

## •肿瘤介入 Tumor intervention•

## 明胶海绵微粒-TACE 治疗 15 例大肝癌术后外周血 Treg 细胞的变化及意义

任志忠, 刘 影, 岳元勋, 杨晓伟, 黄 鑫, 张跃伟

**【摘要】 目的** 初步探讨应用明胶海绵微粒(GSMs)行 TACE 治疗大肝癌术后外周血中调节性 T 淋巴细胞(Treg)变化及意义。**方法** 应用流式细胞技术检测健康组和大肝癌患者 GSMs-TACE 术前与术后第 10 天、第 22 天外周血 Treg 细胞的含量。**结果** 选择健康人 7 名,符合入组标准的肝癌患者共计 15 例。外周血中 Treg 细胞含量:健康对照组为 $(8.64\pm 1.94)\%$ ;肝癌患者术前为 $(11.52\pm 3.78)\%$ ,术后第 10 天为 $(9.07\pm 1.94)\%$ ,与术前相比显著下降( $P=0.039$ ),术后第 22 天为 $(9.96\pm 1.48)\%$ ,与术前比较差异有统计学意义( $P=0.028$ )。**结论** GSMs-TACE 治疗大肝癌能够显著降低外周血 Treg 细胞的含量,表明该方法对机体免疫功能有正向调节作用。

**【关键词】** 肝细胞肝癌;肝动脉化疗栓塞术;调节性 T 淋巴细胞;明胶海绵微粒

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2018)-12-1151-04

**Postoperative changes and its significance of Treg cells in peripheral blood after GSMs - TACE treatment for large hepatocellular carcinoma in 15 patients** REN Zhizhong, LIU Ying, YUE Yuanxun, YANG Xiaowei, HUANG Xin, ZHANG Yuewei. Department of Hepatobiliary Intervention, Affiliated Beijing Tsinghua Changgung Hospital, School of Clinical Medicine, Tsinghua University, Beijing 102218, China

Corresponding author: ZHANG Yuewei, E-mail: zhangyuewei1121@sina.com

**【Abstract】 Objective** To study on the postoperative changes and its significance of regulatory T lymphocytes (Treg cells) in peripheral blood after transcatheter arterial chemoembolization with gelatin sponge microparticles (GSMs-TACE) for large hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** By using flow cytometry, the contents of Treg cells in peripheral blood were determined before and 10 days, 22 days after GSMs-TACE in both health control group and patients with large HCC (study group). **Results** Seven healthy subjects and 15 HCC patients, whose clinical data met the inclusion criteria, were enrolled in this study. The content of Treg cells in peripheral blood in healthy control group was  $(8.64\pm 1.94)\%$ . The content of Treg cells in peripheral blood in HCC patients before GSMs-TACE was  $(11.52\pm 3.78)\%$ , which was decreased to  $(9.07\pm 1.94)\%$  at 10 days and to  $(9.96\pm 1.48)\%$  at 22 days after GSMs-TACE respectively, the postoperative values in Treg cells content were statistically significantly different from the preoperative one ( $P=0.039$  and  $P=0.028$  respectively). **Conclusion** For the treatment of large HCC, GSMs-TACE can significantly reduce the content of Treg cells in peripheral blood, indicating that this method has a positive regulatory effect on the immune function of human body.(J Intervent Radiol, 2018, 27: 1151-1154)

**【Key words】** hepatocellular carcinoma; transcatheter arterial chemoembolization; regulatory T lymphocyte; gelatin sponge microparticle

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2018.12.008

基金项目:国家自然科学基金(81571783)

作者单位:102218 清华大学附属北京清华长庚医院肝胆介入科、清华大学临床学院

通信作者:张跃伟 E-mail: zhangyuewei1121@sina.com

1995 年 Sakaguchi 等<sup>[1]</sup>首次报道在正常人外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞中有一群持续高表达 CD25 分子的细胞——调节性 T 淋巴细胞(Treg), Treg 细胞与肿瘤的免疫逃逸有关。已有研究证实,肝癌患者外周血 Treg 细胞数量增加<sup>[2]</sup>。射频消融、TACE 是治疗肝癌(HCC)有效方法,同时能够有效降低 HCC 患者外周血 Treg 细胞含量<sup>[3-5]</sup>。明胶海绵微粒(GSMs)-TACE 是目前国内外研究热点,术后肿瘤显著坏死是疗效的病理特征之一。本中心较早应用 GSMs 治疗 BCLC B 期和 C 期患者取得良好安全性和临床疗效<sup>[6]</sup>,术后 3 h 即可见肿瘤坏死改变。本研究通过检测 GSMs-TACE 术后不同时间点外周血 Treg 含量水平,初步探讨 GSMs-TACE 对机体免疫功能影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

选择 2016 年 7 月至 2018 年 5 月在我院初次行 GSMs-TACE 的 HCC 患者 15 例(见表 1)患者平均年龄为(47±12)岁。所有入组肝癌患者按照《原发性肝癌规范化诊治专家共识条例》,均行 2 种以上影像检查或肝肿瘤活检病理证实为 HCC,选择患者均为大肝癌:最大肿瘤病灶直径均>5 cm。选择 7 名志愿者作为健康对照组。随访截止时间为 GSMs-TACE 术后 30 d。

表 1 肝癌患者一般资料

参数	GSMs-TACE/n
性别	
男	12
女	3
肝癌类型	
乙肝	13
无	2
Child-Pugh 分级	
A	13
B	2
BCLC 分级	
B	4
C	11
AFP/(ng/mL)	
≥400	10
20~400	3
<20	2
肿瘤大小/cm	
5~10	9
≥10	6

### 1.2 方法

1.2.1 GSMs-TACE 治疗 入组肝癌患者行 GSMs-TACE 治疗。应用 Seldinger 法穿刺右侧股动脉,引入

RH 肝管,常规行腹腔动脉、肝总动脉造影。根据肿瘤部位、大小及肿瘤染色是否完整等情况,结合影像资料,辅助行膈动脉、肠系膜上动脉、右肾动脉、肋间动脉、胃左动脉、胸廓内动脉等造影,以明确肿瘤所有供血来源动脉。术中依据肿瘤大小、微导管超选情况、有无动静脉瘘及术前的肝功能评分,选择不同直径的 GSMs。应用 30 mg 表柔比星稀释液与 GSMs 制成微粒悬浮液。DSA 透视下经导管缓慢推注化疗药与 GSMs 悬浮液至肿瘤供血动脉,停止栓塞直至出现血流停滞或对比剂反流,再次造影显示肿瘤染色完全消失。术后常规给予 3~5 d 保肝(2到 3 组保肝药:多烯磷脂酰胆碱 20 mL、还原性谷胱甘肽 1.8 g、复方甘草酸苷 15 mL)、补液(总液体量 2 000~2 500 mL)、止吐(昂丹司琼 8 mg、盐酸甲氧氯普胺 10 mg)、止痛(地佐辛/6 h)、抗炎(头孢唑林钠 1 g,2 次/d)、退热(体温 38.5℃以下物理降温,超过 38.5℃赖氨匹林 1 g)、抑酸(奥美拉唑 40 mg)治疗。

1.2.2 血液标本采集及标本处理 所有患者均签署知情同意书,在 GSMs-TACE 术前 1 d 和术后 4、10、20、30 d 常规行肝肾功、血常规、异常凝血酶原、甲胎蛋白检查,术后 4 d 行上腹部 CT 平扫,术后 30 d 行上腹部增强 CT 或 MRI 检查。所有大肝癌患者于 GSMs-TACE 术前 1 d,术后 10、22 d(15~30 d 的均值)用肝素钠抗凝剂采血管采集前臂静脉外周血 2 mL,应用流式细胞技术进行外周血 Treg 细胞含量的测定。健康对照组与肝癌患者 GSMs-TACE 治疗前 1 d 同时采集前臂静脉血 2 mL 进行外周血 Treg 细胞含量的测定,并保存数据进行统计学分析。

1.2.3 Treg 全血处理过程 ①使用抗凝管收集静脉穿刺的血液;②取出 1 个干粉试剂管(底部已有 CD25/CD4/CD127/CD3 抗体),加入 100 μL 的全血于干粉试剂管底部;③旋涡轻振荡 0.5~1 s,混匀。孵育 15 min,室温(15~25℃),避光;④将 500 μL 红细胞裂解液加入试管中。孵育 15 min,室温,避光;⑤每测试管加入 PBS 溶液 2 mL,振荡,在室温下离心 5 min,离心力为 300 g;⑥除去上清液,重复步骤 5 一次;⑦除去上清液,每个试管中加入 PBS 溶液 500 μL。1 h 内上流式细胞仪进行检测;⑧流式图圈门方案:Treg:CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>;CD25<sup>+</sup>、CD127+Low 的细胞群。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行数据统计分析,计量资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示,两两组间比较采用 *t* 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肝癌患者 GSMs-TACE 术前与健康人外周血 Treg 细胞含量

肝癌患者与健康人对照组在年龄、性别等一般资料上比较差异无统计学意义( $P < 0.05$ )。肝癌患者 GSMs-TACE 术前 Treg 细胞含量,即 Treg 细胞(CD25+、CD127+Low)占 Th 细胞百分比(CD3+、CD4+)为  $(11.52 \pm 3.78)\%$ ,健康对照组 Treg 细胞含量为  $(8.64 \pm 1.94)\%$ ,肝癌患者外周血中 Treg 细胞含量显著高于健康对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.2 GSMs-TACE 术前与术后 10、22 d 外周血中 Treg 细胞含量变化

Treg 细胞含量在 TACE 术后 10 d 有所下降  $(9.07 \pm 1.94)\%$ ,术后 22 d 升高至  $(9.96 \pm 1.48)\%$ 。外周血 Treg 细胞含量在术后 10、22 d 与 GSMs-TACE 术前比较均有统计学差异( $P < 0.05$ )(见表 2)。

表 2 15 例大肝癌患者 GSMs-TACE 治疗前后外周血 Treg 细胞含量比较

时间	Treg 含量(%)	t 值	P 值
术前	$11.52 \pm 3.78$		
术后 10 d	$9.07 \pm 1.94$	4.138	0.039
术后 22 d	$9.96 \pm 1.48$	3.638	0.028

注: 术后 10 d、22 d 均与术前比较,  $P < 0.05$

### 2.3 肝癌患者 GSMs-TACE 治疗前后影像学改变 GSMs-TACE 术中 DSA 造影显示肝内肿瘤染色,

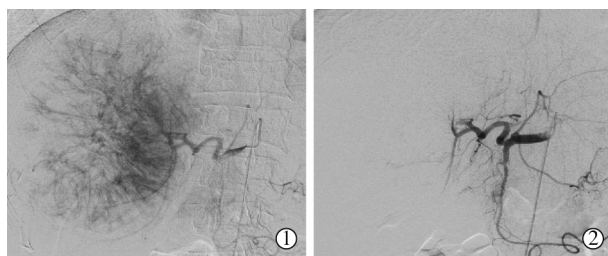
供血动脉来自肝右动脉。GSMs-TACE 术后阻断肿瘤供血动脉,再次造影可见肿瘤染色消失(见图 1)。肝癌患者介入术后第 4 天复查上腹部 CT 平扫,结果显示 15 例 HCC 患者肝内肿瘤均有不同程度蜂窝状坏死(见图 2)。

### 2.4 肝癌患者 GSMs-TACE 治疗前后外周血 Treg 细胞流式检测图

GSMs-TACE 治疗后 Treg 细胞含量明显升高,术后 10 d 下降至最低水平,术后 22 d 又现升高,但仍低于术前水平(见图 3)。

## 3 讨论

当肝癌发生后,机体 T 淋巴细胞在肿瘤免疫中起调控及免疫监视作用。Treg 细胞参与机体免疫系统对自身抗原形成免疫耐受,由于大多数肿瘤抗原



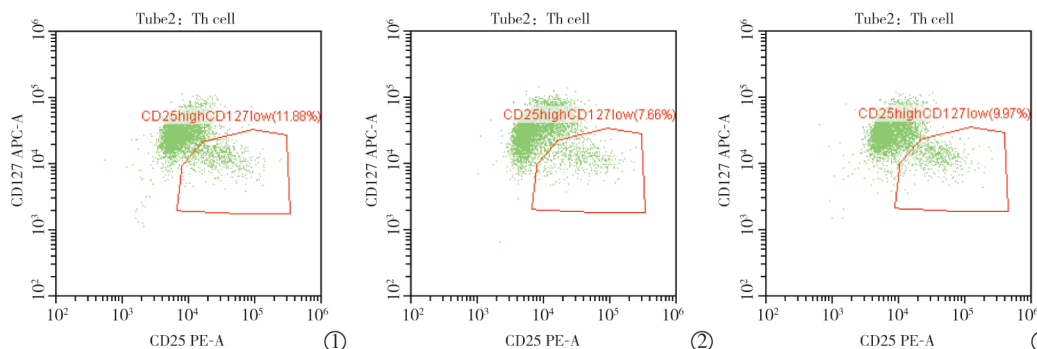
①显示肿瘤染色,供血动脉来自肝右动脉,应用 GSM-TACE 后肝右动脉血流速度减慢;②术后 DSA 造影可见肿瘤染色基本消失

图 1 大肝癌患者 GSMs-TACE 术中 DSA 造影



①显示肝右叶巨大肿瘤动脉期明显强化;②GSMs-TACE 术后 4 d CT 平扫可见肿瘤呈蜂窝状、低密度改变;③术后 1 个月复查 MRI 增强扫描显示肝右叶肿瘤病灶大部分呈液化坏死改变

图 2 同一例患者手术前后影像学检查



①术前 Treg 含量(11.88%)较健康对照组明显升高;②术后 10 d(7.66%)下降至最低水平;③术后 22 d(9.97%)升高但仍低于术前水平

图 3 同一例患者 GSMs-TACE 治疗前后外周血 Treg 细胞含量流式检测图



属于自身抗原,机体对早期原发肿瘤一般处于免疫无反应状态,而这种肿瘤免疫耐受的形成与 Treg 细胞存在一定关系<sup>[7]</sup>。另外,Treg 细胞一旦被激活,可通过抗原非特异方式抑制 CD4+T 细胞和 CD8+T 细胞,从而抑制 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用<sup>[8]</sup>。

已有研究证实,HCC 患者外周血中 Treg 细胞较正常人显著上升,从肿瘤免疫学角度证实 HCC 的发生机制<sup>[9]</sup>。本研究对比 HCC 患者与健康人外周血中 Treg 细胞的含量,同样支持上述结论。TACE 方法虽然是作为无手术切除适应证 HCC 有效治疗方法,广泛应用临床实践,但多次治疗仍有部分患者获得完全缓解,疗效机制可能与治疗前后机体肿瘤免疫功能状态相关。已有研究证实,cTACE 术后患者外周血 CD4+CD25+/CD4+T 细胞的比例较治疗前 ( $11.12\pm 3.58\%$ ),显著下降至 ( $7.58\pm 2.65\%$ )<sup>[5]</sup>。

GSMs-TACE 相对传统 cTACE,在肝功能和肝储备功能良好前提下,彻底栓塞肿瘤供血动脉,术后肿瘤呈现蜂窝状坏死改变,肿瘤负荷短时间内大量减少,同样表现在如 HCC 特异性肿瘤标记物 AFP 数值显著下降。前期研究证实,GSMs-TACE 方法多次治疗巨块型肝癌,术后 6 个月完全缓解率为 25%,而且 TACE 治疗间隔平均时间为 2.6 个月<sup>[6]</sup>。探讨上述临床现象的原因,除充分闭塞肿瘤供血动脉以阻断其营养来源外,是否也存在肿瘤呈显著蜂窝状坏死病理改变,肿瘤负荷短时间内大量减轻,进而对机体免疫功能有正向调节作用,这方面研究还未见报道。

本研究观察术后 10、22 d 外周血中 Treg 细胞含量的变化,发现术后 10 d Treg 细胞含量为 ( $9.07\pm 1.94\%$ ),较术前 ( $11.52\pm 3.78\%$ ) 显著下降,表明肿瘤负荷的显著下降有助于改善机体免疫功能状态。继续观察术后 22 d Treg 细胞含量为 ( $9.96\pm 1.48\%$ ),仍低于术前基线水平,但较术后 10 d 数值略有升高。GSMs-TACE 术后外周血 Treg 细胞的含量先下降后升高可能是肝肿瘤介入术后出现的液化坏死,在短期内可能不会导致肿瘤进展,但由于是晚期大肝癌,残存的肝癌细胞继续生长,通过多种作用机制,从而导致外周血中的 Treg 细胞的含量再次升高。上述研究结果可以初步得出 2 个基本结论:①外周血中 Treg 细胞在 GSMs-TACE 治疗后,肿瘤大范围坏死,肿瘤负荷显著减轻,术后 10 d 是外周血 Treg 细胞最低值,可能是适时给予免疫辅助治疗的最佳时机;②机体免疫功能改善可以在 1 个月内持续保持,但可能随着肿瘤细胞的进一步增殖,机体免疫

功能又逐渐恢复抑制状态,包括 GSMs-TACE 在内的肿瘤后续治疗方法要随后进行,进一步减轻肿瘤负荷,以更好恢复和提升机体抗肿瘤的免疫能力。

本研究入组患者例数较少,初步观察 GSMs-TACE 治疗 HCC 对外周血中 Treg 细胞含量影响,初步证实该方法对机体免疫功能可能存在正向调节作用。拟进一步扩大 HCC 数量,观察疗效与外周血中 Treg 细胞相关性,从 Treg 细胞角度,更加深入探讨 GSM-TACE 对机体免疫功能影响,从肿瘤免疫学角度探讨 GSMs-TACE 方法治疗 HCC,尤其是大肝癌的疗效机制。

#### [参考文献]

- [1] 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-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. J Immunol, 1995, 155: 1151-1164.
- [2] He MK, Le Y, Zhang YF, et al. Matrix metalloproteinase 12 expression is associated with tumor FOXP3+ regulatory T cell infiltration and poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Lett, 2018, 16: 475-482.
- [3] Zuo MX, Huang JH. The history of interventional therapy for liver cancer in China[J]. J Intervent Med, 2018, 1: 70-76.
- [4] 曾江正, 刘光清, 郝新宝, 等. 冷循环射频消融治疗肝癌患者调节性 T 细胞变化及其对预后的影响[J]. 介入放射学杂志, 2014, 23: 491-495.
- [5] Liao J, Xiao J, Zhou Y, et al. Effect of transcatheter arterial chemoembolization on cellular immune function and regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2015, 12: 6065-6071.
- [6] Zhou J, Liu Y, Ren Z, et al. Transarterial chemoembolization with gelatin sponge microparticles for Barcelona clinic liver cancer Stage C and large hepatocellular carcinoma: initial clinical experience[J]. J Cancer Res Ther, 2017, 13: 767-772.
- [7] Yuan CH, Sun XM, Zhu CL, et al. Amphiregulin activates regulatory T lymphocytes and suppresses CD8+ T cell-mediated anti-tumor response in hepatocellular carcinoma cells[J]. Oncotarget, 2015, 6: 32138-32153.
- [8] 李虎子, 郭志, 王海涛, 等. 肝细胞癌患者 TACE 术后外周血调节性 T 细胞水平对预后的影响[J]. 介入放射学杂志, 2012, 21: 998-1001.
- [9] Brouwer-Visser J, Cheng WY, Bauer-Mehren A, et al. Regulatory T-cell genes drive altered immune microenvironment in adult solid cancers and allow for immune contextual patient subtyping[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2018, 27: 103-112.

(收稿日期:2018-08-14)

(本文编辑:俞瑞纲)