



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.022
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3965.shtml

· 简要论著 ·

原发性肝癌患者微环境中 CD8⁺CD28⁻ 调节性 T 细胞表达变化及意义

王徐, 胡明华, 王小明

(皖南医学院第一附属医院 肝胆二科, 安徽 芜湖 241001)

摘要

目的: 探讨原发性肝癌患者微环境中 CD8⁺CD28⁻ 调节性 T 细胞 (CD8⁺CD28⁻Treg) 的表达变化及其意义。
方法: 采用流式细胞检测技术对 60 例原发性肝癌患者及其 50 例健康患者的外周血中 CD8⁺CD28⁻Treg 进行检测, 对于顺利手术切除的 46 例患者的肝癌组织及癌旁组织进行 CD8⁺CD28⁻Treg 的检测, 再选取 30 例肝癌石蜡标本, 检测其肝癌组织和癌旁组织中的 CD8⁺CD28⁻Treg 的表达。

结果: 通过对肝癌组与健康对照组检测结果比较发现: CD8⁺CD28⁻Treg 在原发性肝癌患者的外周血中测定值明显高于健康对照组 [(15.55 ± 3.14) % vs. (10.12 ± 3.16) %], 肝癌组织的 CD8⁺CD28⁻Treg 表达较癌周组织中的 CD8⁺CD28⁻Treg 表达增高 [(19.34 ± 3.12) % vs. (13.59 ± 2.47) %], 石蜡标本中肝癌组织 CD8⁺CD28⁻Treg 表达高于癌旁组织中 CD8⁺CD28⁻Treg 的表达 [(13.58 ± 2.46) % vs. (9.47 ± 3.04) %], 差异均有统计学意义 (均 P < 0.05)。

结论: CD8⁺CD28⁻ 调节性 T 细胞在原发性肝癌患者的微环境中表达明显增加, 其可能在机体对原发性肝癌的免疫应答中有重要的意义。 [中国普通外科杂志, 2014, 23(7):976-979]

关键词

肝肿瘤; 原发性肝癌; 微环境; CD8⁺CD28⁻ 调节性 T 细胞; 免疫应答
中图分类号: R735.7

原发性肝癌是世界上第五大常见恶性肿瘤, 其病死率居第 3 位。我国是肝癌高发地区, 约占全球一半以上, 虽然手术切除、器官移植等治疗肝癌的方法逐渐进步, 但是总体的术后复发和较高的病死率并没有得到明显的改善。现今免疫检测和治疗逐渐受到重视。以往在治疗肝癌的时候主要集中在对癌细胞本身的生物学行为上, 如今对于肝癌的研究越来越多的关注肿瘤微环境的作用。近年来的相关研究表明肝癌患者由于免疫功能低下使得肝癌细胞产生免疫逃逸, 并容易转移复发, 其中调节性 T 细胞在肝癌免疫逃逸中起着重要作用。CD8⁺CD28⁻ 调节性 T 细胞是近年来证实的一

种重要的调节性 T 细胞, 这种 T 细胞在肿瘤患者、慢性病毒感染患者以及存活时间超过 50 d 的同种异体移植动物体内大量增加^[1-2]。本研究将通过检测原发性肝癌患者微环境中的 CD8⁺CD28⁻ 调节性 T 细胞表达变化探讨其在肝癌肿瘤生物学中的意义。

1 资料与方法

1.1 标本来源

选取 2012 年 6 月—2014 年 1 月 在皖南医学院弋矶山医院经 CT 以及实验室检查初诊的肝癌的患者 60 例 (肝癌组)。男 36 例, 女 24 例; 平均年龄为 (60.8 ± 4.2) 岁, 均经过术后病理检查证实为肝癌。根据肝癌大小的分类, 其中微小肝癌 8 例, 小肝癌 14 例, 大肝癌 24 例, 巨大肝癌 14 例。其中 46 例患者成功接受了肝癌切除术, 术后病理提示肝细胞肝癌 32 例, 肝胆管细胞癌 14 例, 另 14 例患者由于存在腹腔内的远处转移而终止手术。

基金项目: 安徽省芜湖市科技计划资助项目 (2012hm29-2)。

收稿日期: 2014-04-12; **修订日期:** 2014-06-07。

作者简介: 王徐, 皖南医学院第一附属医院硕士研究生, 主要从事肝胆胰疾病基础与临床方面的研究。

通信作者: 王小明, Email: wxm6901@aliyun.com

有远处转移 14 例,无远处转移 46 例。60 例肝癌患者术前均留取空腹静脉血 2 mL 进行 CD8⁺CD28⁻Treg 检测,46 例手术切除的肝癌患者术中留取癌组织及癌旁组织进行 CD8⁺CD28⁻Treg 检测。

选取 50 名健康志愿者进行对照(健康对照组),男 32 例,女 18 例;平均年龄(57.3 ± 3.9)岁。留取清晨空腹静脉血 2 mL,送检我院中心实验室进行 CD8⁺CD28⁻Treg 检测。从我院病理科选取 2011 年 1 月—2012 年 6 月病理诊断为肝细胞肝癌的石蜡切片 30 例。分别检测癌旁组织及癌组织中的 CD8⁺CD28⁻Treg。

1.2 主要试剂

CD8、CD28 单克隆抗体及显色剂均购自北京金桥生物技术有限公司。流式细胞仪等器材由我院中心实验室和病理科提供。

1.3 检测方法

1.3.1 肝癌组和健康对照组外周血中的 CD8⁺CD28⁻Treg 检测 抽取外周血 2 mL,用加入肝素钠抗凝并混匀。从每管中取 100 μL 全血,按照 CD8、CD28 单抗的说明书,将所需抗体加入不同试充分混匀。室温下避光孵育 30 min,加入 1% 草酸氨 2 mL,充分混匀,孵育 10 min,离心机 1 500 r/min × 15 min,弃去上清,每管加入 500 μL 混匀后,应用流式细胞仪检测 CD8⁺CD28⁻Treg 水平。

1.3.2 新鲜癌组织及癌旁组织中的 CD8⁺CD28⁻Treg 检测 用 PBS 清洗标本,去除多余血液,用无菌剪刀将新鲜的癌组织及癌旁组织剪碎,去除脂肪组织及坏死组织,制备单细胞悬液,用 200 μm 筛网将组织匀浆过滤于平皿中,取 5 mL 匀浆加 PBS 混合至 50 mL,离心 1 500 r/min × 5 min。将离心后的上清再次移入 50 mL 离心管,1 500 r/min × 20 min,去上清,加 PBS 至 50 mL,离心 1 500 r/min × 10 min,去上清。采用流式细胞仪检测 CD8⁺CD28⁻Treg 水平。

1.3.3 石蜡切片中的癌组织及癌旁组织中的 CD8⁺CD28⁻Treg 检测 利用 SP 免疫组化法,石蜡切片进行二甲苯脱蜡和梯度酒精水化后,用 pH 7.1 的 PBS 缓冲液冲洗 3 次,根据 CD8、CD28 一抗的要求进行高温高压抗原修复,每张切片滴加 1 滴过氧化物酶阻断溶液,室温下孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次,去除 PBS 液,每张切片加 1 滴非免疫动物血清,室温下孵育 10 min,同样的方法冲洗并

去除 PBS,每张切片加入 100 μL DAB 溶液,避光显微镜下观察。免疫组化检测癌组织及癌旁组织中的 CD8⁺CD28⁻Treg 情况。CD8⁺CD28⁻Treg 主要表达在胞浆中,呈棕色颗粒。计数公式 = 每高倍镜(10 × 40)下的 CD8⁺CD28⁻Treg 计数 / 每高倍镜(10 × 40)下的 T 细胞数 × 100%。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 19.0 统计学软件,以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌组和健康对照组外周血 CD8⁺CD28⁻Treg 比较

肝癌组 CD8⁺CD28⁻Treg 的比例为(15.55 ± 3.14)%,较对照组的比例(10.12 ± 3.16)% 显著升高,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 不同大小的肝癌患者外周血 CD8⁺CD28⁻Treg 比较

微小肝癌组的比例为(19.03 ± 3.74)%,小肝癌组的比例为(18.79 ± 2.28)%,大肝癌组的比例为(21.83 ± 2.71)%,巨大肝癌组的比例为(23.61 ± 3.83)%。大肝癌组和巨大肝癌组较微小肝癌和小肝癌组的 CD8⁺CD28⁻Treg 细胞升高程度增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),微小肝癌和小肝癌组之间、大肝癌和巨大肝癌组之间的比例的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 不同组织学分型的肝癌患者外周血 CD8⁺CD28⁻Treg 比较

肝细胞肝癌组的比例为(20.94 ± 3.07)%,肝胆管细胞癌组的比例为(20.45 ± 3.47)%,两组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 无远处转移和伴有远处转移 CD8⁺CD28⁻Treg 比较

伴有远处转移的肝癌组外周血中的 CD8⁺CD28⁻Treg 的检测结果为(22.56 ± 3.43)%,无远处转移的肝癌外周血中的 CD8⁺CD28⁻Treg 的检测结果为(20.74 ± 2.94)%。两组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 肝癌组织及癌旁组织中的 CD8⁺CD28⁻Treg 比较

术中留取的肝癌组织中的 CD8⁺CD28⁻Treg 检

测结果为 $(19.34 \pm 3.12)\%$ ，癌旁组织中的检测结果为 $(13.59 \pm 2.47)\%$ ，两组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.6 石蜡标本中癌组织和癌旁组织中的 CD8⁺CD28⁻Treg 比较

肝癌组织中的 CD8⁺CD28⁻Treg 细胞检测结果为 $(13.58 \pm 2.46)\%$ ，癌旁组织中的检测结果为 $(9.47 \pm 3.04)\%$ ，两组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

CD8⁺CD28⁻Treg 具有较强的免疫抑制作用，使其在机体的免疫稳态中扮演着重要的角色。

肿瘤杀伤细胞 (CTL) 在发挥作用的过程中，需要一些刺激信号，其中主要包括两种，一种是肿瘤抗原与主要组织相容性复合物 I (MHC-I) 形成的肽复合物^[3]，另一种是肿瘤细胞自身表面的协同刺激分子^[4]。这两种信号可以使得 TCL 被激活而发挥肿瘤杀伤作用，CD8⁺CD28⁻Treg 的存在可以抑制这两种复合物与 CTL 上的某些受体如 CD3、CD4、CD28 等结合，从而使 CTL 无法被有效的活化，失去肿瘤杀伤作用。

NF- α B 传导通路^[5]和 E-cadherin/ α E β 7^[6]传到通路在机体识别肿瘤的过程中有着重要的作用，CD8⁺CD28⁻Treg 可以通过抑制 CTL 活化使得这两种传导通路被抑制，肿瘤无法有效的被机体的免疫系统识别，使得 CTL 和 NF 等无法有效的杀伤肿瘤细胞，肿瘤细胞发生免疫逃逸。

细胞毒性物质在机体正常代谢中是不可缺少的重要元素，CD8⁺CD28⁻Treg 的增加可以抑制细胞毒性物质的产生，同时减少了一些诱导细胞凋亡的细胞因子的产生，从坏死和凋亡两条路径阻碍机体清除肿瘤细胞。最新的有关研究^[7-8]表明，穿孔素、Syntaxin7、Vit1 等都是有效的细胞毒性物质，CD8⁺CD28⁻Treg 可抑制这些物质的产生。

有研究^[9]表明 CD8⁺CD28⁻Treg 自身可以分泌 IL-6、IL-10、IFN- γ 等因子，其中 IL-10 可以协同肿瘤的毒性反应，使得肿瘤的侵蚀性增强^[10]，而 IFN- γ 、IL-6 可以促进肿瘤细胞的增值。

CD8⁺CD28⁻Treg 在体内的作用机制目前仍然还没有完全的明确，通过现有的机制我们可以总结

出，CD8⁺CD28⁻Treg 在机体内的抑制作用是多方面、多层次的存在，最终在体内会形成一种级联反应，它的比例增加会严重影响肿瘤细胞的正常代谢，从而导致肿瘤在机体内无限增值。

现阶段，一些有关肝癌患者外周血和癌组织中的 CD8⁺CD28⁻Treg 检测结果表明其在肝癌的微环境中存在不同程度的增高，如黄庆梅等^[11]在检测肝癌外周血中的 CD8⁺CD28⁻Treg 发现这种调节性 T 细胞呈高表达状态，宋丁等^[12]在检测肝癌患者外周血中的 CD8⁺CD28⁻Treg 时也得出相同的结果。在检测癌组织及肿瘤的石蜡切片中的肝癌细胞组织浸润性淋巴细胞时，叶韵斌等^[13]发现在肝癌的微环境中抑制性淋巴细胞表达增加，其中包括 CD8⁺CD28⁻Treg。裘宇容等^[14]研究发现原发性肝癌患者 CD8⁺T 细胞亚群的百分率升高时因为 CD8⁺CD28⁻Treg 升高所致，两者之间呈正相关关系。此外，有研究表明，肝癌外周血中 CD8⁺CD28⁻Treg 的数量与肿瘤负荷正相关，Hori 等^[15]通过研究发现，CD8⁺CD28⁻Treg 在原发性肝癌患者外周血中的数量与患者的病情呈正相关，提示 CD8⁺CD28⁻Treg 水平越高预后效果越差。有学者^[16]认为 CD8⁺CD28⁻Treg 可以作为肝癌患者预后判断的一个有效指标，当患者外周血中的 CD8⁺CD28⁻Treg 的数量明显增高时，意味着病情有恶化和肿瘤复发的风险。

越来越多研究证实了 CD8⁺CD28⁻Treg 在肝癌患者微环境中表达增加，这为肝癌的免疫相关诊疗提供了一个新的突破点，这需要我们更深层次的去研究其变化的原因、机制，以及可以控制的方法。

介入、射频消融等治疗能减少肝癌负荷，降低患者外周血中 CD8⁺CD28⁻Treg 的表达，增强机体的肿瘤免疫能力，肝癌氩氦冷冻治疗后短期内 CD8⁺CD28⁻Treg 比例轻度下降^[17]，T 淋巴细胞亚群分布异常得到一定的改善。此外，经导管肝动脉化疗栓塞治疗能明显改善原发性肝癌患者的免疫情况，一定程度的降低 CD8⁺CD28⁻Treg^[18]。高强度聚焦超声治疗对中晚期肝癌患者的免疫细胞及其活性也有一定程度的影响，据报道^[19]，经治疗后的中晚期肝癌患者高强度聚焦超声治疗的百分率的水平明显降低。

目前，CD8⁺CD28⁻Treg 在肝癌微环境中长的表达情况以及作用机制以及手术切除肿瘤对其表达

的影响仍不明确,通过对 CD8⁺CD28⁻Treg 的进一步研究,尚有以下问题值得去探索:(1)通过研究 CD8⁺CD28⁻Treg 在肝癌微环境中的变化,能否用来作为临床上监测肝癌变化的免疫指标。(2)通过研究手术切除等治疗后的肝癌患者的 CD8⁺CD28⁻Treg 变化,能否用来作为判断手术效果及术后恢复的一项免疫指标。(3)通过对 CD8⁺CD28⁻Treg 作用机制的进一步研究,能否使其成为肝癌的一个新的免疫治疗的靶点。

本研究表明,在肝癌微环境中,CD8⁺CD28⁻Treg 表达明显升高,这可能是导致原发性肝癌患者机体免疫功能下降的重要原因,所以对 CD8⁺CD28⁻ 调节性 T 细胞进行进一步的研究将有助于更准确的去探索其在肝细胞肝癌微环境中表达变化及其作用机制,有助于对于传统肝癌治疗方法的突破,从而对于肝癌进行有效的干预。

参考文献

- [1] Fenoglio D, Ferrera F, Fravega M, et al. Advancements on phenotypic and functional characterization of non-antigen-specific CD8⁺CD28⁻ regulatory T cells[J]. Hum Immunol, 2008, 69(11):745-750.
- [2] Weng NP, Akbar AN, Goronzy J. CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function[J]. Trends Immunol, 2009, 30(7):306-312.
- [3] Alves NL, Arosa FA, van Lier RA. IL-21 sustains CD28 expression on IL-15-activated human naive CD8+ T cell[J]. J Immunol, 2005, 175(2):755-762.
- [4] Godlove J, Chiu WK, Weng NP. Gene expression and generation of CD28-CD8 T cells mediated by interleukin 15[J]. Exp Gerontol, 2007, 42(5):412-415.
- [5] Suci-Foca N, Cortesini R. Central role fo ILT3 in the T suppressor cell cascade[J]. Cell Immunol, 2007, 248(1):59-67.
- [6] Brennan AJ, Chia J, Trapani JA, et al. Perforin deficiency and susceptibility to cancer[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(4):607-615.
- [7] Pattu V, Qu B, Marshall M, et al. Syntaxin 7 is required for lytic granule release from cytotoxic T lymphocytes[J]. Traffic, 2011, 12(7):890-901.
- [8] Qu B, Pattu V, Junker C, et al. Docking of lytic granules at the immunological synapse in human CTL requires Vti1b-dependent pairing with CD3 endosomes[J]. J Immunol, 2011, 186(12):6894-6904.
- [9] Allenbach Y, Chaara W, Rosenzweig M, et al. Th1 response and systemic treg deficiency in inclusion body myositis[J]. PLoS One, 2014, 9(3):e88788. doi: 10.1371/journal.pone.0088788.
- [10] Filaci G, Fenoglio D, Fravega M, et al. CD8+CD28- T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers[J]. J Immunol, 2007, 179(7):4323-4334.
- [11] 黄庆梅, 覃锦耀. CD4+CD25+ 细胞和 CD8⁺CD28⁻ 调节性 T 细胞在原发性肝癌患者外周血中的水平变化 [J]. 检验医学, 2010, 25(9):705-707.
- [12] 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 [J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(4):493-494.
- [13] 叶韵斌, 彭峰, 李洁羽, 等. 肝细胞肝癌组织浸润性淋巴细胞及其因子的表达 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(10):1056-1060.
- [14] 裴宇容, 杨春莉, 陈炼波, 等. 原发性肝癌患者 CD8⁺CD28⁻ 和 CD8+CD28+ 细胞亚群的分析 [J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(1):72-73.
- [15] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S, et al. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3[J]. Science, 2003, 299(5609):1057-1061.
- [16] Zou W. Immunosuppressive networks in the tumor environment and their therapeutic relevance[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(4):263-274.
- [17] 李小丽, 司同国, 于海鹏, 等. 冷冻消融对肝癌患者外周血 CD4+CD25+ 调节 T 细胞影响的初步研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(8):453-454.
- [18] 廖娟, 王春晖, 李肖, 等. 经导管肝动脉化疗栓塞术对原发性肝癌患者细胞免疫及调节 T 细胞的影响 [J]. 肝脏, 2011, 16(3):198-201.
- [19] 曹玮, 吴发伟, 刘毅勇, 等. 高强度聚焦超声对中晚期肝癌患者机体免疫细胞及其活性的影响 [J]. 介入放射学杂志, 2009, 18(4):308-310.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式:王徐,胡明华,王小明.原发性肝癌患者微环境中 CD8⁺CD28⁻ 调节性 T 细胞表达变化及意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(7):976-979. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.022

Cite this article as: WANG X, HU MH, WANG XM. Change and significance of CD8⁺CD28⁻ Treg cells expression in the patients suffering from primary hepatocellular carcinoma[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(7):976-979. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.022