

# 原发性肝癌患者CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>调节性T细胞及转化生长因子β<sub>1</sub>检测

郑盛, 宁珠 (云南省第三人民医院 消化内科, 昆明 650011)

**摘要:** 目的 探讨检测原发性肝癌患者外周血CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>调节性T细胞 (Treg) 及血清转化生长因子 (TGF)-β<sub>1</sub>的临床意义。方法 应用流式细胞学方法和酶联免疫吸附测定方法分别检测原发性肝癌患者32例、转移性肝癌患者25例、健康体检者30例的外周血Treg占总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例和血清TGF-β<sub>1</sub>浓度。结果 原发性肝癌、转移性肝癌患者外周血Treg占总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例与对照组比较均明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 原发性肝癌患者外周血Treg占总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例较转移性肝癌患者亦明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。原发性肝癌、转移性肝癌患者血清TGF-β<sub>1</sub>浓度与对照组比较均明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 原发性肝癌患者血清TGF-β<sub>1</sub>浓度较转移性肝癌患者亦明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。相关分析显示, 原发性肝癌患者外周血Treg占总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例与病理分期、血清TGF-β<sub>1</sub>浓度呈正相关 ( $r = 0.762$ 、 $r = 0.698$ ,  $P < 0.01$ ), 与Karnofsky功能状态 (KPS) 评分呈负相关 ( $r = -0.642$ ,  $P < 0.01$ )。结论 原发性肝癌患者外周血Treg比例明显升高, 且与血清TGF-β<sub>1</sub>浓度、病理分期和KPS评分具有一定的相关性。检测原发性肝癌患者外周血Treg占总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例可能有助于评估原发性肝癌患者的病情进展及判断其预后。

**关键词:** 肝肿瘤; T淋巴细胞; 转化生长因子β<sub>1</sub>

## Therapeutic effect of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and transforming growth factor beta-1 on patients with hepatocellular carcinoma

ZHENG Sheng, NING Zhu (Department of Gastroenterology, Yunnan Third People's Hospital, Kunming 650011, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the changes of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory cells (Treg) in peripheral blood and the serum levels of transforming growth factor beta-1 (TGF-β<sub>1</sub>) in patients with hepatocellular carcinoma. **Methods** The ratios of Treg in peripheral blood of 32 patients with hepatocellular carcinoma, 25 cases with metastatic liver cancer and 30 healthy controls, were determined by flow cytometry. Meanwhile, the serum levels of TGF-β<sub>1</sub> were detected by ELISA. **Results** The ratio of Treg in total CD4<sup>+</sup> T cells in peripheral blood [(9.61 ± 3.32)% vs (5.88 ± 1.16)%,  $P < 0.01$ ] and the serum levels of TGF-β<sub>1</sub> [(98.10 ± 20.41) ng/L vs (9.78 ± 2.54) ng/L,  $P < 0.01$ ] of patients with hepatocellular carcinoma were significantly higher than those in healthy controls. Meanwhile, the ratio of Treg in total CD4<sup>+</sup> T cells in peripheral blood [(9.61 ± 3.32)% vs (7.56 ± 2.17)%,  $P < 0.05$ ] and the serum levels of TGF-β<sub>1</sub> [(98.10 ± 20.41) ng/L vs (29.33 ± 6.90) ng/L,  $P < 0.01$ ] of patients with hepatocellular carcinoma was higher compared with those in metastatic liver cancer ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The correlation indicated that the ratio of Treg in total CD4<sup>+</sup> T cells in peripheral blood were positively related with TGF-β<sub>1</sub> levels and tumor clinical stages ( $r = 0.698$  and  $0.762$ ,  $P < 0.01$ ), but negatively correlated with Karnofsky performance status score (KPS) ( $r = -0.642$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusions** The ratio of Treg in total CD4<sup>+</sup> T cells in peripheral blood from hepatocellular carcinoma is higher and correlated with TGF-β<sub>1</sub> level, tumor clinical stages and KPS. It might be helpful to determine the prognosis of

hepatocellular carcinoma by detecting the ratio of Treg in total CD4<sup>+</sup> T cells in peripheral blood.

**Key words:** Liver neoplasms; T-Lymphocytes; Transforming growth factor beta 1

原发性肝癌的发生、发展与免疫功能密切相关,原发性肝癌患者的免疫功能处于抑制状态,寻找抑制原发性肝癌患者的免疫应答因素对肿瘤的免疫治疗具有重要意义<sup>[1]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)是具有免疫抑制功能的T细胞亚群,具有免疫调节作用。近年来,Treg在恶性肿瘤的发生、发展及预后中的作用更是倍受关注,成为免疫学和肿瘤学领域研究的热点<sup>[2]</sup>。本研究通过检测原发性肝癌患者外周血Treg占总CD4<sup>+</sup>T细胞的比例及血清转化生长因子(TGF)- $\beta_1$ 浓度,探讨Treg在原发性肝癌发病中的作用及其与预后的关系。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院2010年6月至2011年6月经肝组织活检或手术病理证实的原发性肝癌住院患者32例为原发性肝癌组,其中男性21例,女性11例,年龄30~82岁,平均年龄( $53.1 \pm 5.8$ )岁,其中23例并发乙型肝炎病毒感染,肝癌TNM分期采用国际抗癌协会标准(2002年),其中I/II期11例,III期15例,IV期6例。采用Karnofsky法评定患者功能状态,32例患者根据KPS评分分别为10分2例,20分3例,30分2例,40分6例,50分4例,60分5例,70分5例,80分2例,90分1例,100分2例。选择同期转移性肝癌患者25例为转移性肝癌组,其中男性13例,女性12例,年龄40~77岁,平均年龄( $55.8 \pm 4.0$ )岁。转移性肝癌组患者原发肿瘤均为消化道肿瘤,其中食管癌5例,胃癌8例,结肠癌12例。32例原发性肝癌组及25例转移性肝癌组测定相关指标前,均未接受过任何抗肿瘤治疗及免疫治疗。选择同期健康体检者30例作为对照组,其中男性17例,女性13例,年龄35~80岁,平均年龄( $50.8 \pm 6.2$ )岁。3组性别、年龄差异均无统计学意义( $F = 2.162, 3.338; P < 0.01$ ),具有可比性。

## 1.2 方法

1.2.1 Treg细胞检测 应用荧光直接标记法及流式

细胞仪检测外周血Treg细胞水平。Treg百分值为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞占总CD4<sup>+</sup>T细胞的比例。取不同荧光标记的单克隆抗体各20  $\mu$ l,分别加入100  $\mu$ l乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝的外周血,漩涡混匀后室温下避光孵育15分钟,加入红细胞裂解液(1 ml细胞压积加入3~5 ml裂解液),轻轻吹打混匀,800~1000 r/min离心5~8分钟,弃去上层红色清液,收集沉淀部分,生理盐水洗涤2次,生理盐水悬浮。采用流式细胞仪进行检测,Cellquest软件分析数据,以CD4荧光标记设门区分T细胞及正常细胞群体,分析其中CD25阳性、CD127阴性细胞占CD4细胞的比例,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>LOW</sup>细胞为调节性T细胞。荧光素标记的鼠抗人CD4<sup>+</sup>-FITC抗体、CD25-PECY5抗体、CD127-PE抗体及各自的同型对照IgG荧光抗体购自美国BECKMAN公司。

1.2.2 TGF- $\beta_1$ 检测 采用酶联免疫吸附测定方法测定血清TGF- $\beta_1$ 浓度,试剂盒购自奥地利Bender Medsystems公司。

1.3 统计学处理 采用SPSS 15.0统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以例数或百分数进行描述,多个均数间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 $q$ 检验,两组间比较采用 $t$ 检验,两个变量间的关系采用Spearman或者Pearson直线相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 3组患者外周血Treg占总CD4<sup>+</sup>T细胞的比例及血清TGF- $\beta_1$ 浓度比较 原发性肝癌组、转移性肝癌组外周血Treg占总CD4<sup>+</sup>T细胞的比例与对照组比较,均明显升高, $P < 0.01$ ,差异有显著统计学意义。原发性肝癌组外周血Treg占总CD4<sup>+</sup>T细胞的比例与转移性肝癌组比较,亦明显升高, $P < 0.05$ ,差异有统计学意义;原发性肝癌组、转移性肝癌组血清TGF- $\beta_1$ 浓度与对照组比较,均明显升高, $P < 0.01$ ,差异有显著统计学意义;原发性肝癌组血清TGF- $\beta_1$ 浓度与转移性肝癌组比较,亦明显升

高,  $P < 0.01$ , 差异有显著统计学意义, 见表1。

2.2 原发性肝癌组外周血Treg占总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例与病理分期、血清TGF- $\beta_1$ 浓度及KPS评分的相关性分析 Spearman相关分析显示, 原发性肝癌组外周血Treg占总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例与病理分期呈正相关 ( $r = 0.762$ ,  $P < 0.01$ )。Pearson直线相关分析显示, 原发性肝癌组外周血Treg占总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例与血清TGF- $\beta_1$ 浓度呈正相关 ( $r = 0.698$ ,  $P < 0.01$ ), 其外周血Treg占总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例与KPS评分呈负相关 ( $r = -0.642$ ,  $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

Treg为CD4<sup>+</sup> T细胞的新亚群, 占健康人外周血CD4<sup>+</sup> T细胞的5%~10%。Treg细胞具有免疫负向调控作用, 在维持机体自身免疫耐受过程及肿瘤的发生、发展中发挥重要作用。当机体内Treg细胞数量增多和(或)功能增强时, 其抑制免疫的功能也随之增强, 除抑制CD4<sup>+</sup>及CD8<sup>+</sup> T细胞外, 还抑制自然杀伤细胞、B细胞以及其他免疫细胞的功能, 使机体处于高度免疫耐受状态, 最终肿瘤细胞能够逃逸免疫监视系统, 继而发生、发展, 形成肿瘤<sup>[3,4]</sup>。

原发性肝癌患者外周血中Treg水平目前报道不一。早年研究认为, 原发性肝癌患者外周血中Treg占总淋巴细胞的比例与对照组比较差异无统计学意义<sup>[5]</sup>。Thakur等<sup>[6]</sup>报道, 原发性肝癌患者外周血中Treg水平明显高于健康献血者。但近年来国内报道, 原发性肝癌患者外周血中Treg术前比例明显低于健康献血者, 而术后比例则明显高于健康献血者<sup>[7]</sup>。为剔除年龄、性别及肿瘤类型的影响, 本研究比较了原发性肝癌、转移性肝癌及健康体检者外周血中Treg占总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例。结果显示, 原发性肝癌组和转移性肝癌组外周血Treg占总

CD4<sup>+</sup> T细胞的比例与对照组比较, 均明显升高,  $P < 0.01$ , 差异有显著统计学意义; 原发性肝癌组外周血Treg占总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例与转移性肝癌组比较, 亦明显升高,  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义。目前, 肝癌临床分期及患者行为状态成为肿瘤明确的预后因素, 故本研究通过直线相关分析, 进一步分析了外周血Treg比例与原发性肝癌临床分期及KPS评分之间的相关性。结果表明, 原发性肝癌组外周血Treg占总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例与病理分期呈正相关, 与KPS评分呈负相关。本研究结果一方面提示了肝癌患者Treg数目增加是肿瘤免疫抑制的机制之一, 亦可能是导致机体免疫力下降的原因之一; 另一方面, 检测原发性肝癌组外周血Treg占总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例具有判断预后的临床意义。本研究结果还显示, 原发性肝癌组外周血Treg占总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例高于转移性肝癌组, 考虑与我国原发性肝癌患者绝大多数与肝炎病毒感染相关。

TGF- $\beta_1$ 是一种多功能的细胞因子, 目前已知TGF- $\beta_1$ 对肿瘤细胞的生长具有促进和抑制双重生物学效应。在肿瘤发生早期, TGF- $\beta_1$ 通过已知细胞生长周期G1→S期来抑制正常细胞生长和肿瘤细胞发生。但随着肿瘤的发展, 肿瘤对TGF- $\beta_1$ 介导的生长抑制效应不再敏感, TGF- $\beta_1$ 转变为肿瘤生长刺激因子, 对促进自身的生长、浸润和转移具有重要意义<sup>[8]</sup>。TGF- $\beta_1$ 还是很强的免疫抑制因子, 其能影响参与天然免疫和获得性免疫细胞的增殖、活化和分化, 抑制免疫调节性细胞因子的产生。因此, TGF- $\beta_1$ 与肝癌的发生、发展及复发有密切的联系<sup>[9]</sup>。目前研究证实, 血清TGF- $\beta_1$ 与原发性肝癌的临床分期呈正相关, TGF- $\beta_1$ 升高有助于原发性肝癌诊断及预后判断; 通过下调TGF- $\beta_1$

表 1 3组患者外周血Treg和血清TGF- $\beta_1$ 浓度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

	Treg (%)	TGF- $\beta_1$ (ng/L)
原发性肝癌组 (n = 32)	9.61 $\pm$ 3.32	98.10 $\pm$ 20.41
转移性肝癌组 (n = 25)	7.56 $\pm$ 2.17	29.33 $\pm$ 6.90
对照组 (n = 30)	5.88 $\pm$ 1.16	9.78 $\pm$ 2.54
F	16.97	23.07
P	< 0.001	< 0.001

受体表达或应用TGF- $\beta_1$ 抑制剂,抑制TGF- $\beta$ 通路,可缩小肿瘤,减少门静脉侵犯及肝内转移,从而改善原发性肝癌患者的预后<sup>[10-12]</sup>。TGF- $\beta_1$ 能够促进Treg细胞体外增殖,且Treg细胞自分泌TGF- $\beta_1$ ,在诊断原发性肝癌的血清标记物中,血清TGF- $\beta_1$ 浓度较血甲胎蛋白(AFP)浓度有更好的敏感性<sup>[13]</sup>。本研究检测了研究对象中TGF- $\beta_1$ 浓度,结果显示原发性肝癌组、转移性肝癌组与对照组比较,血清TGF- $\beta_1$ 浓度均明显升高,差异有统计学意义,提示TGF- $\beta_1$ 有促进肝癌发生、发展的作用。原发性肝癌组与转移性肝癌组比较,血清TGF- $\beta_1$ 浓度明显升高,符合我国绝大多数原发性肝癌患者存在感染乙型肝炎病毒的现象<sup>[14]</sup>。同时,笔者通过直线相关分析,进一步分析了外周血Treg比例与血清TGF- $\beta_1$ 浓度的相互关系。结果表明,原发性肝癌患者外周血Treg占总CD4<sup>+</sup>T细胞的比例与血清TGF- $\beta_1$ 浓度呈正相关,进一步证实了检测原发性肝癌患者外周血Treg占总CD4<sup>+</sup>T细胞的比例可反映肿瘤的进展。

肝癌患者预后差,寻找预测肝癌预后的生物学指标具有重要的临床意义<sup>[15]</sup>。目前,对预测肝癌预后的免疫性指标研究较少<sup>[16]</sup>。本研究结果显示,随着肝癌的进展,外周血Treg占总CD4<sup>+</sup>T细胞的比例有增高趋势,Treg与患者的KPS评分呈负相关,因此,动态检测原发性肝癌患者Treg的表达有助于判断病情和评估预后。此外由于本研究样本量较小,尽管原发性肝癌患者外周血Treg占总CD4<sup>+</sup>T细胞的比例较转移性肝癌患者升高,但尚不能认为外周血中Treg的检测可用于两者鉴别。

#### 参考文献

- [1] Hoshida Y. Molecular signatures and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Minerva Gastroenterol Dietol*,2011,57:311-322.
- [2] Matsuda Y, Ichida T, Fukumoto M. Hepatocellular carcinoma and liver transplantation: clinical perspective on molecular targeted strategies[J]. *Med Mol Morphol*,2011,44:117-124.
- [3] Liu H, Leung BP. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in health and disease[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*,2006,33:519-524.
- [4] Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, et al. Cutting edge: direct suppression of b cells by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells[J]. *J Immunol*,2005,175:4180-4183.
- [5] Unit E, Rushbrook SM, Marshall A, et al. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells[J]. *Hepatology*,2005,41:722-730.
- [6] Thakur S, Single A, Chawla Y, et al. Expansion of peripheral and intratumoral regulatory T cells in hepatocellular carcinoma: a case-control study[J]. *Indian Pathol Microbiol*,2011,54:448-453.
- [7] Chen T, Song D, Min Z. Perioperative dynamic alterations in peripheral regulatory T and B cells in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *J Transl Med*,2012,10:14.
- [8] Bollard CM, Rossing C, Calonge MJ, et al. Adapting a transforming growth factor beta related tumor protection strategy to enhance antitumor immunity[J]. *Blood*,2002,99:3179-3187.
- [9] Dooley S, Weng H, Mertens PR, et al. Hypotheses on the role of transforming growth factor-beta in the onset and progression of hepatocellular carcinoma[J]. *Dig Dis*,2009,27:93-101.
- [10] Mamiya T, Yamazaki K, Masugi Y, et al. Reduced transforming growth factor-beta receptor II expression in hepatocellular carcinoma correlates with intrahepatic metastasis[J]. *Lab Invest*,2010,90:1339-1345.
- [11] Giannelli G, Mazzocca A, Fransvea E, et al. Inhibiting TGF- $\beta$  signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *Biochim Biophys Acta*,2011,1815:214-223.
- [12] Lu Y, Wu LQ, Li CS, et al. Expression of transforming growth factors in hepatocellular carcinoma and its relations with clinicopathological parameters and prognosis[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*,2008,7:174-178.
- [13] Hung YJ, Lin ZH, Cheng TI, et al. Serum midkine as a prognostic biomarker for patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Clin Pathol*,2011,136:594-603.
- [14] 甘雨. 青少年原发性肝癌与乙型及丙型肝炎病毒感染的关系分析[J]. *中国全科医学*,2010,15:170-173.
- [15] 聂庆东, 黄鹤, 李艳君. 血清AFP联合GP73在原发性肝癌的诊断中的意义[J]. *中国肝脏病杂志(电子版)*,2011,3:22-25.
- [16] 陈若蝉, 黄燕, 周蓉蓉, 等. 高迁徙率族蛋白B1和糖基化终产物受体与肝癌发生发展的关系[J]. *中国肝脏病杂志(电子版)*,2011,3:54-59.

收稿日期: 2012-08-08