

肝细胞癌患者 TACE 后外周血调节性 T 细胞水平对预后的影响

李虎子, 郭志, 王海涛, 司同国, 刘长富, 于海鹏

【摘要】目的 探讨肝细胞癌(HCC)患者 TACE 治疗后外周血调节性 T 细胞(Treg)水平与预后的关系。**方法** 回顾性分析天津医科大学附属肿瘤医院收治的 122 例 HCC 患者经 TACE 治疗后外周血中 Treg 占 CD4⁺ T 细胞比例与生存时间(OS)的关联。**结果** HCC 患者 TACE 后 Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比率显著升高(分别为 6.109 和 6.834, $P = 0.000$);低 Treg 组(< 6.7)HCC 患者中位生存期 19.3 个月,高 Treg 组(≥ 6.7)中位生存期 12 个月,两组间 OS 存在显著差异。**结论** HCC 患者 TACE 治疗后外周血 Treg 水平是判断预后的独立预测指标。

【关键词】 原发性肝癌; 调节性 T 细胞; 免疫功能; 预后

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2012)-12-0998-04

The effect of regulatory T cells level in peripheral blood on the prognosis in HCC patients after TACE

LI Hu - zi, GUO Zhi, WANG Hai - tao, SI Tong - guo, LIU Chang - fu, YU Hai - peng. Department of Interventional Radiology, Affiliated Cancer Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China

Corresponding author: GUO Zhi, E-mail: jieruke@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To discuss the correlation between regulatory T cells (Treg) level in peripheral blood and the prognosis in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) after transcatheter arterial chemoembolization (TACE). **Methods** A total of 122 patients with HCC who received TACE at authors' hospital were enrolled in this study. The CD3⁺ T, CD4⁺ T, CD8⁺ T, NK and Treg levels in peripheral blood were assessed by flow cytometry method. The relationship between the Treg level in peripheral blood and the survival time was evaluated by Cox regression and Kaplan - Meier analysis. **Results** In HCC patients after TACE, the ratio of Treg cells to CD4⁺ T was significantly increased (6.109 and 6.834, $P = 0.000$). In lower ratio group (ratio of Treg cells to CD4⁺ T < 6.7), the median survival time of patients was 19.3 months, while in higher ratio group (ratio of Treg cells to CD4⁺ T ≥ 6.7), the median survival time of patients was 12.0 months. The difference between the two groups was statistically significant by using single factor analysis ($\chi^2 = 8.771, P = 0.003$) or multivariate analysis ($P = 0.020$). **Conclusion** The Treg level in peripheral blood is an independent predictive factor for judging the prognosis of HCC patients after TACE. (J Intervent Radiol, 2012, 21: 998-1001)

【Key words】 transcatheter arterial chemoembolization; regulatory T cell; immunologic function; prognosis

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界第 5 大常见的恶性肿瘤, 其死亡率排在第 3 位。大约 70% HCC 患者确诊时已是中晚期, 无法获得

根治性治疗, 经导管选择性肝动脉化疗栓塞(TACE)就成为其首选的治疗方法。

调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)能够削弱免疫效应、诱导免疫耐受^[1], 其与肿瘤发生发展、浸润转移及预后的关系是近年来临床研究的热点。研究表明, HCC 患者根治性切除术后^[2]、冷冻消融治疗后^[3]高水平 Treg 与肿瘤复发、进展有关。本课题拟了解 TACE 治疗后 Treg 水平与预后的关系。

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2012.12.008

作者单位: 300060 天津医科大学附属肿瘤医院介入科
天津市肿瘤防治重点实验室

通信作者: 郭志 E-mail: jieruke@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取我科 2007 年 6 月至 2009 年 8 月 122 例肝癌患者,全部经病理(根治性切除术后病理或穿刺病理)、肿瘤标志物、影像学(超声、DSA、CT、MRI)诊断为 HCC,符合 TACE 适应证并行 TACE 治疗,无糖尿病、高血压及免疫系统疾病,近 3 个月无增强或抑制机体免疫功能治疗的患者。其中男 108 例,女 14 例,年龄 32 ~ 82 岁,中位年龄 59 岁;肝功能 Child-Pugh 分级 A 级 108 例 (88.5%),B 级 14 例 (11.5%);HBsAg 阴性 46 例 (37.7%),HBsAg 阳性 76 例 (62.3%);伴门脉高压 82 例 (67.2%),无门脉高压 40 例 (32.8%);根治性切除术后复发 14 例 (11.5%),无法根治性切除 108 例 (88.5%);76 例 (54.1%)肿瘤直径 ≤ 10 cm,46 例 (45.9%)肿瘤直径 > 10 cm;依照巴塞罗那肝癌分期(BCLC 分期)B 期 92 例 (75.4%),C 期 30 例 (24.6%)。随访时间截止到 2011 年 12 月 31 日,全部患者均获得随访。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 全部患者均符合 TACE 治疗适应证,并行 TACE 治疗。采用 Seldinger 技术,经皮股动脉穿刺,导管选择至肿瘤供血动脉行 DSA 造影,根据肿瘤血供情况进行栓塞。TACE 治疗方案为 5-氟尿嘧啶 750 ~ 1 000 mg、顺铂 40 ~ 80 mg、丝裂霉素 20 mg 或表柔吡星 40 ~ 60 mg 联合超液化碘油 5 ~ 20 ml 或海藻酸钠微球 0.1 ~ 2 g。分别于 TACE 治疗前 1 周及治疗后 3 周取外周血检测 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞。

1.2.2 T 细胞亚群与 NK 细胞的检测方法 所有患者检测当天清晨抽取空腹外周静脉血 3 ml (EDTA 抗凝)。检测方法采用 CD3/CD4/CD8 (BD)、CD3/CD16 + 56/CD45 (BD) 和抗-CD4-Per-CP/抗-CD25-PE/抗-CD127-APC (Biolegend) 3 色荧光抗体。标本制备:将标记的 3 支流式管分别加入 20 μ l 同型对照试剂及相对应的荧光抗体。取待测样本 100 μ l 分别加入各管,室温避光孵育 30 min 后加溶血素 (BD) 1.5 ml,静置 10 min,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,PBS 2 ml 洗涤 2 次;加 1% 多聚甲醛 0.5 ml,上流式细胞仪检测表型。CellQuest 软件分析数据。检测指标分别为淋巴细胞所占比例和 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、NK 细胞比例、CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ T 细胞 (Treg) 占 CD4⁺ T 细胞的比例。

1.3 统计学方法

应用 SPSS16.0 进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差别采用 *t* 检验进行统计学差异性分析。生存资料采用 Kaplan-Meier 法及 Log-rank 检验,Cox 回归模型最终确立影响生存的独立危险因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TACE 治疗前后 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞的变化

HCC 患者 TACE 治疗前后 CD3⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞比例均无显著变化,而 TACE 后 Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比例显著升高 [(6.109 \pm 2.208)% 对 (6.834 \pm 2.491)% , $P = 0.000$],见表 1。

表 1 TACE 前后 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞的变化 (%)

时间	CD3 ⁺ T	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T	NK	Treg
TACE 前	23.560 \pm 8.410	51.768 \pm 11.400	36.414 \pm 13.665	19.393 \pm 9.246	6.109 \pm 2.208
TACE 后	22.260 \pm 8.628	52.486 \pm 12.157	36.120 \pm 15.138	18.941 \pm 9.229	6.834 \pm 2.491
<i>t</i> 值	1.787	0.970	0.606	0.871	9.306
<i>P</i> 值	0.084	0.336	0.547	0.387	0.000

2.2 Treg 与临床特点的关系

HCC 患者 TACE 治疗后外周血中 Treg 水平与性别、年龄、病灶大小、BCLC 分期、Child-Pugh 分级、AFP 水平、HBsAg、肝硬化、门脉高压、是否根治性切除术后复发均无显著相关。见表 2。

2.3 生存分析

2.3.1 总体生存分析 122 例 HCC 患者的生存时间 (over survival time, OS) 为 2 ~ 51 个月,中位 OS 17 个月;1 年生存率 61%,2 年生存率 18%,3 年生存率 8%。

2.3.2 预后单因素及多因素分析 Log-rank 法对可能影响生存期的因素进行单因素分析,结果显示 NK 水平、HBsAg 阴性、门脉高压、是否根治性切除术后、Treg 水平是影响生存期的重要因素,见表 3。NK 细胞比例高 ($P = 0.022$)、HBsAg 阴性 ($P = 0.008$)、无门脉高压 ($P = 0.046$) 有助于延长 OS;根治性切除术后复发再经 TACE 治疗的 HCC 患者也较仅经 TACE 治疗的患者具有生存优势 ($P = 0.000$)。Treg 占 CD4⁺ T 细胞的比例明显影响 OS ($P = 0.003$),高水平 Treg (≥ 6.7) 患者的 OS 较短,低水平 (< 6.7) 患者的 OS 较长。

Cox 多因素分析显示:HBsAg ($P = 0.001$)、是否根治性切除术后 ($P = 0.000$)、Treg ≥ 6.7 ($P = 0.020$) 是影响预后的独立因素。其中,高 Treg 组 (≥ 6.7) 1 年生存率 43%,2 年生存率 5%,中位生存期 12.0 个

表 2 122 例患者 Treg 水平与临床特点的关系

参数	例(%)	Treg	t 值	P 值
性别				
男	108(88.5)	6.907 ± 2.571 4	0.912	0.364
女	14(11.5)	6.264 ± 1.562 8		
年龄/岁				
≤ 60	64(52.5)	7.003 ± 2.695 3	0.793	0.429
> 60	58(47.5)	6.646 ± 2.227 6		
病灶直径/cm				
< 10	76(62.3)	6.808 ± 2.417 8	0.148	0.882
≥ 10	46(37.7)	6.877 ± 2.606 8		
BCLC 分期				
B	92(75.4)	6.596 ± 2.563 2	1.868	0.064
C	30(24.6)	7.561 ± 2.080 2		
Child-Pugh 分级				
A	108(88.5)	6.848 ± 2.539 0	0.176	0.861
B	14(11.5)	6.723 ± 2.045 7		
AFP/(ng/L)				
< 400	62(50.8)	6.808 ± 2.769 5	0.117	0.907
> 400	60(49.2)	6.860 ± 2.164 5		
HBsAg				
阴性	46(37.7)	7.081 ± 2.307 5	0.865	0.394
阳性	76(62.3)	6.684 ± 2.582 7		
肝硬化				
无	24(19.7)	7.245 ± 2.735 8	0.906	0.367
有	98(80.3)	6.733 ± 2.418 1		
门静脉高压				
无	40(32.8)	6.957 ± 2.953 1	0.383	0.702
有	82(67.2)	6.773 ± 2.231 5		
根治性切除术后复发				
是	14(11.5)	6.897 ± 2.618 2	1.713	0.091
否	108(88.5)	6.348 ± 0.741 3		
Treg				
< 6.7	72(59.0)			
≥ 6.7	50(41.0)			

表 3 单因素分析临床特征对 OS 的影响

参数	χ^2	P
性别	0.743	0.389
年龄	0.670	0.413
病灶	0.401	0.527
BCLC 分期	1.015	0.314
Child-Pugh	0.107	0.744
AFP	0.010	0.922
HBsAg(+)	7.134	0.008
肝硬化	1.133	0.287
门脉高压	3.990	0.046
根治性切除术后	14.505	0.000
CD3 ⁺ T	0.038	0.846
CD4 ⁺ T	0.104	0.747
CD8 ⁺ T	0.017	0.895
NK	5.241	0.022
Treg	8.771	0.003

月;低 Treg 组(< 6.7)1 年生存率 76%,2 年生存率 29%,3 年生存率 15%,中位生存期 19.3 月;两组存在显著差异。生存曲线见图 1。

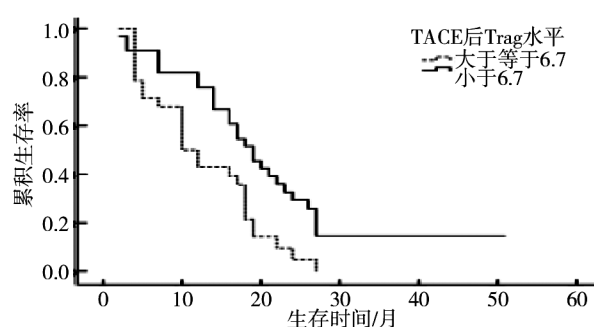


图 1 TACE 后不同 Treg 水平患者生存曲线

3 讨论

Treg 作为特殊的 T 淋巴细胞亚群是近年来研究的热点。越来越多的证据表明,Treg 能够强效抑制 T 淋巴细胞的增殖,削弱宿主抗肿瘤免疫效应,诱导免疫耐受,促进肿瘤进展,并且降低了肿瘤过继免疫治疗的疗效。对于 HCC 患者,TACE 治疗后 Treg 水平升高已经见诸报道^[3]。

本研究显示,经 TACE 治疗的 HCC 患者外周血中 Treg 占 CD4⁺ T 细胞的比例显著升高,与 Xiong 等^[4]报道相一致;而 CD3⁺ T 细胞比例、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞及 NK 细胞比例无显著变化。这表明 TACE 治疗对 HCC 患者免疫状态的影响可能是通过改变 Treg 水平实现的。与肺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃肠道恶性肿瘤、淋巴瘤等恶性肿瘤一样^[5],HCC 患者的外周血、肿瘤微环境中的 Treg 水平显著升高^[6-8],而 TACE 治疗后患者外周血中 Treg 水平进一步提高。这可能是由于 TACE 改变了肿瘤细胞表面抗原、TGF- β 和(或)白细胞介素(IL)的分泌^[6],进而诱导 CD4⁺ CD25⁻ T 细胞向 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞转化,使 Treg 水平升高,削弱肿瘤免疫效应,诱导免疫抑制。

本研究显示不同病灶大小、不同 Child-Pugh 分级、不同 AFP 水平患者 Treg 占 CD4⁺ T 细胞比例无显著差别;BCLC C 期患者较 B 期 Treg 水平较高,但差异不显著。这与报道不甚一致^[7],可能与 TACE 的适应证有关。肝功能良好且无脉管侵犯的多结节 HCC 患者是 TACE 的最佳目标总体,肿瘤侵犯门静脉、胆红素升高(> 30 $\mu\text{mol/L}$)、肝脏被肿瘤侵犯程度大于 50%是 TACE 的相对禁忌证^[8]。适应证的选择使本研究患者在病灶大小、分期、肝功能、标志物水平方面差异较小,可能不完全反映 Treg 对肿瘤进展的影响。Gao 等^[9]通过对 302 例 HCC 患者的研究发现,Treg 与 HCC 进展相关。Sasaki 等^[2]研究表明 Treg 水平与 HCC 根治性切除术的复发相关。Zhou 等^[3]研究表明高水平 Treg 与 HCC 冷冻消融治疗后肿瘤继续进展有关。Treg 可能通过以下机制影

响肿瘤进程:① 表达高水平的 GITR 和 Foxp3,通过细胞间的直接接触抑制免疫效应;② 分泌大量 IL-10 和(或)TGF- β ^[10],不仅抑制效应 T 细胞的增殖和细胞因子的产生,而且抑制抗原提呈细胞的功能^[11];③ Treg 与 IL-2 竞争性结合,使其丧失诱导活化 T 细胞增殖及分泌细胞因子的能力,抑制抗肿瘤免疫效应^[12];④ 抑制同源 T 细胞的增殖及其表面穿孔素的表达^[12];⑤ Treg 能够杀死 DC 细胞或减少 DC 细胞表面 CD80 和 CD86 (2 种关键的共同刺激分子)的表达,使 DC 细胞失去活化 T 细胞的能力,诱导免疫抑制。因此,随着肿瘤进展,Treg 水平越高;同样 Treg 水平越高越易于肿瘤复发、转移。

Treg 是导致免疫抑制的关键因素^[13],肿瘤患者无论外周血还是肿瘤微环境中显著升高的 Treg 常提示预后较差、生存期较短^[13-14]。本研究发现,HBsAg(+)、门脉高压、经过根治性切除术治疗、NK 细胞水平、TACE 后 Treg 水平是影响预后的重要因素。高 Treg 水平组 1、2 年生存率分别为 43%、5%,中位生存期 12.0 个月;低 Treg 水平组 1、2 和 3 年生存率分别为 76%、29%和 15%,中位生存期 19.3 个月;两组差异有统计学意义。本研究组前期研究发现冷冻消融治疗^[15]、CIK 细胞免疫治疗^[16]能够降低 TACE 治疗后 Treg 水平,但是否有助于改善预后有待于进一步研究,TACE 联合冷冻消融或过继免疫治疗也许是改善预后的有效途径。

本研究中 BCLC C 期患者较少,且无门静脉主干癌栓及肝外转移,肝功能 Child-Pugh 分级以 A 级为主,少数肝功能较差患者经保肝治疗后肝功能好转,这可能是导致本研究结果显示 BCLC 分期、肝功能 Child-Pugh 分级与 OS 无关的原因。因此,对于其他临床特点差异不显著的 HCC 患者,Treg 水平可成为评估预后的新选择。

本研究 Cox 多因素分析表明,除 HBsAg(+)、根治性切除术外,Treg ≥ 6.7 也是影响 TACE 治疗患者预后的独立危险因素。樊永利等^[7]通过研究不同阶段肝癌 Treg 水平发现 Treg > 7.0 是影响预后的独立危险因素。这说明 TACE 治疗使 Treg 水平升高,而评估预后的界定值反而降低;采用 Treg ≥ 6.7 作为经 TACE 治疗的 HCC 患者的独立预测指标也许更客观。

[参考文献]

[1] Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy

[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6: 295 - 307.

- [2] Sasaki A, Tanaka F, Mimori K, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating FOXP3⁺ regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Eur J Surg Oncol, 2008, 34: 173 - 179.
- [3] Zhou L, Fu J, Lu Y, et al. Regulatory T cells are associated with post - cryoablation prognosis in patients with hepatitis B virus - related hepatocellular carcinoma[J]. J Gastroenterol, 2010, 45: 968 - 978.
- [4] Xiong B, Feng G, Luo S, et al. Changes of CD4(+) CD25 (+) regulatory T cells in peripheral blood in patients with hepatocellular carcinoma before and after TACE[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2008, 28: 645 - 648.
- [5] Wang HY, Wang RF. Regulatory T cells and Cancer [J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19: 217 - 223.
- [6] Huang B, Pan P, Li Q, et al. Gr-1⁺CD115⁺ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor - induced T regulatory cells and T - cell anergy in tumor - bearing host [J]. Cancer Res, 2006, 66: 1123 - 1131.
- [7] 樊永利, 于津浦, 李 慧, 等. 原发性肝癌患者调节性 T 细胞与预后的关系[J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38: 442 - 446.
- [8] Brown DB, Nikolic B, Covey AM, et al. Quality improvement guidelines for transhepatic arterial chemoembolization, embolization, and chemotherapeutic infusion for hepatic malignancy[J]. J Vasc Interv Radiol, 2012, 23: 287 - 294.
- [9] Gao Q, Qiu S, Fan J, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cell is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection [J]. J Clin Oncol, 2007, 25: 2586 - 2593.
- [10] Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, et al. Interleukin - 10 - secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans [J]. Immunol Rev, 2006, 212: 28 - 50.
- [11] Lan RY, Mackay IR, Gershwin ME. Regulatory T cells in the prevention of mucosal inflammatory diseases: patrolling the border[J]. J Autoimmun, 2007, 29: 272 - 280.
- [12] Xiu HuaYang, Yamagiwa S, Ichida T, et al. Increase of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T - cells in the liver of patients with hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2006, 45: 245 - 262.
- [13] Elkord E, Alcantar - Orozco EM, Dovedi SJ, et al. T regulatory cells in cancer: recent advances and therapeutic potential[J]. Expert Opin Biol Ther, 2010, 10: 1573 - 1586.
- [14] Griffiths RW, Eikord E, Gilham DE, et al. Frequency of regulatory T cell in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival [J]. Cancer Immunol Immunother, 2007, 56: 1743 - 1753.
- [15] 郭 志, 邢文阁, 刘 方, 等. 氩氦冷冻在原发巨块型肝癌介入治疗中的临床应用 [J]. 中华放射学杂志, 2005, 39: 198 - 203.
- [16] 杨 茂, 郭 志, 司同国, 等. 动脉化疗栓塞联合 CIK 细胞过继免疫治疗对中晚期肝癌患者免疫功能的影响[J]. 介入放射学杂志, 2011, 20: 116 - 119.

(收稿日期:2012-07-27)

(本文编辑:俞瑞纳)