

肝细胞癌患者病灶局部 Treg 细胞分析及其临床意义

王宏波, 郭存丽, 程文, 郑秀兰, 张艳华

(哈尔滨医科大学附属第三医院, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要: [目的] 探讨肝细胞癌患者病灶局部 Treg 细胞的变化规律及其临床意义。[方法] 收集 40 例原发性肝细胞型肝癌(HCC)患者经手术切除的肝癌组织及非癌肝组织(距肿瘤边缘>5cm)标本,用流式细胞仪分别检测肝癌组织、非癌肝组织中调节性 T 淋巴细胞(Treg 细胞)的数量及变化规律,并且分析 Treg 细胞表达数量与预后的关系。[结果] 肝癌病灶局部有不同程度免疫细胞浸润,主要为 T 淋巴细胞,其中 Treg 淋巴细胞含量高于非肿瘤组织。Ⅲ、Ⅳ期患者 Treg 细胞含量($7.7\% \pm 4.03\%$)明显高于 I、II 期患者($3.7\% \pm 1.6\%$)($P=0.037$)。高 Treg 细胞含量组($\geq 6\%$)患者的预后明显差于低 Treg 细胞含量组($<6\%$)($P=0.005$)。[结论] 肝癌组织中,对免疫起抑制作用的 Treg 细胞比例增加。Treg 细胞含量高与预后差相关。

关键词: 肝肿瘤;肿瘤浸润淋巴细胞;调节性淋巴细胞;免疫

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)02-0133-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.02.B012

Analysis of Treg Cells in Hepatocellular Carcinoma and Their Clinical Significance

WANG Hong-bo, GUO Cun-li, CHENG Wen, et al.

(The Third Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

Abstract: [Purpose] To investigate Treg cells in HCC tissue and non-tumor tissue and to evaluate the relationships between the changes of these cells and the prognosis of HCC patients. [Methods] Treg cells were isolated from HCC tissue and the corresponding non-tumor tissue and were detected by flow cytometric analysis. We analyzed the relationship between changes of the cells and the clinical data, also between changes of the cells and prognosis. [Results] Compared with the non-tumor tissue, TILs had the higher intensity of the CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺regulatory T cell's (Treg cells) infiltration compared with NILs. The intensity of Treg cells in patients stage III, IV ($7.7\% \pm 4.03\%$) was higher than that in patients stage I, II ($3.7\% \pm 1.6\%$)($P=0.037$). The prognosis was worse in high intensity of Treg cells group($\geq 6\%$) than that in low intensity of Treg cells group($<6\%$)($P=0.005$). [Conclusion] The ratio of Treg cells increases in tumor tissue of HCC and it correlates with patients' survival.

Subject words: hepatocellular neoplasms; tumor-infiltrating lymphocytes; regulatory T cells; immune

CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞(Treg 细胞)为 CD4⁺细胞簇中高表达 CD25 分子并且具有调节功能的一群细胞^[1]。其对于维持机体免疫稳态、防治自身免疫性疾病的发生、移植物的免疫耐受、肿瘤免疫、过敏反

应及微生物感染方面都有一定作用。Treg 细胞在维持机体外周免疫耐受方面起到关键的作用,作为对 CD4⁺细胞及 CD8⁺细胞的功能抑制细胞,Treg 细胞能够在一定程度上控制适应性免疫,阻止自身免疫疾病的发生。此外,它还能够抑制 B 细胞、树突状细胞、单核/巨噬细胞的功能。由上可知,Treg 细胞可以通过对自然免疫及适应性免疫的调节发挥作用^[2]。

通讯作者: 程文,主任,主任医师,博士;哈尔滨医科大学附属第三医院超声科,黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路 150 号(150081); E-mail: docguocunli@163.com

收稿日期: 2014-06-20; **修回日期:** 2014-09-08

因此,本课题着重探讨肝细胞癌患者肿瘤微环境中 Treg 细胞的变化规律,并在此基础上探讨肿瘤局部浸润 Treg 细胞与肝细胞癌预后的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

病例选自 2010 年 7 月至 2012 年 12 月哈尔滨医科大学附属第一医院及哈尔滨医科大学附属第三医院收治的临床确诊为肝细胞癌(HCC)患者 40 例,其中男性 33 例,女性 7 例,年龄 36~81 岁,平均(53±11)岁。收集的资料包括年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤数量、血清 AFP、GOT、GPT 水平,以及 HBV、HCV 感染情况(Table 1)。所有病例排除其他肝炎病毒感染及合并自身免疫性、酒精性肝病等,HCC 患者在入组前未经任何手术、微创及免疫治疗。

1.2 各项临床标准的确定

根治性手术切除:完整切除肿瘤,组织学检查切缘阴性,无术前肝门淋巴结侵犯或远处转移。

肝癌 TNM 分期:采用 AJCC/UICC 2002 年 TNM 分期标准。

术后随访:对手术后病例进行术后随访,术后第一年每 6 个月进行包括体格检查、血 AFP 变化水平、胸部 X 线检查、螺旋 CT 检查。其他检查如:腹部超声、MR 等取决于患者的状况而定。

1.3 主要试剂

CD3-ECD、CD4-PECy7 及相应的同型对照,购自 Beckman 公司。PerCP-CY5.5-CD25、FITC-Foxp3 及相应的同型对照,购自 eBioscience 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞分离

肿瘤浸润淋巴细胞的获取:肝脏组织来源于肝细胞癌手术标本,肝细胞癌术后肝脏组织分别取肿瘤组织及远离肿瘤 5cm 以上的组织。肝组织用含 2%FCS、1%EDTA 的 Hank's 液除去外周血,仔细剪碎、研磨,经 Percoll 分离液密度梯度离心,最后在 50%~70%密度层之间获得肝脏浸润淋巴细胞。距离肿瘤组织 3~5cm 取肿瘤周边组织作为对照,提取 NILs 细胞,淋巴细胞获取方法同肿瘤组织。

1.4.2 抗体及流式细胞仪检测

利用多色流式细胞仪分析:①EDTA 抗凝的静

脉血 2ml;②加入溶血素,室温暗处孵育 10min;③离心 500g,5min,弃上清加固定剂,室温暗处孵育 15min,离心 500g,5min,弃上清;④加适当的细胞表面染色试剂 5~10μl 于 Falcon 管中,混匀,室温暗处孵育 15min;⑤加破膜剂温暗处孵育 10min。⑥加 2~3ml PBS 洗液,离心 500g,5min,弃上清;⑦加入荧光标记的细胞内染色细胞因子抗体,混匀,室温暗处孵育 30min;⑧加 2~3ml 洗液,离心 500g,5min,弃上清,加入 500μl PBS 上机或加入 500μl 1% PFA 固定后再上机。

流式细胞仪检测数据的获取和处理:前向角散射光/侧向角散射光(FSC/SSC),圈出淋巴细胞;圈门(gate)到淋巴细胞群,圈出 CD3⁺细胞;圈门(gate)到淋巴细胞群,圈出 CD4⁺CD25⁺细胞;圈门(gate)到 CD4⁺CD25⁺细胞群,圈出 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺细胞。

1.5 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较,符合方差齐性者用单因素方差分析,方差不齐的数据用 Mann-Whitney *U* 非参数检验,相关性分析采用多元线性回归分析,生存分析应用 Kaplan-Meier 法。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝细胞癌患者肿瘤组织与非肿瘤组织中 Treg 淋巴细胞百分比

肿瘤组织中浸润淋巴细胞分为主要参与细胞免疫的 T 淋巴细胞(CD3⁺)和主要参与体液免疫的 B 淋巴细胞(CD20⁺)。而 T 淋巴细胞又分为辅助性 T

Table 1 Clinical data of HCC patients

Variables	$\bar{x} \pm s/n$
Age(years)	63±10.8
Gender(male/female)	19/11
HBsAg(+/-)	17/13
HcAg(+/-)	7/23
Disease history(chronic hepatitis/cirrhosis/fat liver/alcohol liver)	9/16/3/2
Tumor size (cm)(≤3.0/>3.0/multiple)	14/9/7
Number of tumors (single/double/multiple)	20/8/2
AFP(μg/L)(>400/400~200/≤200)	6/3/21
TNM stage (I / II / III / IV)	5/13/8/4
GOT/GPT (≤1.0/>1.0)	9/21

淋巴细胞(CD3⁺CD4⁺)和抑制性/杀伤性 T 淋巴细胞(CD3⁺CD8⁺)。在正常情况下,各群淋巴细胞的数目和相对比例都在一定的范围内才能维持机体的内环境免疫平衡。通过 FACS 检测 40 例肝细胞癌患者肿瘤组织与非肿瘤组织中 Treg 淋巴细胞百分比,结果显示,肝细胞癌患者肿瘤组织和非肿瘤组织相比,CD3⁺淋巴细胞:27.4%±15.4% vs 18.7%±8.0% ($P=0.029$);CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞 (Treg 细胞)(7.1%±4.0% vs 5.1%±3.3%) ($P=0.030$)(Figure 1、2)。以上结果表明,肝细胞癌患者肿瘤组织中具有免疫抑制作用的 Treg 细胞数量有所增加,两者相比较差异具有统计学意义。

2.2 肿瘤浸润淋巴细胞与不同临床病理特征的关系

TNM 分期中 I、II、III、IV 期患者组织内 Treg 的频率分别为 3.7%±1.6%、6.7%±3.7%、6.2%±3.7% 和 8.9%±4.2%。如果将 I、II 期患者定义为肿瘤早期,III、IV 期患者定义为进展期的话,那么进展期肿瘤局部的 Treg 细胞(7.7%±4.03%)明显高于肿瘤早期患者(3.7%±1.6%) ($P=0.037$) (Figure 3)。AFP、GOT、GPT 等临床指标不影响外周血或肿瘤组织局部 Treg 细胞的频率 (Table 2)。

2.3 肿瘤浸润 Treg 淋巴细胞与预后的关系

所有患者均随访 25 个月,将所有数据分为两组,低 Treg 细胞含量组(Treg 含量<6%)和高 Treg 细胞含量组(Treg 含量≥6%)。统计学结果显示,高 Treg 细胞含量组患者的预后明显差于低 Treg 细胞含量组($P=0.005$)(Figure 4)。

Table 2 The relationship between tumor infiltrating Treg and its clinical data

Factors	Unstandardized coefficients		Standardized coefficients (β)	t	P
	β	Std. Error			
(Constant)	6.797	6.897		0.985	0.334
WBC	-0.001	0.000	-0.462	-2.101	0.072
GOT	0.001	0.022	0.008	0.036	0.971
GPT	-0.005	0.031	-0.035	-0.167	0.868
Age	0.039	0.077	0.095	0.513	0.612
Stage	1.666	1.126	0.277	1.480	0.151

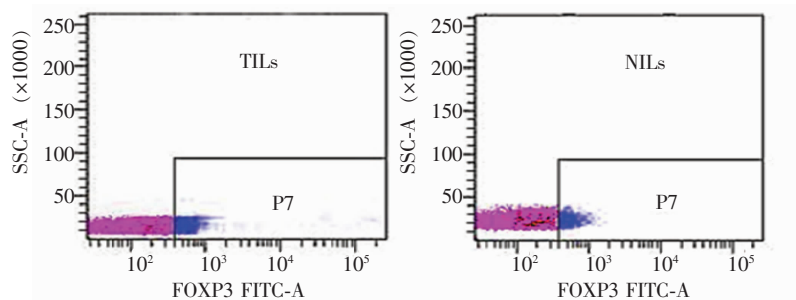


Figure 1 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells in FACS in non-tumor tissue and tumor tissue

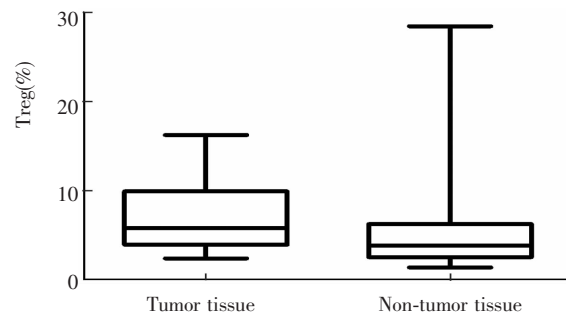


Figure 2 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells charts in tumor tissue and non-tumor tissue

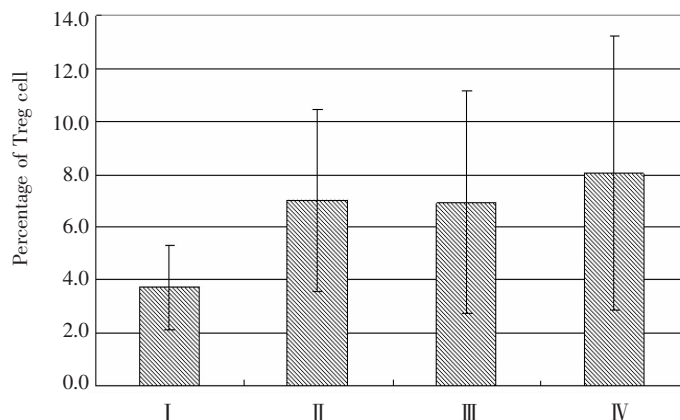
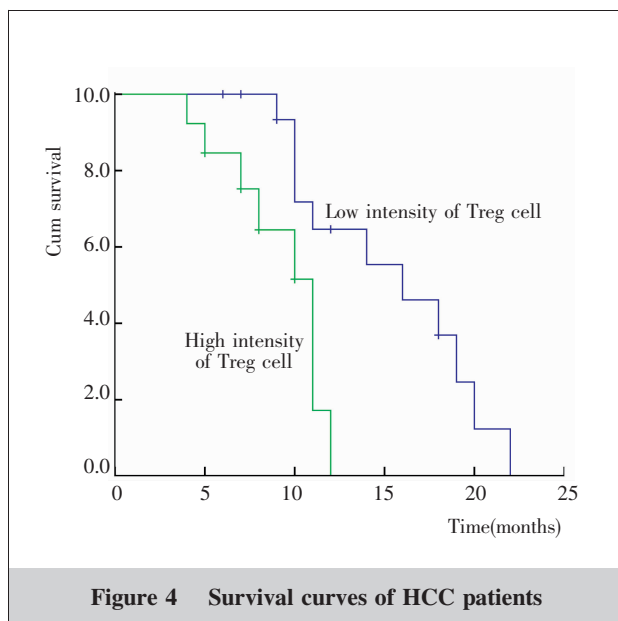


Figure 3 Percentage of Treg cells paraneoplastic in different TNM stages



3 讨论

与所有恶性肿瘤一样,肝细胞癌的发生、发展、转归不单取决于肿瘤本身的恶性程度,也取决于肿瘤的侵袭和宿主的抵抗互相作用。机体的免疫功能与患者预后密切相关。机体抗肿瘤免疫反应是一个复杂的过程,而针对肿瘤细胞免疫应答的产生需要免疫系统有效地识别、提呈肿瘤抗原,活化效应性淋巴细胞,从而有效地杀灭肿瘤细胞。从某种意义上说,肿瘤的发生是宿主本身所具有的抗肿瘤免疫机制失败的结果。

随着肿瘤微环境概念的提出,人们越来越认识到作为与肿瘤密不可分的局部微环境对肿瘤演进起着不容忽视的重要作用,微环境免疫细胞的组成和功能等特征在一定程度上反映了机体抗肿瘤反应的性质、强度和总体水平,肿瘤微环境中免疫细胞浸润的程度越高,患者的预后就越好^[3,4]。因此,肿瘤的微环境是保护和支肿瘤发生发展以及转移复发的必要结构与功能单元。

肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes, TIL)是指位于原发和继发肿瘤细胞周围的淋巴细胞,主要包括T淋巴细胞、B淋巴细胞、巨噬细胞、NK细胞等^[5-7]。TIL具有杀灭肿瘤细胞、降低转移潜能的作用,因其聚集到肿瘤局部而与肿瘤细胞密切接触,因此TIL又被认为是机体对肿瘤细胞识

别的直接途径。肿瘤组织中TIL数量和功能的变化能够在一定程度上反映机体抗肿瘤反应的强度和总体水平^[8-10]。

Treg细胞作为机体重要的免疫调节性淋巴细胞,能够抑制多种细胞的功能,包括CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞、NK细胞、NKT细胞、B细胞、树突状细胞、单核细胞/巨噬细胞。与肿瘤的免疫逃逸及患者的预后密切相关。本研究和其他科研小组都证实,在肝细胞癌肿瘤局部组织中,代表免疫抑制的Treg细胞存在数量、比例的增加^[11,12]。Treg细胞在肿瘤组织中的增多原因尚无统一定论,以往有研究报道肿瘤细胞及恶性腹水中巨噬细胞而非外周血中的单核细胞分泌大量趋化因子,可与Treg细胞表面的受体相结合,引起外周血的Treg细胞向肿瘤局部聚集^[13],这可能是肿瘤组织中Treg细胞数量增加的一个原因。

在以往的研究中表明,外周血Treg细胞含量升高,则肿瘤患者的预后较差。而TIL中Treg细胞的含量与肿瘤患者的预后少有报道。本研究结果表明,在肿瘤浸润淋巴细胞中,Treg细胞含量上升与患者疾病进展有关,高Treg细胞含量组患者的生存率明显低于低Treg细胞含量组。与以往的报道相一致^[14,15]。所以我们认为调节性T细胞可能是一个潜在的预后标志物。然而,有待于大样本的分析进一步证实。

上述研究表明,Foxp3⁺Treg细胞在肿瘤免疫的复杂多重机制中起到了免疫负性调节的作用,即通过促进效应性免疫细胞凋亡或抑制效应性免疫细胞的杀伤作用,使局部抗肿瘤免疫功能受损,导致肿瘤细胞凋亡水平降低,从而促进了肿瘤浸润、转移。如何利用分子生物学方法调控Treg细胞,消除CD4⁺CD25⁺Treg细胞的影响,在最大限度地放大治疗效果的同时,又不增加发生自身免疫性疾病的危险性,真正实现肿瘤的免疫治疗等问题还有待于深入研究。

我们在对不同TNM分期的肝细胞癌肿瘤微环境Treg细胞的相关分析中发现,TNM分期与肿瘤微环境中Treg细胞的频率无明显相关性,可能与本研究的实验样本数量有关。如果将I、II期患者定义为肿瘤早期;III、IV期患者定义为进展期的话,那么早期肿瘤局部的Treg细胞明显低于肿瘤进展期患者,表明随着肝细胞癌的进展,机体的免疫系统受抑制的状况越来越明显,随着肿瘤细胞增多,Treg细胞的数量和功能进一步增强,其具体机制有待于进一步

研究。总之可视为 T 调节细胞降低了机体对肿瘤细胞的免疫监视,从而可能在肿瘤的发展过程中发挥作用。因此,Treg 细胞的多少可能与肝细胞癌进展及不良预后相关。

参考文献:

- [1] Lim DG, Park YH, Kim SE, et al. Aurintricarboxylic acid promotes the conversion of naive CD4+CD25- T cells into Foxp3-expressing regulatory T cells[J]. *Int Immunol*, 2011, 23(9):583-592.
- [2] Ryba M, Hak L, Zorena K, et al. Regulatory T lymphocytes expressing L-selectin in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus [J]. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab*, 2010, 16(1): 12-16.
- [3] Aguilar-Cazares D, Meneses-Flores M, Prado-Garcia H, et al. Relationship of dendritic cell density, HMGB1 expression, and tumor-infiltrating lymphocytes in non-small cell lung carcinomas[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2014, 22(2): 105-113.
- [4] Pang YL, Zhang HG, Peng JR, et al. The immunosuppressive tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(6): 877-886.
- [5] Li YW, Qiu SJ, Fan J, et al. Tumor-infiltrating macrophages can predict favorable prognosis in hepatocellular carcinoma after resection[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135(3): 439-449.
- [6] Shen X, Li N, Li H, et al. Increased prevalence of regulatory T cells in the tumor microenvironment and its correlation with TNM stage[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(11): 1745-1754.
- [7] Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, et al. Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(4): 246-255.
- [8] Qiu SJ, Ye SL, Tang ZY. Immune and liver cancer metastasis and recurrence[A]. Tang ZY. The basis and clinical liver metastasis and recurrence[J]. 1st edition. Shanghai: Shanghai Science and Technology Education Press, 2003. 191-204. [邱双健, 叶胜龙, 汤钊猷. 肝脏免疫与肝癌转移复发[A]. 汤钊猷. 肝癌转移复发的基础与临床[M]. 第 1 版. 上海: 上海科技教育出版社, 2003. 191-204.]
- [9] Shi F, Shi M, Zeng Z, et al. PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8 T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients[J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(4): 887-896.
- [10] Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, et al. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity[J]. *Trends Immunol*, 2003, 24(11): 603-609.
- [11] Yang XH, 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(2): 254-262.
- [12] Unitt E, Rushbrook SM, Marshall A, et al. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells[J]. *Hepatology*, 2005, 41(4): 722-730.
- [13] Dagouassat M, Suffee N, Hlawaty H, et al. Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)/CCL2 secreted by hepatic myofibroblasts promotes migration and invasion of human hepatoma cells[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(5): 1095-1108.
- [14] 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.
- [15] Fu J, Xu D, Liu Z, et al. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7): 2328-2339.