

· 临床研究 ·

肝癌肝移植术后肿瘤复发与外周血调节性T细胞及细胞因子表达水平的关系

杨绍臻 周林 杜国盛 宋继勇 朱志东 封立魁 索龙龙 郑永根

【摘要】 目的 分析肝细胞癌(肝癌)肝移植术后肿瘤复发与调节性T细胞(Treg)及细胞因子表达水平的关系。方法 以解放军第309医院2010年至2014年56例肝移植患者为研究对象。根据术后病理资料分为肝癌肝移植组(28例)和肝硬化肝移植组(肝硬化组,28例),肝癌肝移植组再根据术后患者有否肿瘤复发分为未复发组(8例)和复发组(20例)。比较各组患者外周血中Treg及调节性细胞因子[血管内皮生长因子(VEGF)、白细胞介素(IL)-2、IL-10、IL-12、转化生长因子(TGF)- β 、干扰素(IFN)- γ]的表达水平。结果 与肝硬化组比较,未复发组的IFN- γ 、IL-12水平显著升高(均为 $P < 0.05$);复发组的Treg%、VEGF、IFN- γ 、IL-10、TGF- β 水平均显著升高,IL-2和IL-12水平明显降低(均为 $P < 0.05$)。与未复发组比较,复发组的Treg%、VEGF、IL-10、TGF- β 水平均显著升高,IFN- γ 、IL-2、IL-12水平明显降低(均为 $P < 0.05$)。结论 Treg及细胞因子水平可作为肝癌肝移植术后肿瘤复发的预测指标。

【关键词】 肝移植; 肿瘤复发; 西罗莫司; 调节性T细胞; 细胞因子

【中图分类号】 R617, R735.7 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445(2016)05-0010-04

Correlation of tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma with the expression levels of regulatory T cells and cytokines in peripheral blood

Yang Shaozhen^{*}, Zhou Lin, Du Guosheng, Song Jiyong, Zhu Zhidong, Feng Likui, Suo Longlong, Zheng Yonggen. ^{*} Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China
Corresponding author: Du Guosheng, Email: duguosheng@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To analyze the correlation of tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma (HCC) with the expression levels of regulatory T cell (Treg) and cytokines in peripheral blood. **Methods** A total of 56 patients who underwent liver transplantation in the 309th Hospital of People's Liberation Army from 2010 to 2014 were studied. According to the postoperative pathological data, all the patients were divided into the group of liver transplantation for HCC (HCC group, $n = 28$) and group of liver transplantation for cirrhosis (liver cirrhosis group, $n = 28$), of which the HCC group was further divided into non-recurrence group ($n = 8$) and recurrence group ($n = 20$) according to the situation of postoperative tumor recurrence. The expression levels of Treg and cytokines [vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin (IL)-2, IL-10, IL-12, transformation growth factor (TGF)- β and interferon (IFN)- γ] in peripheral blood of the patients in various groups were compared. **Results** Compared with the liver cirrhosis group, levels of IFN- γ and IL-12 in the non-recurrence group increased significantly (both $P < 0.05$); levels of Treg%, VEGF, IFN- γ , IL-10 and TGF- β in the recurrence group increased significantly, while levels of IL-2 and IL-12 decreased significantly (all $P < 0.05$). Compared with the non-recurrence group, levels of Treg%, VEGF, IL-10 and TGF- β in the recurrence group increased significantly, while levels of IFN- γ , IL-2 and IL-12 decreased significantly (all $P < 0.05$). **Conclusions** Levels of Treg and cytokines can be used to predict the tumor recurrence after liver transplantation for HCC.

【Key words】 Liver transplantation; Tumor recurrence; Sirolimus; Regulatory T cell; Cytokine

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2016.05.010

基金项目: 国家自然科学基金(81370578)

作者单位: 075000 河北张家口, 河北北方学院(杨绍臻、索龙龙); 解放军第309医院全军器官移植研究所肝胆外科(周林、杜国盛、宋继勇、朱志东、封立魁、郑永根); 海南五指山市75559部队医院(郑永根)

通讯作者: 杜国盛, Email: duguosheng@medmail.com.cn

目前认为,调节性T细胞(Treg)与肿瘤的发生有密切关系,其可通过分泌抑制性细胞因子,直接或间接作用抑制效应性T细胞,主要是CD4⁺和CD8⁺T细胞的增殖和活化,促进肿瘤细胞逃避机体的免疫监视,削弱机体的抗肿瘤能力。肝细胞癌(肝癌)肝移植术后肿瘤复发一直是肝移植领域亟待解决的难题。解放军第309医院全军器官移植研究所自2010年至2014年,针对超“米兰标准”的肝癌肝移植患者采用以西罗莫司为主的联合免疫抑制治疗方案,与既往以他克莫司为主的免疫抑制方案患者进行回顾性对比发现,以西罗莫司为主的免疫抑制治疗方案可显著延长患者的生存时间,降低肿瘤的复发风险。本研究通过分析肝癌肝移植术后肿瘤复发患者外周血中Treg及调节性细胞因子的表达,进一步了解Treg和细胞因子与肿瘤发生的相关性,为临床治疗提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

采用回顾性队列研究方法,收集2010年至2014年在我院行原位肝移植的患者56例作为研究对象,根据术后病理诊断分为因肝癌行肝移植术患者28例,肝硬化行肝移植术患者28例,其中男47例,女9例,年龄(46±8)岁。所有患者签署知情同意书。

1.2 研究标准

纳入标准:(1)术前诊断且术后病理证实为肝癌患者;(2)术前诊断为乙型病毒性肝炎(乙肝)后肝硬化,术后病理提示结节性肝硬化患者;(3)年龄30~65岁;(4)心肺功能良好,耐受手术;(5)知情同意。

排除标准:(1)酒精性肝病、丙型病毒性肝炎(丙肝)等肝移植患者;(2)年龄小于30岁或者大于65岁;(3)严重心肺并发症,不能耐受手术。

1.3 分组

按照术后肿瘤复发与否,将肝癌肝移植患者(肝癌组,28例)分为复发组(20例)和未复发组(8例),复发组平均术后肿瘤复发时间为22个月;而肝硬化肝移植患者(肝硬化组,28例)作为移植患者体内细胞因子变化的基础水平参考。各组患者的性别、年龄、排斥反应等基线指标差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$)。

1.4 干预方案及随访方法

所有患者术后即开始随访,术后2~3d开始口服免疫抑制剂,方案为他克莫司(FK506)和吗替麦考酚酯(MMF),术后1个月逐渐撤除FK506,由西罗莫司替代;术中给予甲泼尼龙500mg,术后小剂量甲泼尼龙治疗,1周停药;肝癌肝移植组术后1d开始应用胸腺法新及槐耳颗粒(胸腺法新用法:先连续皮下注射10d,每次1.6mg,每日1次,以后每周2次;槐耳颗粒:每次20g,每日3次);肝硬化组采用西罗莫司+MMF方案。所有入组患者均随访至少24个月,随访期间无失访、死亡、退出等情况。

1.5 实验方法

以各组患者术后2~3年血清作为研究样本,采用酶链免疫吸附试验(ELISA)对血管内皮生长因子(VEGF)、白细胞介素(IL)-2、IL-10、IL-12、转化生长因子(TGF)- β 、干扰素(IFN)- γ 进行分析;采用流式细胞术对Treg%进行分析。

1.6 统计学方法

采用SPSS 15.0软件进行统计学分析。数据以均数±标准差表示,两组间比较采用Student *t* 检验分析,多组间比较采用方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

各组患者术后血清调节性细胞因子水平的比较见表1。与肝硬化组比较,未复发组的IFN- γ 、IL-12水平明显升高(均为 $P<0.05$),而Treg%、VEGF、IL-2、IL-10、TGF- β 水平,两组比较差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$);复发组的Treg%、VEGF、IFN- γ 、IL-10、TGF- β 水平均明显升高(均为 $P<0.05$),IL-2和IL-12水平均明显降低(均为 $P<0.05$)。与未复发组比较,复发组的Treg%、VEGF、IL-10、TGF- β 水平均明显升高(均为 $P<0.05$),IFN- γ 、IL-2、IL-12水平均明显降低(均为 $P<0.05$)。

3 讨论

大量研究提示,高水平表达Foxp3⁺的Treg与肝癌的发生、复发及临床预后有密切的关系^[1]。Treg与效应性T细胞间的平衡决定机体对肿瘤的免疫反应。在肿瘤免疫中,Treg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,通

表 1 各组患者移植术后血清调节性细胞因子水平的比较

Table 1 Comparison of regulatory cytokine levels in each group of patients after transplantation

组别	n	Treg (%)	VEGF (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)	IL-10 (ng/L)	IL-12 (ng/L)	TGF- β (ng/L)
肝癌组								
未复发组	8	12.6 \pm 4.4	186 \pm 27	331 \pm 95 ^a	232 \pm 39	33 \pm 10	14.1 \pm 2.4 ^a	73 \pm 29
复发组	20	23.6 \pm 6.3 ^{a,b}	361 \pm 51 ^{a,b}	90 \pm 10 ^{a,b}	157 \pm 24 ^{a,b}	111 \pm 5 ^{a,b}	2.3 \pm 0.6 ^{a,b}	190 \pm 17 ^{a,b}
肝硬化组	28	8.9 \pm 3.1	255 \pm 41	74 \pm 11	286 \pm 43	64 \pm 17	6.3 \pm 0.7	121 \pm 36

注: 与肝硬化组比较, ^a $P < 0.05$; 与未复发组比较, ^b $P < 0.05$

过直接或间接作用方式抑制 CD4⁺ 和 CD8⁺ 效应性 T 细胞的活化、增殖及细胞因子的分泌, 同时通过削弱机体抗肿瘤免疫力或自体对肿瘤细胞抗原的无应答, 使肿瘤细胞逃避机体的免疫监视, 达到促进肿瘤的生长和增殖的效应^[2-3]。

我中心早期的临床研究提示, 以西罗莫司、胸腺法新、槐耳颗粒为基础的联合免疫在预防晚期肝癌肝移植术后肿瘤复发有显著疗效, 能延缓肿瘤的复发, 延长患者的生存时间^[4]; 此外还发现 Foxp3⁺ Treg 与肝癌肝移植术后肿瘤复发的关系密切, 对超加州大学旧金山分校 (UCSF) 标准的肝癌肝移植患者术后 Foxp3⁺ Treg 越高, 提示复发风险越大, 联合检测甲胎蛋白 (AFP) 有助于早期发现肿瘤复发^[5]。Treg 作为当前移植免疫与肿瘤免疫的研究热点, 研究西罗莫司为主的联合免疫治疗对 Treg 的作用影响, 及其分泌的抑制性细胞因子的作用对预防肝癌肝移植术后肿瘤复发具有促进意义。

众所周知, 诱导型 Treg 主要通过分泌 IL-10 及 TGF- β 等细胞因子发挥免疫抑制作用^[6-7]。IL-10 是一种由辅助性 T (T helper, Th) 2 细胞亚群分泌的抑制性细胞因子, 具有减少抗原特异性 T 细胞的数量, 抑制炎症发生的作用。当机体促炎因子与抑炎因子被某种因素打破时, 可引起机体的免疫紊乱, 原癌基因活化, 导致肿瘤的发生与发展^[8-10]。TGF- β 是一种具有多种功能的细胞因子, 在癌症发展的过程中起重要作用, 通过抑制效应细胞及细胞因子的产生, 促进肿瘤细胞增殖、血管生成、抑制机体的抗炎反应使肿瘤细胞发生、发展^[11-12]。进一步说明, 两者作为抗炎因子通过共同作用, 抑制一氧化氮 (NO) 的产生, 而干扰 IFN- γ 对巨噬细胞的活化, 影响机体的炎症反应^[13-14]。VEGF 是一种促血管生成促进因子, 通过阻断其相应的受体及因子可抑制肿瘤血管生成, 从而抑制肿瘤生长^[15]。

此外, IL-10 及 TGF- β 细胞因子在一定程度上也可诱导 Treg 的分化, 两者相互作用, 使机体对肿瘤的逃逸处于失控状态, 导致肿瘤的生长及转移^[16-17]。有研究通过对肝癌患者肿瘤组织及瘤周组织分析发现, 其 Treg 含量明显高于正常组织, 且与肿瘤的生长关系密切, 通过对 CD4⁺ 及 CD8⁺ T 细胞的抑制, 使免疫功能处于免疫抑制状态, Treg% 与肿瘤的恶性程度也呈正相关性^[18]。

在我们之前的研究中发现, 以西罗莫司为主的联合免疫治疗可以显著延长患者的生存时间, 降低肝癌肝移植术后患者 (未复发) Treg 的水平, 而在肝癌肝移植复发患者其水平显著升高。与肝移植患者的基础水平相比, 对于长期生存无复发的肝癌肝移植患者 IFN- γ 、IL-12 的水平显著升高, 而抑制性细胞因子如 IL-10、TGF- β 却无明显的变化; 而复发患者 IFN- γ 、IL-12 水平降低, IL-10、TGF- β 却呈现相反的变化 (均为 $P < 0.05$), 且与肿瘤生长相关的 VEGF 也明显升高 (均为 $P < 0.05$)。因此, 我们认为西罗莫司为主的联合免疫治疗可降低肝癌肝移植患者外周抑制性细胞因子 IL-10、TGF- β 水平, 维持在与普通肝移植患者相一致的水平, 且可提高机体的细胞免疫水平, 表现在 IFN- γ 、IL-12 水平升高。

Treg 与抑制性细胞因子 IL-10 和 TGF- β 以相互促进的通路模式不断促进肿瘤的生长和增殖, 且可影响 IFN- γ 、IL-12 等效应性细胞因子的分泌, 而本研究认为, 联合免疫治疗不仅可以使肝癌肝移植患者的 Treg 维持在较低水平, 同时降低 IL-10 和 TGF- β 表达, 并进一步增强 IFN- γ 、IL-12 等效应性细胞因子表达, 增强机体的抗肿瘤免疫, 监视肿瘤的复发。定期检测肝移植术后患者外周血中 Treg、IFN- γ 、IL-12、VEGF、IL-2、IL-10、TGF- β 的表达水平变化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具有重要的理论和临床意义。然而,本研究所纳入的病例数有限且为单中心研究,有待于随机对照研究进一步证实。

参考文献:

- [1] Ozgur HH, Ercetin AP, Eliyatkin N, et al. Regulatory T cells and their prognostic value in hepatopancreatobiliary tumours [J]. *Hepatogastroenterology*, 2014, 61 (135): 1847-1851.
- [2] Chen X, Du Y, Huang Z. CD4⁺ CD25⁺ Treg derived from hepatocellular carcinoma mice inhibits tumor immunity [J]. *Immunol Lett*, 2012, 148 (1): 83-89.
- [3] Ligocki AJ, Niederkorn JY. Advances on non-CD4⁺ Foxp3⁺ T regulatory cells: CD8⁺, type 1, and double negative T regulatory cells in organ transplantation [J]. *Transplantation*, 2015, 99 (8): 1553-1559.
- [4] 杜国盛, 周林, 石炳毅, 等. 三联抗肿瘤疗法预防晚期原发性肝癌肝移植术后肿瘤复发的临床研究 [J]. *器官移植*, 2014, 5 (2): 74-77.
Du GS, Zhou L, Shi BY, et al. Clinical study of triple anti-tumor therapy for preventing tumor recurrence of terminal primary liver cancer after liver transplantation [J]. *Organ Transplant*, 2014, 5 (2): 74-77.
- [5] 杜国盛, 周林, 朱志东, 等. Foxp3⁺ 调节性 T 细胞与肝癌肝移植患者术后肿瘤复发关系的研究 [J]. *器官移植*, 2015, 6 (5): 310-315.
Du GS, Zhou L, Zhu ZD, et al. Research on the relationship between Foxp3⁺ regulatory T cell and tumor recurrence of patients after liver transplantation for hepatocellular carcinoma [J]. *Organ Transplant*, 2015, 6 (5): 310-315.
- [6] Chen X, Du Y, Lin X, et al. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in tumor immunity [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 34: 244-249.
- [7] Teh PP, Vasanthakumar A, Kallies A, et al. Development and function of effector regulatory T cells [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2015, 136: 155-174.
- [8] Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens [J]. *World Allergy Organ J*, 2015, 8 (1): 17.
- [9] Hall BM. T cells: soldiers and spies—the surveillance and control of effector T cells by regulatory T cells [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015, 10 (11): 2050-2064.
- [10] Li L, Yang C, Zhao Z, et al. Skewed T-helper (Th) 1/2- and Th17/T regulatory cell balances in patients with renal cell carcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11 (2): 947-953.
- [11] Askar M. T helper subsets & regulatory T cells: rethinking the paradigm in the clinical context of solid organ transplantation [J]. *Int J Immunogenet*, 2014, 41 (3): 185-194.
- [12] Liu KS, Fan XQ, Zhang L, et al. Effects of recombinant human interleukin-10 on Treg cells, IL-10 and TGF- β in transplantation of rabbit skin [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9 (2): 639-644.
- [13] Metidji A, Rieder SA, Glass DD, et al. IFN- α/β receptor signaling promotes regulatory T cell development and function under stress conditions [J]. *J Immunol*, 2015, 194 (9): 4265-4276.
- [14] Vahl JC, Drees C, Heger K, et al. Continuous T cell receptor signals maintain a functional regulatory T cell pool [J]. *Immunity*, 2014, 41 (5): 722-736.
- [15] Zhao Y, Wu T, Shao S, et al. Phenotype, development, and biological function of myeloid-derived suppressor cells [J]. *Oncoimmunology*, 2015, 5 (2): e1004983.
- [16] Wang Y, Liu T, Tang W, et al. Hepatocellular carcinoma cells induce regulatory T Cells and lead to poor prognosis via production of transforming growth factor- β 1 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38 (1): 306-318.
- [17] Pandiyan P, Zhu J. Origin and functions of pro-inflammatory cytokine producing Foxp3⁺ regulatory T cells [J]. *Cytokine*, 2015, 76 (1): 13-24.
- [18] 张志强, 贺杰峰, 张瑜, 等. 大鼠肝癌免疫微环境中 Treg 与 IL-10 水平的变化及意义 [J]. *当代医学*, 2014, 20 (4): 18-19.
Zhang ZQ, He JF, Zhang Y, et al. The change and significance of the levels of Treg and IL-10 in immune microenvironment of rat with liver cancer [J]. *Contemp Med*, 2014, 20 (4): 18-19.

(收稿日期: 2016-05-20)

(本文编辑: 邬加佳 朱佩玲)