

文章编号:1005-6947(2007)07-0690-03

· 简要论著 ·

CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞在肝癌微环境中的分布状况与局部免疫状态的关系

陈中¹, 倪家连¹, 刘鲁岳¹, 晏建军², 黄亮², 严以群²

(1. 济南军区总医院 肝胆外科, 山东 济南 250031; 2. 东方肝胆外科医院 肝外一科, 上海 200438)

摘要:笔者对 52 例肝癌组织和癌旁组织用 CD4 和 CD25 双重酶标免疫组化染色标记 Treg 和 CD4⁺ T 细胞,对 20 例肝癌组织和癌旁组织用 CD8EnVision 法染色标记 CD8⁺ T 细胞,光镜下计数阳性细胞,对癌组织中 Treg 细胞和 CD4⁺ T, CD8⁺ T 及 CD4⁺ T/CD8⁺ T 值进行相关性分析,并用正常肝组织作对照。结果显示 8 例正常肝组织中未发现 Treg 细胞。52 例肝癌、癌旁组织中 Treg 细胞单个高倍视野平均数分别为 7.6308 ± 2.8368 和 5.1654 ± 1.6718 ($P=0.000$);肝癌中 Treg 细胞数目与肿瘤大小、有无子灶、有无癌栓及肿瘤临床病理分期有关,组间差异有显著性 ($P < 0.05$),而与患者年龄、性别、有无肝硬化、术前 AFP 浓度、肿瘤有无包膜及肿瘤 Edmondson 分级无明显关系(均 $P > 0.05$);肝癌中 Treg 细胞数量与其浸润性 CD4⁺ T 淋巴细胞的数量以及 CD4⁺ T/CD8⁺ T 值呈显著负相关 ($r = -0.539$, $P=0.014$; $r = -0.545$, $P=0.000$),而与浸润性 CD8⁺ T 淋巴细胞的数量分布无关 ($r = -0.403$, $P=0.078$)。提示肝癌微环境中的 Treg 细胞可能通过抑制肿瘤局部免疫,使肿瘤细胞逃避免疫监视,促进肿瘤的进展以及侵袭或转移;肝癌组织中的 Treg 细胞数量可能作为判断肝细胞癌预后的指标之一。

[中国普通外科杂志,2007,16(7):690-692]

关键词: 肝肿瘤; CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞; 免疫组化

中图分类号: R735.7

文献标识码: B

肝癌患者免疫功能低下,特别是局部免疫微环境异常,导致机体免疫防御反应不能有效地进行是肝癌产生免疫逃逸、容易转移复发的重要因素。虽然肝癌免疫研究已取得了一定进展,但对肝癌细胞是如何诱导免疫耐受并逃避免疫监视的确切机制尚未充分了解。Treg 细胞是 CD4⁺ T 细胞的一个重要亚群,在调节肿瘤免疫方面发挥重要作用。因此,其数量或功能的变化,都有可能影响肝癌微环境的免疫功能,从而影响肝癌进展、预后及转归。本实验通过双重酶标免疫组化的方法,检测肝癌、癌旁组织及正常肝脏组织中 Treg 细胞,分析肝癌微环境中 Treg 细胞分布与其浸润性 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 淋巴细胞的数量以及 CD4⁺ T/CD8⁺ T 值的变化,借以阐明 Treg 细胞的数量与肝癌局部免疫微环境免疫状态的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集东方肝胆外科医院 2004 年 12 月—2005 年 5 月手术患者经病理学检查证实为肝细胞癌标本 52 例(包括肝癌组织以及癌旁组织)。癌旁组织取材时为距癌结节边缘 2 cm 以外肝组织;避开坏死区。患者术前均未接受任何化疗及其他治疗。男 42 例,女 10 例,年龄 29 ~ 71 (平均 49.2)岁。14 例有血管癌栓(包括肉眼及镜下癌栓),19 例肝内有子灶,27 例有完整包膜,25 例包膜不完整或无包膜;小肝癌 (≤ 5 cm) 25 例,大肝癌 (> 5 cm) 27 例;术前甲胎蛋白阳性 ($> 20 \mu\text{g/L}$) 38 例,阴性 14 例;伴有肝硬化 25 例,无肝硬化 27 例。HCC 的 Edmondson 分级: I 级及 II 级 9 例, III 级及 IV 级 43 例。按国际 TNM 分期: I 期 18 例, II 期 22 例, III 期 12 例。正常肝组织组: 8 例,取自肝血管瘤、肝囊肿的周围正常肝组织;男 3 例,女 5 例,年龄 27 ~ 57 (平均 42.4)岁。所有对象均无糖尿病、类风湿、甲状腺功能亢进等自身免疫性疾病史以及免疫治疗史。

收稿日期:2007-01-14; **修订日期:**2007-06-29。

作者简介:陈中,男,安徽桐城人,济南军区总医院主治医师,主要从事肝癌的基础与临床方面的研究。

通讯作者:陈中 E-mail:zhongchen01@163.com

1.2 检测项目

对52例肝癌组织和癌旁组织用CD4和CD25双重酶标免疫组化染色标记Treg和CD4⁺T细胞,对20例肝癌组织和癌旁组织用CD8EnVision法染色标记CD8⁺T细胞,光镜下计数阳性细胞,对癌组织中Treg细胞和CD4⁺T,CD8⁺T及CD4⁺T/CD8⁺T值进行相关性分析,并用正常肝组织作对照。

1.3 主要试剂

小鼠抗人CD4单克隆抗体(DAKO公司生产),使用时稀释为1:100;小鼠抗人CD25单克隆抗体(DAKO公司生产),使用时稀释为1:200;即用型羊抗小鼠辣根过氧化物酶(HRP)标记的EnVision二抗(DAKO公司生产),生物素化羊抗兔免疫球蛋白G和链酶亲合素标记的碱性磷酸酶,使用时稀释为1:200(Zymed公司生产);小鼠抗人CD8单克隆抗体(DAKO公司生产),使用时稀释为1:100。

1.4 实验方法

1.4.1 双重免疫组化步骤 所有标本经10%福尔马林液固定,常规石蜡包埋,连续切取4μm厚的切片。石蜡切片常规脱蜡至水,磷酸盐缓冲液(PBS)洗3min×3次;抗原修复98℃20min,室温中冷却20min,PBS洗3min×3次;0.3% H₂O₂室温20min,PBS洗3min×3次;CD4(M)1:100 4℃过夜,PBS洗3min×3次;EnVision(M)-HRP试剂37℃30min,PBS洗3min×3次;0.04% DAB-0.03% H₂O₂显色8min,PBS洗3min×3次;20%蛋清孵育抑制内源性生物素,PBS洗3min×3次;CD25(M)1:200 37℃2h,PBS洗3min×3次;生物素化羊抗兔IgG 1:200 37℃30min,PBS洗3min×3次;Streptavidin-AKP 1:200 37℃30min,

PBS洗3min×3次;0.02mol/L pH9.0 TBS洗20min;NBT/BCIP显色30~120min;蒸馏水洗5min;核固红衬染5min,水洗;常规树脂封片。EnVision法标记CD8⁺T淋巴细胞步骤;石蜡切片常规脱蜡至水,PBS洗3min×3次;0.3% H₂O₂抑制内源性过氧化物酶20min,室温;PBS洗3min×3次;PBS-Triton×100洗20min,PBS洗3min×3次;滴加适当稀释一抗湿盒中4℃过夜,37℃1h;PBS洗3min×3次;EnVision试剂37℃30min;PBS洗3min×3次;DAB显色8~12min;苏木素衬染色,热水蓝化;吹干后,树脂封片。

1.4.2 免疫组化结果判定 Treg细胞阳性标准:细胞形态完整,结构清晰,棕黄色和紫蓝色颗粒特异性同时定位于胞浆和胞膜上(棕褐色颗粒)。CD4⁺T和CD8⁺T细胞阳性标准:形态完整,结构清晰,棕黄色阳性颗粒特异性定位于胞浆和胞膜上,采用盲法进行观察先在低倍镜下观察整张切片,随机选择5个高倍视野(400×)计数阳性细胞,求其平均值。

1.5 统计学处理

对Treg细胞的分组计量结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用SPSS 11.0统计软件以非参数检验方法Mann-Whitney T法对数据进行检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有极显著性。

2 结果

2.1 Treg细胞的分布特征

8例正常肝组织中未发现Treg细胞;Treg细胞在肝癌组织的分布显著高于($P < 0.001$)。癌旁组织Treg细胞在癌组织的分布状态与肿瘤大小、血管癌栓癌周灶,TNM分期有关(表1)。

表1 Treg细胞的分布与常用临床指标的关系

分组	例数	$\bar{x} \pm s$	P值	分组	例数	$\bar{x} \pm s$	P值
组织				血管癌栓			
HCC	52	7.6308 ± 2.8368	0.000	有	14	8.1143 ± 2.4487	0.014
癌旁	52	5.1654 ± 1.6718		无	38	7.4526 ± 1.8794	
性别				癌周子灶			
男	42	7.7143 ± 1.8406	0.086	有	19	8.2211 ± 2.4516	0.000
女	10	7.2800 ± 2.7613		无	33	7.2909 ± 1.8217	
年龄(岁)				术前AFP浓度(ng/mL)			
>60	9	7.7111 ± 2.4910	0.981	≥20	38	7.6105 ± 1.8686	0.909
≤60	43	7.6140 ± 1.8959		<20	14	7.6857 ± 2.7715	
肿瘤大小(cm)				Edmondson 分级			
>5	27	8.0815 ± 1.5122	0.000	I, II	9	7.2444 ± 1.7196	0.091
≤5	25	7.1440 ± 1.8535		III, IV	43	7.7116 ± 2.8444	
包膜				TNM分期			
有	27	7.4519 ± 2.7245	0.056	I	18	6.7333 ± 1.5980	0.000
无	25	7.8240 ± 1.9190		II	22	7.8818 ± 2.4171	
肝硬化				III	12	8.5167 ± 2.2480	
有	25	7.7520 ± 1.8471	0.290				
无	27	7.5185 ± 2.8270					

2.2 HCC 中 Treg 的分布与肿瘤浸润性 T 淋巴细胞分布的相关性

HCC 中 Treg 细胞数量与肿瘤浸润性 CD4⁺ T 淋巴细胞数量以及 CD4⁺ T/CD8⁺ T 值呈显著负相关,而与肿瘤浸润性 CD8⁺ T 淋巴细胞数量无明显相关性(表 2)。

表 2 HCC 中 Treg 分布与肿瘤浸润性 T 淋巴细胞分布的相关性

Treg 细胞	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T	CD4 ⁺ T/CD8 ⁺ T 值
<i>r</i>	-0.539	-0.403	-0.545
<i>P</i> 值	0.014	0.078	0.000

3 讨论

研究发现,某些乳腺癌、肺癌、卵巢癌、胆囊癌、胰腺癌、结肠癌等恶性肿瘤患者外周血 Treg 细胞数量明显增多,且其增多的程度与肿瘤的分期和病程相关^[1-4]。Liyanage 等^[2]对胰腺癌和乳腺癌研究发现,Treg 细胞数量在肿瘤局部显著增多。最近 Ormandy 等^[5]报道,肝癌患者外周血 Treg 细胞数量明显增多。本研究发现,正常肝组织中无 Treg 细胞浸润,而在肝癌微环境中 Treg 细胞数量较癌旁组织增多,差异有显著意义;同时随着肿瘤临床分期的进展,Treg 数量增多,差异有统计学意义。因此推测 HCC 组织中浸润 Treg 数量可作为 HCC 患者预后的指标之一。同时显示,侵袭性高或有转移的 HCC 组 Treg 细胞数高于侵袭性低或无转移组,差异有统计学意义。Treg 细胞数量增多与原发肝癌的侵袭转移呈正相关,提示 Treg 细胞可以作为 HCC 侵袭转移的一个指标,可能是 Treg 细胞对肝癌的侵袭转移有促进作用。实验及临床研究证实原发性肝癌患者免疫功能低下^[6],肿瘤患者或模型动物均有继发性的免疫缺陷,且随着肿瘤的生长,机体免疫功能进一步下降。肿瘤发生的早期,机体并无全身性的免疫功能低,而仅表现为肿瘤抗原的耐受;至肿瘤的晚期,才表现出全身性的免疫功能受抑^[7]。本实验显示,小肝癌组织中 Treg 细胞的数量明显少于大肝癌者,差异有统计学意义。这可能是肿瘤晚期,免疫细胞受到抑制的缘故。可以推测,Treg 细胞数量的增多可能是肝癌侵袭转移性升高的因素之一。表明 Treg 细胞在肝癌的局部免疫中取负向免疫调节作用,支持 Treg 细胞对肝癌的侵袭转移具有促进作用。

由于 Treg 细胞的特殊作用,其数量在局部组织中的增多,提示机体局部免疫功能受损,而且随着肿瘤的浸润和转移而迅速增加。证明在恶性肿瘤进展过程中,其对机体免疫系统功能造成持续性损害。因而在以细胞免疫为主的肿瘤免疫中,Treg 处于关键环节;它在肿瘤组织中的浸

润程度代表了机体肿瘤免疫抑制反应的一个方面,在免疫调节中起重要作用。决定免疫反应的最终走向是激活免疫还是诱导耐受。本实验研究发现,肝癌组织中 Treg 细胞数量与 CD4⁺ T 细胞数量以及 CD4⁺ T/CD8⁺ T 的值呈显著负相关,而与 CD8⁺ T 细胞数量无明显相关性。提示 HCC 组织中 Treg 细胞可能通过抑制 CD4⁺ T 细胞的增殖,导致 T 淋巴细胞亚群之间的平衡被破坏。众所周知,CD4⁺ T/CD8⁺ T 值在机体免疫反应及免疫调节中具有重要作用,其变化反映出机体免疫状态的变化,肿瘤组织和癌旁组织的肿瘤浸润淋巴细胞中该比值的下降表明愈接近肿瘤部位细胞免疫受抑制愈明显。因此笔者认为,HCC 局部 Treg 细胞与 TIL 的这种分布特征改变了组织局部免疫微环境,免疫抑制逐渐加重,免疫监视功能减弱,有利于肿瘤细胞增殖。

近年来,肿瘤的免疫治疗包括肿瘤疫苗以及肿瘤浸润淋巴细胞过继免疫治疗已经过大量试验^[8],但其对抗肿瘤作用是有限的。Treg 细胞尤其是肿瘤微环境中数目增多是肿瘤免疫治疗亟待解决的问题之一。研究表明,通过除去机体 Treg 细胞可以提高肿瘤疫苗的抗瘤效应^[9];进一步了解 Treg 细胞调节机制或控制 Treg 细胞增殖的方法可以设计更有效的抗肿瘤免疫疗法。

参考文献:

- [1] Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, *et al.* CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: Possible involvement of regulatory T cells in disease progression [J]. *Cancer*, 2003, 98(5): 1089 - 1099.
- [2] Liyanage UK, Moore TT, Joo H G, *et al.* Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma [J]. *J Immunol*, 2002, 169(5): 2756 - 2761.
- [3] Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, *et al.* Regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer [J]. *Cancer Res*. 2001, 61(12): 4766 - 4769.
- [4] Woo EY, Yeh H, Chu CS, *et al.* Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation [J]. *J Immunol*, 2002, 168(9): 4272 - 4277.
- [5] Ormandy LA, Hilleman 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.
- [6] 常旭, 区庆嘉, 陈积圣. 原发性肝癌的免疫状态及免疫治疗 [J]. *国外医学·肿瘤学分册*, 1991, 18(3): 136 - 138.
- [7] Pawelec G, Zeuthen J, Kiessling R. Escape from host-antitumor immunity [J]. *Crit Rev Oncog*, 1997, 8(2-3): 111 - 141.
- [8] 何生, 巴明臣, 章崇杰, 等. 肿瘤浸润淋巴细胞及重组白介素 2 治疗原发性肝癌细胞癌 [J]. *中国普通外科杂志*, 1999, (02): 85 - 88.
- [9] Suttmuller RP, van LM, Duivenvoorde A, *et al.* Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25⁺ regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses [J]. *J Exp Med*, 2001, 194(6): 823 - 829.