

原发性肝癌患者射频消融治疗前后外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞的变化

邓俊 陈卫 陆忠华 周颜

【摘要】目的 观察原发性肝癌患者射频消融(RFA)治疗前后 T 细胞亚群及 NK 细胞的变化。方法 23 例原发性肝癌患者接受 RFA 治疗;采用流式细胞仪检测患者和 23 例健康体检人群外周血 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD4⁺/CD8⁺、CTL 细胞及 NK 细胞水平。结果 原发性肝癌患者 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CTL 细胞、NK 细胞的比例及 CD4⁺/CD8⁺ 比值分别为 61.9±13.8%、33.3±5.0%、10.3±4.9%、4.4±1.3%和 1.4±0.6 均显著低于健康人群(75.7±12.3%、41.1±10.1%、19.7±5.8%、16.7±8.2%、1.7±0.6 $P<0.05$)。CD8⁺T 细胞的比例为 25.5±5.1% 高于健康人(21.7±6.7% $P<0.05$)。RFA 治疗后 1 周和 2 周,CD3⁺T 细胞(72.1±9.8%、73.3±7.3%)、CD4⁺T 细胞(39.6±10.9%、39.0±10.0%)、CTL 细胞(14.8±9.6%、12.3±7.4%)、NK 细胞(11.1±4.9%、12.8±8.1%)均较治疗前上升,而 CD8⁺T 细胞(22.6±5.8%、22.0±9.6%)比例下降,CD4⁺/CD8⁺ 比值(1.7±0.8、1.9±0.4)上升,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 原发性肝癌患者大多处于免疫抑制状态,RFA 治疗可调节其 T 细胞亚群的平衡,升高 NK 细胞水平。

【关键词】 原发性肝癌 射频消融术 T 淋巴细胞亚群 自然杀伤细胞

doi:10.3969/j.issn.1672-5069.2013.05.010

Changes in peripheral T-cell subsets and natural killer cell in patients underwent radiofrequency ablation for primary liver cancer Deng Jun, Chen Wei, Lu Zhonghua et al. Department of Hepatology, The Fifth People's Hospital, Wuxi 214005, Jiangsu Province, China

【Abstract】 Objective To investigate the changes in peripheral T lymphocyte subsets and natural killer (NK) cells in patients underwent radiofrequency ablation (RFA) for primary liver cancer. Methods 23 patients with primary liver cancer were recruited and received RFA treatment. The changes in the proportion of CD3⁺T cell, CD4⁺T cell, CTL cell, NK cells and CD4⁺/CD8⁺ ratio in peripheral blood in 23 healthy controls and in 23 patients with primary liver cancer before and after RFA treatment were determined by flow cytometry. Results The proportion of CD3⁺T cell, CD4⁺T cell, CTL cell, NK cell and the CD4⁺/CD8⁺ ratio in patients with primary liver cancer were 61.9±13.8%, 33.3±5.0%, 10.3±4.9%, 4.4±1.3% and 1.4±0.6 respectively, all of which were significantly lower than those in healthy controls (75.7±12.3%, 41.1±10.1%, 19.7±5.8%, 16.7±8.2%, 1.7±0.6 $P<0.05$). In contrast, the proportion of CD8⁺T cell (25.5±5.1%) in patients was higher than that in healthy controls (21.7±6.7% $P<0.05$). In patients with primary liver cancer, the proportion of CD3⁺T cell (72.1±9.8%, 73.3±7.3%), CD4⁺T cell (39.6±10.9%, 39.0±10.0%), CTL cell (14.8±9.6%, 12.3±7.4%) and NK cell (11.1±4.9%, 12.8±8.1%) were increased, while the proportion of CD8⁺T cell (22.6±5.8%, 22.0±9.6%) was reduced and the CD4⁺/CD8⁺ ratio (1.7±0.8, 1.9±0.4) was decreased ($P<0.05$) one or two weeks after RFA as compared to that before RFA. Conclusion Most of the patients with primary liver cancer are in immunosuppressed status and RFA therapy can adjust the balance in T cell subsets and increase NK cell counts.

【Key words】 Primary liver cancer Radiofrequency ablation T lymphocyte subsets Natural killer cell

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一,目前手术切除仍为早期肝癌的首选治疗方法^[1],但研究表明,

手术后患者免疫功能下降,肝功能损害加重,还有可能出现肝癌的转移及复发,造成治疗失败^[2-4]。射频消融(radiofrequency ablation, RFA)因其疗效确切、损伤轻微、并发症少等优点在肝脏肿瘤的治疗中应用日趋广泛,已经成为新的有效治疗方法之一^[5]。我们观察了原发性肝癌患者在 RFA 治疗前后外周血 CD3⁺ 细胞、

作者单位 214005 江苏省无锡市第五人民医院肝病科

第一作者 邓俊 男,36岁,大学本科,硕士研究生,主治医师。主要从事肝病的诊断与治疗学研究。E-mail: dengjun770626@sohu.com
通讯作者 陈卫 E-mail: wuxichenwei@yahoo.com.cn

CD4⁺细胞、CTL细胞、NK细胞比例和CD4⁺/CD8⁺比值的变化,以探讨RFA对原发性肝癌患者机体抗肿瘤免疫功能的影响。

资料与方法

一、研究对象 我科2011年10月至2013年1月间收治的23例原发性肝癌患者,男18例,女5例,年龄28~72岁,平均年龄为48.3±11.1岁。符合2001年第八届全国肝癌学术会议通过的原发性肝癌的临床诊断与分期标准,经影像学、甲胎蛋白(AFP)或肝穿组织病理学活检确诊。其中HBsAg阳性22例,HBsAg阴性1例;同时伴有肝硬化21例,不伴有肝硬化2例;癌灶共29个,直径2.0~5.0cm,肝功能Child A级20例,B级3例。同时选择23例健康献血者作为对照组,男17例,女6例,年龄22~59岁,平均年龄为41.7±9.1岁。

二、仪器与试剂 使用德国西门子欢悦TWO全身螺旋CT机和迈德S-1500肿瘤射频治疗仪,射频消融针为迈德配套射频消融针。使用美国BECKMAN COULTER公司Epics XL型流式细胞仪。

三、治疗方法 先行腹部CT扫描,确认肿瘤位置、穿刺方向及进针深度。常规消毒铺巾后,2%利多卡因局麻,使用22G Chiba针作为导引针穿刺入预设射频靶点部位,穿刺时注意避开主要血管和胆管较大分支,重复CT扫描证实导引针尖位于靶点部位,在穿刺点局部切开约0.3cm的切口,射频电极针沿导引针穿刺路径穿刺入靶点部位,CT扫描确定射频电极针

尖位于靶点部位后,推出电极子针,使电极子针覆盖肿瘤周围0.5~1.0cm正常肝组织。连接肿瘤射频治疗仪进行射频消融治疗,设定瓦控模式,输出功率为100W,当阻抗超限热凝自动停止。对较大或多个病灶,行多次RFA治疗。术后均给予保肝、止血和支持治疗。

四、外周血淋巴细胞亚群的检测 取外周血2ml,EDTA抗凝。取抗凝血100μl,加入CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5三色标记的单克隆抗体(美国Becton Dickinson公司)20μl,CD3-FITC/CD16⁺CD56-PE二色标记的单克隆抗体(美国Becton Dickinson公司)20μl,充分混匀,室温避光染色30min,经Q-Per-cp处理充分混合后立即上机检测。

五、统计学处理 应用SPSS17.0软件对数据进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验, P<0.05为有统计学意义。

结果

原发性肝癌患者在RFA治疗前后外周血T细胞亚群与正常健康者比较见表1。结果显示,原发性肝癌患者RFA前CD3⁺T细胞、CD4⁺T细胞、CTL细胞、NK细胞水平及CD4⁺/CD8⁺比值均低于正常对照组,差异有显著性(P<0.05),而CD8⁺T细胞水平则明显高于正常对照组(P<0.05);在RFA治疗后CD3⁺T细胞、CD4⁺T细胞、CTL细胞、NK细胞水平升高,CD4⁺/CD8⁺比值升高,而CD8⁺T细胞水平下降,与治疗前比,差异有统计学意义(P<0.05),但仍低于正常对照组水平。

表1 健康人与原发性肝癌患者T细胞亚群(% $\bar{x} \pm s$)变化的比较

	例数	CD3 ⁺ T细胞	CD4 ⁺ T细胞	CD8 ⁺ T细胞	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CTL细胞	NK细胞
正常人	23	75.7±12.3	41.1±10.1	21.7±6.7	1.7±0.6	19.7±5.8	16.7±8.2
肝癌 RFA 前	23	61.9±13.8	33.3±5.0	25.5±5.1	1.4±0.6	10.3±4.9	4.4±1.3
RFA后1周	23	72.1±9.8	39.6±10.9	22.6±5.8	1.7±0.8	14.8±9.6	11.1±4.9
RFA后2周	23	73.3±7.3	39.0±10.0	22.0±9.6	1.9±0.4	12.3±7.4	12.8±8.1

与正常人比, P<0.05;与治疗前比, P<0.05

讨论

肿瘤可以通过多种途径逃逸机体的免疫监视^[6]。肝癌细胞可以通过对自身表面抗原的修饰以及改变肝癌组织周围的微环境来逃避机体的免疫识别与攻击,从而发生肿瘤免疫逃逸。机体的抗肿瘤效应主要是通过体内T细胞介导的细胞免疫来发挥作用的,尤其CD4⁺T细胞介导的免疫杀伤作用在抗肿瘤免疫中发挥关键作用。肝癌患者大多数存在免疫抑制,细胞

免疫功能低下,外周血常出现T淋巴细胞亚群紊乱以及NK细胞数量的下降^[7,8]。研究发现患者AFP与CD4⁺细胞、CD4⁺/CD8⁺和NK细胞呈负相关,而与CD8⁺细胞呈正相关^[9]。根据CD28⁺的表达与否可将CD8⁺T细胞分为抑制性T细胞(Ts,CD8⁺CD28⁻)和杀伤性T细胞(CTL,CD8⁺CD28⁺)。肝癌患者外周血CD8⁺T细胞亚群的百分率升高为CD8⁺CD28⁻升高,而CTL细胞数量下降^[10]。机体免疫特别是细胞免疫的降低是肝癌的

发生、转移及复发的重要原因^[11]。

近年来 RFA 治疗肝癌得到迅速普及和应用,已成为继手术切除和介入治疗后的第三大肝癌治疗方法,并且被认为是小肝癌根治性治疗手段之一^[12]。RFA 的基本原理是通过针型电极输出高频射频波,使组织内离子产生快速振动摩擦产热,局部温度可达 90~120℃,引起靶区肿瘤组织细胞发生热凝固性变性和坏死,并使肿瘤周围血管凝固闭塞,从而达到杀灭肿瘤和防止转移的目的^[13]。本组 23 例肝癌患者存在 T 淋巴细胞亚群紊乱,主要表现为 CD3⁺、CD4⁺、CTL 细胞下降,CD4⁺/CD8⁺ 下降。经 RFA 治疗后,CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CTL 细胞上升,NK 细胞上升,CD4⁺/CD8⁺ 比值亦明显上升,相反 CD8⁺T 细胞则出现下降,表明 RFA 治疗后机体细胞免疫功能得到改善,抗肿瘤免疫功能有所提高,分析原因可能为 RFA 产生的高温使肿瘤组织发生凝固性坏死,经灭活的肿瘤组织作为抗原能够产生持续性的局部炎症反应,活化抗原递呈细胞(APCs),诱导肿瘤特异性 T 淋巴细胞反应,改善机体抗肿瘤免疫耐受状态^[14,15]。

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. *Gastroenterology* 2005, 40 (11):1054-1060.
- [2] 涂康生, 胡会社, 刘青光, 等. 复方氨基酸注射液对肝癌患者术后恢复功能的影响. *实用肝脏病杂志* 2010, 13(5):378-379.
- [3] 薛平, 郑超, 曹良启, 等. 超声联合腹腔镜射频消融术对肝癌患者免疫功能的影响. *临床医学工程* 2012, 19(10):1637-1640.
- [4] Ronnie TP. Prevention of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: A daunting challenge. *Hepatology* 2011, 54 (3):757-759.
- [5] Kondo Y, Yoshida H, Tateishi R, et al. Percutaneous radiofrequency ablation of liver cancer in the hepatic dome using the intrapleural fluid infusion technique. *Br J Surg* 2008, 95(8):996-1004.
- [6] Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, et al. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 2011, (29):235-271.
- [7] Alessandro Z, Massimo P, Amalia P, et al. Radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma liver nodules responses. *Cancer Res* 2006, 66(23):1139-1146.
- [8] El-Shanawani FM, Abdel-Hadi AA, Abu Zikri NB, et al. Clinical significance of aflatoxin mutant P53 gene and sIL-2 receptor in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Egypt Soc Parasitol* 2006, 36(1):221-239.
- [9] 辛永宁, 宣世英, 史光军, 等. 肝癌病人甲胎蛋白水平与 T 细胞亚群及 NK 活性的相关性研究. *中华肝胆外科杂志* 2005, 11 (12):851-852.
- [10] 宋丁, 王燕云. CD8⁺CD28⁻T 细胞在原发性肝癌患者外周血的表达及意义. *中国实验诊断学* 2009, 13(4):493-494.
- [11] 程树群, 吴孟超, 陈汉, 等. 肝癌患者术后肝动脉化疗栓塞联合胸腺肽治疗预防复发的随机对照研究. *中华肿瘤杂志* 2004, 26 (5):305-307.
- [12] 肝癌局部消融治疗规范的专家意见. *实用肝脏病杂志* 2011, 14 (4):243-245.
- [13] Buscarini E, Savoia A, Brambilla G, et al. Radiofrequency thermal ablation of liver tumors. *Eur Radiol* 2005, 15(5):884-894.
- [14] Zerbini A, Pilli M, Fagnoni F, et al. Increased immunostimulatory activity conferred to antigen-presenting cells by exposure to antigen extract from hepatocellular carcinoma after radiofrequency thermal ablation. *J Immunother* 2008, 31(3):271-282.
- [15] Plathow C, Lohr F, Divkovic G, et al. Focal gene induction in the liver of rats by a heat-inducible promoter using focused ultrasound hyperthermia: Preliminary results. *Investigat Radiol*, 2005, 40(11):729-735.

(收稿:2013-04-17)

(校对:陈从新)