

原发性肝癌患者射频消融后外周血 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞对预后的影响

崇 杨 江 涛 王 轩
(解放军第81医院,江苏南京 210000)

摘要:目的 研究射频消融术治疗原发性肝癌患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞水平与预后的关系。方法 回顾性分析 102 例原发性肝癌患者经射频消融治疗后外周血 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ / CD4⁺ 比值与生存时间的关联。结果 原发性肝癌患者射频术后 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 细胞占 CD4⁺ T 的比例显著降低,与临床分期、肿瘤大小、AFP 水平相关。CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞数目与生存率相关。结论 原发性肝癌患者射频消融治疗后外周血 Treg 水平是判断预后的独立预测指标。

关键词: 射频消融术; 原发性肝癌; CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞; 免疫功能; 预后
中图分类号: R735.7 文献标志码: A

Effect of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cells in Peripheral Blood on the Prognosis of Patients with Primary Liver Cancer after Radiofrequency Ablation(RFA)

CHONG Yang, JIANG Tao, WANG Xuan
(The 81th Hospital of PLA, Nanjing 210000, China)

Abstract: Objective To discuss the correlation between the level and the prognosis of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes in peripheral blood of patients after the RFA. **Method** A total of 102 patients with primary liver cancer who received RFA were enrolled in the study. The relationship between the ratio of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ / CD4⁺ Treg cells and the survival time of them was evaluated by COX regression. **Results** The ratio of CD4⁺ CD25⁺ foxp3⁺ regulatory T cells in peripheral blood after radiofrequency ablation declined significantly and was related to the clinicopathologic characteristics, tumor sizes and AFP values, the number of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ cells was also significantly correlated with the survival rate ($P < 0.01$). **Conclusion** The CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes level in peripheral blood is an independent predictive factor for judging the prognosis of patients with primary liver cancer after radiofrequency ablation.

Key words: radiofrequency ablation; primary liver cancer; CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes; immunity function; prognosis

原发性肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,虽手术切除依然被认为是治愈肝癌的主要手段,但许多肝癌患者就诊时由于肿瘤生长部位或肝功能储备较差,从而失去手术切除的机会。作为肝癌局部治疗

收稿日期: 2013-01-15

基金项目: 南京军区医学科技创新重点资助项目(10Z012)。

作者简介: 崇 杨(1987-),女,硕士研究生,主要从事 RFA 临床和基础研究;

通信作者: 江 涛(1965-),男,副主任医师,主要从事 RFA 临床和基础研究。

技术 射频消融术(RFA)在疗效上可取得与外科切除相当的效果^[1].肝癌的发生、发展与多种因素有关,其中机体的免疫功能低下是主要原因之一,而抗肿瘤免疫主要是细胞免疫^[2].为了解原发性肝癌患者射频治疗前 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 改变与预后的关系,收集检测 102 例明确诊断为原发性肝癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比值,分析其改变与预后的关系.

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取解放军第 81 医院 2008 年 1 月—2010 年 6 月 102 例肝癌患者,所有患者均符合 2001 年第八届全国肝癌学术会议通过的原发性肝癌诊断标准^[3],临床诊断为原发性肝癌或行肝穿活检病理学明确诊断.其中,男 84 例,女 18 例,年龄 35~79 岁,中位年龄(59.5±6.28)岁.肝功能 Child-Pugh 分级 A 级 56 例, B 级 46 例.肿瘤边缘距离脏面 < 10 mm 23 例,肿瘤边缘距离脏面 ≥ 10 mm 79 例.病灶最大径 ≤ 30 mm 36 例, 30~50 mm 50 例, 50~70 mm 12 例, > 70 mm 4 例.单个病灶患者 80 例, 2 个病灶患者 14 例, 3~4 个病灶患者 8 例.病例选择排除合并有影响机体免疫功能疾病的患者,且未使用影响机体免疫功能的药物.

1.2 治疗方法

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—161361)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,一次治疗过程中的消融位点不超过 5 个,消融结束后进行针道消融.

1.3 检测方法

于术前、术后 1 个月分别抽血送检,采用流式细胞计数仪(XL/XL-MCL,美国贝克曼公司)检测 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比值及 CD4⁺/CD8⁺ 比值.随访时间截止到 2012 年 12 月 31 日,全部患者均获得随访.

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 进行统计学分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间两独立样本采用 *t* 检验或配对 *t* 检验.多因素分析采用 Cox 回归模型,分析外周血 Treg 与生存率的关系. *P* < 0.05 认为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 RFA 治疗前后 CD4⁺/CD8⁺ 及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 的变化

由表 1 可见:原发性肝癌患者 RFA 治疗前后 CD4⁺/CD8⁺ 比值升高,与治疗前相比,差异无统计学意义(*P* > 0.05). CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比值降低,与治疗前相比,差异有统计学意义(*P* < 0.01).

表 1 射频前后 CD4⁺/CD8⁺ 比值及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比值

Tab. 1 Change of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺ cells before and after RFA

组别	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺
射频前	1.19 ± 0.49	3.04 ± 0.17
射频后	1.33 ± 0.53	2.43 ± 0.37
<i>t</i>	1.958 9	15.130 0
<i>P</i>	0.051 5	0

2.2 患者外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比值与临床特征的关系

分析肝癌外周血 Treg 表达与临床特征发现: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比值与肿瘤大小、BCLC 分期、AFP 水平有关,差异有明显统计学意义(*P* < 0.05).原发性肝癌患者 RFA 治疗后外周血中 Treg 比值与性别、年龄、Child-Pugh 分级、HBsAg、肝硬化、门静脉高压、是否根治性切除术后复发均无统计学意义.见表 2.

表 2 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 水平与临床特点的关系

Tab. 2 The relationship between CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ level and clinical characteristics

项目	<i>n</i>	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺	<i>t</i>	<i>P</i>	
性别	男	84	2.53 ± 0.47	1.580 2	0.117 2
	女	18	2.35 ± 0.23		
年龄/岁	≤ 60	55	2.55 ± 0.66	1.352 1	0.179 4
	> 60	47	2.39 ± 0.51		
病灶直径/mm	< 50	86	2.40 ± 0.11	2.017 1	0.046 4
	≥ 50	16	2.48 ± 0.27		
BCLC 分期	A	48	2.41 ± 0.21	2.019 9	0.046 1
	B~C	54	2.49 ± 0.19		
Child-Pugh 分级	A	56	2.44 ± 0.28	0.481 0	0.631 6
	B	46	2.41 ± 0.35		
AFP/(ng·L ⁻¹)	< 800	60	2.40 ± 0.19	2.304 0	0.023 3
	≥ 800	42	2.49 ± 0.20		
HBsAg	阴性	13	2.48 ± 0.51	0.399 6	0.690 3
	阳性	89	2.41 ± 0.60		
肝硬化	无	8	2.47 ± 0.49	0.405 6	0.685 9
	有	94	2.42 ± 0.32		
门静脉高压	无	34	2.45 ± 0.24	0.502 0	0.616 6
	有	78	2.42 ± 0.31		
复发	是	41	2.46 ± 0.49	0.565 9	0.572 7
	否	61	2.42 ± 0.21		

2.3 生存分析

肝癌外周血 Treg 的表达与生存率之间的关系:102 例肝癌患者生存 3~60 个月,1 a 生存率 88%,2 a 生存率 46%,3 a 生存率 26%。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 占 CD4⁺T 细胞比例与生存率相关($\chi^2=11.5612, P=0.0007$) 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

3 讨 论

在肿瘤发生过程中,Treg 的免疫无能和免疫抑制两大功能使肿瘤免疫逃逸,导致机体对肿瘤的免疫无应答或免疫耐受。Treg 在维持对自身成分免疫耐受的同时也阻止了机体对自体同源肿瘤细胞的免疫,在肿瘤的发生、发展过程中发挥重要作用。目前研究发现:在多种恶性肿瘤患者外周血和肿瘤浸润淋巴细胞中存在着 Treg 数目或比例增高的现象,提示恶性肿瘤患者体内 Treg 上调是一个普遍现象^[4]。Kobayashi 等^[5]发现在肝癌的癌前病变、早期肿瘤和肿瘤的进展期,Treg 数目、比例随着肿瘤发生、进展逐渐上升,提示 Treg 与肿瘤发生、发展与预后的关系密切。

常作为反映细胞免疫功能 CD4⁺/CD8⁺ 比值指标在射频治疗后升高,但无显著统计学意义。另外,经过射频治疗的肝癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 占 CD4⁺T 细胞比例较术前明显降低,有显著统计学意义,本研究采用 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 作为 Treg 指标。有相关研究表明:CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 是一个目前唯一严格意义上的标记^[6],为大多数学者所采用。

本试验结果提示:CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比例与肿瘤大小、分期及 AFP 水平密切相关,肿瘤较大者、肿瘤分期较晚者及 AFP 水平异常升高者外周 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比例较高。Ormandy 等^[7]研究表明:CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 数目与肿瘤分期密切相关,肿瘤越晚,CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 数目越多,提示 Treg 数目占 CD4⁺T 细胞比例及数目与肿瘤负荷有关,肿瘤因素可以使 Treg 增加。

Treg 是导致免疫抑制的关键因素^[8],对于肿瘤患者无论是外周血还是肿瘤微环境中显著升高的 Treg 常提示预后较差,生存期较短^[8-9]。本试验表明:在肝癌外周血 Treg 的表达与预后关系研究中,CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 占 CD4⁺T 细胞比例及数目与肝癌患者的生存率相关,是肝癌独立的预后因素,可作为判断预后的指标之一。目前的各研究报

道中,健康对照和各种肿瘤外周血 Treg 细胞比例结果差异较大。我们采用 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞作为 Treg 标记,检测肝癌外周血中 Treg 的比例为(2.43±0.37)% ,与国内食管癌外周血的数据(3.72±1.39)% 接近^[10],CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 更加能够反映 Treg 的真实状态。

总之,肝癌外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 占 CD4⁺T 细胞比例在射频术后降低,临床分期较晚、肿瘤较大、AFP 水平异常升高者比例及数目相对较高,并与术后生存时间相关。提示 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 可能在肝癌免疫耐受中发挥重要作用,对于判断肝癌的预后有一定价值。

参考文献:

- [1] Kudo M. Radio Frequency Ablation for Hepatocellular Carcinoma: Updated Review in 2010 [J]. *Oncology* 2010, 78(1): 113-124.
- [2] 贾战生,于兰. T 淋巴细胞亚群的检测及其临床意义 [J]. *国外医学临床生物·化学与检验学分册* 1992, 13(4): 157.
- [3] 杨秉辉,夏景林. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准 [J]. *中华肝脏病杂志* 2001, 9(6): 324.
- [4] Junlang Fu, Dongping Xu, Zhenwen Liu, et al. Increased Regulatory T Cells Correlate with CD8 T-cell Impairment and Poor Survival in Hepatocellular Carcinoma Patients [J]. *Gastroenterology* 2007, 132: 2328-2339.
- [5] Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, et al. FOXP3⁺ Regulatory T Cells Affect the Development and Progression of Hepato Carcinogenesis [J]. *Clin Cancer Res* 2007, 13(3): 902-911.
- [6] 焦志军,尤海燕,陈蕾,等. 流式细胞术检测表达 Foxp3 的 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞 [J]. *临床检验杂志*, 2008, 126(13): 161-163.
- [7] Ormandy L A, Hillemann T, Wedemeyer H, et al. Increased Populations of Regulatory T Cells in Peripheral Blood of Patients with Hepatocellular Carcinoma [J]. *Cancer Res* 2005, 65(6): 2457-2464.
- [8] Elkord E, Alcantar-Orozco E M, Dovedi S J, et al. T Regulatory Cells in Cancer: Recent Advances and Therapeutic Potential [J]. *Expert Opin Biol Ther* 2010, 10: 1573-1586.
- [9] Griffiths R W, Eikord E, Gilham D E, et al. Frequency of Regulatory T Cell in Renal Cell Carcinoma Patients and Investigation of Correlation with Survival [J]. *Cancer Immunol Immunother* 2007, 56: 1743-1753.
- [10] 付白清,吴朝阳,许亚平等. 食管癌患者外周血 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 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.

【责任编辑:陈丽华】