1 流式细胞术检测宫颈癌组、对照组外周血中Th17细胞的表达** 取200  $\mu$ L全血,与200  $\mu$ L的RPMI 1640混匀,同时加入莫能霉素、佛波酯、离子霉素,在孵育箱中孵育4 h(孵育箱条件为37  $^{\circ}$ C, 5%二氧化碳),取100  $\mu$ L刺激后的溶液加入Percp/cy5.5-CD4混匀进行表面染色,固定破膜后加入AlexaFluor647-anti-IL-17进行染色,加入100  $\mu$ L的固定液A, PBS洗涤、离心后,加入100  $\mu$ L破膜液B液,立即加入AlexaFluor647-anti-IL-17抗体,磷酸缓冲盐溶液重悬细胞,流式细胞仪检测Th17细胞的比例。

**1.3.2 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)方法检测两组外周血中IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA表达** 首先分离外周血的单个核细胞,用Trizol法裂解单个核细胞并提取总RNA,应用逆转录试剂盒将总RNA逆转成互补DNA(cDNA),荧光定量PCR按照SYBR Green Realtime PCR MasterMix试剂盒配成反应体系,内参为GAPDH。引物序列如下:IL-1 $\beta$ 正向引物GTACCTGAGCTCGCCAGTG,反向引物TGTTTAGGGCCATCAGCTT;IL-6正向引物TTCTC-CACAAGCGCCTTCGGTCCA,反向引物AGGGCT-GAGATGCCGTCGAGGATGTA。

**1.3.3 CD4<sup>+</sup>T细胞及CD14<sup>+</sup>单核细胞的分选** 使用Ficoll密度梯度离心法分离宫颈癌组和对照组外周血中的单个核细胞,显微镜下计数,调整细胞浓度为 $1\times 10^6$ /L。严格按照Miltenyi公司试剂盒进行磁珠分选对照组外周血中CD4<sup>+</sup>T细胞、CD14<sup>+</sup>单核细胞及宫颈癌病人外周血中的CD14<sup>+</sup>单核细胞。分选出的细胞进行流式细胞仪进行纯度检测,均可达95%以上。

**1.3.4 细胞培养** 将对照组外周血中初始CD4<sup>+</sup>T细胞以 $2\times 10^5$ 个/孔分为2组在96孔板中培养,每组设置2个复孔。每孔中均加入anti-CD3(2 mg/L), anti-CD28(1 mg/L)、IL-2(10I U/mL)。第一组:加入正常对照者(15例)外周血中单核细胞,与CD4<sup>+</sup>T细胞共培养,细胞数目比例为1:2;第二组:加入宫颈癌外周血中单核细胞(15例),与CD4<sup>+</sup>T细胞共培养,细胞数目比例为1:2。为研究IL-6及IL-1 $\beta$ 对宫颈癌病人Th17细胞分化的影响,我们另入组12例宫颈癌病人,分离宫颈癌外周血中单核细胞,与对照组中CD4<sup>+</sup>T细胞共培养,细胞数目比例为1:2,设置如下四组:空白对照组、anti-IL-1 $\beta$ 组、anti-IL-6组、anti-IL-6+anti-IL-1 $\beta$ 组。于孵育箱中进行细胞培养5 d(条件为37  $^{\circ}$ C, 5%二氧化碳),收集各组中的细胞,应用流式细胞术检测各组中Th17细胞的比例。

**1.4 统计学方法** 运用SPSS 22软件分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 $t$ 检验,多组之间两两比较采用SNK- $q$ 检验的方法;非正态分布的计量资料以中位数(第25、第75百分位数)[ $M(P_{25}, P_{75})$ ]表示,分析用非参数分析,相关性分析采用Pearson相关性检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组中 Th17 细胞的表达** 与对照组( $2.3 \pm 1.6$ )%相比,Th17细胞比例在宫颈癌组( $3.5 \pm 1.4$ )%中明显升高( $t=3.20, P=0.002$ )。

**2.2 两组中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达水平比较** 与对照组相比,宫颈癌组外周血中IL-1 $\beta$ 、IL-6的表达水平均明显升高( $P < 0.05$ ),并且IL-1 $\beta$ 的表达水平与Th17细胞的比例呈正相关( $r=0.52, P=0.001$ )。见表1,图1。

表1 白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6在宫颈癌组、对照组外周血中的表达水平/ $M(P_{25}, P_{75})$

组别	例数	IL-1 $\beta$	IL-6
对照组	26	0.279(0.017, 0.686)	0.038(0.019, 0.112)
宫颈癌组	39	0.457(0.078, 1.193)	0.094(0.043, 0.272)
Z值		2.24	2.36
P值		0.019	0.018

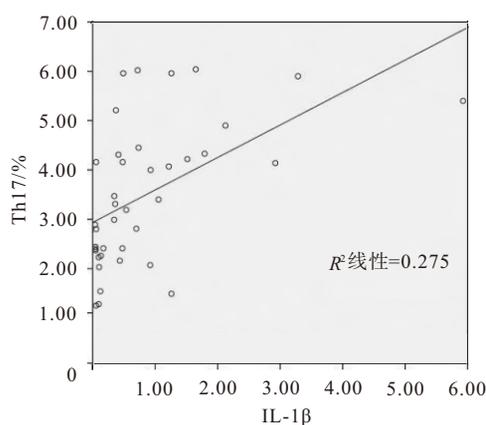


图1 宫颈癌组中IL-1 $\beta$ 表达水平与Th17细胞比例的相关性

## 2.3 单核细胞对 Th17 细胞分化的影响

**2.3.1** 两组外周血单核细胞分别与正常对照者的CD4<sup>+</sup>T细胞共培养后,检测两组中Th17细胞表达与对照组中Th17细胞比例( $0.90 \pm 0.39$ )相比,宫颈癌组中Th17细胞比例( $1.77 \pm 0.61$ )明显升高( $t=4.60, P < 0.001, n=15$ ),说明宫颈癌病人外周血中的单核细胞更能促进Th17细胞的分化( $P < 0.05$ )。

**2.3.2** 宫颈癌病人加入中和抗体的培养组与正常对照者的CD4<sup>+</sup>T细胞共培养后,检测三组中Th17细胞的比例 与未加中和抗体的空白对照组相比,实验组三组中Th17细胞比例均明显降低( $P < 0.05$ ),且加入anti-IL-1 $\beta$ 组与加入anti-IL-6组相比,Th17细胞

下降更为明显( $P < 0.05$ )。说明IL-1 $\beta$ 及IL-6均对Th17细胞的分化起了重要的作用,而IL-1 $\beta$ 在促进Th17细胞分化过程中的诱导作用可能更强。见表2。

表2 anti-白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、anti-IL-6对Th17细胞分化的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	Th17/%
空白对照组	12	1.82 $\pm$ 0.47
anti-IL-1 $\beta$ 组	12	0.76 $\pm$ 0.23 <sup>①</sup>
anti-IL-6组	12	1.06 $\pm$ 0.42 <sup>②</sup>
anti-IL-1 $\beta$ +anti-IL-6组	12	0.51 $\pm$ 0.34
F值		27.84
P值		<0.001

注:①与对照组比较, $P < 0.05$ 。②与anti-IL-1 $\beta$ 组比较, $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

Th17细胞作为一种辅助型T细胞,参与多种炎症相关性恶性肿瘤的发生发展,包括结肠癌、前列腺癌、肝癌等<sup>[10-13]</sup>。Salazar等<sup>[14]</sup>在肺癌研究中发现,Th17细胞在肺癌组织中明显升高,且与病人的生存率呈负相关,体外培养试验中发现,抑制IL-17的作用可减少上皮-间质转化,减缓肺癌细胞的侵袭和转移,说明Th17细胞在肺癌中发挥促癌的作用。在一项乳腺癌的研究中发现,IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T细胞在肿瘤微环境中表达明显升高,肿瘤组织中IL-17与血管内皮生长因子的表达、肿瘤血管密度呈正相关,提示IL-17在乳腺癌的进展中起到促进作用<sup>[15]</sup>。Xue等<sup>[16]</sup>研究发现,宫颈癌病人中,Th17细胞的比例随着肿瘤期别增加而逐步升高,推测在宫颈癌中,Th17细胞可能起到促进疾病进展的作用。此次我们通过流式细胞术检测到宫颈癌病人外周血Th17细胞比例明显增加,验证该细胞在宫颈癌中高表达,但是Th17细胞在宫颈癌中的分化尚不明确。

单核细胞可分泌多种细胞因子,包括IL-6,IL-1 $\beta$ ,IL-10等<sup>[17-18]</sup>,是IL-6,IL-1 $\beta$ 的重要分泌来源。而在原始CD4<sup>+</sup>T细胞向Th17细胞的分化过程中,多种细胞因子参与其中,主要包括IL-1 $\beta$ ,IL-6,IL-23,TGF- $\beta$ 等。Kuang等<sup>[19]</sup>研究发现,抑制肝癌小鼠体内的单核细胞所致的炎性环境,小鼠体内的Th17细胞比例显著减少,且肿瘤的生长速度明显减缓。提示在Th17细胞的分化过程中,单核细胞所分泌的细胞因子可能发挥了重要作用。我们通过qRT-PCR技术验证了宫颈癌病人外周血中表达较高水平的IL-1 $\beta$ 、IL-6,我们推测宫颈癌病人外周血中的单核细胞可能通过高表达这两种细胞因子促进Th17的分化。同时我们发现,宫颈癌病人中Th17细胞的表达水平与IL-1 $\beta$ 的表达水平呈显著正相关,推测IL-

IL-1 $\beta$ 可能对Th17细胞的分化起着更重要的作用。我们通过细胞共培养的方式进一步研究单核细胞、IL-1 $\beta$ 、IL-6对Th17细胞分化的影响。

从健康对照者外周血中分选出CD4<sup>+</sup>T细胞,分别与对照组和宫颈癌病人外周血中分离出的单核细胞共培养,结果发现,宫颈癌组中Th17细胞分化的比例明显升高,表明宫颈癌病人中的单核细胞更能促进Th17细胞的分化。为进一步研究单核细胞是否通过分泌IL-1 $\beta$ 及IL-6这两种细胞因子影响Th17细胞的分化,我们在与宫颈癌病人单核细胞共培养的体系中,分别加入抗IL-1 $\beta$ 抗体、抗IL-6抗体、IL-1 $\beta$ 抗体+抗IL-6抗体,结果显示,与未加中和抗体的空白对照组相比,加入两种细胞因子中和抗体后,Th17细胞分化的比例均明显下降,在加入抗IL-1 $\beta$ 组,Th17细胞比例下降较加入抗IL-6组更为明显,进一步验证在Th17细胞分化过程中,IL-1 $\beta$ 对Th17细胞的诱导作用更强。

综上所述,宫颈癌病人外周血中高表达Th17细胞,宫颈癌病人中的单核细胞可能通过分泌更高水平的IL- $\beta$ 及IL-6(尤其是IL-1 $\beta$ )促进了Th17细胞的分化,进而促进肿瘤的进展。但是诱导单核细胞分泌功能增强的机制仍有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] BUSKWOFIE A, DAVID-WEST G, CLARE CA. A Review of cervical cancer: incidence and disparities[J]. J Natl Med Assoc, 2020, 112(2): 229-232.
- [2] HEMMAT N, BANNAZADEH BAGHI H. Association of human papillomavirus infection and inflammation in cervical cancer[J]. Pathog Dis, 2019, 77(5): ftz048. DOI: 10.1093/femspd/ftz048.
- [3] CHANG SH. T helper 17 (Th17) cells and interleukin-17 (IL-17) in cancer[J]. Arch Pharm Res, 2019, 42(7): 549-559.
- [4] ASADZADEH Z, MOHAMMADI H, SAFARZADEH E, et al. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity[J]. Cell Immunol, 2017, 322: 15-25.
- [5] WILKE CM, KRYCZEK I, WEI S, et al. Th17 cells in cancer: help or hindrance?[J]. Carcinogenesis, 2011, 32(5): 643-649.
- [6] HOU F, LI Z, MA D, et al. Distribution of Th17 cells and Foxp3-expressing T cells in tumor-infiltrating lymphocytes in patients with uterine cervical cancer[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(23/24): 1848-1854.
- [7] MOSSANEN JC, KRENKEL O, ERGEN C, et al. Chemokine (C-C motif) receptor 2-positive monocytes aggravate the early phase of acetaminophen-induced acute liver injury[J]. Hepatology, 2016, 64(5): 1667-1682.
- [8] KUANG DM, PENG C, ZHAO Q, et al. Tumor-activated monocytes promote expansion of IL-17-producing CD8<sup>+</sup> T cells in hepatocellular carcinoma patients[J]. J Immunol, 2010, 185(3): 1544-1549.
- [9] TAKEDA K, AKIRA S. Toll-like receptors in innate immunity[J]. Int Immunol, 2005, 17(1): 1-14.
- [10] LIU Y, MIKRANI R, XIE D, et al. Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and prostate cancer: study of immune cells and cytokines[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2020, 34(2): 160-172.
- [11] WANG D, YU W, LIAN J, et al. Th17 cells inhibit CD8<sup>+</sup> T cell migration by systematically downregulating CXCR3 expression via IL-17A/STAT3 in advanced-stage colorectal cancer patients[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 68.
- [12] PEREZ LG, KEMPSKI J, MCGEE HM, et al. TGF- $\beta$  signaling in Th17 cells promotes IL-22 production and colitis-associated colon cancer[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2608.
- [13] SONG R, LI J, YANG HJ, et al. Role of signal transducer and activator of transcription 1 in regulation of Treg/Th17 balance in hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Hepatol, 2022, 38(11): 2627-2631.
- [14] SALAZAR Y, ZHENG X, BRUNN D, et al. Microenvironmental Th9 and Th17 lymphocytes induce metastatic spreading in lung cancer[J]. J Clin Invest, 2020, 130(7): 3560-3575.
- [15] QIAN XL, XU P, ZHANG YQ, et al. Increased number of intratumoral IL-17<sup>+</sup> cells, a harbinger of the adverse prognosis of triple-negative breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2020, 180(2): 311-319.
- [16] XUE JS, WANG YL, CHEN C. Effects of Th17 cells and IL-17 in the progression of cervical carcinogenesis with high-risk human papillomavirus infection[J]. Cancer Med, 2018, 7(2): 297-306.
- [17] CHÁVEZ-SÁNCHEZ L, CHÁVEZ-RUEDA K, LEGORRETA-HAQUET MV, et al. The activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mLDL induces IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages[J]. Lipids Health Dis, 2010, 9: 117. DOI: 10.1186/1476-511X-9-117.
- [18] REVU S, WU J, HENKEL M, et al. IL-23 and IL-1 $\beta$  drive human Th17 cell differentiation and metabolic reprogramming in absence of CD28 costimulation[J]. Cell Rep, 2018, 22(10): 2642-2653.
- [19] KUANG DM, PENG C, ZHAO QY, et al. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma promote expansion of memory T helper 17 cells[J]. Hepatology, 2010, 51(1): 154-164.

(收稿日期:2022-02-07,修回日期:2022-12-21)