

文章编号:1005-6947(2007)03-0209-04

· 肝癌专题研究 ·

肝动脉化疗栓塞对原发性肝癌患者树突状细胞的影响

刘谨文, 易继林

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 普通外科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 探讨原发性肝癌患者肝动脉化疗栓塞(TACE)前后肝癌组织和外周血液中树突状细胞(DCs)的变化及其意义。方法 选取经TACE治疗后二期手术切除的原发性肝癌患者标本17例(TACE+手术组)和未经TACE单纯手术切除的原发性肝癌患者标本30例(单纯手术组),用免疫组织化学方法检测肝癌组织中的DCs含量。另选经TACE治疗的原发性肝癌患者37例,分别于治疗前、治疗后第1,7,15天采集周围静脉血,用流式细胞仪检测治疗前后外周血DCs的含量。结果 TACE+手术组肝癌组织中DCs数量明显少于单纯手术组($P < 0.05$);经TACE治疗后第7,15天,患者外周血DCs数量明显少于治疗前(均为 $P < 0.05$)。结论 TACE治疗后,患者肝癌组织和血液中DCs数量的减少可能是TACE后肝癌易复发、转移的重要原因之一。

[中国普通外科杂志,2007,16(3):209-212]

关键词: 肝肿瘤/治疗; 化疗栓塞,治疗性; 肝动脉; 树突状细胞

中图分类号: R 735.7

文献标识码: A

The effect of transcatheter arterial chemoembolization on dendritic cells in hepatocellular carcinoma

LIU Jin-wen, YI Ji-lin

(Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To investigate the changes and significance of dendritic cells (DCs) in hepatocellular carcinoma (HCC) tissue and peripheral blood after transcatheter arterial chemoembolization (TACE).

Methods Surgical specimens were obtained from 17 HCC patients who had been treated by operation after TACE and 30 patients operated on without TACE. The infiltration of DCs in HCC tissue was measured by immunohistochemistry method. Peripheral blood was obtained from 37 patients with HCC treated by TACE. The blood was obtained on the day before TACE, the first day, the 7th day and the 15th day after TACE respectively. The counts of DCs in peripheral blood were quantified by flow cytometry. **Results** The infiltration of DCs in HCC tissue which had been treated by operation after TACE was lower than that of the group not treated by TACE ($P < 0.05$). On the 7th and 15th day after TACE, the counts of DCs in peripheral blood decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** After TACE, the infiltration of DCs in HCC tissue decreased, and the counts of DCs in blood were also decreased. This could be one of the reasons why HCC can recur and metastasize easily after TACE.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(3): 209-212]

Key words: Liver Neoplasms/ther; chemoembolization, Therapeutic; Hepatic Artery; Dendritic cell

CLC number: R 735.7

Document code: A

收稿日期:2006-05-24; 修订日期:2007-01-05。

作者简介:刘谨文,男,湖北仙桃人,华中科技大学同济医学院附属同济医院主治医师,主要从事肝脏、乳腺和甲状腺方面的研究。

通讯作者:刘谨文 E-mail:liujinwen@tjh.tjmu.edu.com。

树突状细胞(DCs)是目前发现的功能最强大的抗原提呈细胞(APC),在抗肿瘤、抗感染、移植排斥和自身免疫疾病中发挥着重要作用^[1-2]。采用肝动脉化疗栓塞(TACE)治疗原发性肝癌,尤其是中晚期肝癌,疗效较好。但TACE后有着较高的肝癌复发和转移率。本研究通过比较TACE前后肝癌患者血液和肝癌组织中DCs的变化,以探讨其意义。

1 材料与方法

1.1 分组及临床一般资料

1.1.1 TACE + 切除组 随机选取2002—2004年我院经TACE治疗后二期手术切除的原发性肝癌患者17例(TACE组)。男16例,女1例;平均年龄(42.5 ± 7.3)岁。肿瘤最大直径 ≤ 5 cm 10例, > 5 cm 7例。按Edmondson-Steiner分级,I~II级11例,III~IV级6例。

1.1.2 单纯切除组 同期未经TACE而行单纯手术切除的原发性肝癌患者30例(单纯手术组)。男28例,女2例;平均年龄(40.3 ± 8.7)岁。肿瘤最大直径 ≤ 5 cm 21例, > 5 cm 9例。按Edmondson-Steiner分级,I~II级22例,III~IV级8例。两组病例均经手术和病理证实。

1.1.3 单纯TACE组 同期于我院行TACE的原发性肝癌患者37例,均为第1次行TACE治疗,并经血生化和血管造影检查得以证实诊断者。男34例,女3例,平均年龄(40.8 ± 12.6)岁。本组所有病例分别于TACE治疗前、治疗后第1天、第7天、第15天清晨空腹由前臂静脉采血10mL,各加入10U/mL肝素抗凝备用。

1.2 实验方法

1.2.1 标本处理及免疫组化检测DCs 标本经10%福尔马林液固定后,常规脱水,石蜡包埋,作4 μ m连续切片,HE染色并经病理诊断证实。分别于肿瘤区取材切片,进行S-100免疫组化染色。染色方法为SABC法。S-100单抗及SABC试剂盒均购自武汉博士德公司。结果判定:以已知阳性切片为阳性对照,以0.1mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗为空白对照。S-100染色完成后,以细胞浆染成棕黄色为阳性,在光学显微镜下在阳性细胞集中区选取10个高倍镜视野(400 \times)观察,记数每高倍镜视野中阳性细胞数并计算其

平均值。

1.2.2 DCs的分离与计数 取10mL全血,首先通过血细胞分析仪测定其中单个核细胞数,然后通过Ficoll-Hypaque分层法分离出单个核细胞,分别加入鼠抗人CMRF-44单克隆抗体和异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠Ig(FITC-SAM),再以10%鼠血清封闭,上流式细胞仪检测FITC标记的CMRF-44单抗(CMRF-44-FITC),记录DCs在单核细胞中的相对数,然后计算出DCs的绝对数。Ficoll-Hypaque分层液、鼠抗人CMRF-44单克隆抗体选用美国Pharmingen公司产品。流式细胞仪为美国BD公司产品。

1.3 统计学处理

采用SAS软件(V6.40)进行统计分析,DCs数用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,显著性采用 t 检验,组间生存率和复发率比较采用 κ^2 检验。

2 结果

2.1 TACE + 切除组与单纯手术组肝癌标本中DCs细胞比较

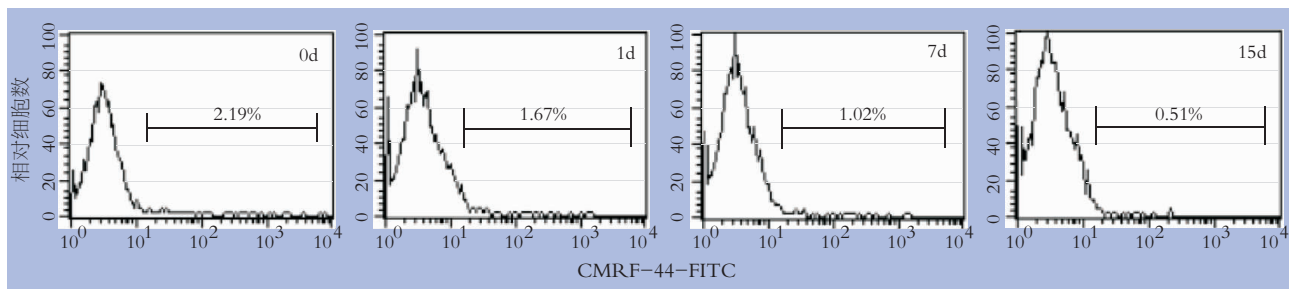
两组标本中均可见DCs胞浆染为黄色,即S-100表达阳性细胞。DCs形态不规则,表面可见长短不一、数目不等的树突状突起,也可见较多DCs表面并无明显树突状突起。可见较多DCs聚集成团,也可见其散在分布。其主要分布在间质中,亦可见分布于肿瘤组织中。两组DCs数量比较见表1。无论范围与均值,TACE + 切除组均显著低于单纯手术组($P < 0.05$)(表1)。

表1 TACE组 + 切除组与单纯手术组肝癌标本中浸润的DCs数量比较

分组	标本数	DCs范围	DCs均值
TACE + 切除组	17	4~20	11.2 \pm 4.5
单纯手术	30	5~38	20.8 \pm 8.7
P 值		<0.05	<0.05

2.2 肝癌患者TACE前后外周血DCs的含量变化

肝癌患者TACE后第1天即出现外周血DCs数量减少,但与治疗前相比差异无显著性意义($P > 0.05$);至第7天和第15天DCs数量更为减少,与TACE前相比差异有显著性意义(均为 $P < 0.05$)(附图)(表2)。



附图 TACE 前后 DCs 计数的流式图

表2 37 肝癌患者 TACE 前后外周血中 DCs 数量

时间	DCs 数量($\times 10^6/L$)
治疗前	18.222 \pm 2.3417
治疗后第 1 天	16.744 \pm 1.7371 ¹⁾
治疗后第 7 天	13.756 \pm 1.6234 ²⁾
治疗后第 15 天	12.233 \pm 1.7819 ²⁾

注:与 TACE 治疗前相比 1) $P > 0.05$; 2) $P < 0.05$

2.3 随访

所有患者均接受随访,以 2 年为限。TACE + 切除组患者 17 例,失访 4 例,随访率 76.47% (13/17),2 年生存率为 30.77% (4/13),复发率 84.62% (11/13)。单纯切除组患者 30 例,失访 6 例,随访率 80.00% (24/30),2 年生存率为 46.15% (12/26),复发率 80.76% (21/26)。两组间生存率和复发率比较,差异无显著性意义(均 $P > 0.05$)。单纯 TACE 组患者 37 例,失访 7 例,随访率 81.08% (30/37),2 年生存率为 6.67% (2/30),与上两组比较,差异有显著性意义(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

DCs 在机体抗肿瘤免疫过程中发挥着重要作用。Dhodapkar 等^[3]发现在体外被肿瘤负载的 DCs 所诱导的肿瘤反应性 T 淋巴细胞是肿瘤特异性的,未发现其对自身淋巴细胞有直接损伤作用,说明 DCs 在诱导和维持抗肿瘤免疫反应中起重要作用。Yin 等^[4]的研究显示在原发性肝癌组织中虽然 DCs 数量较少,但肿瘤组织中 DCs 的含量多少和淋巴细胞的浸润情况对患者的预后仍有着明显的影响,DCs 和淋巴细胞浸润多的患者其

肿瘤复发时间和生存时间明显要长。其机制可能是肿瘤组织的 DCs 与肿瘤细胞接触后可能摄取肿瘤抗原并提呈给 T 细胞,从而引发机体的抗肿瘤免疫机制。DC 肿瘤疫苗的研究结果显示负载肿瘤抗原的 DCs 可强烈刺激 T 淋巴细胞增殖,并导致肿瘤组织中淋巴细胞浸润增加,从而抑制肿瘤生长^[5-6]。本研究发现原发性肝癌组织中浸润的 DCs 的数量较少,此结果与 Yin 的研究相符;而经 TACE 后的肿瘤组织中的 DCs 数量更明显下降,与未行 TACE 的肝癌患者相比差异有显著性。比较 TACE 后行肿瘤切除和直接手术切除患者的 2 年生存率和复发率,但前者的低于后者,两者间差异虽无显著性意义(可能与病例数较少有关),其复发率则高于后者,提示经行 TACE 后的肝癌患者抗肿瘤免疫明显减弱,

目前已有大量研究证实,肿瘤浸润 DCs 与正常 DCs 相比,前者存在着明显的功能缺陷,如其膜表面 MHC 分子及某些共刺激分子不表达或低表达,这被认为可能是 DCs 无法激发特异性 CTLs 反应的主要原因^[7]。鉴于肿瘤局部浸润的 DCs 可能存在一定的功能缺陷,而机体的抗肿瘤免疫是一种全身性机制,故本文同时比较了外周循环血中的 DCs 数量,发现经 TACE 后,患者外周血 DCs 数量在 TACE 后第一天即开始下降,至第 15 天时最为明显。单纯 TACE 组患者的 2 年生存率亦明显低于手术切除肿瘤的患者。提示在 TACE 治疗后,DCs 受到显著的抑制,导致 DCs 对肿瘤抗原的识别、摄取和提呈功能显著下降,从而显著影响机体对残余肿瘤细胞的免疫杀伤作用,进而可能导致肝癌复发和转移的几率加大。

有研究表明血管内皮生长因子(VEGF)可通

过与血液中 DCs 前体细胞表面 flt-3 受体结合而抑制 DCs 前体细胞中核转录因子 NF- κ B 的活化,从而导致 DCs 不能发育成熟^[8]。最近有学者^[9]发现,在肝癌患者中,过量分泌的甲胎蛋白(AFP)不仅可破坏 DCs 的抗原提呈功能,而且可导致 DCs 的凋亡。作者亦发现原发性肝癌经 TACE 治疗后血液中和癌组织中的 VEGF 水平均有升高(另文发表)。所以 TACE 后可能有较多因素的参与而导致肝癌组织中浸润的 DCs 和血液中的 DCs 数量减少。

本研究显示,经 TACE 后,肝癌组织和血液中的 DCs 含量减少。这可能导致对肝癌细胞肿瘤抗原提呈的减少,对残余肿瘤组织和微小病灶的清除能力进一步减弱,并导致肿瘤的复发和转移。这也间接说明临床上对经 TACE 治疗后的原发性肝癌,一旦有手术切除的机会应争取手术切除病灶,以减少肿瘤复发和转移的机会,延长生存时间。

参考文献:

[1] Iyoda T, Shimoyama S, Kang L, *et al*. The CD8 + dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo [J]. *J Exp Med*, 2002, 195(10): 1289 - 1302.

[2] 唐朝晖, 邹声泉, 邱文洪, 等. 癌细胞裂解物修饰的 DC 疫苗体外诱导 T 细胞特异性抗胰腺癌免疫[J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(4): 283 - 286.

[3] Dhodapkar MV, Krasovsky J, Olson K. T cells from the tumor microenvironment of patients with progressive myeloma can generate strong, tumor-specific cytolytic responses to autologous, tumor-loaded dendritic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(20): 13009 - 13013.

[4] Yin XY, Lu MD, Lai YR, *et al*. Prognostic significances of tumor-infiltrating S-100 positive dendritic cells and lymphocytes in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Hepato-gastroenterology*, 2003, 50(53): 1281 - 1284.

[5] 雷晓, 石彦, 余佩武, 等. 树突状细胞诱导抗胃癌免疫效应的研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11(4): 230 - 232.

[6] 张坤, 余佩武, 高朋芬, 等. 胃癌细胞 - DC 融合疫苗 T 淋巴细胞激活效应的研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15(2): 94 - 97.

[7] Troy A, Davidson P, Atkinson C, *et al*. Phenotypic characterisation of the dendritic cell infiltrate in prostate cancer [J]. *J Urol*, 1998, 160(1): 214 - 219.

[8] Ohm JE, Shurin MR, Esche, C. Effect of vascular endothelial growth factor and FLT3 ligand on dendritic cell generation in vivo [J]. *J Immunol*, 1999, 163(6): 3260 - 3268.

[9] Um SH, Mulhall C, Alisa A, *et al*. Alpha-fetoprotein impairs APC function and induces their apoptosis [J]. *J Immunol*, 2004, 173(3): 1772 - 1778.

本刊 2007 年各期重点内容安排

本刊 2007 年各期重点内容安排如下, 欢迎赐稿。

第 1 期	乳腺、甲状腺外科	第 7 期	胆道外科
第 2 期	胆道外科	第 8 期	肝脏外科
第 3 期	肝脏外科	第 9 期	胃肠道外科
第 4 期	胃肠道外科	第 10 期	胰腺外科
第 5 期	胰腺外科	第 11 期	甲状腺、乳腺外科
第 6 期	血管、腔镜外科	第 12 期	腔镜外科及其他