

论著·基础研究

HBV 感染肝癌患者外周血 Treg 细胞和 IDO 表达的相关性*

杨 峻^{1,2}, 王 前¹, 石青峰², 苗海霞³(1. 南方医科大学, 广州 510515; 2. 桂林医学院附属医院检验科, 广西桂林 541001;
3. 桂林出入境检验检疫局保健中心, 广西桂林 541000)

摘要:目的 探讨 HBV 感染肝癌患者外周血中 Treg 细胞和吲哚胺 2,3-二氧酶(IDO)表达的相关性。
方法 对 51 例 HBV-DNA 阳性原发性肝癌(HCC)患者、44 例慢性乙型肝炎(CHB)患者, 29 例肝硬化患者和 28 例健康志愿者(对照组)应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、流式细胞术检测各组外周血中 Treg 细胞和 IDO 的表达水平。结果 IDO mRNA 表达从高到低依次为 HCC 组、CHB 组、肝硬化组、对照组。对照组与肝硬化组 IDO mRNA 表达明显低于其他 2 组($P < 0.01$), 其余各组之间比较, 差异也有统计学意义($P < 0.05$)。Treg 细胞计数从高到低依次为 HCC 组、肝硬化组、CHB 组和对照组; HCC 组明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 除 CHB 组外, 各组 Treg 细胞与对照组比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。IDO mRNA、Treg 表达相关性分析: $r = 0.912$, $P = 0.000$, 表明患者外周血中 IDO 的表达与 Treg 细胞间呈正相关。
结论 HCC 组中 Treg 细胞与 IDO 表达水平均高于对照组, 肝癌患者外周血中 IDO 表达与 Treg 细胞间呈正相关, 即 IDO 高表达伴随着 Tregs 比例增高。IDO 和 Treg 细胞之间可能存在正反馈调节环路, 二者共同诱导肝癌的免疫耐受, 与肝癌的发生发展相关。

关键词:肝癌; Treg 细胞; 吲哚胺 2,3-二氧酶**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.03.001**文章编号:**1673-4130(2018)03-0257-04**中图法分类号:****文献标识码:**A

Expression and significance of treg cells and IDO in blood of the HBV-induced hepatocellular carcinoma*

YANG Jun^{1△}, WANG Qian¹, SHI Qingfeng², MIAO Haixia³

(1. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China; 3. Guilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guilin, Guangxi 541000, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical significance of the level of regulatory T (Treg) cells and indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) in HBV-induced hepatocellular carcinoma. **Methods** 51 cases of HBV-DNA positive primary liver cancer (HCC), 44 cases of chronic hepatitis B (CHB), 29 cases of cirrhosis and 28 cases of healthy volunteers (control group) were used RT-PCR and flow cytometry to detect the expression of Treg cells and IDO in peripheral blood of each group. **Results** The expression of IDO mRNA from high to low were HCC group, CHB group, liver cirrhosis group and control group. The control group and the liver cirrhosis group were lower than the other 2 groups ($P < 0.01$), and the difference between the other groups was statistically significant ($P < 0.05$). Treg counts from high to low were HCC group, cirrhosis group, CHB group and control group. HCC group was significantly higher than that of control group ($P < 0.05$), except for CHB group, Treg cells in each group were statistically significant compared with control group ($P < 0.05$). The correlation analysis of expression of IDO mRNA and Treg: $r = 0.912$, $P = 0.000$, indicating that the expression of IDO in peripheral blood was positively correlated with the Treg cells. **Conclusion** IDO is over expressed in HCC with the high Treg cell level. Treg cells and IDO may associated with hepatocellular carcinoma immune escape mechanisms.

Key words:hepatocellular carcinoma; treg cells; indoleamine 2,3-dioxygenase原发性肝癌(HCC)是世界上最常见的恶性肿瘤, 也是癌症致死的主要因素之一^[1]。广西是我国肝癌

* 基金项目: 广西教育厅资助课题(0210150012); 广西卫计委自筹经费课题(Z2012416)。

作者简介: 杨峻,男,讲师,主要从事临床免疫与微生物学检验方面研究。

本文引用格式: 杨峻,王前,石青峰,等. HBV 感染肝癌患者外周血 Treg 细胞和 IDO 表达的相关性[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(3): 257-259.

高发地区之一,其病死率达 55.94/100 000^[2],占全部恶性肿瘤病死者的 36.01%,高居广西肿瘤死亡谱的首位。HBV 感染是引发 HCC 的首要因素,HBV 感染的患者发展为肝癌的风险是普通人群的 100 倍^[3]。肝癌患者体内免疫系统受损,自身抗肿瘤能力下降,这可能是肝癌患者抗肿瘤免疫应答缺陷机制之一。近年研究发现,吲哚胺 2,3-二氧酶(IDO)具有免疫调节功能,可能与肿瘤免疫逃逸机制有关,IDO 通过抑制 T 细胞和 NK 细胞活性来阻断免疫反应^[4],人类多种肿瘤组织和器官中均可出现不同程度 IDO 表达。近来研究表明,在多种人类肿瘤中,调节性 T 细胞(Treg)参与抑制免疫反应,与肿瘤免疫逃逸密切相关,参与肿瘤的发生发展^[5-6]。本文检测肝癌患者肿瘤组织中 Treg 细胞和 IDO 表达的变化,对 Treg 细胞和 IDO 表达在 HBV 感染患者肝癌发生发展中的相关性作初步探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2014 年 9 月至 2016 年 9 月桂林医学院附属医院接受治疗的 HBV-DNA 阳性患者 152 例纳入研究,其中慢性乙型肝炎(CHB)组 44 例,肝硬化组 29 例,HCC 组 51 例,性别及年龄见表 1。各组诊断标准均参考 2015 年《慢性乙型肝炎防治指南》^[7]。对照组外周血来源于 28 例性别和年龄相匹配的健康志愿者,对照组均排除了自身免疫疾病、HBV、HCV、HIV 及梅毒等。

表 1 各组患者年龄和性别的比较

组别	n	性别(n)		年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)
		男	女	
对照组	28	16	12	41.5 ± 7.9
CHB 组	44	20	24	39.3 ± 8.4
肝硬化组	29	18	11	48.6 ± 7.5
HCC 组	51	33	18	45.3 ± 8.5
合计	152	71	58	42.7 ± 8.2

注:性别组间比较使用 χ^2 检验, $\chi^2 = 3.935$, $P = 0.269$; 年龄组间比较使用独立样本 t 检验, $t = 0.119$, $P = 0.651$, 差异均无统计学意义

1.2 仪器与试剂 荧光定量 PCR 试剂: Trizol 使用 Invitrogen 公司产品; PCR 试剂盒使用 Toyobo 公司生产的 RNA-directed SYBR Green RT-PCR Master Mix。流式细胞分析仪型号为 EPICS XL,美国贝克曼公司生产。溶血素、鞘液及鼠抗人 CD4-CP/CD25-PE/CD127-FITC 均购自美国贝克曼公司。

1.3 方法

1.3.1 外周血单个核细胞(PBMC)分离 早晨空腹采集 HCC 患者 EDTA 抗凝的静脉血及健康志愿者静脉血,用淋巴细胞分离液(Ficoll-Paque)进行密度梯度离心(于 22 °C · 3 300 r/min 离心 20 min)获取 PBMC。

1.3.2 引物设计及合成 引物均遵循引物设计原则

进行设计,引物序列由 Invitrogen 公司合成。IDO 引物序列:P1 5'-TTA ATG TAA CCC AAC AAG AG-3',P2 5'-GTA TTA GTT TGT GGC TCT GT-3'。

1.3.3 流式细胞检测标本制备 在装有 100 μL 抗凝全血的试管中分别加入 5 μL 鼠抗人 CD4-CP/CD25-PE/CD127-FITC 单抗混匀,室温下避光孵育 15 min,加入溶血素 1 mL 混匀,避光放置 12 min,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,再次加入 PBS 2 mL,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 PBS 300 μL 重悬细胞,上流式细胞仪检测。

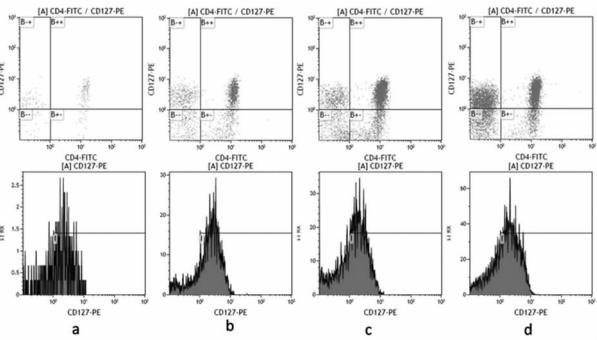
1.3.4 IDO mRNA 的提取和逆转录 PBMC IDO mRNA 提取按照试剂盒(QIAGEN)说明进行。逆转录反应使用 MBI 逆转录试剂盒,按说明进行操作。

1.3.5 荧光实时定量 PCR 检测 荧光实时定量 PCR 检测所用染料为 DYBR Green。反应条件:预变性 93 °C 2 min; 扩增 93 °C 10 s, 58 °C 30 s, 共 40 个循环。扩增循环结束后进行熔点曲线检测:45~90 °C, 升温速度 0.2 °C/s, 连续检测荧光; 最后降温至 40 °C; 扩增结束后, 利用配套软件进行检测和分析。

1.4 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用方差分析,相关性分析采用 Pearson 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 Treg 细胞 组间比较中,除 CHB 组外,肝硬化组、HCC 组与 NC 组相比差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),其中 HCC 组明显高于其他组($P < 0.05$),Treg 计数从高到低依次为 HCC 组、CHB 组、肝硬化组和对照组,见图 1、表 2。



注:a 表示对照组;b 表示 CHB 组;c 表示肝硬化组;d 表示 HCC 组

图 1 外周血流式细胞 Treg 细胞计数检测图

表 2 外周血 IDO mRNA、Treg 细胞表达比较

组别	n	IDO mRNA($\times 10^3$ copies)	Treg 细胞(%)
对照组	28	0.67 ± 0.41△	2.87 ± 1.19△
CHB 组	44	1.11 ± 0.62△	3.65 ± 1.30△
肝硬化组	29	1.05 ± 0.47△*	4.04 ± 1.20△
HCC 组	51	2.63 ± 0.84#	10.36 ± 3.42
F		34.377	8.018
P		0.000	0.000

注:与对照组比较,* $P > 0.05$;与肝硬化组比较,# $P < 0.05$;与 HCC 组比较,△ $P < 0.05$;其他数据各组间两两比较,均 $P < 0.05$

2.2 IDO mRNA IDO mRNA 表达总体组间比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。IDO mRNA 表达从高到低依次为 HCC 组、CHB 组、肝硬化组和对照组。HCC 组明显高于其他 3 组($P<0.01$),其余各组间两两比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.3 IDO mRNA、Treg 细胞表达相关性分析 $r=0.912, P=0.000$,表明患者外周血中 IDO 表达与 Treg 细胞间存在正相关性,见图 2。

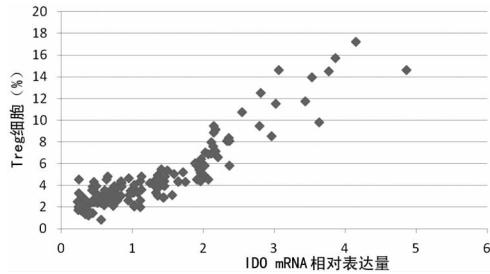


图 2 HBV 感染患者外周血 IDO mRNA、Treg 细胞表达相关性分析

3 讨 论

肝癌在发生发展过程中会演化出种种逃避机体免疫监视的方式,导致宿主自身免疫系统不能有效清除肿瘤细胞而发生免疫耐受,肿瘤诱导免疫耐受的调控机制目前尚未完全阐明。近年研究表明^[8-9],IDO 的高表达,会造成肿瘤或体液局部微环境中色氨酸耗竭,同时肿瘤周边淋巴细胞中存在着 Treg 细胞水平增高的现象,两者相互作用与影响,可能导致肿瘤细胞逃避免疫系统的监视,IDO 和 Treg 细胞均为免疫抑制细胞,它们在肿瘤发生发展的过程中呈现高表达,为研究 HBV 感染的肝癌患者体内免疫耐受的发生机制提供了一个新的方向。

IDO 是色氨酸及犬尿素分解代谢途径的限速酶,能在多种细胞特别是一些涉及调节免疫反应的关键细胞的胞浆中表达^[10-11],通过分解代谢色氨酸抑制 T 细胞功能,是机体免疫抑制功能的重要调节因子。组织局部微环境中色氨酸的耗竭对 T 细胞具有免疫抑制作用,可能是肿瘤微环境中免疫耐受形成过程中的一个关键因素。本研究中,对外周血中 IDO mRNA 表达检测结果显示,HCC 组中为 $(2.63 \pm 0.84) \times 10^3$ copies,高于对照组 $(0.67 \pm 0.41) \times 10^3$ copies,也高于 CHB 组和肝硬化组,说明随着 HBV 感染病程进展,肝癌患者外周血中 IDO 表达水平不断增高,在机体内逐步建立起有利于肿瘤发展的免疫逃逸机制,使肝癌细胞逃避机体免疫攻击,从而导致肝癌的发生发展。

不少报道指出 IDO 可以通过介导色氨酸使其代谢产物的降解,抑制 T 细胞的作用,从而帮助肿瘤逃避免疫监视^[12-13]。由于 T 细胞对色氨酸耗竭尤为敏感,在色氨酸浓度较低时,T 细胞的增殖被抑制,细胞分化静止在 G₁ 期。这种静息的 T 细胞更容易凋亡,

从而造成 T 细胞的缺乏。而色氨酸的分解代谢产物对 T 细胞的增殖也有抑制作用^[14],本研究在 HCC 组与对照组中,均进行了 Treg 细胞流式检测,结果显示 HCC 组中 Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞比例为 $(10.36 \pm 4.11)\%$,高于对照组 $(2.87 \pm 1.19)\%$,提示 IDO 的表达上调对 Treg 细胞没有明显的抑制作用。Treg 细胞计数从高到低依次为 HCC 组、肝硬化组、CHB 组和对照组,且 CHB 组 Treg 细胞计数与对照组无显著性差异,说明随着 HBV 感染加重,导致肝脏功能恶化后 Treg 细胞的增加可能预示着预后不良。对各实验组 IDO mRNA、Treg 细胞表达的相关性分析结果为 $r=0.912, P=0.000$,表明患者外周血中 IDO 表达与 Treg 细胞间存在正相关性,即 IDO 高表达伴随着外周血 Treg 细胞比例增高。IDO 和 Treg 细胞间可能存在一个正反馈的调控环路,共同介导肿瘤的免疫耐受。但 THUERE 等^[15]却提出 Treg 细胞在妊娠早期的母体蜕膜上即可出现,而 IDO 在妊娠 8 天之后才在胎盘中表达,因此,Treg 细胞可能不是诱导 IDO 表达的原因,这为 IDO 与 Treg 细胞间相互关系的研究提出了新的挑战。限于本研究并未包括 HCC 组内的具体分期和肿瘤组织研究,因此未能解释 IDO 与 Treg 细胞间存在何种调控途径,这也是下一步工作的主要内容。

总之,IDO 与 Treg 细胞的共同作用可能是介导免疫抑制,从而导致肝癌发生发展的原因之一,对其的进一步研究可以为肝癌的防治提供一个全新思路。通过对生物医学手段下调患者体内的 IDO 与 Treg 细胞表达,有可能重建患者的主动免疫,抑制肿瘤的发生发展。

参考文献

- BALOGH J, VICTOR D, ASHAM E H, et al. Hepatocellular carcinoma: a review [J]. J Hepatocell Carcinoma, 2016, 5(3): 41-53.
- 邓伟, 黄天壬, 利基林, 等. 广西居民恶性肿瘤死亡流行特征及趋势分析 [J]. 中国肿瘤, 2013, 22(6): 423-427.
- HEES S V, MICHELSEN P. Thomas vanwolleghem circulating predictive and diagnostic biomarkers for hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(37): 8271-8282.
- MUNN D H, MELLOR A L. IDO in the tumor microenvironment: inflammation, counter-regulation, and tolerance [J]. Trends Immunol, 2016, 37(3): 193-207.
- 钟锐, 冯龙, 兰琼玉, 等. CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} 调节性 T 细胞在晚期胃癌中的表达及意义 [J]. 重庆医学, 2016, 45(15): 2065-2069.
- JUNG M K, SHIN E C. Regulatory T cells in hepatitis B and C virus infections [J]. Immune Netw, 2016, 16(6): 330-336.

(下转第 263 页)

~S 期的转化,使细胞周期停滞在静止期,发挥在细胞增殖、分化、凋亡及细胞间黏附等方面的重要作用^[11]。本研究发现,p27kip1 在正常早孕流产绒毛及 HM 中表达于合体滋养叶细胞和绒毛间质细胞的细胞核,不表达于细胞滋养叶细胞的细胞核。在 CHM 中,p27kip1 呈细胞核黄色或棕黄色着色,而在正常早孕流产绒毛和 PHM 中,p27kip1 呈细胞核棕褐色着色(图 2)。运用和 p57kip2 同样的分析方法将阴性组和弱阳性组以及阳性组和强阳性组分别合并为弱表达组和强表达组,结果发现,在 PHM 组、CHM 组和 NP 组中,p27kip1 的强阳性表达率分别为 87.21%,46.67%,76.67%,p27kip1 在 CHM 组中阳性率低于 PHM 组和 NP 组,差异有统计学意义($P < 0.01$),而在 PHM 组和 NP 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。在 HM 发展过程中,可能也伴随着 p27kip1 向细胞质迁移并降解,而致细胞核中表达减少^[12],p27kip1 调节细胞周期作用减弱,细胞周期转化加速,滋养细胞过度增殖。p27kip1 被认为是一种新型的抑癌基因,它在细胞核中的表达减少可能同时调控着其他因子参与 HM 恶变的发生,具体机制仍需要进一步的研究。p27kip1 的丢失可能在 CHM 的发生发展中起到了重要作用,p27kip1 可能成为对鉴别 PHM 和 CHM 较有用的一项新指标。

综上所述,尽管在临床工作中 HM 及其分型容易发生误诊,但通过根据患者病史,形态学特征结合 p57kip2、p27kip1 等免疫表型综合判断,可以较准确地对 HM 做出诊断并分型,从而为临床诊治疾病和指导随访提供依据。

参考文献

- [1] MARISA R N, ESTHER O. Gynecologic pathology [M]. Amsterdam: Elsevier Inc, 2009: 645.
- [2] 向阳, 宋鸿钊. 滋养细胞肿瘤学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 25-33.
- [3] MCCONNELL T G, MURPHY K M, HAFIZ M A, et al. Diagnosis and subclassification of hydatidiform moles using p57 immunohistochemistry and molecular genotyping: validation and prospective analysis in routine and consultation practice settings with development of an algorithmic approach [J]. Am J Surg Pathol, 2009, 33(6): 805-817.
- [4] KIPP B R, KETTERLING R P, OBERG T N, et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization, p57 immunostaining, flow cytometry, and digital image analysis for diagnosing molar and nonmolar products of conception [J]. Am J Clin Pathol, 2010, 133(2): 196-204.
- [5] SECKL M J, FISHER R A, SALERNO G, et al. Choriocarcinoma and partial hydatidiform moles [J]. Lancet, 2000, 356(9223): 36-39.
- [6] 厉霞玲, 钱建华, 周彩云, 等. KCNQ1, p57kip2 蛋白在水泡状胎块中的表达及意义 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2009, 25(2): 131-135.
- [7] 曹泽毅. 中华妇产科学 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 201-208.
- [8] 刘伯宁, 范娜娣. 人类胎盘病理学手册 [M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 2008: 273.
- [9] 卢立霞, 陶林, 常彬. 葡萄胎的分子诊断研究进展 [J]. 中华病理学杂志, 2014, 43(12): 859-862.
- [10] 任晓燕, 陶玉梅. 水泡状胎块中 p57kip2 的表达及其意义 [J]. 医学临床研究, 2012, 29(3): 422-424.
- [11] 管晓翔, 陈巍巍, 陈龙邦. p27kip1 基因启动子区的生物信息学分析 [J]. 医学研究生学报, 2010, 23(10): 1029-1032.
- [12] BLAIN S W, MASSAGU J. Breast cancer banishes p27 from nucleus [J]. Nat Med, 2002, 8(10): 1076-1078.

(收稿日期: 2017-07-22 修回日期: 2017-09-28)

(上接第 259 页)

- [7] 王贵强, 王福生, 成军, 等. 慢性乙型肝炎防治指南 [J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(12): 1941-1960.
- [8] 陈永兵, 王琼, 沈小青, 等. IDO 在肝癌细胞复发转移中的作用探讨 [J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(23): 41-44.
- [9] CHEN Y B, LI S D, HE Y P, et al. Immunosuppressive effect of IDO on T cells in patients with chronic hepatitis B [J]. Hepatology Research, 2009, 39(5): 463-468.
- [10] 卜晓倩, 张瑞, 申慧琴, 等. 吲哚胺 2,3-双加氧酶基因转染对肝癌细胞凋亡的影响及相关机制研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(5): 22-27.
- [11] 杨洁, 王琦. 吲哚胺 2,3 双加氧酶对肝癌细胞的作用 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(6): 1117-1119.
- [12] 蒋艳萍, 曹来英, 洛若愚. Treg 细胞和 IDO 在 HPV 感染

相关宫颈疾病组织中表达及意义 [J]. 实用癌症杂志, 2012, 27(1): 32-35.

- [13] CHENG J T, DENG Y N, YI H M, et al. Hepatic carcinoma-associated fibroblasts induce IDO-producing regulatory dendritic cells through IL-6-mediated STAT3 activation [J]. Oncogenesis, 2016, 5(5): 198.
- [14] VACCHELLI E, ARANDA F, EGGERMONT A A, et al. Trial watch: IDO inhibitors in cancer therapy [J]. Oncoimmunology, 2014, 3(10): e957994.
- [15] THUERE C, ZENCLUSSEN M L, SCHUMACHER A, et al. Kinetics of regulatory T cell during murine pregnancy [J]. Am J Reprod Immunol, 2007, 58(6): 514.

(收稿日期: 2017-07-23 修回日期: 2017-09-29)