مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۲۰۰/هفته دوم مهرماه ۱۳۹۱

مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۱/۶/۱

مطالعه‌ی سلول‌های Treg +Foxp3 در سلول‌های +T-CD4 و +T-CD8 خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان

دکترعلیرضا عندلیب[۱]، مهتاب تاپاک[۲]، دکتر پیمان متقی[۳]، دکتر شادی بابازاده[۴]، دکتر عباس رضایی[۵]، دکتر منصور ثالثی[۳]

چکیده

مقدمه: سلول‌های ایمنی و سایتوکین‌های آن‌ها در سرنوشت بدخیمی‌ها مؤثر هستند. سلول‌های Regulatory T cells (Tregs) گروه به نسبت جدیدی از سلول‌های T هستند که در تنظیم سایر سلول‌های اجرایی سیستم ایمنی از جمله T helper 1 (T_H1) و T helper 2 (T_H2) مؤثر می‌باشند. Forkhead box protein 3 (Foxp3)، عضو خانواده‌ی فاکتور نسخه‌برداری (Forkhead winged–helix) به عنوان فاکتور شاخص رده و عامل توسعه و همچنین حفظ فعالیت مهاری سلول‌های Treg شناخته شده است. تاکنون چندین زیر مجموعه از سلول‌های T تنظیمی +Foxp3 شناسایی شده‌اند که گروه‌های +CD4 +Foxp3 و +CD8 +Foxp3 از جمله‌ی آن‌ها هستند.

روش‌ها: سلول‌های تک هسته‌ایی خون محیطی پس از خون‌گیری از ۴۸ بیمار مبتلا به سرطان پستان و نیز از گروه شاهد سالم تهیه گردید. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی و رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی‌های کنژوگه‌ی ضد CD4، CD8 و Foxp3 تیمار شدند و برای سنجش مارکرها به روش فلوسیتومتری آماده‌سازی شدند.

یافته‌ها: آنالیز یافته‌های فلوسیتومتری و آماری نشان داد که میانگین سلول‌های واجد بروز Foxp3 در جمعیت سلول‌های +CD4 در گروه شاهد برابر ۰/۳۰ ± ۱/۲۵ درصد و در گروه بیماران برابر ۰/۷۴ ± ۱/۷۵ درصد محاسبه گردید (P = ۰/۰۰۴). میانگین فراوانی سلول‌های واجد بروز Foxp3 در جمعیت سلول‌های +CD8 در افراد گروه‌های شاهد و بیماران به ترتیب ۰/۱۶ ± ۰/۶۳ و ۰/۱۷ ± ۰/۷۱ درصد بود (P = ۰/۰۸). با این که تعداد گلبول‌های سفید خون و لنفوسیت‌های مبتلایان به بدخیمی پستان از گروه شاهد کمتر بود، ولی از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری حاصل نگردید (P > ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی نشان می‌دهد که با این که کلون‌های سلول‌های +Treg–Foxp3 در خون محیطی فراوانی قابل توجهی ندارد، ولی کمیت تغییرات آن‌ها در بدخیمی پستان قابل سنجش است. این تغییرات ممکن است عامل مؤثری در زمینه‌ی استعداد ابتلا به بیماری و یا تغییرات در ضمن روند بیماری تلقی گردد. بنابراین هدف قرار دادن سلول‌های Treg می‌تواند از اهداف نوین روش‌های درمانی ایمونولوژیک باشد.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، سلول‌های T تنظیمی، سلول‌های Foxp3، سلول‌های CD4، سلول‌های CD8

مقدمه

به طور معمول سلول‌های T یاریگر (T helper) بر حسب سایتوکین‌هایی که تولید می‌کنند به گروه‌های T_H1، T_H2 و T_H17 تقسیم می‌شوند (۱). سلول‌های T_H1 در پاسخ به IL-12 (Interleukin 12)، از لنفوسیت‌های +TCD4 تولید می‌شوند. ترشح سایتوکینی غالب آن‌ها IL-2 و IFN-γ (Interferon-γ) و نقش آن‌ها تقویت مکانیسم‌های ایمنی سلولی است. از

[۱] دانشیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] کارشناسی ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۳] دانشیار، گروه داخلی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۴] متخصص تومور شناسی و رادیوتراپی، بیمارستان سیدالشهدا (ع)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۵] استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر علیرضا عندلیب
Email: andalib@med.mui.ac.ir

سوی دیگر سلول‌های T_H2 در حضور IL-4 تمایز پیدا می‌کنند. این سلول‌ها IL-4، IL-5 و IL-13 تولید می‌کنند و به طور معمول ایمنی هومورال را تقویت می‌کنند و نیز در پاکسازی عفونت‌های انگلی اهمیت دارند (۲). عدم تعادل T_H1 و T_H2 ممکن است در بروز و پیشرفت بیماری‌های متعدد و عوارض حاصل از آن‌ها مؤثر باشد. آرتریت روماتویید (Rheumatoid arthritis یا RA) (۳)، دیابت نوع ۱ و اسکلروز متعدد (Multiple sclerosis یا MS) (۴) از جمله بیماری‌های مزمن التهابی و خودایمنی هستند که زیرمجموعه‌های T_H1 در آن‌ها غالب است. ولی بیماران با سرطان پیشرفته اغلب دچار اختلال ایمنی با واسطه‌ی سلولی و تغییرات سلول های اجرایی ایمنی همراه با گرایش به T_H2 در محیط تومور می‌شوند (۵). سلول‌های T تنظیمی (Regulatory T cells یا Treg) انواعی از سلول های ایمنی بدن هستند که در بلوکه نمودن فعالیت T_H1 و T_H2 و یا هر دو دخالت دارند و با بیان دایمی زنجیره‌ی آلفای گیرنده‌ی اینترلوکین ۲ (CD25) شناخته می‌شوند (۶). سلول‌های Treg زیر مجموعه‌ی مشخصی از سلول‌های T هستند که می‌توانند هم پاسخ‌های ایمنی هومورال و هم سلولی را مهار کنند (۸-۷). نقش سلول‌های Treg در شبکه‌ی سلول‌های ایمنی توسط Sakaguchi و همکاران اثبات شده است (۹). سلول‌های Treg نماینده‌ی زیر مجموعه‌ی مهمی از سلول های $TCD4^+$ هستند که در حفظ تحمل ایمنی به خود نقش دارند و حدود ۱۰-۵ درصد سلول های $TCD4^+$ در خون محیطی انسان را شامل می‌شوند (۱۰) و از تیموس منشأ می‌گیرند (۱۱). Forkhead box protein 3 (Foxp3) عضو خانواده‌ی فاکتور نسخه‌برداری Fork head winged helix به عنوان فاکتور شاخص رده و عامل توسعه و همچنین حفظ فعالیت مهاری سلول های Treg است که به طور اختصاصی در سلول‌های $TCD4^+CD25^{high}$ بیان می‌شود (۱۲). دسته‌ای از سلول‌های Treg وجود دارند که از تیموس مشتق نمی‌شوند و در محیط قابلیت تولید دایم Foxp3 را کسب می نمایند. در انسان منبع عمده‌ی سلول‌های Treg را این سلول‌ها تشکیل می‌دهند (۱۳). بنابراین Foxp3 مارکر ملکولی اختصاصی سلول های Treg در خون محیطی انسان شناخته شده است (۱۴). کاهش بیان Foxp3 با کاهش عملکرد مهاری سلول های Treg و تبدیل سلول های T به سلول‌های اجرایی (Effector) همراه است که باعث ایجاد بیماری‌های خودواکنشگر ایمنی می‌شود (۱۵). جهش در ژن Foxp3 در مدل آزمایشگاهی ایجاد بیماری شدید خودایمنی/ آلرژی (IPEX یا Immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) می‌کند که با نقص ایمنی کلی مشخص می‌شود (۱۷-۱۶). به تازگی تکوین و بروز ژن Foxp3 در زیر گروه‌های سلول‌های CD8 نیز گزارش شده است (۱۸). سلول های CD8 با تحریک مداوم آنتی‌ژن در حضور مونوسیت‌های $CD14^+$ تولید می‌شوند و برخلاف سلول‌های تنظیمی $CD4^+$ سلول‌های $CD8^+$ به طور عمده با مکانیسم تماسی خاصیت مهاری خود را اعمال می‌کنند (۱۹).

در انسان گزارشاتی مبنی بر افزایش Treg در خون محیطی بیماران سرطانی و تلاش برای حذف آن‌ها در in vivo جهت تقویت بقای ایمنی یا روشی برای ایمونوتراپی پیشنهاد شده است (۲۰). نتایج مطالعه‌ی Hueman و همکاران نشان داد که سلول‌های $CD4^+$ $CD25^+$ Treg در بیماران مبتلا به سرطان

پستان افزایش می‌یابد (۲۱). همچنین Liyanage و همکاران اعلام کردند که سلول‌های TCD4+ CD25+ Treg در خون محیطی و در محیط اطراف تومور در بیماران مبتلا به آدنوکارسینومای پستان افزایش می‌یابد (۱). یافته‌های Knutson و همکاران در مدل موشی سرطان پستان نشان داد که سلول‌های Treg در سرطان خود به خودی پستان افزایش می‌یابد (۲۲). Wolf و همکاران (۲۳) با استفاده از مارکرهای CD4+ CD25+ CD45+ RA و Linehan و Goedegebuure (۲۴) با مارکر CD4+ CD25+ مشخص نمودند که این سلول‌ها در بیماران مبتلا به سرطان پستان افزایش معنی‌داری داشته است. طبق مطالعات موجود می توان از سلول‌های Treg به عنوان پایه‌ی درمان ایمونولوژیکی در بیماری‌های مرتبط استفاده نمود، ولی در مورد تغییرات Treg در مراحل مختلف بیماری‌ها و در روند درمان آن‌ها اطلاعات کم و گاه متناقضی وجود دارد که مانع از طراحی جامع و بهینه در جهت گسترش ایمونوتراپی شده است (۲۵).

در مطالعه‌ی حاضر میانگین مقادیر سلول‌های T اجرایی CD8 و CD4 واجد شاخص‌های Treg در مبتلایان به سرطان پستان ارزیابی شد.

روش‌ها

در این بررسی از ۴۸ بیمار مبتلا به سرطان پستان در بیمارستان سیدالشهدا (ع) و میلاد واقع در شهر اصفهان مقدار ۵ میلی‌لیترخون برای آزمایشات معمول، انجام رنگ‌آمیزی و انجام فلوسیتومتری گرفته شد. به علاوه، از ۲۱ فرد سالم که شرایط سنی و جنسی مشابه بیماران داشتند نیز نمونه‌ی خون گرفته شد و با روش مشابه آماده سازی گردید. انجام شمارش سلولی به روش استاندارد از خون گرفته شده در لوله‌ی حاوی ماده‌ی ضد انعقاد، با دستگاه هماتولوژی اتوماتیک انجام شد. در این بررسی نمونه‌های با تشخیص سرطان پستان وارد مطالعه گردیدند و سایر تشخیص‌ها از مطالعه خارج شدند.

برای آماده‌سازی نمونه جهت خوانش با فلوسیتومتری، خون گرفته شده از بیمار در لوله‌ی حاوی هپارین با همان حجم فسفات بافر ایزوتونیک سرد (PBS یا Phosphate-buffered saline) مخلوط شد و سپس روی شیب چگالی فایکول هایپاک با چگالی ۱/۰۷۷ قرار گرفت (۲۶). پس از انجام سانتریفوژ نمونه در سانتریفیوژ یخچال‌دار بدون استفاده از ترمز و مشاهده‌ی سلول‌ها در حد فاصل دو لایه‌ی فایکول، لایه ی سلولی توسط پیپت پاستور جدا شد و در لوله‌ای با بافر Hank's دو بار شستشو داده شد. پس از جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC یا Peripheral blood mononuclear cell) به تعداد آنتی‌بادی‌های مورد استفاده و کنترل منفی (بدون آنتی‌بادی)، سلول‌ها در لوله‌ها تقسیم گردید. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کنژوگه‌ی ضد CD4 و CD8 به لوله‌های مورد اشاره به طور مجزا اضافه شد. نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی (برای اجتناب از نور) انکوبه شد. بعد از رنگ‌آمیزی سطح سلولی در مرحله‌ی بعد برای رنگ‌آمیزی داخل سلولی آنتی‌بادی ضد Foxp3 اضافه گردید و به مدت ۴۵ دقیقه همراه با ورتکس شدید انکوبه شد. سپس آنتی‌بادی‌های اضافه و واکنش نداده دو مرتبه با بافر PBS شستشو داده شدند و نمونه‌ها در ۴۰۰-۳۰۰ میکرولیتر از بافر PBS برای آنالیز فلوسیتومتری FACSCalibur (BD, USA) قرار

www.mui.ac.ir

گرفتند. از آنتی بادی های زیر جهت انجام آزمایشات استفاده گردید:

Phycoerythrin (PE) conjugated Anti-human Foxp3 monoclonal antibody (BD Bioscience, clone#259D/C7)
Fluorescein Isothiocyanate (FITC) conjugated Anti-human CD4 monoclonal antibody (mouse IgG1, From BD Bioscience, clone# MOPC-21)
Fluorescein Isothiocyanate (FITC) conjugated Anti-human CD8 monoclonal antibody (mouse IgG1, BD Bioscience, clone#MOPC-21)
Mouse IgG/IgG Isotype control (BD Bioscience, clone# X40)

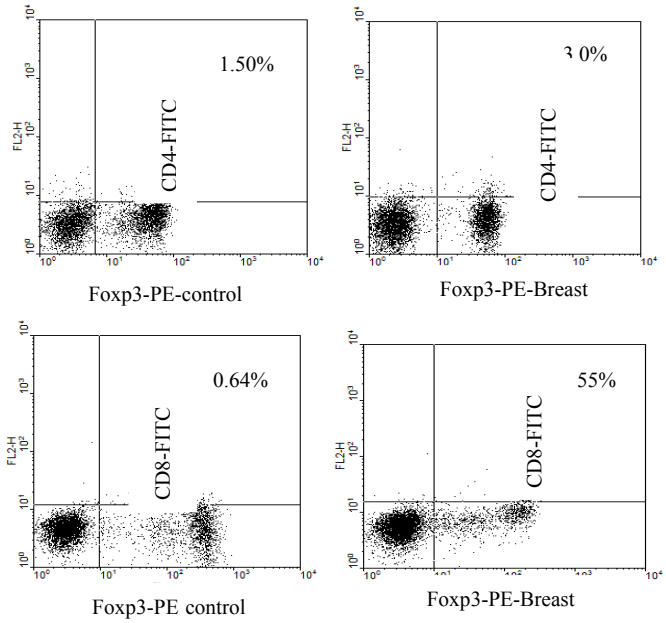
سیستم فلوسیتومتری بر مبنای تشخیص رنگ های فلورسنت متصل به مارکرهای در حال حرکت در مقابل دتکتورهای حساس می‌باشد. در این مطالعه از فلوروکروم ایزوتیوسیانات فلورسین (FITC) متصل به مارکرها ویژه‌ی خوانش با دستگاه فلوسیتومتری استفاده گردید که به دلیل فلورسنت بودن توانایی جذب طیف نوری ۴۸۸ نانومتر و انعکاس طول موج بالاتر از آن را (۵۳۰ نانومتر) دارد. به علاوه از فلوروکروم فیکواریترین (PE) که طیف جذبی متفاوت (۵۷۰ نانومتر) در انعکاس طول موج دارد، برای تمایز مارکرهای رنگ‌آمیزی شده استفاده گردید. چنان چه در پلات‌های آنالیز مشاهده می گردد (شکل ۱)، در سیستم فلوسیتومتری مقادیر هر کدام از نورهای جذب شده از مارکرهای سلول‌های رنگ‌آمیزی شده توسط سیستم رایانه ایی به صورت گراف ها و اعداد محاسبه شده منعکس می‌شود که از آن‌ها به صورت داده‌های آماری استفاده شد. لوله‌های حاوی سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با آنتی بادی‌های مونوکلونال با گیت (Gate) نمودن دستگاه با لنفوسیت ها تنظیم شد تا سلول های دیگر را از آنالیز خارج کند. به طور معمول در این سیستم ۱۰۰۰۰ سلول از هر لوله شمارش می شود. نتایج به صورت درصد کل PBMC در سوسپانسیون سلولی گزارش شد و برای تصحیح اتصالات غیر اختصاصی و کنترل زمینه ای از آنتی بادی ایزوتایپ موشی جهت کنترل روند خوانش استفاده شد و نتایج به صورت هیستوگرام یا دات پلات جهت مطالعات تکمیلی در فایل های مجزا جمع‌آوری گردید (۲۰).

در این مطالعه شمارش گلبول‌های سفید توسط دستگاه هماتولوژی اتوماتیک انجام شد. درصد لنفوسیت‌ها از محاسبه‌ی Differential آنالیز نمونه‌ها حاصل گردید و نسبت اعداد در ده هزار سلول خوانده شده توسط فلوسیتومتری محاسبه گردید.

اطلاعات حاصل از فلوسیتومتری با استفاده از نرم افزار CellQuest تحلیل آماری گردید. نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار برای هر گروه از نمونه ها بیان شد. جهت مقایسه ی گروه شاهد با بیماران آزمون Student-t در نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده گردید. شاخص معنی‌دار آماری $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین تعداد گلبول های سفید در بیماران مبتلا به سرطان پستان قبل از شیمی درمانی ۲۱۷۸ ± ۵۳۰۶ و بعد از آن ۲۳۵۰ ± ۴۸۱۵ و در افراد گروه شاهد ۱۶۵۸ ± ۶۳۰۹ بود. مقایسه‌ی آماری نشان داد که میانگین گلبول‌های سفید بیماران قبل و بعد از شیمی‌درمانی اختلاف معنی‌داری نداشت ($P = ۰/۷۱۱$). مقایسه‌ی میانگین تعداد گلبول‌های سفید در گروه شاهد با مبتلایان قبل از شیمی‌درمانی نیز اختلاف معنی‌داری نداشت ($P = ۰/۱۵۲$)، اما با میانگین گلبول‌های سفید در گروه بیماران بعد از شیمی‌درمانی تفاوت معنی‌داری داشت ($P = ۰/۰۱$).



شکل ۱. نتایج فلوسیتومتری به صورت دات پلات از یک بیمار مبتلا به سرطان پستان یک نمونه‌ی کنترل نشان داده شده است. به طور عموم در این گونه نمودارها هر نقطه حاصل نمایش یک سلول مورد خوانش می‌باشد (شباهت پارامترهای سلول‌های مشابه باعث بر هم قرار گرفتن نقاط در صفحه می‌گردد). بر حسب طراحی نرم‌افزار هر صفحه‌ی دات پلات با دو خط عمود بر هم به چهار کادر تقسیم می‌گردد. نقاط موجود در خانه‌ی چپ پایین نمایانگر کنترل سلولی بدون رنگ و یا در نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده به عنوان جمعیت سلولی فاقد پارامترهای به کار برده شده می‌باشد. کادر چپ بالایی در کنار محور Y نمایانگر درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با مارکر متصل به فلوروکروم ایزوتیوسیانات فلورسین (FITC یا Fluorescein Isothiocyanate) و از لحاظ فلوروکروم فیکواریترین (PE) منفی می‌باشد. کادر سمت راست پایین نمایانگر درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با مارکر متصل به PE و از لحاظ FITC منفی می‌باشد. کادر سمت راست بالا شامل درصد سلول‌هایی است که واجد هر دو مارکر متصل به FITC و PE یا مثبت دوگانه (Double positive) می‌باشد. پلات‌های ارائه شده به عنوان نماینده‌ی بررسی Forkhead box protein 3 (Foxp3) مطالعه شده در سلول‌های CD4 یا CD8 نشان داده شده است.

داده‌های به دست آمده نشان داد که تعداد لنفوسیت‌ها در گروه بیماران قبل از شیمی‌درمانی ۶۸۰ ± ۱۷۴۰ (۲۰/۷۹ ± ۳۹/۲۶ درصد گلبول‌های سفید) و بعد از شیمی‌درمانی ۱۰۳۰ ± ۱۵۶۴ یا (۱۶/۳۵ ± ۳۳/۵۴ درصد گلبول‌های سفید) و درگروه شاهد برابر ۳۳۷ ± ۲۰۵۷ یا (۸/۴۹ ± ۳۴/۳۲ درصد گلبول‌های سفید) بوده است. مقایسه‌ی میانگین لنفوسیت‌ها در گروه بیماران قبل و بعد از شیمی‌درمانی اختلاف آماری معنی‌داری نداشت (P = ۰/۲۴۹). تفاوت آماری معنی‌داری نیز بین لنفوسیت‌های گروه بیماران و شاهد قبل از شیمی‌درمانی (P = ۰/۱۵۶) و بعد از شیمی‌درمانی (P = ۰/۸۳۲) مشاهده نشد.

میانگین سلول‌های واجد بروز Foxp3 در جمعیت سلول های TCD+4 در گروه شاهد برابر ۰/۳ ± ۱/۲۵ درصد و در گروه بیماران برابر ۰/۷۴ ± ۱/۷۵ درصد محاسبه گردید. مقایسه‌ی میانگین فراوانی سلول‌های CD4+ Foxp3+ Treg بین گروه شاهد و بیماران نشان دهنده افزایش معنی‌دار درصد سلول‌های CD4+ Foxp3+ Treg بود (P = ۰/۰۰۴).

میانگین فراوانی سلول های واجد بروز Foxp3 در جمعیت سلول‌های $TCD^{+}8$ در گروه شاهد برابر

www.mui.ac.ir

۰/۱۶ ± ۰/۶۳ درصد و در گروه بیماران برابر ۰/۱۷ ± ۰/۷۱ درصد بود (P = ۰/۰۸۰).

بحث

در حال حاضر پذیرفته شده است که سلول های Treg مراقبت ایمنی مؤثر ضد توموری را بر هم می‌زنند و مانع عمده‌ای برای توسعه‌ی موفقیت‌آمیز ایمونوتراپی سرطان‌ها هستند. بر اساس تحقیقات انجام شده در بیماران مبتلا به سرطان پستان، افزایش نفوذ Treg به تومورهای اولیه، وضعیت بالینی ناخوشایندی را قابل پیش‌بینی می‌کند (۲۷). در شرایط آزمایشگاهی، سلول های Treg جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان پستان تکثیر سلول‌های T اجرایی را مهار می‌نمایند (۲۸). در بررسی حاضر فراوانی و شمارش مطلق سلول‌های CD4+ Foxp3+ Treg و CD8+ Foxp3+ Treg در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان اندازه‌گیری و با گروه شاهد مقایسه گردید. یافته‌های ما نشان داد که تفاوت آماری معنی داری در فراوانی سلول‌های CD4+ Foxp3+ Treg در خون محیطی بیماران با گروه شاهد وجود داشت. افزایش سلول های T تنظیمی در محل تومور ممکن است رشد موضعی تومور را افزایش دهد، در حالی که افزایش این سلول ها در خون محیطی مربوط به پیشرفت بیماری سیستمیک می‌باشد. این گونه نتایج می‌تواند استراتژی های جدیدی را برای ایمونوتراپی قابل تبیین نماید (۲۹).

نشان داده شده است که سلول‌های CD4+ CD25+ Treg در خون محیطی مبتلایان به سرطان پستان افزایش می‌یابد (۲۱). در مطالعات Knutson و همکاران (۲۲)، Wolf و همکاران (۲۳) و Linehan و Goedegebuure (۲۴) نیز نتایج مشابهی گزارش شده و افزایش فراوانی این سلول ها در انواع مختلف سرطان‌ها از جمله بدخیمی سلول‌های اپی‌تلیال و آدنوکارسینوما نیز مشاهده شده است (۱). گزارش Miller و همکاران نشان داد که فراوانی سلول‌های TCD4+ CD25+ Treg در بیماران مبتلا به سرطان پروستات نیز افزایش داشته است (۳۰). نتایج آزمایشات ما نیز یافته های ایشان را تأیید نمود. از این شباهت می‌توان نتیجه‌گیری نمود که افزایش سلول‌های Treg ممکن است محیط رشد مناسبی را جهت رشد سلول های سرطانی در بدن فراهم آورد. نتایج ما نشان می دهد که تعداد مطلق TCD4+ در بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با گروه شاهد کاهش داشته است که این کاهش می‌تواند به علت اثرات شیمی‌درمانی باشد (۲۵). به علاوه کاهش در این سلول‌ها می‌تواند در جهت تضعیف سیستم ایمنی عمل کند. این یافته‌ها با بررسی Mackall و همکاران تشابه دارد (۳۱). از آن جایی که مطالعه‌ی ما تعداد سلول های Treg را در خون نشان می دهد، ممکن است نشان‌دهنده‌ی تعداد یا انعکاسی از سلول‌های Treg در سطح بافت نباشد. بررسی‌های ایمونوهیستوشیمی بافت توموری و مقایسه‌ی آن با خون محیطی می‌تواند تأثیرات محیط تومور را در تغییر درصد Tregها در بافت، در قیاس با PBMC تقویت کند. از آن جا که حذف سلول‌های Treg ممکن است بتواند پاسخ های ضد تومور مؤثر ایمنی را آشکار کند. بنابراین انتقال مجدد سلول های Treg به محل تومور ممکن است به انحرف پاسخ های T اختصاصی تومور به زیرگروه‌های تنظیمی منجر شود و در نتیجه ایمنی مؤثر ضد توموری را از بین ببرد (۳۲).

پیشنهاد شده است که ترکیبی از حذف موضعی یا تضعیف سلول‌های Treg و تحریک هم‌زمان سلول‌های CTL (Cytotoxic T lymphocyte) در تومور ممکن است در ایمونوتراپی سرطان پستان، به خصوص در موارد پیشرونده‌ی بیماری مؤثر باشد (۳۳).

سلول‌های CD8+ Foxp3+ Treg گروه جدیدی از سلول های Treg هستند که اثرات مهارکننده ای بر سلول های TCD4+ برای آن ها ذکر شده است (۳۴). یافته‌های ما نشان داد که میانگین سلول‌های CD8+ Foxp3+ Treg در بیماران مبتلا در مقایسه با شاهد ارتباط معنی داری نداشت، ولی روندی به سوی معنی‌دار شدن را نشان داد (P = ۰/۰۸). در بررسی Chaput و همکاران نشان داده شد که CD8+ CD25+ Foxp3+ Treg در خون محیطی و بافت توموری مبتلایان به سرطان کولورکتال افزایش می یابد (۳۵). به علاوه درصد سلول‌های CD8+ Foxp3+ Treg در PBMCs افراد سالم و مبتلایان به سرطان پروستات تغییرات جزیی داشته است. این یافته‌ها نشان داد که این سلول ها در فرار سلول های سرطانی از سیستم ایمنی و پیشرفت بیماری ممکن است نقش داشته باشند (۳۵). القای این سلول‌ها ممکن است جایگزین جدیدی برای ایمونوتراپی بیماری‌ها به ویژه بیماری خودایمنی باشد. به علاوه در سایر بیماری‌ها گزارش‌هایی از حضور CD4+ Foxp3+ در روند بیماری‌ها بیان شده است. به عنوان مثال در مطالعه‌ی Frisullo و همکاران تفاوت معنی‌داری از لحاظ درصد سلول‌های CD8+ CD25+ Foxp3+ Treg در بیماران مبتلا به MS با گروه سالم مشاهده نگردید (۳۶)، ولی در گزارش Lim و همکاران درصد سلول‌های CD8+ CD25+ Foxp3+ Treg در مبتلایان به ایدز افزایش داشت (۳۷). این زیر مجموعه از سلول‌های CD8 ممکن است در مقاومت‌های ویروسی و پیشرفت روند سرطان نیز نقش داشته باشند (۳۶). این تغییرات ممکن است عامل مؤثری در استعداد ابتلا به بیماری باشد و هدف قرار دادن سلول های Treg شاید بتواند به عنوان روشی نوین درمانی مطرح باشد که در بعضی از بررسی‌های اخیر نیز منعکس شده است (۳۸).

تشکر و قدردانی

این مطالعه با شماره‌ی ۳۸۹۲۰۳ در معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ثبت و حمایت مالی شد. نویسندگان ضمن آرزوی سلامتی، از بیمارانی که در پروژه شرکت نمودند قدردانی می‌نمایند.

References

1. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. J Immunol 2002; 169(5): 2756-61.
2. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. Nat Immunol 2007; 8(9): 950-7.
3. Cope AP. T cells in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther 2008; 10(Suppl) 1: S1.
4. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. Altern Med Rev 2003; 8(3): 223-46.
5. Shurin MR, Lu L, Kalinski P, Stewart-Akers AM, Lotze MT. Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. Springer Semin Immunopathol 1999; 21(3): 339-59.
6. McGuirk P, Mills KH. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. Trends Immunol 2002; 23(9): 450-5.
7. Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. Nat Rev Immunol

2002; 2(6): 389-400.
8. Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O. CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol 2005; 140(2): 360-7.
9. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. Cell 2008; 133(5): 775-87.
10. Van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. Arthritis Rheum 2004; 50(9): 2775-85.
11. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. Nat Immunol 2001; 2(4): 301-6.
12. Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. Nat Immunol 2007; 8(3): 277-84.
13. Pillai V, Karandikar NJ. Human regulatory T cells: a unique, stable thymic subset or a reversible peripheral state of differentiation? Immunol Lett 2007; 114(1): 9-15.
14. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science 2003; 299(5609): 1057-61.
15. Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. Nature 2007; 445(7129): 766-70.
16. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nat Genet 2001; 27(1): 20-1.
17. Boissier MC, Assier E, Biton J, Denys A, Falgarone G, Bessis N. Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. Joint Bone Spine 2009; 76(1): 10-4.
18. Kiniwa Y, Miyahara Y, Wang HY, Peng W, Peng G, Wheeler TM, et al. CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. Clin Cancer Res 2007; 13(23): 6947-58.
19. Mahic M, Henjum K, Yaqub S, Bjornbeth BA, Torgersen KM, Tasken K, et al. Generation of highly suppressive adaptive CD8(+)CD25(+) FOXP3(+) regulatory T cells by continuous antigen stimulation. Eur J Immunol 2008; 38(3): 640-6.
20. Powell DJ, Jr., Attia P, Ghetie V, Schindler J, Vitetta ES, Rosenberg SA. Partial reduction of human FOXP3+ CD4 T cells in vivo after CD25-directed recombinant immunotoxin administration. J Immunother 2008; 31(2): 189-98.
21. Hueman MT, Stojadinovic A, Storrer CE, Foley RJ, Gurney JM, Shriver CD, et al. Levels of circulating regulatory CD4+CD25+ T cells are decreased in breast cancer patients after vaccination with a HER2/neu peptide (E75) and GM-CSF vaccine. Breast Cancer Res Treat 2006; 98(1): 17-29.
22. Knutson KL, Dang Y, Lu H, Lukas J, Almand B, Gad E, et al. IL-2 immunotoxin therapy modulates tumor-associated regulatory T cells and leads to lasting immune-mediated rejection of breast cancers in neu-transgenic mice. J Immunol 2006; 177(1): 84-91.
23. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstein B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. Clin Cancer Res 2003; 9(2): 606-12.
24. Linehan DC, Goedegebuure PS. CD25+ CD4+ regulatory T-cells in cancer. Immunol Res 2005; 32(1-3): 155-68.
25. Rech AJ, Mick R, Kaplan DE, Chang KM, Domchek SM, Vonderheide RH. Homeostasis of peripheral FoxP3(+) CD4 (+) regulatory T cells in patients with early and late stage breast cancer. Cancer Immunol Immunother 2010; 59(4): 599-607.
26. Loos JA, Roos D. Ficoll-isopaque gradients for the determination of density distributions of human blood lymphocytes and other reticulo-endothelial cells. Exp Cell Res 1974; 86(2): 333-41.
27. Wolf AM, Rumpold H, Wolf D, Gastl G, Reimer D, Jenewein N, et al. Role of forkhead box protein 3 expression in invasive breast cancer. J Clin Oncol 2007; 25(28): 4499-500.
28. DeLong P, Carroll RG, Henry AC, Tanaka T, Ahmad S, Leibowitz MS, et al. Regulatory T cells and cytokines in malignant pleural effusions secondary to mesothelioma and carcinoma. Cancer Biol Ther 2005; 4(3): 342-6.
29. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. Cancer Res 2001; 61(12): 4766-72.
30. Miller AM, Lundberg K, Ozenci V, Banham AH, Hellstrom M, Egevad L, et al. CD4+CD25high T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients. J Immunol 2006; 177(10): 7398-405.
31. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Magrath

IT, Shad AT, Horowitz ME, et al. Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer. Blood 1994; 84(7): 2221-8.

32. Jarnicki AG, Lysaght J, Todryk S, Mills KH. Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells. J Immunol 2006; 177(2): 896-904.

33. Liu F, Lang R, Zhao J, Zhang X, Pringle GA, Fan Y, et al. CD8(+) cytotoxic T cell and FOXP3(+) regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. Breast Cancer Res Treat 2011; 130(2): 645-55.

34. Correale J, Villa A. Role of CD8+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in multiple sclerosis. Ann Neurol 2010; 67(5): 625-38.

35. Chaput N, Louafi S, Bardier A, Charlotte F, Vaillant JC, Menegaux F, et al. Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. Gut 2009; 58(4): 520-9.

36. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Plantone D, Patanella AK, Tonali PA, et al. CD8(+)Foxp3(+) T cells in peripheral blood of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. Hum Immunol 2010; 71(5): 437-41.

37. Lim A, Tan D, Price P, Kamarulzaman A, Tan HY, James I, et al. Proportions of circulating T cells with a regulatory cell phenotype increase with HIV-associated immune activation and remain high on antiretroviral therapy. AIDS 2007; 21(12): 1525-34.

38. Falgarone G, Duclos M, Boissier MC. TNFalpha antagonists in rheumatoid arthritis patients seen in everyday practice. Joint Bone Spine 2007; 74(6): 523-6.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 200, 2nd week, October 2012 Received: 7.6.2012 Accepted: 22.8.2012

Forkhead Box Protein 3 and Regulatory T Cells in Cluster of Differentiation 4 and 8 T cell Subsets in Peripheral Blood of Patients with Breast Cancer

Alireza Andalib PhD[1], Mahtab Tapak MSc[2], Payman Mottaghi MD[3], Shady Babazadeh MD[4], Abbas Rezaei PhD[5], Mansoor Salesi MD[3]

Abstract

Background: Immune cells and their cytokine production affect in the outcomes of many malignancies. Two subsets of cluster of differentiation 4 T cells (TCD4+) are categorized as T helper 1 (T_H1) and 2 (T_H2) which differ in their cytokine profile. T_H1/T_H2 cell balance could shift toward T_H2-type responsiveness in many malignancies. Regulatory T cells (Treg) are a new group of T cells which are indicated to adjust other immune cells including T helper cells. Forkhead box protein 3 (Foxp3) is a lineage-determining transcription factor for Treg. Several subsets of Foxp3 and Treg have been identified. $CD4^+Foxp3^+$Treg and $CD8^+Foxp3^+$Treg are the main cell population in circulation and were the subject of evaluation in this study.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from 48 patients with breast cancer and 21 healthy controls. Monoclonal antibodies including anti-CD4, anti-CD8 and anti-Foxp3 were used and specific staining process was performed. Flow cytometry was applied for evaluation and assessment of the markers.

Findings: The percentage of $CD4^+Foxp3^+$Treg was 1.75 ± 0.74 in breast cancer group and 1.25 ± 0.30 in the control group (P = 0.004). The corresponding values for $CD8^+Foxp3^+$ Treg were 0.71 ± 0.17 and 0.63 ± 0.16 percent (P = 0.080). The mean of white blood cell (WBC) count and lymphocyte population in the breast cancer group were lower than the control group but the differences were not statistically significant.

Conclusion: According to our findings, altered frequency of Treg might be involved in the prognosis of breast cancer. This may be a contributory factor in the susceptibility to breast cancer. Therefore, targeting Treg can be a novel therapeutic approach in this disease.

Keywords: Breast cancer, Regulatory T cells, Foxp3, CD4, CD8, T cells

[1] Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[2] Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[3] Associate Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[4] Department of Radiotherapy and Oncology, Seyed-Al-Shohada Hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[5] Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Alireza Andalib PhD, Email: andalib@med.mui.ac.ir