

Th17/Treg 平衡对肝细胞癌患者预后的影响

王娟华 李莹 王珊 胡敏涛 朱银芳 周敏 汪铮

【摘要】 目的 本研究通过检测肝炎-肝硬化-肝细胞癌进展过程中外周血 T 细胞各亚群数量,探讨 Th17/Treg 平衡在肝细胞癌发病过程中的意义。**方法** 选取慢性肝炎组、肝硬化组、肝细胞癌组、肝癌治疗后组患者及健康对照组共 92 例,检测各组患者丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、Th1、Th2、Th1/Th2、Tc1、Th17、Tc17、Th17/Tc17、Treg 和 Th17/Treg 等多项 T 细胞亚群细胞计数;比较组间各项免疫学指标的差异及其与转氨酶之间的相关性。**结果** 各组患者间 CD3⁺、CD8⁺、ALT 和 AST 水平差异具有统计学意义。肝细胞癌组患者较对照组 CD3⁺ T 细胞数减少, Th17、Tc17 和 Treg 细胞数增多;较慢性肝炎组 CD3⁺、CD8⁺ T 细胞数减少, Th17 和 Tc17 细胞数增多,血清 ALT 和 AST 水平降低;较肝硬化组患者 Th17 细胞数增多, Th17/Tc17 比值升高;较肝细胞癌治疗后组 Th17 细胞数减少。Th17 和 Tc17 在肝细胞癌时升高,治疗后回落, Th17/Tc17 在肝细胞癌时向 Tc17 极化,治疗后再进一步向 Tc17 极化;Treg 细胞在慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌时均升高,肝细胞癌治疗后回落, Th17/Treg 在慢性肝炎、肝硬化时向 Treg 极化,肝细胞癌时向 Th17 极化,治疗后再次向 Treg 极化。各项免疫指标与转氨酶无显著相关性。**结论** 肝炎-肝硬化-肝癌进程中患者外周血 T 细胞亚群多项指标发生改变,其中 Th17/Treg 平衡与肝癌预后关系密切。

【关键词】 Th17 细胞;调节性 T 细胞;原发性肝癌;预后

Significance of Th17/Treg balance in peripheral blood on prognosis of hepatocellular carcinoma

WANG Juan-hua, LI Ying, WANG Shan, HU Min-tao, ZHU Yin-fang, ZHOU Min, WANG Zheng. The fifth people's Hospital of Wuxi, Wuxi 214005, China

Corresponding author: LI Ying, Email:yingli1994@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the significance of Th17/Treg in the process from hepatitis to liver cirrhosis and then to hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Patients with chronic hepatitis, liver cirrhosis, HCC and control were collected, respectively. The amount of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, Th1, Th2, Tc1, Th17, Tc17 and regulatory T cells (Treg) were detected by flow cytometry (FCM), respectively. Alanine amino transferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were also detected. The correlation between the immune indicators and transaminase were evaluated. **Results** There were significant differences on the amount of CD3⁺ and CD8⁺ cells and the level of ALT and AST among these groups. Compared with the control, CD3⁺ T cells reduced, Th17 cells, Tc17 cells and Treg cells increased in untreated patients with HCC; compared with the patients with chronic hepatitis, CD3⁺ cells, CD8⁺ cells, ALT and AST reduced, Th17 cells, Tc17 cells increased; compared with the patients with liver cirrhosis, Th17 cells and Th17/Tc17 increased; compared with the treated patients with cirrhosis, Th17 cells and Th17/Tc17 increased. Th17 and Tc17 cells increased in untreated patients with HCC, while reduced in treated patients with HCC; Treg cells increased in patients with chronic hepatitis, liver cirrhosis and HCC, while reduced in treated patients with HCC; Th17/Treg polarization turned to Treg in patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis, while turned to Th17 in patients with HCC, and turned to Treg in treated patients with HCC. There were no significant correlation between the immune indicators and transaminase. **Conclusions** Th17/Treg in peripheral blood of patients with HCC could indicate the prognosis.

【Key words】 Th17 cells; Regulatory T cells; Hepatocellular carcinoma; Prognosis

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.06.008

基金项目:无锡市医院管理中心医学技术重大项目(No. YGZX1113);甘肃省胃肠病重点实验室开放课题(No. gswcky-2012-005)

作者单位:214005 无锡市,江苏省无锡市第五人民医院肝病科(王娟华、胡敏涛、朱银芳、周敏、汪铮);甘肃省兰州市兰州大学第一医院普外二科(李莹、王珊)

通讯作者:李莹,Email:yingli1994@126.com

乙型病毒性肝炎是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染所导致的传染病。我国是高流行区,乙型肝炎与肝硬化、肝细胞癌关系密切,严重危害人民健康。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一,病程短、进展快、病死率高^[1]。其发病机制复杂,调节性 T 细胞(Treg)等多种免疫抑制机制参与其中^[2]。近年发现的 Th17 亚群认为在自身免疫性疾病的炎性损伤过程中发挥着重要作用,其功能与 Treg 的免疫抑制功能相反,研究发现 Th17/Treg 平衡参与多种疾病的发生,但其与肝细胞癌的发生、发展之间的关系尚不明确^[3]。Tc17 细胞也是近年发现的 T 细胞亚群,在肝细胞癌组织中数量增加,认为其与肝癌发展有关^[4]。本研究通过检测肝炎-肝硬化-肝细胞癌过程中患者外周血 T 细胞各亚群数量,尤其是 Th17、Tc17 和 Treg 计数,探讨 Th17/Treg、Th17/Tc17 平衡在肝细胞癌发病过程中的意义。

资料与方法

一、材料

1. 研究对象:收集无锡市第五人民医院和兰州大学第一医院门诊、住院患者共 92 例。研究方案经以上两家医院伦理委员会批准,患者签署知情同意书。收集健康体检者 7 例、慢性乙型肝炎患者 44 例(其中 12 例经肝组织活检明确诊断)、乙型肝炎肝硬化患者 18 例(其中 3 例经肝组织活检明确诊断)、HBV 相关原发性肝癌未经治疗者 8 例以及 HBV 相关原发性肝癌经手术切除、肝动脉灌注化疗栓塞术(transhepatic arterial chemotherapy and embolization, TACE)等治疗后 1 年以上病情稳定者 15 例,分别为对照组、慢性肝炎组、肝硬化组、肝细胞癌组和肝细胞癌治疗后组,慢性肝炎及肝硬化诊断标准符合全国传染病与寄生虫病学术会议(2005 年)修订的病毒性肝炎诊断标准,原发性肝癌诊断标准符合中国抗癌协会肝癌委员会 2001 年 9 月广州会议制定的原发性肝癌临床诊断及分期标准。健康对照及患者抽取清晨空腹外周静脉血 2 ml,置于肝素钠抗凝管中,进行流式细胞术检测,同时留取血清检测肝功能。

2. 仪器和主要试剂:流式细胞仪(FACScalibur)购自美国 BD 公司,CO₂ 培养箱购自美国 Thermo 公司,人淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限公司,APC 100 标记的鼠抗人抗-CD3、FITC 标记的鼠抗人抗-CD8a、PerCP-Cy5.5 标记的鼠抗人抗-CD4、PE 标记的鼠抗人抗-IFN- γ 、PE 标记的鼠抗人抗-IL-4、FITC 标记的鼠抗人抗-IL-17A 购自美国

eBioscience 公司,胞内染色试剂盒购自联科生物公司,PMA/Ionomycin/Monensin 刺激剂购自美国 ENZO 公司,人 Treg 染色试剂盒购自美国 eBioscience 公司。

二、方法

1. 临床资料的收集:收集患者的年龄、性别、病史和肝功能等资料。各组性别及年龄差异无统计学意义,具有可比性,表 1。

表 1 各组患者年龄和性别的比较

组别	例数	性别(例)		年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)
		男	女	
对照组	7	6	1	45.71 \pm 11.25
慢性肝炎组	44	35	9	43.25 \pm 12.04
肝硬化组	18	16	2	47.22 \pm 13.61
肝癌组	8	7	1	51.50 \pm 9.43
肝癌治疗后组	15	9	6	53.07 \pm 8.76
合计	92	73	19	46.53 \pm 12.03
统计量		$\chi^2 = 4.925$		$F = 2.342$
P		0.295		0.061

2. 免疫荧光标记和流式细胞术分析 T 细胞亚群:所有观察对象均于清晨空腹采静脉血 2 ml,以肝素抗凝。分离收集外周血单个核细胞,刺激分化后,荧光标记细胞表面抗原 CD3、CD4、CD8,破膜后荧光标记细胞内抗原 IL-17、IFN- γ 和 IL-4。以 CD3⁺CD4⁺IL-17⁺ 为 Th17 细胞、CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ 为 Th1 细胞、CD3⁺CD4⁺IL-4⁺ 为 Th2 细胞、CD3⁺CD8⁺IL-17⁺ 为 Tc17 细胞以及 CD3⁺CD8⁺IFN- γ ⁺ 为 Tc1 细胞。收集的单个核细胞,荧光标记细胞表面抗原 CD4、CD25,破核后荧光标记细胞内抗原 Foxp3,以 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 为 Treg 细胞。

三、统计学处理

所有数据采用 SPSS 13.0 软件处理。各组性别比较采用 χ^2 检验;各组年龄、T 细胞亚群及转氨酶水平采用单因素方差分析进行多重比较及组间两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

将各组临床指标和免疫指标进行多重比较,结果提示,各组间 CD3⁺ ($F = 6.944, P = 0.000$)、CD8⁺ ($F = 3.135, P = 0.019$)、ALT ($F = 11.343, P = 0.000$) 和 AST ($F = 14.366, P = 0.000$) 差异具有统计学意义(见图 1)。进一步进行各组间两两比较,结果如下。

一、肝细胞癌组与其他各组临床指标和免疫指标比较

肝细胞癌组患者较正常对照外周血 CD3⁺ T 细

胞减少, Th17 细胞、Tc17 细胞、Treg 细胞增多; 慢性肝炎组 CD3⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞减少, Th17 细胞、Tc17 细胞增多, 血清 ALT、AST 水平降低; 较肝硬化组 Th17 细胞增多、Th17/Tc17 比值升高; 较肝癌治疗后组 Th17 细胞减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 表 2。

二、各项指标在肝炎-肝硬化-肝细胞癌进程中的变化

CD3⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞在慢性肝炎时升高, 发生肝硬化、肝细胞癌后逐渐降低, 肝细胞癌治疗稳定后又复常, CD4⁺/CD8⁺ 在慢性肝炎时向 CD8⁺ T 细胞极化, 在肝硬化、肝细胞癌后 CD8⁺ T 细胞受抑制, CD4⁺/CD8⁺ 向 CD4⁺ T 细胞极化, 肝细胞癌治疗稳定后 CD4⁺/CD8⁺ 再次向 CD8⁺ T 细胞极化。Th1/Th2 的平衡中, 慢性肝炎时 Th2 升高, Th1/Th2 向 Th2 极化, 肝硬化和肝细胞癌后以 Th1 升高为主, Th1/Th2 向 Th1 极化, 而肝细胞癌治疗稳定后 Th1 进一步升高, Th1/Th2 进一步向 Th1 极化。Th17 和 Tc17 在发生肝细胞癌后均有显著升高, 肝细胞癌治疗稳定后均显著回落, Th17/Tc17 在肝细胞癌时向 Tc17 极化, 肝细胞癌治疗稳定后进一步向 Tc17 极化。Treg 细胞在慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌时均有显著升高, 肝细胞癌治疗稳定后有回落, Th17/Treg 在慢性肝炎时向 Treg 极化, 肝硬化时进一步向 Treg 极化, 而在肝细胞癌时则向 Th17 极化, 在肝细胞癌治疗稳定后再次向 Treg 极化, 图 2。

三、T 细胞各亚群数量与肝功能的相关性

CD3⁺、CD8⁺ 与 ALT 和 AST 之间相关性具有统

计学意义, 但相关关系并不密切。其他指标与转氨酶无显著相关性, 见表 3。

讨 论

近年来发现了一群具有免疫抑制作用的 T 细胞, 其通过细胞间接触和产生抑制性细胞因子来发挥免疫负调控功能, 即 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞 (Treg) 亚群。Treg 具有低反应性和免疫抑制性两大功能, 在外周血中细胞数量稀少, 占 CD4⁺ T 细胞比例约为 5% ~ 10%^[4-5]。有研究证实, Treg 具有维持机体免疫状态稳定的重要作用, Treg 数量过少或功能不足将无法控制机体免疫反应, 从而导致相应的免疫性损害, 甚至出现自身免疫性疾病^[5]。Treg 数量过多或功能过强主要在肿瘤患者出现, 如胰腺癌、肺癌、卵巢癌、结肠癌、食管癌、肝细胞癌患者的外周血中 Treg 数量均增加^[6]。肝细胞癌时体内异常增加的调节性 T 细胞可以与自身的 CD8⁺ T 细胞直接接触, 从而破坏 CD8⁺ T 细胞, 使之失去有效的抗肿瘤效应, 还可以通过分泌大量抑制性细胞因子, 抑制其他免疫杀伤机制, 从而促进了肝癌细胞的恶性增殖^[2]。本研究结果显示肝细胞癌患者外周血中 Treg 细胞升高, 而在对肿瘤进行切除或 TACE 等损毁性治疗去除瘤体后, Treg 细胞显著回落, 这与上述文献一致, 进一步印证了 Treg 参与肿瘤发展过程。同时本研究还观察到, Treg 细胞的升高实际上开始于比肿瘤发生更早的阶段, 早在慢性肝炎和肝硬化过程中就已经出现, 这一现象又与 Treg 参与肿瘤发生过程相矛盾, 其机制尚需进一步探讨。

表 2 各组患者各项指标的两两比较 (P)

分组	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ / CD8 ⁺	Th1	Th2	Th1/Th2	Tc1	Th17	Tc17	Th17/ Tc17	Treg	Th17/ Treg	ALT	AST
对照组 vs															
慢性肝炎组	0.664	1.000	0.044 ^a	0.412	0.804	0.489	0.140	0.620	0.469	0.398	0.321	0.011 ^a	0.221	0.004 ^a	0.005 ^a
肝硬化组	0.168	0.473	0.693	0.669	0.675	0.364	0.423	0.533	0.930	0.272	0.609	0.010 ^a	0.076	0.311	0.321
肝癌组	0.009 ^a	0.194	0.751	0.557	0.736	0.653	0.260	0.492	0.032 ^a	0.026 ^a	0.190	0.022 ^a	0.796	0.413	0.259
肝癌治疗后组	0.045 ^a	0.207	0.520	0.586	0.344	0.749	0.663	0.700	0.959	0.365	0.933	0.060	0.171	0.926	0.853
慢性肝炎组 vs															
肝硬化组	0.005 ^a	0.255	0.021 ^a	0.064	0.304	0.658	0.380	0.786	0.234	0.599	0.527	0.647	0.290	0.020 ^a	0.021 ^a
肝癌组	0.000 ^a	0.082	0.011 ^a	0.099	0.474	0.899	0.963	0.149	0.033 ^a	0.033 ^a	0.473	0.694	0.102	0.047 ^a	0.121
肝癌治疗后组	0.000 ^a	0.055	0.076	0.777	0.076	0.652	0.179	0.208	0.288	0.811	0.140	0.555	0.665	0.000 ^a	0.000 ^a
肝硬化组 vs															
肝癌组	0.078	0.404	0.423	0.789	0.976	0.685	0.592	0.139	0.007 ^a	0.111	0.287	0.957	0.031 ^a	0.919	0.776
肝癌治疗后组	0.373	0.458	0.734	0.210	0.480	0.460	0.651	0.196	0.965	0.829	0.446	0.384	0.632	0.252	0.314
肝癌组 vs															
肝癌治疗后组	0.313	0.828	0.296	0.208	0.553	0.843	0.379	0.683	0.010 ^a	0.086	0.103	0.455	0.084	0.384	0.254

注: ^a $P < 0.05$, 差异具有统计学意义

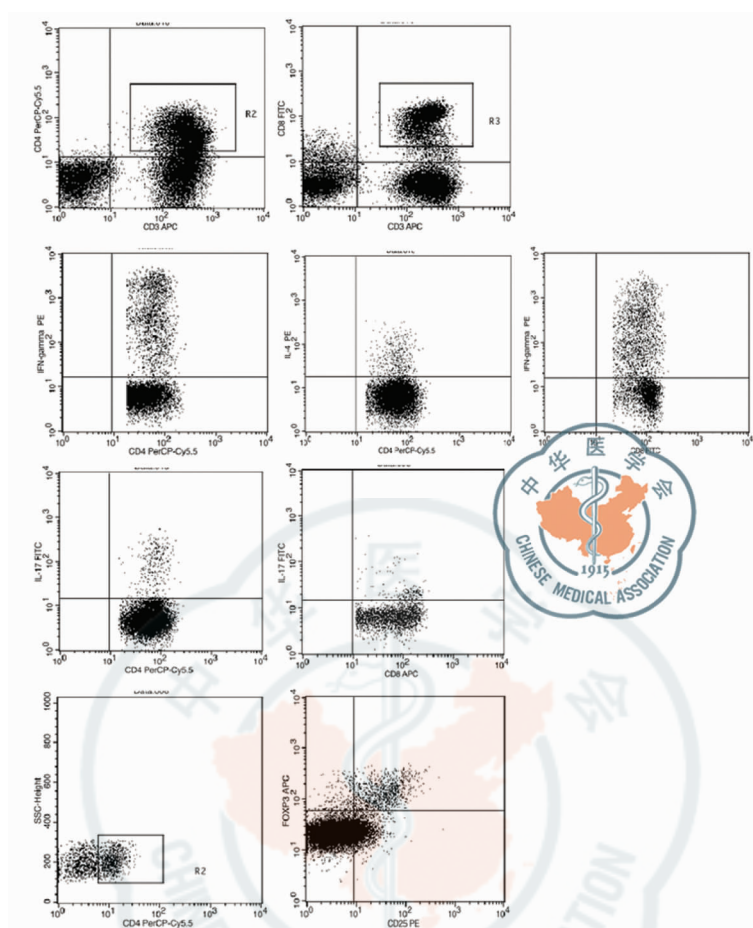


图 1 各项免疫指标流式细胞检测图

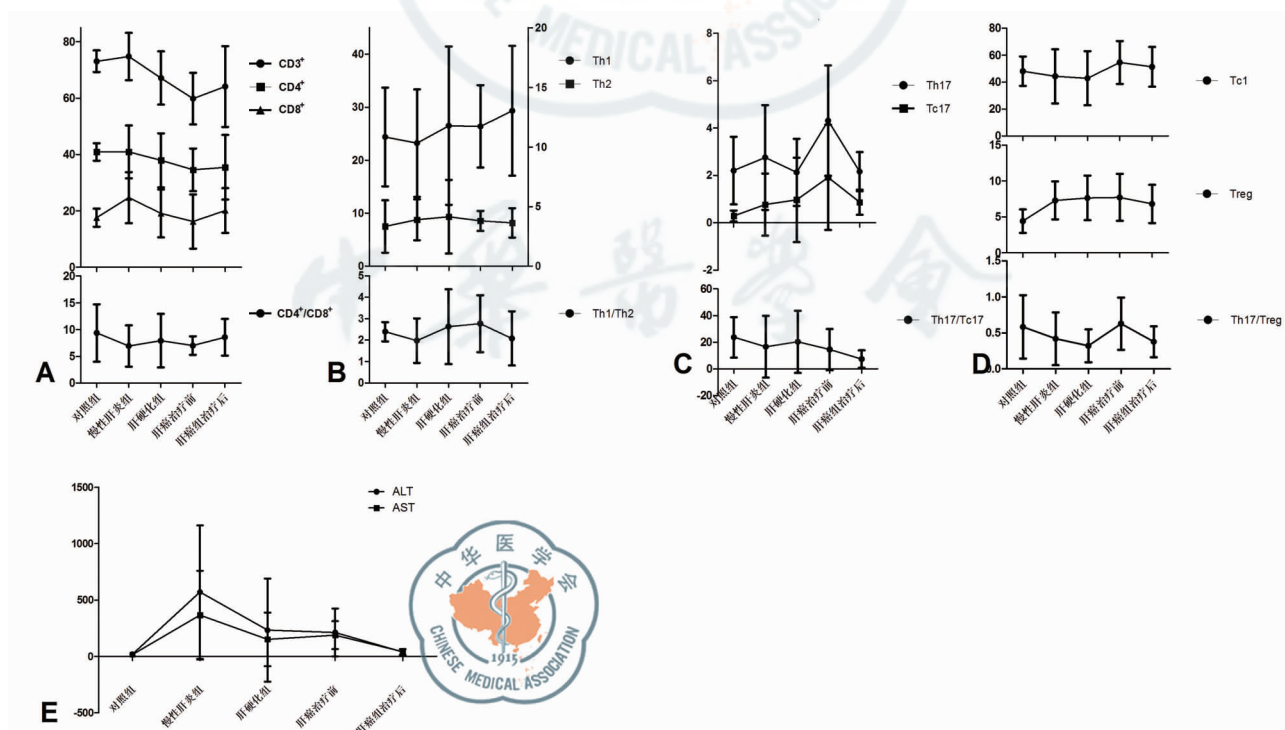


图 2 肝炎-肝硬化-肝癌过程中各项免疫指标的变化趋势

表 3 各项免疫指标与转氨酶之间的相关性

免疫指标	ALT		AST	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
CD3 ⁺	0.218	0.014 ^a	0.238	0.008 ^a
CD4 ⁺	0.073	0.235	0.083	0.204
CD8 ⁺	0.176	0.039 ^a	0.197	0.024 ^a
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	-0.098	0.164	-0.096	0.171
Th1	-0.127	0.103	-0.049	0.312
Th2	-0.049	0.314	-0.010	0.461
Th1/Th2	-0.051	0.307	-0.039	0.348
Tc1	-0.103	0.154	-0.078	0.220
Th17	0.057	0.286	-0.037	0.357
Tc17	-0.087	0.193	-0.068	0.250
Th17/Tc17	-0.020	0.421	-0.053	0.301
Treg	0.084	0.202	0.052	0.301
Th17/Treg	0.002	0.494	-0.078	0.220

注:^a*P* < 0.05, 具有显著相关性

近年来,在 CD4⁺T 细胞亚群中又发现了一种 Th17 细胞,由于其分泌 IL-17 而得名,有研究认为 Th17 在多种炎症性和自身免疫性疾病的形成中起着重要的作用^[7],但对肿瘤发生、发展的作用机制尚不明确。同样,在 CD8⁺T 细胞中也有一群分泌 IL-17 的细胞,称为 Tc17。体内外能够诱导 CD4⁺T 细胞向 Th17 分化发育的细胞因子环境,也能诱导初始 CD8⁺T 细胞分化为 Tc17^[8]。研究发现, HCC 患者肿瘤活化的单核细胞和巨噬细胞产生大量的炎性因子 IL-1 β 、IL-6 和 IL-23,同时, ROR γ t 和 STAT3 转录因子高表达,而 ROR γ t 和 STAT3 是促进 Tc17 和 Th17 分化发育的关键因素。HCC 患者肿瘤病灶局部 CCL20 表达上调,对 Th17 细胞又有趋化作用。以上诱导分化和趋化作用使得 Th17、Tc17 细胞在肿瘤组织内部高表达^[9]。另有研究报道, Th17、Tc17 细胞分泌的 IL-17 通过选择性诱导 CX-CL1、CXCL5、CXCL6 和 CXCL8 等血管源性细胞因子表达上调,促进肿瘤微血管生成,因此有利于肿瘤的生长、转移和浸润^[10]。本研究中肝细胞癌发生时 Th17、Tc17 细胞显著升高,经治疗病情稳定后又显著回落,两者的参与肝细胞癌的发生发展,与上述文献报道一致,同时 Th17、Tc17 细胞波动又与转氨酶波动不平行,因此认为两者在肿瘤发生发展过程中虽然数量增多,但促炎作用减弱。

参与及影响肝细胞癌的发生发展过程的因素众多,其中免疫机制是重要因素。本研究认为 Th17/Treg 可能正是良好的预后影响指标,而 Th17 和

Tc17 则可能成为治疗靶标,为研究 HCC 的致病机制和治疗方案提供了新的思路。

参 考 文 献

- 1 Folasade J, Rohan J, Lidia M, et al. Corona ions from overhead transmission voltage powerlines; effect on direct current electric field and ambient particle concentration levels. *Environ Sci Technol*, 2010, 44(1):526-531.
- 2 Yoshiko T, Yasunari N, Akiko N, et al. Frequency of CD45RO⁺ subset in CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells associated with progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, 2011, 307(2): 165-173.
- 3 Xueyi L, Lina C, Zhenbiao W, et al. Levels of circulating Th17 cells and regulatory T cells in ankylosing spondylitis patients with an inadequate response to anti-TNF-alpha therapy. *J Clin Immunol*, 2012. [Epub ahead of print]
- 4 Zou Q, Yao X, Feng J, et al. Praziquantel facilitates IFN-gamma-producing CD8⁺ T cells (Tc1) and IL-17-producing CD8⁺ T cells (Tc17) responses to DNA vaccination in mice. *PLoS One*, 2011, 6(10):e25525.
- 5 Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 2008, 133(5):775-787.
- 6 Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(7):523-532.
- 7 Jaeckel E, Kretschmer K, Apostolou I, et al. Instruction of Treg commitment in peripheral T cells is suited to reverse autoimmunity. *Semin Immunol*, 2006, 18(2):89-92.
- 8 Anderton SM. Treg and T-effector cells in autoimmune CNS inflammation; a delicate balance, easily disturbed. *Eur J Immunol*, 2010, 40(12):3321-3324.
- 9 Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, et al. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, 2006, 24(6):677-688.
- 10 Huber M, Heink S, Grothe H, et al. A Th17-like developmental process leads to CD8⁺ Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur J Immunol*, 2009, 39(7):1716-1725.
- 11 Chen D, Jiang R, Mao C, et al. Chemokine/chemokine receptor interactions contribute to the accumulation of Th17 cells in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Hum Immunol*, 2012, 73(11):1068-1072.
- 12 Oo YH, Banz V, Kavanagh D, et al. CXCR3 dependent recruitment and CCR6 mediated positioning of Th-17 cells in the inflamed liver. *J Hepatol*, 2012, 57(5):1044-1051.
- 13 Mucida D, Park Y, Kim G, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, 2007, 317(5835):256-260.

(收稿日期:2012-10-22)

(本文编辑:孙荣华)