

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.16.017

原发性肝癌患者肿瘤转移与 T 细胞亚群及其细胞因子的相关性分析

胡丛岗, 汤国军, 王建军, 童 骏
(金华广福医院胃肠外科, 浙江金华 321000)

[摘要] **目的** 探讨原发性肝癌患者肿瘤转移与 T 细胞亚群及其细胞因子的相关性。**方法** 2014 年 1 月至 2016 年 1 月前瞻性收集原发性肝癌患者 97 例, 根据患者是否发生转移, 将患者分为转移组和非转移组, 其中转移组 38 例, 非转移组 59 例。所有患者均取得手术标本, 使用流式细胞仪测定肝癌组织、癌旁组织和外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞比例, 同时使用酶联免疫吸附试验测定外周血中白细胞介素(IL)-6、IL-10、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和 γ-干扰素(IFN-γ)水平。**结果** 与非转移组相比, 转移组患者肝癌组织中 CD4⁺ T 细胞比例显著升高($P=0.002$); CD8⁺ T 细胞显著降低($P=0.015$)。两组患者癌旁组织中 CD4⁺ T 细胞比例差异无统计学意义($P=0.328$)。转移组患者癌旁组织中 CD8⁺ T 细胞比例显著高于非转移组($P=0.021$)。两组患者外周血中 CD8⁺ T 细胞比例差异无统计学意义($P=0.362$)。转移组患者外周血 CD4⁺ T 细胞比例显著低于非转移组($P=0.032$)。与非转移组比较, 转移组患者外周血 IL-6 水平显著降低($P=0.012$); IL-10 水平显著升高($P=0.006$); TNF-α 水平显著降低($P=0.000$); IFN-γ 水平显著降低($P=0.035$)。**结论** 原发性肝癌患者肿瘤转移存在明显的 T 细胞亚群和细胞因子平衡失调。

[关键词] 原发性肝癌; 肿瘤转移; T 细胞亚群; 细胞因子; 免疫抑制

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)16-2215-03

Relationship between tumor metastasis with T cell subsets and cytokines in patients with primary hepatocellular carcinoma
Hu Conggang, Tang Guojun, Wang Jianjun, Tong Qin
(Department of Gastrointestinal Surgery, Jinhua Guangfu Hospital, Jinhua, Zhejiang 321000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation between tumor metastasis with T cell subsets and cytokines in the patients with primary hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Ninety-seven cases of primary HCC were prospectively collected from January 2014 to January 2016 and assigned into the metastasis group (38 cases) and non-metastasis group (59 cases) according to whether suffering from metastasis. Surgical specimens were obtained from all patients and flow cytometry was used to detect the CD4⁺, CD8⁺ T cell proportion in HCC tissue, paracancerous tissues and peripheral blood. Moreover, ELISA was adopted to detect the peripheral blood IL-6, IL-10, TNF-α and IFN-γ levels. **Results** Compared with the non-metastasis group, the CD4⁺ T cell proportion of HCC tissue in the metastasis group was significantly increased ($P=0.02$), while the CD8⁺ T cells were significantly decreased ($P=0.015$). There was no statistical difference in CD4⁺ T cells proportion in the paracancerous tissue between the two groups ($P=0.328$). However the CD8⁺ T cells proportion of paracancerous tissue in the metastasis group was significantly higher than that in the non-metastasis group ($P=0.021$). There was no statistically significant difference in the proportion of CD8⁺ T cells in peripheral blood of the two groups ($P=0.362$). The proportion of CD4⁺ T cells in peripheral blood of the metastatic group was significantly lower than that in non-metastasis group ($P=0.032$). When compared with non-metastasis group, the metastasis group got a decreased level of peripheral blood IL-6 ($P=0.012$); while the IL-10 level was significantly increased ($P=0.006$); the TNF-α level and IFN-γ level were significantly decreased ($P=0.000$, $P=0.035$). **Conclusion** The patients with primary HCC have obvious T cell subsets and cytokines imbalance.

[Key words] primary liver cancer; tumor metastasis; T cell subsets; cytokines; immune suppression

我国乙型肝炎发生率较高, 长期慢性的乙型肝炎病毒感染可导致肝硬化, 进而可导致肝癌^[1-2]。另外, 由于嗜酒人群得不到有效控制, 酒精性肝硬化等导致的肝癌也较为常见^[3]。目前, 肝癌是中老年患者最常见的恶性肿瘤之一, 早期即可肝内转移、肝门转移、远处转移^[4-6]。转移是肝癌患者临床预后的决定性因素。因此探讨原发性肝癌患者肿瘤转移的相关因素具有十分重要的意义。免疫系统失衡在肿瘤的发生和发展中具有十分重要的临床意义。目前在其他肿瘤的研究中已证实肿瘤患者存在免疫抑制, 主要表现为 Th1/Th2 细胞功能失衡^[7-9]。为探讨免疫系统在原发性肝癌患者中的作用, 2013 年林泽伟等^[10]研究发现肝癌组织中、癌旁正常组织和健康肝组织中 CD3⁺ CD4⁺ T 细胞占浸润淋巴细胞的比例分别为 (22.31±3.68)%、(10.69±2.47)% 和 (4.21±4.26)%, 差异有统计学意义($P=0.000$), 而 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞占浸润淋巴细胞的比例分别为 (26.10±5.82)%、(21.82±2.70)% 和

(41.31±14.01)%, 差异有统计学意义($P=0.000$)。CD8⁺ T 细胞是抗肿瘤免疫反应中重要的效应细胞, 受炎性因子刺激可分化成细胞毒性 T 淋巴细胞, 进而介导肿瘤细胞的杀伤作用^[11-12]。在肝癌组织中 CD8⁺ T 细胞水平减低, 表明其杀伤作用降低, 有利于肿瘤细胞的生长和转移。而 CD4⁺ T 细胞可分化为调节性 T 细胞, 介导肿瘤细胞的免疫耐受^[13-15]。因此肝癌组织中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞平衡的失调可能参与了肝癌细胞的生长和转移。上述研究证实了原发性肝癌的发生与免疫抑制相关, 但是免疫抑制与肝癌细胞转移的关系如何, 相关研究缺乏。本研究旨在探讨原发性肝癌患者肿瘤细胞转移与 T 细胞亚群及其细胞因子的关联性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 1 月至 2016 年 1 月前瞻性收集本院收治的原发性肝癌患者, 纳入标准: (1) 原发性肝癌; (2) 可获取手术病理标本; (3) 年龄大于或等于 18 岁且小于或等于 65 岁;

(4)同意参与本研究。排除标准:(1)复发性肝癌;(2)转移性肝癌;(3)心、脑、肺、肾等脏器功能不全;(4)合并急性或慢性感染;(5)合并其他恶性肿瘤;(6)原发性免疫功能缺陷;(7)血液系统或内分泌系统疾病;(8)甲状腺功能异常;(9)原发性肝癌多中心发病灶(各瘤灶相对独立、周围包括高分化区域或存在高分化向低分化过渡的区域或多发瘤灶间瘤细胞亚型不同,对于不能区分的肝癌多中心发病灶和肝内转移病灶给予排除);(10)不配合治疗。研究期间,根据纳入标准和排除标准,共纳入原发性肝癌患者 97 例,根据入院时患者是否发生肝癌转移,将患者分为转移组(合并有肝内、肝门或远处转移,对于肝内转移的患者,肝内转移的诊断要点:肝内多发病灶、瘤灶与门静脉瘤栓相连、较大瘤灶周围伴随多发的卫星病灶或体积较小的实体瘤病灶与体积较大的实体瘤病灶位置接近,组织学特征相似)和非转移组(肝内单结节病灶,经病理确诊为原发性肝癌),其中转移组 38 例,非转移组 59 例。转移组男 21 例,女 17 例,年龄 35~65 岁,平均(51.82±8.92)岁,21 例合并肝内转移,18 例合并肝门转移,7 例合并远处转移(其中 8 例为多处转移);非转移组男 34 例,女 25 例,年龄 37~64 岁,平均(50.88±8.12)岁,无患者发生肝内、肝门或远处转移。两组患者的性别和年龄等差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究中所有患者均知情同意并签署知情同意书,本研究通过本院伦理委员会批准。

1.2 数据收集 观察指标包括肝癌组织中、癌旁组织和外周血中 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞,及外周血中白细胞介素(IL)-6、IL-10、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)和 γ-干扰素(IFN-γ)。

1.3 检测方法 (1)肝癌组织和肝癌旁组织 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞:术中留取肝癌组织和肝癌旁组织标本(距离肿瘤组织大于或等于 5 cm),将标本置于培养皿中,使用 0.9%的氯化钠溶液冲洗标本,取新鲜的组织标本,用组织剪将标本剪成 1 mm³ 左右的组织块,酶消化后用 PBS 溶液反复冲洗,留取细胞悬液,再低速离心除去细胞团及碎片。使用离心机(2 000 r/min)离心细胞悬液 10 min,取细胞沉淀并将其混浴 PBS 溶液中,使用密度梯度离心法将淋巴细胞分离。PBS 溶液再次洗涤淋巴细胞,并在室温下离心。定容后计入单克隆抗体,室内常温下反应 30 min,60 min 内进行流式细胞检测,仪器:Epics XL 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。(2)外周血 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞:抽取患者静脉血 5 mL,留存在乙二胺四乙酸二钠试管中,加入单克隆抗体后室温下避光反应 30 min 后进行流式细胞仪检测,仪器:Epics XL 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。(3)外周血中 IL-6、IL-10、TNF-α 和 IFN-γ:抽取患者静脉血 5 mL,3 000 r/min 离心后取上层血清置于-20 ℃的冷柜中保存待检,使用 ELISA 法检测 IL-6、IL-10、TNF-α 和 IFN-γ,ELISA 试剂盒购自江苏菲亚生物科技有限公司。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 t 检验;计数资料以率表示,比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组患者肝癌组织中 T 细胞亚群分析 与非转移组相比,转移组患者肝癌组织中 CD4⁺ T 细胞比例显著升高[(24.67±4.82)% vs. (19.83±3.27)%, $P=0.002$];CD8⁺ T 细胞显著降低[(20.82±3.08)% vs. (24.76±2.88)%, $P=0.015$]。

2.2 两组患者癌旁组织 T 细胞亚群分析 两组患者癌旁组织中 CD4⁺ T 细胞比例差异无统计学意义[(11.99±2.48)% vs. (11.32±1.98)%, $P=0.328$]。转移组患者癌旁组织中

CD8⁺ T 细胞比例显著高于非转移组[(18.83±4.25)% vs. (21.45±4.82)%, $P=0.021$]。

2.3 外周血中 T 细胞亚群分析 两组患者外周血中 CD8⁺ T 细胞比例差异无统计学意义[(29.33±4.74)% vs. (30.03±3.89)%, $P=0.362$]。转移组患者外周血 CD4⁺ T 细胞比例显著低于非转移组[(24.56±3.24)% vs. (28.76±4.12)%, $P=0.032$]。

2.4 两组患者外周血细胞因子水平比较 与非转移组比较,转移组患者 IL-6 水平显著降低($P=0.012$);IL-10 水平显著升高($P=0.006$);TNF-α 水平显著降低($P=0.000$);IFN-γ 显著降低($P=0.035$)。见表 1。

表 1 两组患者外周血细胞因子水平比较($\bar{x} \pm s$, ng/L)					
组别	<i>n</i>	IL-6	IL-10	TNF-α	IFN-γ
转移组	38	22.45±5.29	44.82±15.62	8.89±2.14	8.12±1.88
非转移组	59	25.48±4.35	39.58±9.83	10.08±3.18	9.43±2.06
<i>t</i>		3.274	3.638	3.873	2.586
<i>P</i>		0.012	0.006	0.000	0.035

3 讨 论

免疫系统介导的细胞免疫在机体对抗肿瘤细胞中起到一个关键作用。肿瘤组织中淋巴细胞的浸润有助于限制肿瘤细胞生长及转移,进而改善患者临床预后。2016 年 Sobottka 等^[16]研究显示乳腺癌组织中淋巴细胞浸润有助于降低患者肿瘤细胞转移风险。同一年 Romero 等^[17]研究同样证实了淋巴细胞浸润在非小细胞肺癌中的作用。目前,关于原发性肝癌患者组织中淋巴细胞浸润情况、癌旁组织中淋巴细胞浸润情况、外周血中 T 细胞亚群及其细胞因子变化与肿瘤细胞转移的关联性尚不清楚,且相关研究缺乏,因此笔者设计了本研究。CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞是 T 淋巴细胞的主要亚群,其水平可以较好地反映患者体内免疫状态。机体对肿瘤细胞的免疫应答,主要通过 CD8⁺ T 细胞,可以产生 IFN-γ,提高机体对肿瘤细胞的杀伤作用^[12,18]。本研究显示转移组 IFN-γ 水平降低,肿瘤组织和癌旁组织中 CD8⁺ T 细胞水平降低,表明原发性肝癌合并肿瘤细胞转移的患者对肿瘤细胞的杀伤作用较低,其可能介导了肿瘤细胞的转移。另外 IL-10 主要由 Th2 细胞分泌,可以抑制 CD4⁺ T 细胞向 Th1 漂移,进而促进 Th1/Th2 细胞免疫向 Th2 免疫漂移,进而介导患者的免疫抑制^[19-21]。本研究中转移组患者 IL-10 水平升高,表明 CD4⁺ T 细胞更倾向于向 Th2 细胞分化,进而促进肝癌细胞的生长和转移。值得注意的是,本研究显示转移组肝癌组织中 CD4⁺ T 细胞水平升高,而外周血中 CD4⁺ T 细胞水平下降。肿瘤组织中 CD4⁺ T 细胞可以在 IL-10 等炎性因子的作用下,分化为 Treg 细胞,Treg 细胞升高是肿瘤免疫耐受的重要基础^[22-23]。外周血中 CD4⁺ T 细胞降低,结合其他细胞因子的结果,表明 Th1/Th2 细胞免疫失衡不仅表现为细胞免疫向 Th2 漂移,还表现为 Th1/Th2 细胞免疫能力整体降低。另外,IL-6 和 TNF-α 均是促炎因子。如 IL-6 由纤维母细胞、单核/巨噬细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、上皮细胞等多种炎性细胞产生,刺激参与免疫反应的细胞增殖、分化并提高其免疫功能,其水平降低与免疫抑制有关^[24-25]。本研究显示转移组患者 IL-6 和 TNF-α 水平均降低,从另一方面证实了免疫抑制在原发性肝癌患者转移中的作用。

综上所述,原发性肝癌患者肿瘤转移存在明显的 T 细胞亚群和细胞因子平衡失调。

参考文献

[1] Yamashita T, Nault JC. Stemness of liver cancer: From

- hepatitis B virus to Wnt activation[J]. *J Hepatol*, 2016, 65(5):873-875.
- [2] Chassagne F, Rojas Rojas T, Bertani S, et al. A 13-year retrospective study on primary liver cancer in cambodia: a strikingly high hepatitis C occurrence among hepatocellular carcinoma cases[J]. *Oncology*, 2016, 91(2):106-116.
- [3] Liang T, Vuppalanchi R, Williams KE, et al. Differential expression of miRNAs in non-tumor liver tissue of patients with hepatocellular cancer due to non-alcoholic steatohepatitis cirrhosis[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2016, 12(8):881-889.
- [4] Swaid F, Downs D, Rosemurgy AS. A practical approach to liver metastasis from unknown primary cancer; what surgeons need to know[J]. *Cancer Genet*, 2016, 21(8):3482-3491.
- [5] Margonis GA, Buettner S, Sasaki K, et al. The role of liver-directed surgery in patients with hepatic metastasis from primary breast cancer; a multi-institutional analysis[J]. *HPB (Oxford)*, 2016, 18(8):700-705.
- [6] Onstenk W, Sieuwerts AM, Mostert B, et al. Molecular characteristics of circulating tumor cells resemble the liver metastasis more closely than the primary tumor in metastatic colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 28(12):994-1002.
- [7] Nunez C, Lozada-Requena I, Ysmodes T, et al. Immunomodulation of *Uncaria tomentosa* over dendritic cells, il-12 and profile TH1/TH2/TH17 in breast cancer[J]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 2015, 32(4):643-651.
- [8] Kiyomi A, Makita M, Ozeki T, et al. Characterization and clinical implication of Th1/Th2/Th17 cytokines produced from three-dimensionally cultured tumor tissues resected from breast cancer patients[J]. *Transl Oncol*, 2015, 8(4):318-326.
- [9] Ma J, Liu H, Wang X. Effect of ginseng polysaccharides and dendritic cells on the balance of Th1/Th2 T helper cells in patients with non-small cell lung cancer[J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34(6):641-645.
- [10] 林泽伟, 骆必伟, 袁晓东, 等. 原发性肝癌患者肿瘤浸润 T 淋巴细胞亚群分析[J]. *中国现代普通外科进展*, 2013, 16(07):523-526.
- [11] Huang J, Xiao L, Gong X, et al. Cytokine-like molecule CCDC134 contributes to CD8⁺ T-cell effector functions in cancer immunotherapy[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(20):5734-5745.
- [12] Yuan CH, Yang XQ, Zhu CL, et al. Interleukin-7 enhances the in vivo anti-tumor activity of tumor-reactive CD8⁺ T cells with induction of IFN-gamma in a murine breast cancer model[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(1):265-271.
- [13] 钟武, 江志远, 钟世彪, 等. 结直肠癌肿瘤组织中 LAP⁺ CD4⁺ T 淋巴细胞的表型特征分析[J]. *中华肿瘤杂志*, 2016, 38(8):596-601.
- [14] Valmori D, Ayyoub M. CD4⁺ T helper cell responses to NY-ESO-1 tumor antigen in ovarian cancer resist perversion into immunosuppressive Tregs[J]. *Oncoimmunology*, 2015, 4(12):946-952.
- [15] Razmkhah M, Abedi N, Hosseini A, et al. Induction of T regulatory subsets from naive CD4⁺ T cells after exposure to breast cancer adipose derived stem cells[J]. *Iran J Immunol*, 2015, 12(1):1-15.
- [16] Sobottka B, Pestalozzi B, Fink D, et al. Similar lymphocytic infiltration pattern in primary breast cancer and their corresponding distant metastases[J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(6):208-215.
- [17] Romero VL. Tumor lymphocytic infiltration in non-small cell lung cancer; the ultimate prognostic marker? [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2016, 5(4):370-372.
- [18] Mumm JB, Oft M. Pegylated IL-10 induces cancer immunity; the surprising role of IL-10 as a potent inducer of IFN-gamma-mediated CD8⁺ T cell cytotoxicity[J]. *Bioessays*, 2013, 35(7):623-631.
- [19] Xue H, Lin F, Tan H, et al. Overrepresentation of IL-10-expressing B cells suppresses cytotoxic CD4⁺ T cell activity in HBV-induced hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5):4815-4821.
- [20] Zhou X, Su YX, Lao XM, et al. CD19⁺ IL-10⁺ regulatory B cells affect survival of tongue squamous cell carcinoma patients and induce resting CD4⁺ T cells to CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells[J]. *Oral Oncol*, 2016, 53(4):27-35.
- [21] Wang L, Liu JQ, Talebian F, et al. IL-10 enhances CTL-mediated tumor rejection by inhibiting highly suppressive CD4⁺ T cells and promoting CTL persistence in a murine model of plasmacytoma [J]. *Oncoimmunology*, 2015, 4(7):232-239.
- [22] Ayyoub M, Pignon P, Classe JM, et al. CD4⁺ T effectors specific for the tumor antigen NY-ESO-1 are highly enriched at ovarian cancer sites and coexist with, but are distinct from, tumor-associated Treg[J]. *Cancer Immunol Res*, 2013, 1(5):303-308.
- [23] Mandapathil M, Szczepanski M, Harasymczuk M, et al. CD26 expression and adenosine deaminase activity in regulatory T cells (Treg) and CD4⁺ T effector cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1(5):659-669.
- [24] Ohno Y, Kitamura H, Takahashi N, et al. IL-6 down-regulates HLA class II expression and IL-12 production of human dendritic cells to impair activation of antigen-specific CD4⁺ T cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2016, 65(2):193-204.
- [25] Narita Y, Kitamura H, Wakita D, et al. The key role of IL-6-arginase cascade for inducing dendritic cell-dependent CD4⁺ T cell dysfunction in tumor-bearing mice[J]. *J Immunol*, 2013, 190(2):812-820.