

• 临床检验研究论著 •

肝癌切除术联合 TACE 对原发性肝癌患者细胞免疫和调节性 T 淋巴细胞的影响*

莫红梅¹, 柴晓玮², 玄祖旗²

(新疆维吾尔自治区人民医院:1. 临床检验中心;2. 放射介入诊疗科, 新疆乌鲁木齐 830001)

摘要:目的 探讨原发性肝癌(PLC)患者经肝癌切除术联合经导管动脉内化疗栓塞(TACE)后细胞免疫及调节性 T 淋巴细胞的变化及其临床价值。方法 采用流式细胞术检测健康者及 PLC 患者肝癌切除术联合 3 次 TACE 治疗后外周血 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ T 细胞及调节性 T 淋巴细胞,同时采用化学发光法监测血清甲胎蛋白(AFP)的变化。结果 PLC 患者肝癌切除术联合 3 次 TACE 治疗后外周血中 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ T 细胞数均显著低于健康对照组($P < 0.05$),但 3 个治疗组组间差异无显著性($P > 0.05$);3 个治疗组患者 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T 细胞的比例均高于健康对照组($P < 0.05$),但 3 个治疗组组间差异无显著性($P > 0.05$);AFP 阳性患者 TACE 治疗期间,AFP 的水平均远远高于健康者($P < 0.05$),三个治疗组间差异无统计学意义($P > 0.05$);CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T 细胞与血清 AFP 的相关系数为 0.542。结论 TACE 并不能改善 PLC 患者肝癌切除术后的免疫状况,但机体的细胞免疫与疾病的发展呈正相关的。

关键词:原发性肝癌; T 淋巴细胞; 肝癌切除术; 经导管肝动脉化疗栓塞术; 甲胎球蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)21-2825-02

Effects of liver resection combined with TACE on cellular immunity and regulatory T cells of patients with primary liver cancer

Mo Hongmei¹, Chai Xiaowei², Xuan Zuqi²

(1. Center for Clinical Laboratories; 2. Diagnostic Therapeutic Intervention, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjing 830001, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of cellular immune function and regulatory T cells of patients with primary liver cancer(PLC) who had accepted liver resection combined with transcatheter arterial chemoembolization(TACE) and its clinical value. **Methods** Flow cytometry was employed to detect peripheral blood CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ T cells of healthy people and PLC patients who had accepted liver resection combined with three times TACE. Chemiluminescence was used to monitor the serum alpha-fetoprotein(AFP) changes. **Results** The numbers of peripheral blood CD3, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ T cells of PLC patients were significantly lower than those in health control group($P < 0.05$), with no statistical differences among three treatment groups($P > 0.05$). The CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells' ratios of patients in the three groups were all higher than those in health control group($P < 0.05$), with no statistical differences among three treatment groups($P > 0.05$). AFP level of patients with positive AFP during TACE treatment was markedly higher than that in healthy people($P < 0.05$), with no statistical differences among three treatment groups($P > 0.05$). Correlation coefficient of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells and serum AFP was 0.542. **Conclusion** TACE treatment could not improve the immune status of PLC patients after hepatectomy, but the body's cellular immunity shows positive correlation with disease development.

Key words: primary liver cancer; T lymphocytes; liver resection; transcatheter arterial chemoembolization; alpha-fetoprotein

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)的发病率在恶性肿瘤中占第 5 位,致死率占第 3 位^[1]。中国是 PLC 的高发区,目前肝癌的治疗包括手术切除、肝移植、消融治疗及经导管动脉内化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)^[2-3]。70%~80%的 PLC 患者诊断时病情已发展到中、晚期,且手术切除复发率高,而 TACE 治疗具有创伤小,对局部治疗效果好,操作简便的优点,得到了迅速发展,并且在 PLC 的治疗中取得了良好的效果,已成为临床上早期 PLC 和术后复发肝癌的重要治疗手段^[4]。本研究使用流式细胞术检测 PLC 经肝癌切除术联合 TACE 治疗后的调节性 T 淋巴细胞(regulatory T lymphocyte, Treg)的变化,借此来探讨 TACE 对 PLC 患者免疫功能的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集新疆维吾尔自治区人民医院 2010 年 1 月至 2013 年 4 月期间经临床症状、影像学资料[CT 或磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)]及甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)检测,确诊为 PLC 的 35 例住院患者,均接受肝癌切除术,术后行 3 次 TACE 治疗,其中,男 24 例,女 11 例;平均年龄(52.8±11.9)岁。所有病例均为在慢性乙型病毒性肝炎基础上合并肝癌。肝癌诊断标准符合第 8 届全国肝癌学术会议(广州)制定的 PLC 临床诊断标准,排除其他肝炎病毒感染及合并自身免疫性、酒精性肝病等。根据血常规、肝功能等予以肝功能 Child-Pugh 分级评级为 I 级。另选择年龄、性别匹配的 35 例健康者作为对照。

* 基金项目:新疆维吾尔自治区卫生厅青年科技人才专项基金项目(2008Y06)。作者简介:莫红梅(1972~),女,博士,副主任技师,主要从事血液免疫学检测工作。

1.2 主要试剂及设备 主要试剂为: 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记鼠抗人 CD25 抗体、藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 标记鼠抗人 FoxP3 抗体、PerCP 标记的鼠抗人 CD4 抗体, 以及 FITC、PE、PerCP 标记的鼠抗人 IgG1 同型对照抗体, 上述抗体均购自美国 BD 公司; FITC 标记鼠抗人 CD4 抗体、PE 标记的鼠抗人 CD8 抗体、PerCP 标记的鼠抗人 CD3 抗体, 均购自美国 BD 公司。主要仪器: TruCOUNT 绝对计数管 (美国 BD 公司)、Calibur 流式细胞检测仪 (美国 BD 公司) 及美国雅培 (Abbott) 公司 i2000 化学发光分析仪。

1.3 方法 采用流式细胞技术, 用乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)-K₂ 抗凝剂采血管收集 PLC 患者手术 1 个月后第 1 次 TACE 前、第 2 次 TACE 前、第 3 次 TACE 前和健康志愿者的静脉血 3 mL, 取 50 μL 全血, CD3-PerCP、CD4-FITC、CD8-PE 混合试剂 10 μL, 加入 TruCOUNT 绝对计数管, 4 ℃ 避光孵育 20 min, 溶血素 450 μL, 避光 30 min 后上机检测 CD3⁺ T 细胞, CD3⁺ CD4⁺ T 细胞, CD3⁺ CD8⁺ T 细胞的细胞数。取 50 μL 全血, CD4-PerCP、CD25-FITC 抗体同型对照 IgG1-FITC/PerCP 各 10 μL, 4 ℃ 避光孵育 20 min, 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered solution, PBS) 洗涤 1 次, 离心后用 PBS 洗涤 1 次, 破膜 20 min, 破膜液洗涤后分别加入 FoxP3-PE、IgG2a-PE 同型对照 10 μL, 4 ℃ 避光孵育 20 min, 破膜液洗涤 1 次, 上机检测。上机使用 CELLQuest 软件收获细胞并分析 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞、CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T 细胞的比例。采用雅培 i2000 化学发光分析仪, 用化学发光法测定血清 AFP 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组内各时间点比较采用 *t* 检验, 相关分析应用 Pearson 相关系数法, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

PLC 患者接受肝癌切除术后行 3 次 TACE 治疗中, 外周血 T 细胞亚群 CD3⁺、CD3⁺ CD4⁺、CD3⁺ CD8⁺ T 细胞数的变化见图 1。

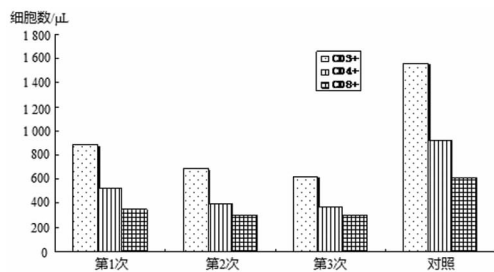


图 1 PLC 患者术后 3 次 TACE 治疗中外周血 T 细胞各亚群的变化

与健康对照组比较, PLC 患者肝癌切除术后 3 次 TACE 治疗过程中, 无论是 T 淋巴细胞总数还是辅助性 T 淋巴细胞 (helper T lymphocyte, Th) 均低于健康对照组 ($P<0.05$), 存在细胞免疫功能低下; 第 1、2、3 次介入治疗后, 各组间 CD3⁺、CD3⁺ CD4⁺、CD3⁺ CD8⁺ T 淋巴细胞的数量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。PLC 患者肝癌切除术后三次 TACE 治疗过程中外周血 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T 细胞亚群变化见图 2。PLC 患者肝癌切除术后 3 次 TACE 治疗前 CD4⁺ CD25⁺ T 和 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ 细胞比例均高于健康对照组 ($P<0.05$), 治疗组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。PLC 患者肝癌切除术后 3

次 TACE 治疗过程中, 血清 AFP 水平的变化见图 3。与健康对照组比较, 35 例患者中有 26 例 AFP>20 ng/mL, AFP 阳性患者 TACE 治疗前、后, AFP 水平高于健康者 ($P<0.05$), 3 次治疗前、后差异无统计学意义 ($P>0.05$)。PLC 患者 TACE 前、后外周血中 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T 细胞亚群与血清 AFP 水平成正相关, 相关系数为 0.542。

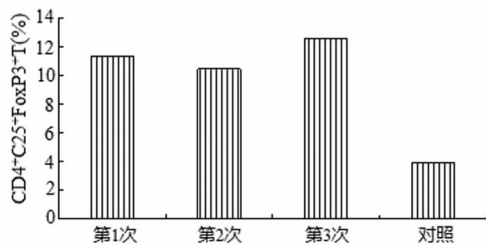


图 2 PLC 患者术后 3 次 TACE 治疗中外周血 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T 细胞亚群的变化

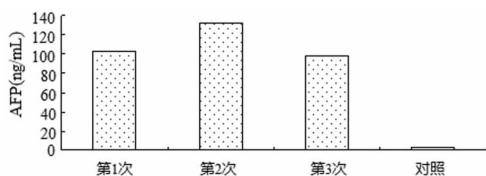


图 3 PLC 患者术后 3 次 TACE 治疗中外周血 AFP 的变化

3 讨 论

TACE 是目前治疗肝癌常用的基本方法, 主要采用肝动脉灌注化疗药物的方法, 增高瘤区药物浓度, 从而提高化疗疗效; 肿瘤供血动脉堵塞后, 可使肿瘤发生缺氧、缺血而坏死^[4-6]。然而, 肿瘤的发生、发展及预后均与机体的免疫功能状态密切相关, 有学者提出“免疫监视”学说^[7], “免疫监视”学说认为机体细胞免疫, 尤其是 T 淋巴细胞, 在杀灭肿瘤细胞中发挥重要作用, 如果机体的免疫监视功能低下, 则可能导致肿瘤发生^[8]。在本研究观察到肝癌切除术后, 3 次介入治疗并未完全纠正细胞免疫减低的状态, 可能与机体的免疫仍处于抑制状态有关。

CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞是由 Sakaguchi 等^[9]在 1995 年首次报道, 是一种重要的有免疫调节作用的 T 淋巴细胞, 已被证实是 Treg 细胞的主要组成部分。在机体抗肿瘤免疫反应中, 其可以通过下调机体的免疫应答来降低宿主的抗肿瘤免疫反应, 被认为是迄今为止所发现的最重要的免疫抑制细胞, 在肿瘤的免疫抑制中发挥重要作用。活化后 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞能抑制 CD4⁺ 和 CD8⁺ Treg 细胞的活化和增殖^[10-11], 达到免疫的负调节作用。CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞能够下调免疫共刺激分子和黏附分子的表达, 抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡, 抑制传统 T 细胞的活化等, 在维持机体内环境的稳定、肿瘤免疫监视、诱导移植耐受以及自身免疫性疾病的发生中发挥重要作用。近年来, CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞在恶性肿瘤的免疫耐受和逃逸机制中所起的作用越来越受到重视^[12], 是肿瘤免疫中的研究热点之一。本次研究观察发现, 在 3 次介入治疗过程中 PLC 患者 Treg 细胞有波动, 但并未对其升高的状态予以逆转。究其原因, 国外研究发现乳腺癌、肺癌、卵巢癌、胃癌、食管癌、胆囊癌、前列腺癌等恶性肿瘤患者外周血 Treg 细胞数量明显增多, 且其增多的程度与肿瘤的分期和病程相关^[13-15], 因此, 在本研究中, 介入治疗对 PLC 患者的细胞免疫和 Treg 细胞的影响并不大, 并未改善和提高机体的免(下转第 2829 页)

既往接触抗原的概率与大龄儿童比较, 相对较少, 未能建立起免疫记忆反应, 病原体感染后免疫反应能力较弱, 是否需要根据不同年龄段, 来设定不同的阳性判定标准还需要进一步深入研究。

7 例 IFA 检测阴性而 PPA 检测阳性的患儿, 经双份血清确认, 5 例为肺炎支原体现症感染, 说明 IFA 也存在假阴性结果。当肺炎支原体再次感染, 机体再次产生免疫应答时, 特异性 IgM 持续时间短, 可能检测不到 IgM 而造成 IFA 检测的假阴性结果。5 例确认的病例中, 有 1 例患儿的肺炎支原体抗体滴度在前 8 个月和前 5 个月时分别为 1 : 80 和 1 : 40; 另 1 例前 4 个月时为 1 : 160; 3 例查询不到历史记录。52 例 IFA 检测阴性而 PPA 检测阳性的患儿, 共查询到 16 例在过去 6 个月内有肺炎支原体抗体阳性的历史记录。另外, 患者血清中存在自身抗体则可导致 IFA 检测的生物学假阳性, 因此, IFA 检测也存在局限性。本研究显示, 联合应用 IFA 和 PPA 检测, 可有效提高肺炎支原体感染早期诊断的敏感性和特异性。

参考文献

[1] 倪少娟, 陶春风, 周华辉, 等. 儿科重症监护室和普通病房小儿下呼吸道感染病原学分析[J]. 中华妇幼临床医学杂志: 电子版, 2012, 8(6): 629-632.

[2] 吴茜, 倪林仙, 樊茂, 等. 昆明地区儿童非典型病原体感染病原学回顾性分析[J]. 中国儿童保健杂志, 2009, 17(6): 708-710.

[3] 王秀丽, 饶晓红, 刘进生, 等. 121 例儿童支原体肺炎临床分析[J]. 安徽医药, 2011, 15(4): 448-450.

[4] 王惠榕, 萧剑雄. 肺炎支原体感染的流行病学研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(11): 1062-1066.

[5] 苏文, 吴爱霞, 徐辉甫, 等. 肺炎支原体感染的监测分析(附 15514 例报告)[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2009, 38(6): 853-855.

[6] She RC, Thurber A, Hymas WC, et al. Limited utility of culture for *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* for diagnosis of respiratory tract infections[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(9): 3380-3382.

[7] Yamazaki T, Narita M, Sasaki N, et al. Comparison of PCR for sputum samples obtained by induced cough and serological tests for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children[J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(6): 708-710.

[8] Honderlick P, Philippe B, Picard C, et al. Simultaneous detection by multiplex PCR of atypical bacterial pathogens involved in infections of respiratory tract. Is it useful for the microbiological diagnosis of respiratory infections[J]. Pathol Biol (Paris), 2006, 54(8/9): 467-469.

[9] 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 869.

[10] 王涛, 郭坤, 牛家峰, 等. 呼吸道病原体检测方法的研究进展[J]. 医学检验与临床, 2010, 21(4): 95-96.

[11] 江咏梅, 柳晓琴, 李文胜, 等. 小儿呼吸道感染病原学的研究[J]. 现代预防医学, 2007, 34(21): 4186-4187.

[12] 姚雪曼. 926 例小儿肺炎支原体结果分析[J]. 医学检验与临床, 2011, 22(3): 108-108.

[13] 郑玉平, 张杰, 周逸琴. 被动凝集法检测肺炎支原体抗体的结果分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(21): 1720-1721.

[14] 莫翔, 余尚扬. 应用 ROC 曲线分析颗粒凝集法检测儿童肺炎支原体在近期感染中的效价水平[J]. 临床和实验医学杂志, 2011, 10(21): 1669-1670.

[15] 廖春盛, 戴小波, 刘建军. 呼吸道感染患者肺炎支原体检测的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(13): 1474-1475.

(收稿日期: 2013-05-29)

(上接第 2826 页)

疫状态, 这可能与疾病本身的发生、发展不断恶化有关, 肝癌术后介入治疗本身往往主要在一些不再适宜再次进行手术治疗的患儿开展, 现有的治疗并不能逆转病情的发展。

参考文献

[1] 明华, 车平, 王雁飞. 原发性肝癌的治疗进展[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(12): 1466-1467.

[2] 顾瑞基, 岑贤友, 费西平, 等. 肝动脉栓塞化疗联合冷循环微波刀治疗肝癌[J]. 吉林医学, 2012, 33(23): 4935-4936.

[3] 李建海, 刘勇山, 徐锐. 肝癌介入诊疗技术[M]. 山东: 山东科学技术出版社, 2007.

[4] 区金锐, 王慧玲. 原发性肝癌的治疗新进展[J]. 循证医学, 2012, 12(2): 85-88.

[5] 包长斌, 刘明涛, 蒋林, 等. 肝动脉化疗栓塞术治疗中晚期原发性肝癌的疗效分析[J]. 重庆医学, 2012, 41(32): 3424-3425.

[6] 李国文, 郭贵海. TACE 在原发性肝癌中的应用现状与进展研究[J]. 江西医药, 2012, 47(12): 1109-1111.

[7] Burnet FM. Immunological Surveillance in Neoplasia[J]. Transplant. Rev, 1971, 7(1): 3-25.

[8] Wieder T, Braumüller H, Brenner E, et al. Changing T-cell enigma: Cancer killing or cancer control[J]. Cell Cycle, 2013, 12(19): 3146-3153.

[9] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tol-

erance causes various autoimmune diseases[J]. J Immunol, 1995, 155(3): 1151-1164.

[10] Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses[J]. Annu Rev Immunol, 2004, 2: 531-562.

[11] Trzonkowski P, Szmit E, Mysliwska J et al. CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of CTL and NK cells in humans impact of immuno-senescence[J]. Clin Immunol, 2006, 119: 307-316.

[12] Degl'Innocenti E, Gironi M, Capuano G, et al. Peripheral T-cell tolerance associated with prostate cancer is independent from CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells[J]. Cancer Res, 2008, 68(1): 292-300.

[13] Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival[J]. Nat Med, 2004, 10(9): 942-949.

[14] Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, et al. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression[J]. Cancer, 2003, 98(5): 1089-1099.

[15] Kono K, Kawaida H, Takahashi A, et al. CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers[J]. Cancer Immunol Immunother, 2006, 55(9): 1064-1071.

(收稿日期: 2013-09-01)