

外周血调节性T细胞及细胞因子水平变化与肝癌肝移植术后肿瘤早期复发的相关性

张海涛, 张振, 孙力波, 张其坤 (首都医科大学附属北京佑安医院 肝胆外科暨肝移植中心, 北京 100069)

摘要: 目的 探讨外周血调节性T细胞及细胞因子水平变化与肝癌肝移植术后肿瘤复发的相关性。方法 采用回顾性研究, 以2013年4月至2017年1月在北京医科大学附属北京佑安医院行肝移植的晚期肝癌患者98例为研究对象, 所有患者均采用经典式原位肝移植术, 监测术后肿瘤复发情况, 同时进行外周血调节性T细胞及细胞因子(IL-2、IL-10、IL-12和IFN- γ)水平的检测, 并进行预后随访。结果 98例患者均顺利完成肝移植, 术后半年内肿瘤复发18例。复发组术后外周血CD39⁺含量为(7.32 ± 3.38)%, 显著低于未复发组的(16.52 ± 3.45)% ($t = 8.287, P < 0.001$)。复发组患者血清IL-2、IL-12与IFN- γ 含量显著低于未复发组, IL-10显著高于未复发组, 差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。多因素Logistic分析显示外周血CD39⁺含量、IFN- γ 和IL-10是影响肿瘤复发的主要因素(OR 值分别为2.216、2.062、1.022, P 值分别为0.022、0.020、0.003)。复发组的病死率为16.7% (3/18), 显著高于未复发组的2.5% (2/80), 差异有统计学意义($\chi^2 = 6.114, P = 0.003$)。结论 晚期肝癌肝移植术后肿瘤早期复发较常见, 多伴有外周血调节性T细胞及细胞因子水平表达异常, 也是导致肿瘤复发的危险因素, 不利于患者的预后改善。

关键词: 肝癌; 肝移植; 肿瘤复发; 调节性T细胞; 细胞因子

Relationship between peripheral blood regulatory T cells, cytokine levels and tumor recurrence after liver transplantation in hepatocellular carcinoma

ZHANG Hai-tao, ZHANG Zhen, SUN Li-bo, ZHANG Qi-kun (Department of General Surgery Center, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between peripheral blood regulatory T cells, cytokine levels and tumor recurrence after liver transplantation in hepatocellular carcinoma. **Methods** Total of 98 cases with liver cancer in Beijing Youan Hospital, Capital Medical University from April 2013 to January 2017 were selected as research objects, and retrospective study was applied. All patients were treated with modified piggyback liver transplantation, the postoperative tumor recurrence were recorded, while the levels of peripheral blood regulatory T cells and cytokines of IL-2, IL-10, IL-12 and IFN- γ were detected, and the prognosis were followed up. **Results** All patients were successfully underwent liver transplantation, and 18 patients occurred tumor recurrence after operation. The content of CD39⁺ in peripheral blood was (7.32 ± 3.38)% in recurrence group, which was significantly lower than that in non-recurrence group [(16.52 ± 3.45)%, $t = 8.287, P < 0.001$]. The serum levels of IL-2, IL-12 and IFN- γ of patients in recurrence group were significantly lower than those in non-recurrence group, while the serum levels of IL-10 was significantly higher than that in non-recurrence group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Multivariate Logistic analysis showed that peripheral blood CD39⁺, IFN- γ and IL-10 were the main factors affecting tumor recurrence ($OR = 2.216, 2.062, 1.022; P = 0.022, 0.020, 0.003$). The mortality rate in the recurrent group was higher than that in the non-recurrent group (16.7% vs 2.5%), the difference was statistically significant ($\chi^2 = 6.114, P = 0.003$). **Conclusions** The tumor recurrence after liver transplantation in hepatocellular carcinoma was common and accompanied by abnormal expression of peripheral blood regulatory T cells and cytokines, which were also the risk factors for tumor recurrence and were conducive to the improvement of patients prognosis.

Key words: Liver cancer; Liver transplantation; Tumor recurrence; Regulatory T cells; Cytokines

手术治疗是肝癌患者长期存活唯一希望,但在我国大多数肝癌患者确诊时已属于中晚期,失去了根治性手术切除的机会^[1,2]。随着医学的进步,肝移植在肝癌治疗中的地位已经得到公认,特别是免疫抑制剂的广泛使用,极大地提高了肝移植患者的生存率及长期存活率^[3,4],但晚期肝癌肝移植术后肿瘤早期(半年内)复发较常见,影响了患者的生存质量^[5]。当前研究表明肿瘤复发是由多种细胞因子和免疫细胞共同参与的复杂过程,Th1/Th2比例的失衡在肿瘤复发中发挥着重要的作用。同时由于肿瘤复发缺乏有效的治疗,目前的研究仍应以肿瘤复发的危险因素识别和预防为主^[6,7]。目前认为,调节性T细胞(Treg)通过分泌抑制性细胞因子进入肿瘤细胞逃避机体的免疫监视^[8],也可直接间接作用抑制效应性T细胞,削弱机体的抗肿瘤能力^[9,10]。如CD4⁺ Treg细胞可通过CD39抑制ATP的产生发挥免疫抑制作用,从而对自身组织器官起到保护作用,抑制肿瘤的复发^[11,12]。本文具体探讨了肝癌肝移植术后肿瘤复发与外周血调节性T细胞及细胞因子变化水平的关系,结合肝癌肝移植术后肿瘤的复发,以期为临床研究肝癌肝移植术后预防复发提供新的思路和证据。

1 资料与方法

1.1 研究对象 本研究采用回顾性研究方法,选择首都医科大学附属北京佑安医院2013年4月到2017年1月收治的晚期肝癌(超过米兰标准:单发肿瘤直径大于5 cm,或多发肿瘤大于3个,3个以内肿瘤有大于3 cm的,伴有大血管转移、但无淋巴结转移及肝外转移)行移植术的98例患者为研究对象,其中男性53例,女性45例,年龄22~67岁,平均年龄43.5岁。纳入标准:具有肝移植指征,甲胎蛋白 $\geq 500 \mu\text{g/L}$ 持续4周以上;患者知情同意本研究;年龄 ≥ 18 岁;符合2017年美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)《AJCC癌症分期手册》^[13]中的诊断标准;患者术后存活时间 ≥ 6 个月。排除标准:肝癌有淋巴结转移或肝外器官转移;再次肝移植者;肝脏移植禁忌;同时接受肝脏以外的器官移植。本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 研究方法 所有患者均采用经典原位肝移植术,手术当天及移植后第4天应用巴利昔单抗20 mg,术后第2天开始采用以他克莫司为主的免疫抑制方案[联合吗替麦考酚酯和(或)雷帕霉素]。按照术后肿瘤复发与否,将患者分为复发组和未复发组,记录所有患者的一般临床资料,常规检测患者术前肝功能,主要包括ALT、AST等。随访至2017年8

月,记录两组患者的病死率、机械通气时间和住院时间等。术后定期监测AFP及腹部超声,一旦发现异常立即进行胸腹影像学检查,进行血清学AFP检查以明确诊断。术后(间隔1~3个月)采用酶链免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)对白细胞介素2(interleukin 2, IL-2)、IL-10、IL-12和干扰素 γ (interferon γ , IFN- γ)等细胞因子进行分析。术后(间隔1~3个月)无菌条件下采集6 ml外周静脉血,肝素抗凝,通过密度离心法分离得到外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),采用流式细胞仪检测外周血CD39⁺ T细胞占CD4⁺CD25⁺ T细胞的百分比。比较两组患者上述各指标的差异。

1.3 统计学处理 采用SPSS 20.00软件进行统计分析,计数资料以百分比表示,采用卡方检验或Fisher精确检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布的计量资料采用 t 检验,将单因素分析有统计学意义的变量进行Logistic多因素分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般资料比较 两组患者的年龄、性别、ALT、AST、体重指数、免疫抑制方案等资料差异无统计学意义(P 均 > 0.05),见表1。

2.2 肿瘤复发情况 98例患者均顺利完成肝移植,术后肿瘤复发18例,复发率为18.4%,16例肿瘤复发在术后3个月内,2例发生在术后3~6个月。

2.3 外周血调节性T细胞含量 复发组术后外周血CD39⁺含量为 $(7.32 \pm 3.38)\%$,未复发组为 $(16.52 \pm 3.45)\%$,复发组显著低于对照组($t = 8.287, P < 0.001$)。

2.4 细胞因子表达对比 复发组患者血清IL-2、IL-12与IFN- γ 含量显著低于未复发组,而IL-10含量明显高于未复发组,差异均有统计学意义($P < 0.001$)。见表2。

2.5 肝癌肝移植术后肿瘤复发危险因素的多因素分析 以肿瘤复发为因变量,以外周血CD39⁺含量、IL-2、IL-12、IFN- γ 和IL-10为自变量进行多因素Logistic分析,结果显示外周血CD39⁺含量、IFN- γ 和IL-10为影响肿瘤复发的主要因素(OR 值分别为2.216、2.062和1.022, P 值分别为0.022、0.020、0.003)。见表3。

2.6 预后 复发组患者病死率为16.7%(3/18),未复发组患者病死率为2.5%(2/80),复发组患者病死率显著高于对照组,差异有统计学意义($\chi^2 = 6.114, P = 0.003$)。

表 1 两组晚期肝癌患者一般资料对比

组别	例数	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	性别 (男/女, 例)	体重指数 ($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	免疫抑制方案(例)			ALT ($\bar{x} \pm s$, U/L)	AST ($\bar{x} \pm s$, U/L)
					一联	二联	三联		
复发组	18	51.33 ± 3.19	10/8	22.33 ± 3.92	7	10	1	164.44 ± 23.95	130.32 ± 22.64
未复发组	80	49.22 ± 3.19	40/40	22.88 ± 3.19	38	40	2	165.22 ± 28.11	139.11 ± 19.40
统计量值	-	$t = 0.433$	$\chi^2 = 0.278$	$t = 0.184$	$\chi^2 = 0.221$			$t = 0.142$	$t = 0.995$
P值	-	0.502	0.682	0.781	0.721			0.811	0.109

注: 一联方案为使用他克莫司, 二联方案为使用他克莫司联合吗替麦考酚酯或雷帕霉素、三联方案为他克莫司联合联合吗替麦考酚酯和雷帕霉素; “-”为无相关数据

表 2 两组晚期肝癌患者细胞因子的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-2 (ng/L)	IL-12 (ng/L)	IFN- γ (pg/ml)	IL-10 (ng/L)
复发组 ($n = 18$)	157.33 ± 25.39	2.45 ± 0.55	90.10 ± 10.44	111.93 ± 14.49
未复发组 ($n = 80$)	232.49 ± 38.19	14.29 ± 2.49	333.1 ± 19.48	33.29 ± 10.22
t 值	7.339	22.493	9.113	13.352
P值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表 3 98 例患者肝癌肝移植术后肿瘤复发的危险因素分析

因素	P值	OR值	95%CI
外周血CD39 ⁺ 含量	0.022	2.216	1.120-4.283
IFN- γ	0.020	2.062	1.109-3.298
IL-10	0.003	1.022	1.008-4.192

3 讨论

随着医学技术的发展, 肝移植发展迅速, 无论是受体系统还是供体系统均有了很大进展, 已成为晚期肝癌唯一有效的治疗方法, 然而晚期肝癌肝移植术后肿瘤复发是影响长期生存率的最主要原因^[13,14]。本研究中的98例患者均顺利完成肝移植, 术后肿瘤复发18例, 复发率为18.4%; 16例肿瘤复发发生在术后3个月内, 2例发生在术后3~6个月, 若肿瘤复发常规治疗效果欠佳, 多需再次行肝移植以挽救生命。有研究表明, 肿瘤复发的部位包括移植肝、肺转移和骨转移, 主要是由于术前和术中癌细胞血行播散而形成^[15]。由于目前尚无有效的可预防肝移植术后肿瘤复发的系统性治疗手段, 因此只有早期识别与预防才能改善患者的预后^[16]。移植术后肿瘤复发的临床症状往往不明显, 难以早期诊断, 且许多患者术后出现AFP升高后的很长时间内影像学检查均无法发现肿瘤复发的病灶和部位^[17], 为此加强影响因素研究意义重大。

调节性T细胞具有免疫调节作用, 有研究发现临床状况对CD39⁺在自身免疫性疾病患者外周血CD4⁺调节性T细胞的表达和功能有一定的影响, 其中外周血CD39⁺水平的降低与疾病易感性具有密切关系^[18]。调节性T细胞的胞外三磷酸核苷双磷酸水解酶在调控中产生的腺苷除具有免疫抑制功能外, 还可与嘌呤G蛋白偶联受体结合, 进而发挥免疫抑制效应^[19]。

CD39⁺调节性T细胞在大量产生ATP的受损细胞炎性环境中, 尤其是调节性T细胞能通过表面CD39水解ATP, 从而产生免疫抑制^[20]。本研究显示复发组患者术后外周血CD39⁺含量为(7.32 ± 3.38)%, 显著低于未复发组患者的(16.52 ± 3.45)%。提示CD39⁺在肝移植患者外周血CD4⁺CD25⁺T细胞的表达受到抑制, 这可能是导致术后肿瘤复发的原因之一。

当机体促炎因子与抑炎因子的平衡遭到破坏, 机体免疫发生紊乱, 原癌基因被活化, 导致发生肿瘤^[21,22]。IL-10是一种由辅助性T2细胞亚群产生的抑性细胞因子, 而调节性T细胞通过分泌IL-10等细胞因子发生免疫抑制作用, 具有抑制炎症和减少抗原特异性T细胞数量的作用^[23-25]。巨噬细胞的活化也会受到IFN- γ 表达的影响, 使机体发生炎症反应。本研究中复发组患者血清IL-2、IL-12与IFN- γ 含量显著低于未复发组, 而IL-10含量显著高于未复发组, 表明肿瘤复发多伴有IL-2、IL-12与IFN- γ 的低表达和IL-10的高表达。

在肿瘤免疫中, 调节性T细胞除了具有免疫调节功能外, 还具有促进肿瘤细胞生长增殖的功能, 直接或间接通过抑制CD4⁺效应性T细胞的增殖、活化及细胞因子的分泌, 使肿瘤细胞逃避机体的免疫监视, 从而诱发肿瘤复发^[26-28]。本研究中复发组患者的病死率显著高于未复发组, 多因素Logistic分析显示

外周血CD39⁺含量、IFN- γ 和IL-10为影响肿瘤复发的主要因素,表明细胞因子与调节性T细胞可作为肝癌肝移植术后肿瘤复发的预测指标,对肝移植术后预防肿瘤复发与预测预后具有重要的临床意义。

总之,肝癌患者肝移植术后肿瘤复发比较常见,多伴随有外周血调节性T细胞及细胞因子水平表达异常,也是导致肿瘤复发的危险因素,不利于患者的预后改善。

参考文献

- [1] Haug AR. Imaging of primary liver tumors with positron-emission tomography[J]. Q J Nucl Med Mol Imaging, 2017, 61(3): 292-300.
- [2] Li DP, Fan J, Wu YJ, et al. MiR-155 up-regulated by TGF- β promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells in vitro[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(6): 2956-2965.
- [3] Gabr A, Abouchaleh N, Ali R, et al. Comparative study of post-transplant outcomes in hepatocellular carcinoma patients treated with chemoembolization or radioembolization[J]. Eur J Radiol, 2017, 8(93): 100-106.
- [4] Angelico R, Passariello A, Pilato M, et al. Ante situm liver resection with inferior vena cava replacement under hypothermic cardiopulmonary bypass for hepatoblastoma: Report of a case and review of the literature[J]. Int J Surg Case Rep, 2017, 13(37): 90-96.
- [5] Liu Q, Chen K, Liu Z, et al. BORIS up-regulates OCT4 via histone methylation to promote cancer stem cell-like properties in human liver cancer cells[J]. Cancer Lett, 2017, 20(403): 165-174.
- [6] Liu F, Li F, Luo L, et al. Genetic variants in cell death pathway genes and HBV-related hepatocellular carcinoma among a Chinese Han population[J]. Apoptosis, 2017, 22(8): 1035-1047.
- [7] 张萌, 叶敬发, 钟自彪, 等. 原发性肝癌肝移植的研究进展[J]. 中华消化外科杂志, 2017, 16(2): 215-220.
- [8] Li Y, Huang Q, Tang JT, et al. Correlation of HLA-DP/DQ polymorphisms with transplant etiologies and prognosis in liver transplant recipients[J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(25): e7205.
- [9] Long D, Niu M, Tan L, et al. Ball-in-ball ZrO₂ nanostructure for simultaneous CT imaging and highly efficient synergic microwave ablation and tri-stimuli-responsive chemotherapy of tumors[J]. Nanoscale, 2017, 9(25): 8834-8847.
- [10] van Tilborg M, Maan R, van der Meer AJ, et al. Interferon-free antiviral therapy for chronic hepatitis C among patients in the liver transplant setting[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2017, 31(2): 219-225.
- [11] De Simone P, Carrai P, Coletti L, et al. Modification of immunosuppressive therapy as risk factor for complications after liver transplantation[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2017, 31(2): 199-209.
- [12] Visseren T, Darwish Murad S. Recurrence of primary sclerosing cholangitis, primary biliary cholangitis and auto-immune hepatitis after liver transplantation. Best Pract Res[J]. Clin Gastroenterol, 2017, 31(2): 187-198.
- [13] Wassano NS, Sergi F, Ferro G, et al. Rapid disease progression of liver metastases following resection in a liver-transplanted patient with probable lynch syndrome - a case report and review of the literature[J]. Case Rep Oncol, 2017, 10(1): 244-251.
- [14] Billerbeck E, Wolfisberg R, Fahnøe U, et al. Mouse models of acute and chronic hepatitis B virus infection[J]. Science, 2017, 357(6347): 204-208.
- [15] Li XF, Dai D, Song XY, et al. A different representation of natural T cells and natural killer cells between tumor-infiltrating and periphery lymphocytes in human hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Lett, 2017, 13(5): 3291-3298.
- [16] 林花, 郑卫东. AFP、AFU、TSGF及IL-8对肝癌患者诊断及肝移植术预后评估的价值研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(8): 776-780.
- [17] Fan Y, Gao Y, Rao J, et al. YAP-1 Promotes Tregs Differentiation in Hepatocellular Carcinoma by Enhancing TGFBR2 Transcription[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 41(3): 1189-1198.
- [18] Sepehri Z, Kiani Z, Kohan F, et al. Toll like receptor 4 and hepatocellular carcinoma; A systematic review[J]. Life Sci, 2017, 15(179): 80-87.
- [19] Chen X, Takemoto Y, Deng H, et al. Histidine decarboxylase (HDC)-expressing granulocytic myeloid cells induce and recruit Foxp3⁺ regulatory T cells in murine colon cancer[J]. Oncoimmunology, 2017, 6(3): e1290034.
- [20] Han Y, Wu Y, Yang C, et al. Dynamic and specific immune responses against multiple tumor antigens were elicited in patients with hepatocellular carcinoma after cell-based immunotherapy[J]. J Transl Med, 2017, 15(1): 64.
- [21] Chen X, Du Y, Hu Q, et al. Tumor-derived CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells inhibit dendritic cells function by CTLA-4[J]. Pathol Res Pract, 2017, 213(3): 245-249.
- [22] Trehanpati N, Vyas AK. Immune Regulation by T Regulatory Cells in Hepatitis B Virus-Related Inflammation and Cancer[J]. Scand J Immunol, 2017, 85(3): 175-181.
- [23] Kan X, Zhang W, You R, et al. Scutellaria barbata D. Don extract inhibits the tumor growth through down-regulating of Treg cells and manipulating Th1/Th17 immune response in hepatoma H22-bearing mice[J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1): 41.
- [24] Xing H, Liu S, Chen X, et al. A specific immune tolerance toward offspring cells is to exist after the mother lymphocyte infusion[J]. Immunobiology, 2017, 222(4): 658-663.
- [25] 王峰, 饶伟, 臧运金. 肝癌肝移植的研究现状和进展[J]. 临床外科杂志, 2017, 25(3): 165-168.
- [26] Vasquez M, Paredes-Cervantes V, Aranda F, et al. Antitumor effect of an adeno-associated virus expressing apolipoprotein A-I fused to interferon alpha in an interferon alpha-resistant murine tumor model[J]. Oncotarget, 2017, 8(3): 5247-5255.
- [27] Zhang H, He G, Kong Y, et al. Tumour-activated liver stromal cells regulate myeloid-derived suppressor cells accumulation in the liver[J]. Clin Exp Immunol, 2017, 188(1): 96-108.
- [28] Nicolini D, Agostini A, Montalti R, et al. Radiological response and inflammation scores predict tumour recurrence in patients treated with transarterial chemoembolization before liver transplantation[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(20): 3690-3701.

收稿日期: 2017-08-29

张海涛, 张振, 孙力波, 等. 外周血调节性T细胞及细胞因子水平变化与肝癌肝移植术后肿瘤早期复发的相关性[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2017, 9(4): 74-77.