

·非血管介入 Non-vascular intervention·

冷循环射频消融治疗后肝癌患者调节性 T 细胞变化及其对预后的影响

曾江正, 刘光清, 郝新宝, 洪涛, 张建辉, 苏群豪,
黄美珠, 黄芬, 雷俊华

【摘要】 目的 探讨冷循环射频消融(RFA)治疗对肝癌(HCC)患者调节性 T 细胞(Treg)变化及其对预后的影响。**方法** 流式细胞仪检测冷循环 RFA 治疗前、治疗后 1、4、7 和 12 个月后外周血 Treg 的变化。随访期间采用超声造影或肝脏增强 CT 评估疗效。采用受试者工作特征(ROC)曲线及 Kaplan-Meier 生存函数的方法分析 Treg 动态变化与肿瘤无进展生存期的关系。**结果** RFA 术后 1 个月, 30 例患者肿瘤缓解(TR)率 93.3%(28/30), 肿瘤进展(TP)率 6.67%(2/30)。RFA 术前 Treg($9.42 \pm 1.16\%$), 术后 1 个月($6.55 \pm 0.97\%$), 较术前显著下降($t = 15.325, P < 0.01$)。经 12 个月随访, TR 率 33.3%(10/30), TP 率 66.7%(20/30)。TR 组术前 Treg 为($8.75 \pm 0.72\%$), 显著低于 TP 组($9.76 \pm 1.20\%$)($t = -2.448, P = 0.021$)。ROC 曲线表明 Treg 谷值以 4.82% 为最佳临界值时, 灵敏度为 90.0%, 特异度为 60.0%; Treg 达谷时间以 5.5 个月为最佳临界值, 灵敏度为 70.0%, 特异度为 85.0%。采用 Kaplan-Meier 曲线分析表明, 肝癌 RFA 术后 Treg 谷值 $\leq 4.82\%$ 的肿瘤无进展生存率优于 Treg 谷值 $> 4.82\%$ 的患者; Treg 达谷时间 ≥ 5.5 个月的患者预后优于 Treg 达谷时间 < 5.5 个月的患者, Log-rank 检验分别为 $\chi^2 = 5.207, P = 0.023$; $\chi^2 = 22.079, P < 0.01$ 。**结论** 冷循环 RFA 可以下调 Treg 水平, 并且 Treg 谷值及 Treg 达谷时间在一定程度上反映 RFA 治疗 HCC 患者的预后。

【关键词】 冷循环电极; 射频消融; 肝癌; 调节性 T 细胞; 受试者工作特征曲线

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2014)-06-0491-05

Changes of regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma after percutaneous cool-tip radiofrequency ablation and its influence on the prognosis ZENG Jiang-zheng, LIU Guang-qing, HAO Xin-bao, HONG Tao, ZHANG Jian-hui, SU Qun-hao, HUANG Mei-zhu, HUANG Fen, LEI Jun-hua. Department of Oncology, Tumor Institute, Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan Province 570102, China

Corresponding author: LIU Guang-qing, E-mail: zjz2610@aliyun.com

【Abstract】 Objective To investigate the changes of regulatory T cells (Treg) in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) after ultrasound-guided percutaneous cool-tip radiofrequency ablation (RFA), and to discuss its influence on the prognosis. **Methods** A total of 30 patients with HCC were enrolled in this study. The percentage of Treg in peripheral blood was estimated with flow cytometry before RFA and one, 4, 7 and 12 months after RFA. During the follow-up period, the therapeutic effects were evaluated by contrast enhanced sonography or contrast enhanced CT scanning. By using the methods of receiver operating characteristic (ROC) curve and Kaplan-Meier survival function, the correlation of Treg dynamic changes with the progression-free survival time was analyzed. **Results** One month after RTA, the tumor response (TR) rate in the 30 patients was 93.3% (28/30), the tumor progression (TP) rate was 6.67% (2/30). The percentage of Treg before RFA was ($9.42 \pm 1.16\%$), which decreased to ($6.55 \pm 0.97\%$) one month after RFA, the difference was statistically significant ($t = 15.325, P < 0.001$). Twelve months after RFA, TR rate became 33.3% (10/30), and TP rate became

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2014.06.008

基金项目: 海南省自然科学基金(811211)

作者单位: 570102 海口 海南医学院附属医院肿瘤研究所、肿瘤内科(曾江正、郝新宝、洪涛、苏群豪、黄美珠、黄芬、雷俊华), 超声科(刘光清、张建辉)

通信作者: 刘光清 E-mail: zjz2610@aliyun.com

66.7%(20/30). The preoperative percentage of Treg of TR group was $(8.75 \pm 0.72)\%$, which was significantly lower than that of TP group $(9.76 \pm 1.20)\%$, the difference was statistically significant ($t = -2.448$, $P = 0.021$). ROC curves indicated that the optimal cut-off value of Treg nadir was 4.82%, the sensitivity was 90.0% and the specificity was 60.0%. The optimal cut-off time to reach Treg nadir was 5.5 months, the sensitivity was 70.0% and the specificity was 85.0%. Kaplan-Meier curve analysis showed that after RFA the progression-free survival rate (PFS) of patients with Treg nadir $\leq 4.82\%$ was significantly higher than that of patients with Treg nadir $> 4.82\%$. PFS of patients with reaching Treg nadir ≥ 5.5 months was significantly higher than that of patients with reaching Treg nadir < 5.5 months. Log-rank test results were $\chi^2 = 5.207$, $P = 0.023$; $\chi^2 = 22.079$, $P < 0.001$, respectively. **Conclusion** Percutaneous cool-tip radiofrequency ablation can decrease the percentage of Treg cells. Besides, Treg nadir and the time reaching Treg nadir can reflect the prognosis of HCC patients after RFA to a certain extent. (J Intervent Radiol, 2014, 23: 491-495)

[Key words] cool-tip electrode; radiofrequency ablation; hepatocellular carcinoma; regulatory T cell; receiver operating characteristic curve

肝癌(HCC)发病隐匿,仅有 10% ~ 20%的患者有机会接受手术根治性治疗^[1]。射频消融(RFA)治疗已成为无法切除的中晚期 HCC 主要的局部治疗方法^[2]。相关研究表明,经高温作用灭活后的肿瘤组织由于其细胞免疫表型的变化而具有瘤苗作用,从而激活机体免疫反应^[3]。调节性 T(regulatory T, Treg)细胞是一群能抑制免疫功能的负调控细胞,近年来 Treg 细胞已经成为肿瘤免疫学的热点问题之一。本研究通过冷循环 RFA 治疗 HCC 患者,了解 RFA 治疗对 HCC 患者 Treg 细胞水平的影响,同时探讨 Treg 细胞水平变化对 HCC 患者预后的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床资料 2009 年 10 月—2012 年 6 月我院肿瘤内科 HCC 患者 30 例,男 19 例,女 11 例;年龄 32 ~ 65 岁,中位年龄 51 岁;初治 23 例,手术后复发 7 例;肿瘤癌灶最大直径 $(2.5 \pm 1.2)\text{cm}$ ($2.1 \sim 5.0\text{cm}$);Child-Pugh A 级 18 例, B 级 12 例;所有患者术前未接受 TACE 或化疗,随访期间未使用影响免疫调节药物。入组标准:①病理活检证实为 HCC;②肿瘤数目 ≤ 3 个且最大癌灶直径 $\leq 5.0\text{cm}$;③肿瘤有包膜或边界清晰,肿瘤距肝边缘具有足够灭瘤安全范围者;④肝功能 Child-Pugh A 级或 B 级,无肝外转移。排除标准:①肿瘤数目 > 3 枚或最大癌灶直径 $> 5\text{cm}$,或者弥漫型 HCC;②伴有门脉癌栓或者邻近器官侵犯;③肝功能 Child-Pugh C 级,经保肝治疗无法改善者;④治疗前 1 个月内有食管(胃底)静脉曲张破裂出血;⑤不可纠正的凝血功能障碍及严重血象异常,有严重出血倾向者;⑥顽固性大量腹水,恶液质;⑦活动性感染;⑧严重的肝、

肾、心、肺、脑主要脏器功能衰竭;⑨意识障碍或不能配合治疗的患者。所有患者于 RFA 术前均签署治疗同意书。

1.1.2 仪器设备 江苏天马高科技有限责任公司生产 TM-RFTI-1 冷循环 RFA 治疗系统。包括射频源、蠕动泵、冷循环电极、中性电极板。穿刺引导机为 Philips HD11 超声仪。应用日本 ALOKA $\alpha 10$ 彩色多普勒超声(彩超)显像仪,采用 Bracco 公司超声对比剂 Sono Vue,造影微泡为磷脂包裹的六氟化硫微气泡。采用美国 Bectond-Dickinson 公司生产的 FACSCalibur 型流式细胞仪 (FCM) 及抗 CD3-PerCP、抗 CD25-PE、抗 CD4-FITC 及同型对照, CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP/CD4APC T 细胞亚群试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 RFA 方法 术前行常规彩超或超声造影检查,确认肿块的部位、大小、数目、边缘、血供情况及毗邻脏器。术前禁食 6 h,术前 15 min 予哌替啶 50 mg、非那根 25 mg 肌肉注射。术中采用曲马多 300 mg 静脉滴注维持止痛,穿刺点采用 2%利多卡因局麻,对于有慢性呼吸道疾病的患者术前加服可待因 0.3 mg 预防术中突发咳嗽,术中心电监护并准备好抢救用品。

制订方案:直径 $< 3\text{cm}$ 的病灶采用一针穿刺,一点消融;直径 $> 3\text{cm}$ 的病灶采用多针穿刺,多点消融的空间布针方案,多点消融的顺序是先消融深部的肿瘤再消融表浅的肿瘤,治疗范围力求完全覆盖病灶并超出病灶周边 $1.0 \sim 2.0\text{cm}$,最大限度地毁损病灶。右肝病灶一般从右腋前或右腋中线进针,左肝病灶一般从左肋弓内侧进针。彩超确认射频电极位置准确后先开启冷循环泵,然后选择阻抗

模式进行 RFA 治疗, 每个位点治疗时间设为 12 min, 然后根据病灶情况调整电极位置进行多次穿刺追加治疗, 拔针时手动模式 35 W 缓慢退针进行针道消融。

1.2.2 FCM 检测 新鲜采集的 50 μ l 肝素抗凝血 2 份, 分别加入抗 CD3-PerCP/抗 CD4-FITC/抗 CD25-PE 单克隆抗体及抗 CD3-PerCP/抗 CD4-FITC 单克隆抗体/小鼠 IgG1-PE 各 15 μ l, 室温避光孵育 20 min, 加入 2 ml 溶血素, 室温避光 10 min, 1 000 r/min \times 5 min 离心后弃上清液, 加入 PBS 2 ml 洗涤 1 次, 1 000 r/min \times 5 min 离心后弃上清液, 加入 PBS 250 μ l, 上机使用 CELL Quest 软件进行检测, 选择荧光强度 > 100 的 CD4⁺CD25⁺作为 Treg 细胞, 记录阳性细胞百分率, 减去非特异性对照值。检测冷循环 RFA 治疗前、治疗后 1、4、7 和 12 个月后外周血调节性 T 细胞变化。Treg 谷值为 RFA 治疗后每例患者外周血 Treg 百分率降低所达到的最低值。Treg 达谷时间为从治疗开始至外周血 Treg 百分率降低所达到的最低值水平的时间(单位:月)。

1.2.3 疗效评价 治疗后 1 个月行增强 CT 或超声造影检查, 评价病灶消融效果。参照 2011 年肝癌局部消融治疗规范的专家共识^[4], 肿瘤缓解(TR)包括: ① 完全消融(CR), 指肝脏三期 CT 或者超声造影随访, 肿瘤所在区域为低密度(超声表现为高回声), 动脉期未见强化; ② 不完全消融(ICR), 指肝脏三期 CT 或者超声造影随访, 肿瘤病灶内局部动脉期有强化, 提示有肿瘤残留。对治疗后有肿瘤残留者, 可以进行再次消融治疗, 若两次消融后仍有肿瘤残留, 则确定为消融治疗失败, 应该选用其他治疗手段。③ 肿瘤进展(TP), 局部肿瘤进展(local tumor progression), 指肿瘤完全消融后, 在消融灶边缘出现新病灶, 新病灶与消融灶相连; 新病灶(new lesion), 指肝内其他部位新发生的病灶; 远处转移(distant metastasis), 指出现肝外的转移灶。无进展生存期随访终点为治疗后肿瘤进展或者随访时间满 12 个月。如果肿瘤进展, 及时换用其他方案治疗。

1.3 统计方法

数据采用 SPSS13.0 统计软件进行统计处理。计量资料 Treg、Treg 谷值经探索性分析, 均服从正态分布, 采用成组及配对 t 检验。采用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)及 Kaplan-Meier 生存函数的方法分析 Treg 细胞水平动态变化与肿瘤无进展生存期的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Treg 细胞与 RFA 疗效的关系

30 例患者共用 42 支电极针, 其中集束针 4 支。治疗后 1 个月行增强 CT 或超声造影检查示 30 例患者 TR 率 93.3%(28/30), 其中 CR 21 例, PR 7 例, PR 行第 2 次补充消融治疗成功, TP 率 6.7%例(2/30)。RFA 术前 Treg (9.42 \pm 1.16)%, 术后 1 个月(6.55 \pm 0.97)%, 较术前显著下降 ($t = 15.325, P < 0.01$)。经 12 个月随访, TR 率 33.3%(10/30), TP 率 66.7%例(20/30)。TR、TP 组术前 Treg 分别为(8.75 \pm 0.72)%、(9.76 \pm 1.20)%, 两组比较差异有统计学意义 ($t = -2.448, P = 0.021$), 提示 RFA 术前较低的 Treg 细胞值有较好的临床疗效。见图 1、2。

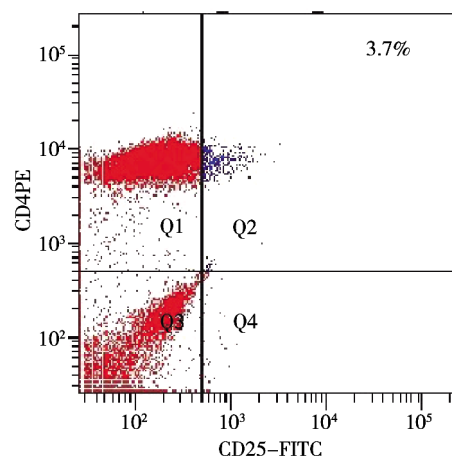


图 1 TR 组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞

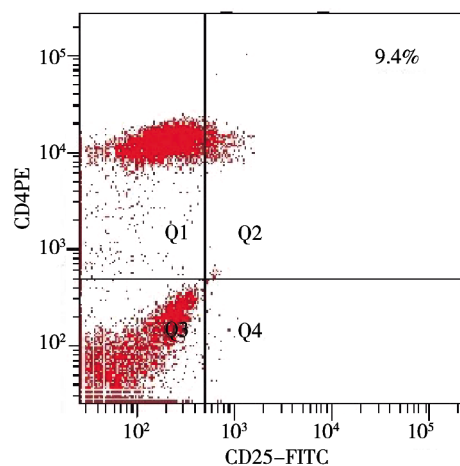


图 2 TP 组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞

2.2 Treg 细胞水平动态变化与肿瘤无进展生存期的关系

采用 ROC 曲线的方法寻找 Treg 谷值、Treg 达谷时间判断 RFA 术后肝癌患者肿瘤进展情况最优化的临界值水平。研究结果表明, Treg 谷值及 Treg

达谷时间的曲线下面积(AUC)分别为 0.795 ± 0.084 ($P = 0.009$)、 0.880 ± 0.061 ($P = 0.001$),说明两者对于预后判断具有一定程度上的准确性。Treg 谷值以 4.82%为最佳临界值时,灵敏度为 90.0%,特异度为 60.0%。Treg 谷值大于 4.82%提示预后欠佳。对于 Treg 达谷时间,5.5 个月为最佳临界值,灵敏度为 70.0%,特异度为 85.0%。达谷时间大于 5.5 个月的患者预后更佳。见图 3、4。

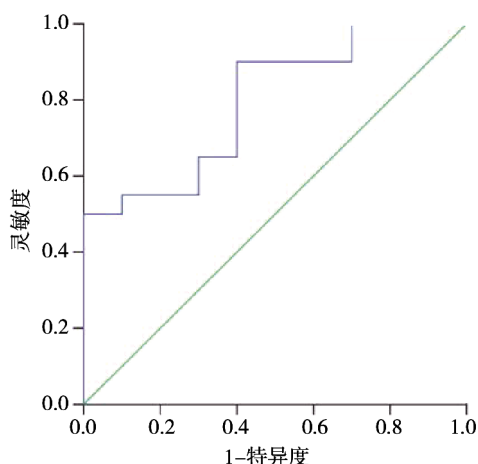


图 3 Treg 谷值预测 RFA 术后肿瘤进展的受试者工作曲线

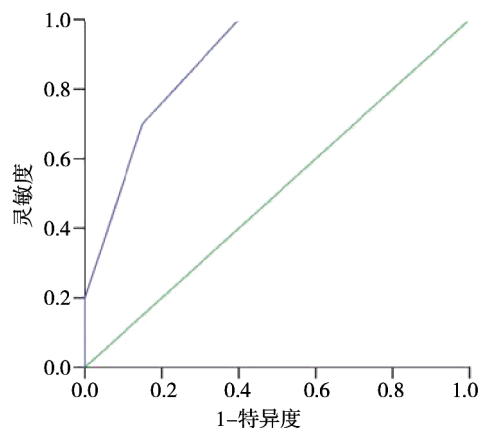


图 4 Treg 达谷时间预测 RFA 术后肿瘤进展的受试者工作曲线

以上述 2 个最佳临界值为分类标准作 Kaplan-Meier 曲线表明,肝癌 RFA 术后 Treg 谷值 $\leq 4.82\%$ 的肿瘤无进展生存率优于 Treg 谷值 $> 4.82\%$ 的患者,中位疾病无进展生存期(PFS)分别为 10.1 个月 (95%CI:8.926 ~ 11.217)、6.9 个月 (95%CI:5.227 ~ 8.648);Treg 达谷时间 ≥ 5.5 个月的患者预后优于 Treg 达谷时间 < 5.5 个月患者;中位 PFS 分别为 10.9 个月 (95%CI:9.891 ~ 11.842)、5.9 个月 (95%CI:4.602 ~ 7.265)。Log-rank 检验分别为 $\chi^2 = 5.207$, $P = 0.023$; $\chi^2 = 22.079$, $P < 0.01$ 。见图 5、6。

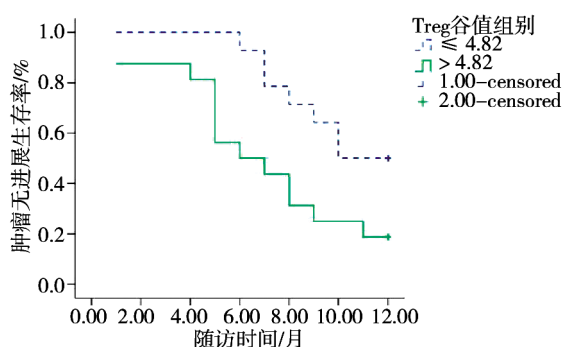


图 5 不同水平的 Treg 谷值与肿瘤无进展生存的关系

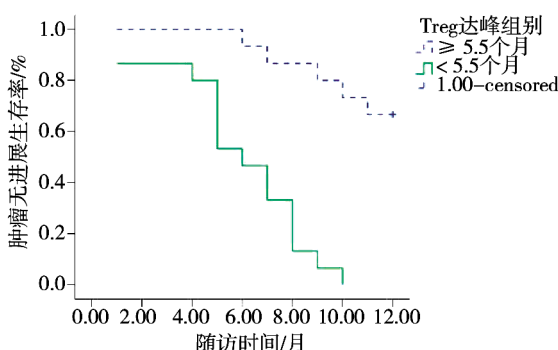


图 6 不同水平的 Treg 达谷时间与肿瘤无进展生存的关系

3 讨论

Treg 细胞是一群能抑制免疫功能的负性调控细胞,已成为肿瘤免疫学的热点问题之一。其中研究进展最快、对其特性了解最多的是 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞。存在于肿瘤微环境中的肿瘤抗原和细胞因子对于 Treg 细胞的募集、扩增和 Treg 细胞的诱导有重要的作用^[5]。CD25 是 IL-2 受体的 α 链,是 Treg 细胞重要的表面标志之一。 $CD4^+CD25^+$ T 细胞在正常人或小鼠外周血中占 $CD4^+$ T 细胞 5% ~ 10%,活化的 $CD4^+CD25^+$ T 细胞可能通过抑制 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞的 IL-2 基因转录及表达从而抑制 T 细胞的活化和增殖^[6]。研究发现转录因子 Foxp3 基因为 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞生成和免疫调节功能发挥的关键基因,可作为 Treg 细胞的特异性标记^[7]。近年研究发现,肿瘤周围有大量 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg 细胞浸润,通过抑制或杀伤效应性 $CD8^+$ 或 $CD4^+$ T 细胞而抑制机体的抗肿瘤免疫,去除荷瘤鼠体内的 Treg 细胞可使抗肿瘤作用增强^[8],进一步研究认为 Treg 细胞可通过增加分泌 IL-10 和转化生长因子 β 、减少分泌 IL-2 等干扰抗肿瘤的免疫反应^[9],也可通过 RANKL-RANK 信号途径促进肿瘤转移^[10]。对肿瘤临床特征分析,发现高 Treg 细胞水平与肝硬化背景和更高的 TNM 分期相关^[11]。采用 COX 模型分析发现 Foxp3⁺ Treg 细胞水平可以预测

肝癌的复发及生存期^[12]。本研究也发现 RFA 术后随访 12 月, 肿瘤缓解组术前 Treg 细胞水平显著低于肿瘤进展组, 表明 RFA 术前 Treg 细胞水平与预后相关。

肝肿瘤 RFA 治疗后短时间内在坏死区周围间质带热休克蛋白增加, 激活机体免疫反应。数周或数月后可检测到肿瘤抗原特异性 CD4、CD8 T 细胞升高^[13]。对乳腺癌大鼠模型, RFA 治疗后在肿瘤边缘区可检测到高水平 NK 细胞浸润, 增加热休克蛋白表达和激活 caspase-3 酶, 同时循环 Treg 细胞水平显著下降^[14]。对大鼠肝癌模型应用手术切除及 RFA 治疗, 分析 Treg 细胞水平变化, 发现手术切除后 Treg 细胞水平较 RFA 治疗后明显升高, 并且 Treg 细胞水平与肿瘤大小呈正相关, 认为 RFA 在术后恢复阶段可稳定 Treg 细胞水平, 而手术切除能激活免疫抑制反应促进肿瘤生长^[15]。肺癌 RFA 治疗后可以下调 Treg 细胞水平, 与 RFA 的远期疗效相关^[16]。

本课题组所采用的冷循环 RFA 为新一代 RFA 治疗仪。冷循环电极采用冷冻灌注液从内部冷却电极, 使临近电极针的组织发热减轻, 防止其炭化, 从而增加总的能量, 增加热凝固效应。本研究通过观察 RFA 治疗后 HCC 患者调节性 T 细胞表达的动态变化, 首次探讨调节性 T 细胞变化对 HCC 患者预后的影响。发现 RFA 可降低 HCC 患者 Treg 细胞水平。ROC 表明 Treg 谷值以 4.82 为最佳临界值时, Treg 达谷时间以 5.5 个月为最佳临界值。采用 Kaplan-Meier 曲线分析表明, 肝癌 RFA 术后 Treg 谷值 ≤ 4.82 的肿瘤无进展生存率优于 Treg 谷值 > 4.82 的患者; Treg 达谷时间 ≥ 5.5 个月的患者预后优于 Treg 达谷时间 < 5.5 个月患者。

综上所述, 冷循环 RFA 治疗可以下调 HCC 患者 Treg 细胞水平, 进一步对其动态变化分析发现 Treg 谷值及 Treg 达谷时间在一定程度上反映 RFA 治疗 HCC 患者的预后。冷循环射频消融治疗所诱导的免疫机制可能为影响肝癌患者预后的重要因素之一。

[参考文献]

- [1] Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2012, 379: 1245 - 1255.
- [2] Shiina S, Tateishi R, Arano T, et al. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: 10-year outcome and prognostic factors [J]. Am J Gastroenterol, 2012, 107: 569 - 577; quiz 578.
- [3] Haen SP, Pereira PL, Salih HR, et al. More than just tumor destruction; immunomodulation by thermal ablation of Cancer [J]. Clin Dev Immunol, 2011; 160250.
- [4] 陈敏山. 肝癌局部消融治疗规范的专家共识 [J]. 实用肝脏病杂志, 2011, 19: 243 - 245.
- [5] Ondondo B, Jones E, Godkin A, et al. Home sweet home: the tumor microenvironment as a haven for regulatory T cells [J]. Front Immunol, 2013, 4: 197.
- [6] Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, et al. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood [J]. J Immunol, 2001, 167: 1245 - 1253.
- [7] Yagi H, Nomura T, Nakamura K, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25 + CD4 + regulatory T cells [J]. Int Immunol, 2004, 16: 1643 - 1656.
- [8] Hindley JP, Jones E, Smart K, et al. T - cell trafficking facilitated by high endothelial venules is required for tumor control after regulatory T-cell depletion [J]. Cancer Res, 2012, 72: 5473 - 5482.
- [9] Wu CP, Qing X, Wu CY, et al. Immunophenotype and increased presence of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with acute lymphoblastic leukemia [J]. Oncol Lett, 2012, 3: 421 - 424.
- [10] Tan W, Zhang W, Strasner A, et al. Tumour - infiltrating regulatory T cells stimulate mammary Cancer metastasis through RANKL-RANK signalling [J]. Nature, 2011, 470: 548 - 553.
- [11] Zhou J, Ding T, Pan W, et al. Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients [J]. Int J Cancer, 2009, 125: 1640 - 1648.
- [12] Lin SZ, Chen KJ, Xu ZY, et al. Prediction of recurrence and survival in hepatocellular carcinoma based on two Cox models mainly determined by FoxP3+ regulatory T cells [J]. Cancer Prev Res (Phila), 2013, 6: 594 - 602.
- [13] Widenmeyer M, Shebzukhov Y, Haen SP, et al. Analysis of tumor antigen-specific T cells and antibodies in Cancer patients treated with radiofrequency ablation [J]. Int J Cancer, 2011, 128: 2653 - 2662.
- [14] Todorova VK, Klimberg VS, Hennings L, et al. Immunomodulatory effects of radiofrequency ablation in a breast Cancer model [J]. Immunol Invest, 2010, 39: 74 - 92.
- [15] Gao HJ, Zhang YJ, Liang HH, et al. Radiofrequency ablation does not induce the significant increase of CD4 (+) CD25 (+) Foxp3 (+) regulatory T cells compared with surgical resection in Hepal-6 tumor model [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2013, 61: 333 - 340.
- [16] Fietta AM, Morosini M, Passadore I, et al. Systemic inflammatory response and downmodulation of peripheral CD25 + Foxp3+ T-regulatory cells in patients undergoing radiofrequency thermal ablation for lung Cancer [J]. Hum Immunol, 2009, 70: 477 - 486.

(收稿日期: 2013-11-28)

(本文编辑: 俞瑞纲)