

# 射频消融术对原发性肝癌患者甲胎蛋白和外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞的影响

崇杨<sup>1</sup>, 江涛<sup>2</sup>, 张冬华<sup>2</sup>, 王兵济<sup>2</sup>, 王轩<sup>2\*</sup>

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210023; 2. 解放军第81医院肿瘤外科, 江苏 南京 210002)

**[摘要]** 目的: 观察原发性肝癌患者经射频消融治疗后外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞以及甲胎蛋白水平的变化, 探讨 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞与肝癌预后的关系。方法: 采用流式细胞仪检测 58 例经过多电极射频消融仪治疗的原发性肝癌患者术前术后外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞及 CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> 比值, 采用化学发光方法检测甲胎蛋白值, 并进行统计学分析。结果: 原发性肝癌患者术前 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞与甲胎蛋白水平存在相关性, 而术后甲胎蛋白恢复正常的患者同时出现 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞的显著下降。结论: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞水平在原发性肝癌射频消融治疗过程中与甲胎蛋白的变化存在显著相关性, 可能成为肝癌预后的重要预测指标。

**[关键词]** 射频消融术; 原发性肝癌; CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞; 细胞免疫

**[中图分类号]** R730.56; R735.7 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 1671-7783(2013)02-0177-03

射频消融术(radiofrequency ablation, RFA)是近年发展起来的一种治疗肝癌的新兴手段,具有微创、痛苦少、治疗确切、耗时短、并发症少、可重复治疗等优点,日益受到临床的重视<sup>[1]</sup>。RFA为位置深在的较小病灶或肝功能差无法耐受手术的患者提供了可靠的治疗手段。众所周知,在肝癌的治疗中,机体免疫功能尤其是细胞免疫功能对预后起到重要的作用。Forkhead 家族叉头翼状螺旋转录因子(Foxp3)组成性表达 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞,是真正意义上的调节性 T 淋巴细胞,对机体免疫起着决定性的作用<sup>[2]</sup>。研究表明 Treg 细胞在肿瘤患者外周血和肿瘤组织中升高<sup>[3]</sup>,而且比例越高,肿瘤患者的预后越差<sup>[4]</sup>。本文拟观察 RFA 治疗前后原发性肝癌患者 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞的变化,探讨其用于判断肝癌预后的临床价值。

## 1 对象与方法

### 1.1 病例

选择 2011 年 6 月至 2012 年 6 月期间在我科行经皮肝穿刺 RFA 治疗的 58 例原发性肝癌患者,其中男 40 例,女 18 例。年龄 38 ~ 79 岁,中位年龄(57.5 ± 6.5)岁。肝癌病灶 1 ~ 3 枚,病灶直径 2 ~ 5 cm,平均 3.2 cm。所有患者均按 2011 年版原发性肝癌诊断标准<sup>[5]</sup>临床诊断为原发性肝癌或行肝穿活检病理学明确诊断。

### 1.2 治疗设备

多电极射频消融系统(S-1500 射频治疗仪,上海迈德医疗科技公司),主频 460 kHz,输出功率 1 ~ 90 W 连续可调,术中阻抗变化和组织凝固性坏死程度由主机自动测试完成。配套使用该公司的 VITA(10-461361)型多电极射频针,穿刺后可呈伞状均匀张开 10 枚电极,展开最大直径为 4.0 cm。若病灶较大者按重叠消融原理多次反复穿刺消融以最大限度灭活病灶。

### 1.3 检测方法

于术前、术后 1 月分别抽血送检,采用流式细胞计数仪(XL/XL-MCL,美国贝克曼公司)检测 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> / CD4<sup>+</sup> 比值及 CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> 比值。采用全自动化学发光免疫分析仪(ACCESS,美国贝克曼公司)检测甲胎蛋白含量。术后 1 月随访,行彩超、超声造影、CT、MRI 等检查明确有无肝内、肝外复发、转移。

### 1.4 疗效标准

均按卫生部办公厅公布的《肿瘤射频消融治疗技术管理规范》疗效标准评价:射频消融后 1 个月左右,采用对比增强 CT/MRI 或超声造影判定肿瘤是否被完全消融。获得完全消融的病灶表现为完全无血供即影像学表现为无增强。

### 1.5 统计学方法

所有检测结果以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,应

[基金项目] 南京军区医学科技创新重点资助项目(10Z012)

\*: 通讯作者,主任医师,硕士生导师 E-mail: wangxuan2002@hotmail.com

用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计学分析。两个独立样本间采用 Wilcoxon 检验,术前术后两样本间采用配对  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 疗效

本组所有患者经过射频消融治疗后无死亡病例,无射频消融相关手术并发症,均于术后 1 月正常随访和完成检查、检验,无失访。这 58 例患者中术前甲胎蛋白正常者 4 例,甲胎蛋白值  $10 \sim 400 \mu\text{g/L}$  者 30 例,甲胎蛋白值  $>400 \mu\text{g/L}$  者 24 例。术后复查所有病灶完全消融者 39 例,不完全消融者 5 例,发现新病灶者 8 例。术后 1 月甲胎蛋白恢复正常者 38 例,甲胎蛋白部分降低但未达到正常范围者 16 例,未降低反而增高者 4 例。

### 2.2 术前甲胎蛋白与 $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+ \text{Treg}$ 细胞的关系

如果将术前甲胎蛋白值按  $800 \mu\text{g/L}$  进行分组

来观察  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+ / \text{CD4}^+$  比值及  $\text{CD4}^+ / \text{CD8}^+$  比值两项细胞免疫指标,我们发现甲胎蛋白明显升高组的患者  $\text{CD4}^+ / \text{CD8}^+$  比值显著降低,  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+ \text{Treg}$  明显增高,两指标在两组间差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 术前甲胎蛋白与  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+ / \text{CD4}^+$  变化

| 甲胎蛋白       | $n$ | $\text{CD4}^+ / \text{CD8}^+$ | $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+ / \text{CD4}^+$ |
|------------|-----|-------------------------------|--|
| $\geq 800$ | 24  | $1.13 \pm 0.26$               | $3.06 \pm 0.14$  |
| $< 800$    | 34  | $1.36 \pm 0.21$               | $2.80 \pm 0.23$  |
| $t$ 值      | -   | 2.23                          | 3.12   |
| $P$ 值      | -   | 0.040 1                       | 0.031 2  |

### 2.3 RFA 后甲胎蛋白恢复正常患者 $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+ / \text{CD4}^+$ 的变化

术后 1 月甲胎蛋白恢复正常的 38 例外周血中  $\text{CD4}^+ / \text{CD8}^+$  比值未见明显变化,但射频消融后  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+ / \text{CD4}^+$  比值明显下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 甲胎蛋白恢复正常患者中  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+ / \text{CD4}^+$  的变化

| 时间    | 甲胎蛋白              | $\text{CD4}^+ / \text{CD8}^+$ | $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+ / \text{CD4}^+$ |
|-------|-------------------|-------------------------------|--|
| RFA 前 | $706.8 \pm 100.6$ | $1.26 \pm 0.57$               | $3.02 \pm 0.24$  |
| RFA 后 | $5.3 \pm 2.4$     | $1.57 \pm 0.79$               | $1.48 \pm 0.39$  |
| $t$ 值 | 41.827            | 1.96                          | 20.73  |
| $P$ 值 | 0.000             | 0.054                         | 0.000  |

### 2.4 甲胎蛋白部分降低但未达到正常范围患者 $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+ / \text{CD4}^+$ 的变化

本组射频消融术后有 16 例患者甲胎蛋白有所下降,但未达正常水平。这部分病例  $\text{CD4}^+ / \text{CD8}^+$  比值在射频前后变化不明显,但  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+ / \text{CD4}^+$  在射频消融后明显降低,差异有统计

学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

### 2.5 术后甲胎蛋白增高患者 $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+ / \text{CD4}^+$ 的变化

有 4 例患者术后甲胎蛋白不降反增,其  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+ / \text{CD4}^+$  及  $\text{CD4}^+ / \text{CD8}^+$  均变化不明显。见表 4。

表 3 甲胎蛋白部分降低但未达到正常范围患者  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+ / \text{CD4}^+$  在射频前后的变化

| 时间    | 甲胎蛋白              | $\text{CD4}^+ / \text{CD8}^+$ | $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+ / \text{CD4}^+$ |
|-------|-------------------|-------------------------------|--|
| RFA 前 | $690.8 \pm 108.6$ | $1.25 \pm 0.28$               | $2.96 \pm 0.41$  |
| RFA 后 | $190.3 \pm 42.4$  | $1.44 \pm 0.32$               | $2.50 \pm 0.62$  |
| $t$ 值 | 17.172            | 1.7874                        | 2.48   |
| $P$ 值 | 0.001             | 0.084                         | 0.019  |

表 4 甲胎蛋白增高患者  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+ / \text{CD4}^+$  在 RFA 前后的变化

| 时间    | 甲胎蛋白              | $\text{CD4}^+ / \text{CD8}^+$ | $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+ / \text{CD4}^+$ |
|-------|-------------------|-------------------------------|--|
| RFA 前 | $699.6 \pm 88.9$  | $1.24 \pm 0.51$               | $3.12 \pm 0.50$  |
| RFA 后 | $1268.8 \pm 99.4$ | $1.20 \pm 0.55$               | $3.08 \pm 0.32$  |
| $t$ 值 | 8.537             | 0.104                         | 0.135  |
| $P$ 值 | 0.000             | 0.921                         | 0.897  |

### 3 讨论

目前常规治疗原发性肝癌的方法如手术切除、肝动脉插管化疗栓塞术对机体的免疫功能干扰大,手术后早期出现明显的免疫抑制,可促进肿瘤细胞的生长,增加了肿瘤的转移和复发率<sup>[6]</sup>,对肝癌患者不利。射频消融治疗原发性肝癌的疗效已得到临床上的肯定,有文献认为有增强细胞免疫功能的作用<sup>[7]</sup>。

CD4<sup>+</sup>细胞为辅助性 T 细胞,帮助完成抗肿瘤免疫,在协同清除、消灭肿瘤细胞方面有重要作用,CD4<sup>+</sup>细胞减少可使肿瘤发生免疫逃逸,CD8<sup>+</sup>细胞增多往往引起细胞免疫功能损害,我们常通过 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值来反映细胞免疫功能<sup>[8]</sup>。肿瘤患者的细胞免疫缺陷与肿瘤的发生、发展及预后密切相关<sup>[9]</sup>,本研究结果中我们发现甲胎蛋白显著升高组的患者 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值异常增高,也同样反映了这个问题。但我们发现 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值在消融术后短期内未见明显变化,因此无法作为即时反映免疫功能变化的参考指标。

Sakaguchi 等<sup>[10]</sup>首次定义 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞的概念后,越来越多证据表明 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞是具有免疫抑制作用的真正意义上的 Treg 细胞,Foxp3 在 Treg 细胞发育和发挥功能的过程中起决定作用。于荣等<sup>[11]</sup>的研究表明 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 可在有效治疗后明显下降,并建议将其作为评估疗效的重要预测指标之一。本研究检测了射频消融术前术后 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> 比值的变化,结果显示 RFA 治疗后外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞出现显著变化,在术后甲胎蛋白恢复正常的患者中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 在射频治疗后 1 月迅速下降,提示 RFA 后细胞免疫功能得以恢复或者是抗肿瘤免疫的增强,因此我们认为射频消融可通过免疫途径对机体产生积极影响。

综上所述,本研究提示 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞在射频消融治疗前后的变化与甲胎蛋白存在相关性,对肝癌患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞水平的监测,不但有利于了解患者的免疫状态,对肝癌的预后评估也具有重要的意义。因本研究例数较少,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞的水平变化能否成为一种预后预测指标,需要今后作进一步的研究。

### [参考文献]

- [1] Lu MD, Xu HX, Xie XY, et al. Percutaneous microwave and radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: a retrospective comparative study [J]. *Gastroenterol*, 2005, 40(11): 1054-1056.
- [2] Khattri R, Cox T, Yasayko SA, et al. An essential role for Scurfin in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T regulatory cells [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(4): 337-342.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 原发性肝癌的诊疗规范(2011年版)摘要 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2012, 20(6): 419-426.
- [6] 孙婧婧, 吴孟超. 肝癌复发转移的分子机制 [J]. *中国实用外科杂志*, 2000, 20(3): 176-178.
- [7] Alessandro Z, Massimo P, Amalia P, et al. Radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma liver nodules responses [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(23): 1139-1146.
- [8] 温江涛, 孙林, 刘海红. 胃癌患者外周血 T 淋巴细胞及 NK 细胞检测的临床意义 [J]. *江苏大学学报: 医学版*, 2006, 16(2): 145-147.
- [9] 付白清, 吴朝阳, 许亚平, 等. 食管癌患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>调节性 T 细胞检测及其临床意义 [J]. *江苏大学学报: 医学版*, 2008, 18(6): 532-534.
- [10] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunological self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25): Breakdown of single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases [J]. *J Immunol*, 1995, 155(3): 1151-1164.
- [11] 于荣, 候建青. 紫杉醇联合铂类化疗对晚期卵巢上皮细胞癌患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>细胞的影响及意义 [J]. *滨州医学院学报*, 2012, 35(4): 248-250.

[收稿日期] 2013-02-27 [编辑] 陈海林