

肝细胞癌患者血清Tim-3水平及其与疾病分期的相关性分析

王林萍¹, 刘宏峰², 苏春霞³, 赵培庆² (1. 淄博市中心医院 消化内科, 山东 淄博 255036; 2. 淄博市中心医院 检验科, 山东 淄博 255036; 3. 淄博市中心医院 健康体检中心, 山东 淄博 255036)

摘要: **目的** 探讨肝细胞癌患者血清中增高的T细胞免疫球蛋白域黏蛋白域蛋白3 (T cell immunoglobulin and mucin domain-3, Tim-3) 水平及其与肿瘤分期和甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP) 的关系。**方法** 应用ELISA检测2014年2月至2014年10月淄博市中心医院收治的46例肝细胞癌患者血清Tim-3水平并分析其与肿瘤分期、AFP的相关性。**结果** 肝细胞癌患者血清中Tim-3水平较正常人显著升高, 其水平与肿瘤分期相关, 在III期及IV期患者中的表达量显著高于I期及II期患者, 且与AFP水平呈正相关, 与碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP)、谷氨酰胺转氨酶 (glutamine transpeptidase, GGT) 等指标呈正相关趋势, 而与AST和ALT无相关性。**结论** Tim-3可能参与肝细胞癌患者疾病的发生发展进程, 可作为肝细胞癌早期诊断与靶向治疗的重要因子。

关键词: 肝细胞癌; Tim-3; 肿瘤分期; 甲胎蛋白

Analysis of Tim-3 serum levels in patients with hepatocellular carcinoma and its correlation with disease stages

WANG Lin-ping¹, LIU Hong-feng², SU Chun-xia³, ZHAO Pei-qing² (1. Department of Gastroenterology, Zibo Central Hospital, Zibo 255036, Shandong Province, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Zibo Central Hospital, Zibo 255036, Shandong Province, China; 3. Department of Physical Examination Center, Zibo Central Hospital, Zibo 255036, Shandong Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the serum levels of Tim-3 and its correlation with tumor stages and AFP in patients with hepatocellular carcinoma. **Methods** ELISA was used to detect the serum levels of Tim-3 in 46 cases with hepatocellular carcinoma from February 2014 to October 2014 in Zibo Central Hospital and the relationship between Tim-3 and the tumor stages or AFP levels was analyzed. **Results** The serum levels of Tim-3 in patients with hepatocellular carcinoma were significantly higher than normal, the relationship between Tim-3 and AFP was positively correlated, and the levels of Tim-3 were more higher in stages III and IV than those of stages I and II. Moreover, the AKP and GGT levels were weakly positive correlated with Tim-3, whereas there was no correlations between Tim-3 and AST or ALT. **Conclusions** Tim-3 may be involved in the process in patients with hepatocellular carcinoma. It may be as an early diagnosis marker and a targeted point in the treatment of hepatocellular carcinoma.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Tim-3; TNM; AFP

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是影响世界居民的主要恶性肿瘤之一, 在全球其死亡率位居肿瘤所致死亡的第3位, 在我国则位居肿瘤总病死率的第2位^[1]。我国是肝癌高发地区, 约占世界新发病例的55%, 其中80%~90%为肝细胞癌^[2]。外科手术切除及肝脏移植是仅有的可以治愈肝细胞

癌的手段, 但仅仅针对早期且无转移的病例; 目前为止, 美国FDA仅批准多吉美 (Sorafenib) 用于治疗有远处转移不能手术的患者, 但其对改善患者生存期无明显影响^[3]。因此, 阐明肝细胞癌确切致病机制及发现潜在治疗靶点迫在眉睫。

Tim-3属于T细胞免疫球蛋白域黏蛋白域蛋白 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain protein, Tim) 基因家族, 于2002年首次发现并被报导, 其专向表达于Th1细胞, 主要功能是通过负

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2015.04.012

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (ZR2014HM042、ZR2015HM031)

通讯作者: 刘宏峰 Email: zbszyjyjk@163.com

向调控Th1细胞从而参与免疫应答反应,并通过Tim-1/galectin-9途径诱导免疫耐受的产生^[4,5]。最近研究发现, Tim-3可以通过调控肿瘤相关巨噬细胞(tumour-associated macrophages, TAMs)功能促进肝细胞癌的发生发展^[6],提示其可能是肝细胞肝癌发生过程中重要的靶点分子。但HCC患者血清中Tim-3表达情况如何,其水平与肿瘤分期及其他临床指标是否相关,至今尚未见报导。本研究旨在通过临床标本检测及临床指标分析,初步阐明HCC患者血清中Tim-3的分泌情况及其参与疾病发生发展的可能机制。

1 资料与方法

1.1 病例标本的收集 收集2014年2月至2014年10期间淄博市中心医院消化内科及肿瘤科肝细胞癌患者外周血血清标本46例,其中I、II期29例,III、IV期17例;患者平均年龄为(57 ± 26)岁,其中男35例,女11例;同时收集体检中心健康体检正常对照标本40例。外周血抽取待其凝固后4000 r/min离心分离血清备用。

1.2 仪器设备 酶标仪为美国Thermofisher公司产品, Tim-3 ELISA试剂盒购自上海瓦兰生物科技有限公司,相关生化检测试剂购北京自利德曼公司,生化分析仪购自日立公司,AFP检测试剂盒及化学发光分析仪均购自德国西门子医学诊断有限公司。

1.3 患者血清中Tim-3水平及临床指标的检测 ELISA法检测患者血清中Tim-3水平,每孔加入待测血清标本0.05 ml,并设阳性对照及阴性对照各2孔,空白对照1孔,同时根据说明书绘制标准曲线。操作完全按说明书进行,最后用酶标仪读数,读取各孔吸光度(A)值。同时,使用化学发光法检测AFP浓度及速率法检测AKP、GGT、AST、ALT等生化指标。

1.4 统计学处理 本研究采用Graphpad Prism 5.0统计

作图软件(GraphPad Software Inc., 美国)进行统计分析,数据采用t检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义;两组之间相关性分析采用Spearman's rank分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝细胞癌患者外周血血清中Tim-3分泌量明显上升 如图1-A所示,肝细胞癌患者外周血血清中Tim-3分泌量明显上升,与正常对照相比差异有统计学意义($r^2 = 0.0918$, $P = 0.0046$);同时患者按TNM分期分为两组,其中A组包括I、II期患者共29例,B组包括III、IV期患者共17例。结果如图1-B所示,A组Tim-3分泌量显著低于B组,差异有统计学意义($r^2 = 0.0945$, $P = 0.0377$),高度提示Tim-3可能参与了肝细胞癌的转移与侵袭过程。

2.2 肝细胞癌患者外周血血清中Tim-3水平与AFP等临床指标相关性分析 Tim-3分泌水平与AFP的相关性结果如图2-A所示, Tim-3与AFP呈显著正相关,结果有统计学意义($r = 0.4648$, $P = 0.0011$);如图2-B、2-C所示, Tim-3与AKP、GGT之间有正相关趋势($r = 0.2778$, $P = 0.0615$; $r = 0.2487$, $P = 0.0956$),但与ALT、AST之间无明显相关性($r = 0.1022$, $P = 0.5417$; $r = 0.1138$, $P = 0.6374$)。大量文献表明,AFP与肝细胞癌发生发展密切相关^[7],该结果进一步提示Tim-3可能参与了肝细胞癌的发生发展。

3 讨论

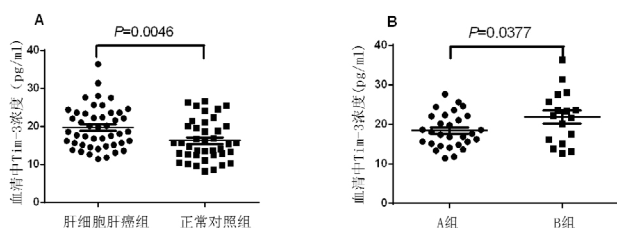


图1 肝细胞癌组与正常对照之间Tim-3分泌差异情况

注: A: 与正常对照相比,血清中Tim-3在肝细胞癌患者中分泌上调($R^2 = 0.0918$); B: Tim-3在肝细胞癌患者A组(I、II期)与B组(III、IV期)血清中分泌差异情况($R^2 = 0.0945$)

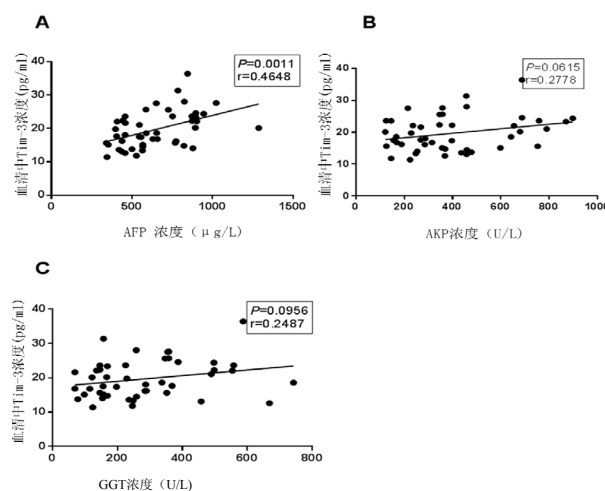


图2 血清中Tim-3与AFP、AKP及GGT相关性分析

注: A: 血清中Tim-3水平与AFP之间呈明显正相关; B: 血清中Tim-3水平与AKP之间呈正相关; C: 血清中Tim-3水平与GGT之间呈正相关

Tim家族是与许多疾病相关的一个新基因家族。Tim-3是Tim家族成员之一,主要表达在巨噬细胞中,是重要的T细胞介导免疫应答负调控分子^[8,9],在慢性病毒感染过程中阻断Tim-3可以使T细胞功能增强^[10]。近期研究发现, Tim-3在许多肿瘤患者中功能异常^[11], 阻断Tim-3可以增强肝细胞癌患者T细胞介导的肿瘤免疫功能^[12]。但目前为止, 肝细胞癌患者血清中Tim-3表达如何、其与肿瘤疾病进程有何关系等相关问题还不是十分清楚。

本实验发现肝细胞癌患者外周血血清中Tim-3表达量显著增高,提示其可能参与了肝细胞癌的疾病进程。同时还发现在有血管侵犯与远处转移组(TNM III~IV期),其Tim-3的表达量与TNM I~II期相比明显增高,提示Tim-3可能参与了肝细胞癌的转移与侵袭过程。近期有学者发现肝细胞癌组织巨噬细胞中Tim-3表达上调,其可能机制是肿瘤微环境中TGF- β 促进了Tim-3的表达,并最终导致巨噬细胞由M1向M2转变^[6],提示患者组织中增高的Tim-3可能是疾病进程恶化的一种表现,这也与本研究的结果相吻合。AFP是肝细胞癌最特异的肿瘤抗原,与肿瘤的发生发展及预后密切相关^[13]。本研究发现,患者血清中表达上调的Tim-3与AFP呈明显正相关性,提示Tim-3可以作为一种新型肿瘤标志物,与AFP一起在肝细胞癌患者的诊断与预后中发挥重要作用。AKP和GGT也是两种重要的癌性酶,与肝细胞癌的肿瘤大小、预后密切相关^[14],本研究结果也进一步验证了传统诊断指标和新型免疫分子Tim-3与HCC疾病进程存在密切相关性。

全世界每年大约有50万人死于肝癌^[15],由于疾病进程隐匿,发现时即处于中晚期,手术效果不理想。肝移植是目前治疗肝细胞癌最佳手段之一,由于肝源的极度缺乏及手术后的高复发率,移植率及效果大打折扣,且仅适用于早期肝癌的治疗。肝细胞肝癌肿瘤组织中表达上调的Tim-3可促使M2样的巨噬细胞活化增殖,最终导致肿瘤免疫的抑制,使疾病迅速恶化^[16]。本研究结果也提示,HCC患者血清中Tim-3表达显著上升;结合国内外学者研究, Tim-3可成为肝细胞癌基因治疗的一个重要靶点,也将成为HCC早期分子诊断与后期靶向治疗的重要分子。

参考文献

- [1] 付艳,邢卉春.原发性肝癌的流行状况及危险因素分析[J/CD].中国肝脏病杂志(电子版),2014,6:87-90.
- [2] Zhao W, Wang L, Han H, et al. 1B50-1, a mAb raised against recurrent tumor cells, targets liver tumor-initiating cells by binding to the calcium channel $\alpha 2\delta 1$ subunit[J]. Cancer Cell,2013,23:541-556.
- [3] Kane RC, Farrell AT, Madabushi R, et al. Sorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma[J]. Oncologist,2009,14:95-100.
- [4] Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease[J]. Nature,2002,415:536-541.
- [5] Zhu C, Anderson AC, Schubart A, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity[J]. Nat Immunol,2005,6:1245-1252.
- [6] Yan W, Liu X, Ma H, et al. Tim-3 fosters HCC development by enhancing TGF- β -mediated alternative activation of macrophages[J]. Gut,2015,64:1593-1604.
- [7] 徐飞,刘颖,胡艳玲,等. 甲胎蛋白异质体对诊断肝细胞癌的相关价值研究[J/CD].中国肝脏病杂志(电子版),2014,6:44-46.
- [8] Sabatos CA, Chakravarti S, Cha E, et al. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance[J]. Nat Immunol,2003,4:1102-1110.
- [9] Sanchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance[J]. Nat Immunol,2003,4:1093-1101.
- [10] Jin HT, Anderson AC, Tan WG, et al. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2010,107:14733-14738.
- [11] Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, et al. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8⁺ T cell dysfunction in melanoma patients[J]. J Exp Med,2010,207:2175-2186.
- [12] Li H, Wu K, Tao K, et al. Tim-3/galectin-9 signaling pathway mediates T-cell dysfunction and predicts poor prognosis in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology,2012,56:1342-1351.
- [13] Tahtouh R, Azzi AS, Alaaeddine N, et al. Telomerase Inhibition Decreases Alpha-Fetoprotein Expression and Secretion by Hepatocellular Carcinoma Cell Lines: In Vitro and In Vivo Study[J]. PLoS One,2015,10:e0119512.
- [14] Xu XS, Wan Y, Song SD, et al. Model based on gamma-glutamyltransferase and alkaline phosphatase for hepatocellular carcinoma prognosis[J]. World J Gastroenterol,2014,20:10944-10952.
- [15] Schulze K, Imbeaud S, Letouze E, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets[J]. Nat Genet,2015,47:505-511.
- [16] Uchida Y, Ke B, Freitas MC, et al. T-cell immunoglobulin mucin-3 determines severity of liver ischemia/reperfusion injury in mice in a TLR4-dependent manner[J]. Gastroenterology,2010,139:2195-2206.

收稿日期: 2015-04-16