

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.31.021

介入化疗栓塞治疗对原发性肝癌患者细胞免疫功能的影响*

厉英超,米琛,薛挥,李伟之,李培杰,吕良山
(西安交通大学第一附属医院消化内科,西安 710061)

[摘要] **目的** 探讨经肝动脉化疗栓塞治疗(TACE)对原发性肝癌患者细胞免疫功能的影响。**方法** 对 89 例原发性肝癌患者行 TACE 治疗,TACE 所用药物为:阿霉素 40~60 mg,5-氟尿嘧啶 1 000~1 250 mg,奥沙利铂 150~200 mg,亚叶酸钙 300 mg,碘化油平均用量 10 mL。分别于治疗前及治疗后 4 周取外周血 2 mL,以流式细胞仪检测 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 细胞百分数及 CD4⁺/CD8⁺ 比值,并与 30 例健康人相对照。**结果** 与健康对照组比较,原发性肝癌患者 CD3⁺、CD4⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 比值明显降低($P<0.05$),分别为(33.2±17.5)%、(14.2±7.1)%和 0.87±0.53。TACE 治疗 4 周后 CD3⁺、CD4⁺ 均高于治疗前,CD8⁺ 较治疗前下降,但差异无统计学意义($P>0.05$),而 CD4⁺/CD8⁺ 比值升至 1.98±0.72,明显高于治疗前($P<0.05$)。**结论** 原发性肝癌患者细胞免疫功能低下,TACE 治疗可促进患者的 T 淋巴细胞免疫功能恢复。

[关键词] 肝肿瘤;T 淋巴细胞亚群;细胞免疫;化疗栓塞;介入治疗

[中图分类号] R735.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)31-4382-03

Effect of interventional chemotherapy embolization on cellular immunity function after in patients with primary hepatic cancer*

Li Yingchao, Mi Chen, Xue Hui, Li Weizhi, Li Peijie, Lv Liangshan

(Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of transcatheter arterial chemoembolization (TACE) on the cellular immunity function in the patients with primary hepatic cancer (PHC). **Methods** Eighty-nine cases of PHC were treated by TACE. The drugs of TACE were adriamycin 40–60 mg, 5-Fu 1 000–1 250 mg, oxaliplatin 150–200 mg and leucovorin 300mg respectively. The average dosage of iodinated oil was 10 mL. 2 mL of peripheral blood was collected before treatment and at 4 weeks after treatment. The values of T cell subsets (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺) were determined by using flow cytometry and controlled with those of 30 healthy persons. **Results** Compared with the healthy control group, the percentages of CD3⁺, CD4⁺ and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ in the patients with primary hepatic cancer were decreased significantly, which were (33.2±17.5)%, (14.2±7.1)% and 0.87±0.53 respectively. At 4 weeks after TACE treatment, the percentages of CD3⁺, CD4⁺ were higher than before treatment and the level of CD8⁺ was decreased compared with before treatment ($P>0.05$), while the ratio of CD4⁺/CD8⁺ was increased to 1.98±0.72, which was significantly higher than that before treatment ($P<0.05$). **Conclusion** The cellular immunity function in the patients with PHC is decreased, and the T cell immunity function will be improved after TACE treatment.

[Key words] live neoplasms; T cell subsets; cellular immunity function; transcatheter arterial chemoembolization; intervention therapy

原发性肝癌是世界上病死率最高的五大肿瘤之一,其发病率近年来呈不断升高的趋势。原发性肝癌恶性度高,病变进展快,大多数患者就诊时已是中晚期,介入化疗栓塞治疗(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)成为目前治疗中晚期原发性肝癌的主要方法^[1-2]。原发性肝癌患者常常出现细胞免疫功能低下,细胞免疫功能异常对肿瘤的发生、发展及转归都有着重要的影响,而 TACE 治疗能否促进细胞免疫功能的恢复,从而进一步达到抑制肿瘤的效果,临床研究尚未得到一致的结果。本研究采用 TACE 治疗原发性肝癌,并通过对比治疗前后 T 淋巴细胞亚群的变化,试图阐明 TACE 对原发性肝癌患者细胞免疫功能的影响,并进一步探讨其在疾病转归中的重要意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 5~10 月,本院消化内科行 TACE 治疗的 89 例原发性肝癌患者(男 71 例,女 18 例,年龄 25~78 岁,平均 51 岁)均经临床、影像学及血清甲胎蛋白(AFP)检测或穿刺活检确诊,经胸部透视、骨扫描、CT 或 MRI 排除肺转移

和骨转移。均按国际抗癌联盟(UICC)制定的 TNM 分期标准进行临床分期。全部患者均未使用免疫制剂。TACE 后 4 周再次复查 AFP。选择健康对照者 30 例,男 20 例,女 10 例,年龄 20~50 岁,平均 34 岁,均为健康献血员。

1.2 介入方法 采用 Seldinger 技术,先行常规肠系膜上动脉间接门脉造影及腹腔动脉造影,再做肿瘤供血动脉选择性和超选择性插管,灌注化疗药物:阿霉素 40~60 mg,5-氟尿嘧啶 1 000~1 250 mg,奥沙利铂 150~200 mg,亚叶酸钙 300 mg。使用碘化油进行栓塞,剂量根据病灶大小及术中患者耐受情况而异,为 5~30 mL,平均用量 10 mL。

1.3 细胞免疫功能测定 TACE 治疗前及治疗后 4 周,分别取 89 例原发性肝癌患者清晨空腹外周静脉血 2 mL,另取 30 例健康人清晨空腹外周静脉血 2 mL 相对照。采用流式细胞仪检测细胞免疫功能:取外周静脉血(乙二胺四乙酸抗凝)2 mL,加入 2 mL 淋巴细胞分离液,1 500 r/min 离心 10 min,提取其中淋巴细胞层,再以 2 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,同速离心 2 次,弃上清液后,将细胞悬液分入试管,调整细胞数为

10⁶/mL。分别加入 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 单抗工作液和阴性对照单抗 IgG 120 μL，均避光反应 30 min，2 000 r/min 离心 15 min，用 2 mL PBS 漂洗，再同速离心漂洗 1 次，均弃上清液，最后加入 PBS 500 μL 待测。上机前以标准荧光微球调整仪器的变异系数并稳定在 2% 以内，上机后收集 2 万个细胞，荧光强度以对数放大，测定完成后用 Cell Quest Plot 软件分析数据。

1.4 仪器与试剂 FAC Scan 型流式细胞仪(美国 BD 公司)、BIO450 型酶标仪(美国 BIO-RAD 公司)、异硫氰酸荧光素(FITC)或藻红蛋白(PE)标记的鼠抗人 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 单抗(法国 Immunotech 公司产品)。

1.5 统计学处理 利用 SPSS19.0 统计软件和 Cell Quest Plot 软件对所得结果进行分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 *t* 检验，以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 原发性肝癌患者 TACE 治疗前后 T 淋巴细胞亚群变化

原发性肝癌患者 TACE 治疗前与健康对照组比较，CD3⁺、CD4⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 比值均明显降低 (*P* < 0.05)，CD8⁺ 也低于健康对照组，但差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。TACE 治疗后 4 周，CD3⁺、CD4⁺ 均高于治疗前，而 CD8⁺ 较治疗前下降，但差异无统计学意义 (*P* > 0.05)，而 CD4⁺/CD8⁺ 比值明显高于治疗前 (*P* < 0.05)，见表 1 及图 1。

表 1 原发性肝癌患者 TACE 治疗前后 T 淋巴细胞亚群检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ / CD8 ⁺
健康对照组	30	65.8±10.6	35.4±8.4	24.5±6.7	1.56±0.58
治疗组(TACE 前)	89	33.2±17.5 ^a	14.2±7.1 ^a	18.5±8.8	0.87±0.53 ^a
治疗组(TACE 后)	89	37.5±17.1	24.7±10.9	12.3±5.4	1.98±0.72 ^b

^a: *P* < 0.05, 与健康对照组比较; ^b: *P* < 0.05, 与 TACE 治疗前比较。

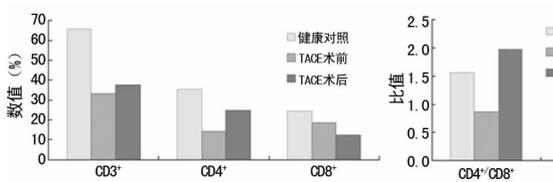


图 1 TACE 治疗前后 T 淋巴细胞亚群的变化

2.2 原发性肝癌患者 TACE 治疗前后 T 淋巴细胞亚群分布

经 Cell Quest 软件分析处理，治疗组患者在 TACE 术前、术后 4 周的 T 细胞亚群分布变化见图 2，TACE 治疗后 4 周，CD4⁺ 细胞比例较治疗前升高，而 CD8⁺ 细胞比例较治疗前降低。

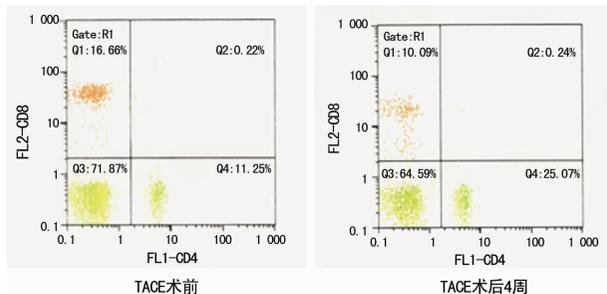


图 2 原发性肝癌患者 TACE 治疗前后 T 淋巴细胞亚群分布图

2.3 原发性肝癌患者 TACE 治疗前后 AFP 变化 在 TACE

治疗前，89 例原发性肝癌患者中，有 73 例 AFP 高于正常值，阳性率 82.0%，平均值为 (1 874±835) μg/L。TACE 治疗后 4 周复查 AFP 为 (327±181) μg/L，较 TACE 治疗前明显下降 (*P* < 0.05)。

3 讨 论

原发性肝癌的发生与机体的免疫状况，特别是 T 淋巴细胞为主的细胞免疫密切相关。随着介入治疗在中晚期肝癌治疗策略中地位的日益突出，细胞免疫状态也将成为介入治疗的重要内容和研究方向之一^[3-4]。

T 淋巴细胞是机体免疫监视及抗肿瘤免疫的重要效应细胞。T 淋巴细胞来源于骨髓的淋巴样干细胞，在胸腺内发育成熟为 T 细胞，移行至外周淋巴组织，执行特异性细胞免疫应答。外周成熟的 T 细胞(CD3⁺、总 T 细胞)按表面分子或功能不同可分为不同的亚群。按其表面 CD 分子的不同可分为 CD4⁺、CD8⁺ 两大亚群。正常情况下，CD4⁺ 和 CD8⁺ 之间始终保持一个恒定的比例，构成宿主细胞免疫调节的重要环节。任何一方过低或过高，调控网络失去平衡均可引起免疫紊乱。因 CD4⁺ 有诱导和辅助功能，一般认为处于细胞免疫的核心，而 CD8⁺ 亚群含抑制性 T 细胞，所以当 CD4⁺ 下降、CD8⁺ 上升或 CD4⁺/CD8⁺ 比值下降时，机体细胞免疫功能低下。肿瘤患者往往机体细胞免疫状态低下，多表现为 T 淋巴细胞亚群异常，而肿瘤患者免疫功能的恢复或好转首先表现为 CD4⁺/CD8⁺ 比值的回升^[5]。本研究 89 例原发性肝癌患者与健康对照组比较，总 T 细胞(CD3⁺)及各亚群(CD4⁺ 和 CD8⁺)均下降，但由于在细胞免疫中起核心作用的 CD4⁺ 下降更为明显而导致 CD4⁺/CD8⁺ 比值明显低于正常 (*P* < 0.05)，提示原发性肝癌患者 T 淋巴细胞亚群异常，细胞免疫状态低下，不能形成有效的免疫应答，表现为机体清除肿瘤细胞的能力下降，使肿瘤得以持续发展。有研究表明，原发性肝癌患者细胞免疫发生不同程度的紊乱，可能与原发性肝癌诱导产生的血清免疫抑制因子有关^[6]。

TACE 是中晚期原发性肝癌重要的治疗方法，可显著延长患者生存期，这与机体免疫功能状态有密不可分的关系，TACE 疗效在机体免疫功能良好的情况下得到加强，复发率明显减少^[7]。尽管 TACE 已广泛应用于临床，但其能否改善肝癌患者细胞免疫状况，尚无定论。Higuchi 等^[8] 研究 TACE 后手术切除标本发现，TACE 不仅破坏瘤体内的瘤细胞，而且对瘤外子灶、肿瘤包膜外浸润灶及门静脉癌栓都有杀伤作用，介入治疗后肿瘤内部坏死率达 35.5%~80.0%。一般认为，TACE 治疗原发性肝癌在很大程度上减轻了肿瘤负荷，解除或减轻了肿瘤组织的免疫抑制作用，使机体的免疫功能恢复^[9]。但也有研究得出不同的结果，认为肝癌患者在 TACE 术后免疫功能至少在初始阶段是受到抑制的^[10]。

TACE 对肝癌患者细胞免疫状态影响的不同研究结果，可能与病例选择(病情的轻重或早晚)^[11]、化疗药物剂量(大剂量或小剂量)^[12]、检测时间(术后指标检测的间隔时间长短)^[13] 等多种因素有关。研究发现 TACE 治疗后 1~2 周细胞免疫水平出现一过性的下降，而 3~4 周出现明显回升，故本研究将 TACE 术后 4 周选定为复查时间。本研究选择的 89 例原发性肝癌病例多为中晚期肝癌的患者，均未使用大剂量的化疗方案，研究结果显示：TACE 治疗后 4 周，机体的细胞免疫功能出现恢复的趋势，表现为总 T 细胞(CD3⁺)和起核心作用的 CD4⁺ 亚群比例出现回升，抑制性 T 细胞 CD8⁺ 亚群比例下降，不同亚群的 CD4⁺ 与 CD8⁺ 细胞呈现出相反的变化趋势，提示此变化是 TACE 治疗干预作用的结果，而非机体自然恢复所

致。特别是 $CD4^+/CD8^+$ 比值的明显升高 ($P < 0.05$), 更被常常作为肿瘤患者免疫功能的恢复或好转的首要表现。血清 AFP 值作为反映原发性肝癌治疗效果的直接参数, 也较 TACE 治疗前明显下降 ($P < 0.05$)。所以说, TACE 在治疗肿瘤的同时, 对机体的细胞免疫功能状态也有促进恢复的作用, 即在局部治疗的同时, 也达到了全身治疗的目的。

TACE 治疗包括栓塞和化疗两部分, 对机体免疫功能的影响颇为复杂。国内外有关栓塞对患者免疫功能影响的报道较少。有研究表明, 介入栓塞治疗后机体的细胞免疫功能得到恢复, 证实了栓塞治疗后原发性肝癌患者的免疫功能抑制减轻^[12]。全身化疗对肿瘤患者 T 细胞亚群的影响已有较多的报道, 多数学者认为化疗可抑制机体的免疫功能, 但研究表明, 介入化疗(特别是小剂量介入化疗)对机体的细胞免疫功能抑制不明显。邹劲林等^[14]观察介入热灌注化疗对原发性肝癌患者细胞免疫功能有一定的激活作用。

原发性肝癌的恶性程度高, 较早即可发生转移, 肝癌的这一生物学特性决定了肝癌的治疗用单一方法难以取得满意的疗效, 故对手术不可切除肝癌的治疗, 今后多倾向于以 TACE 为主的综合介入治疗^[15]。目前报道的综合介入治疗包括: (1) TACE 联合物理消融治疗, 例如 TACE 联合射频消融^[16]、微波消融^[17]、冷冻消融^[18]、高能聚焦超声消融等, 能够提高机体细胞免疫功能, 增强机体抗肿瘤的免疫力。(2) TACE 联合其他介入手术方法, 有研究报道, TACE 联合部分脾栓塞术较单纯 TACE 能更好地改善机体抗肿瘤免疫功能, 促进肝癌患者免疫功能平衡的恢复^[19]。(3) TACE 联合免疫治疗, 例如树突状细胞治疗、细胞因子诱导的杀伤细胞过继治疗等, 均对机体免疫功能有正向调节作用, 展现了良好的前景。(4) TACE 联合分子靶向药物(如索拉非尼), 索拉非尼具有双重抗肿瘤作用即直接抑制肿瘤增殖和抑制肿瘤血管生成的作用, 还具有提高肝癌患者免疫功能的作用。Strebel 等^[20]报道, TACE 联合索拉非尼治疗肝癌可有效抑制肿瘤血管再生, 减少肿瘤的复发和转移, 提高肝癌的治疗效果。(5) TACE 联合中医药治疗, 此类报道较多, 中医药治疗通过改善患者免疫状态, 提高机体的抗肿瘤免疫效应, 有可能降低中晚期肝癌患者 TACE 术后复发和转移的机会。

原发性肝癌患者细胞免疫功能低下, 重视保护和提高患者细胞免疫功能应该是综合治疗中的重要方面。T 细胞亚群能较为准确、合理地反映机体的细胞免疫功能水平, 有助于观察疗效及评定患者预后。在治疗原发性肝癌时, TACE 可促进患者 $CD4^+/CD8^+$ 比值的明显升高和细胞免疫功能的恢复。今后将有更多的以原发性肝癌患者细胞免疫功能为内容或评价指标的临床基础研究出现, 为更为科学、合理地制订原发性肝癌的治疗策略提供循证医学证据。

参考文献

- [1] Shin SW. The current practice of transarterial chemoembolization for the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. Korean J Radiol, 2009, 10(5): 425-434.
- [2] Varga M, Valsanis A, Matia I, et al. Transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma [J]. Rozhl, 2009, 88(8): 434-438.
- [3] 张跃伟. 微创介入治疗肝癌对机体免疫功能影响的研究现状与展望[J]. 实用肝脏病杂志, 2014, 17(3): 231-233, 234.
- [4] 张功霖, 赵卫. 介入治疗肝癌对免疫功能影响的研究进展

- [J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(33): 3225-3230.
- [5] Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, et al. Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2011, 53(4): 1206-1216.
- [6] Qiu FB, Wu LQ, Lu Y, et al. Predominant expression of Th1-type cytokines in primary hepatic cancer and adjacent liver tissues [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2007, 6(1): 63-66.
- [7] Hiroishi K, Eguchi J, Baba T, et al. Strong $CD8^+$ T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma [J]. J Gastroenterol, 2010, 45(4): 451-458.
- [8] Higuchi T, Kikuchi M, Okazaki M. Hepatocellular carcinoma after transcatheter hepatic arterial embolization [J]. Cancer, 1994, 73(9): 2259-2267.
- [9] 毛华, 黄纯积, 宋卫生, 等. 双重介入治疗原发性肝癌患者对免疫功能的影响 [J]. 广东医学, 2006, 27(3): 341-342.
- [10] 刘晓芬, 宋波, 纪雪红. 介入治疗对原发性肝癌患者 T 细胞亚群比例的影响 [J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(5): 599-600.
- [11] 韩聚强, 范公忍, 任永强, 等. 不同微创介入治疗原发性肝癌对机体 T 细胞免疫功能的影响 [J]. 介入放射学杂志, 2014, 23(3): 218-221.
- [12] 曹驰, 李青, 梁颖, 等. 原发性肝癌介入治疗后机体免疫功能的研究 [J]. 中国医师杂志, 2005, 7(7): 903-905.
- [13] 倪全法, 王晓光, 陈徐艰, 等. 肝癌患者肝动脉化疗栓塞术后细胞免疫功能的动态变化及其临床意义 [J]. 中国药物与临床, 2011, 11(8): 906-907.
- [14] 邹劲林, 吕宝军, 杨光伟, 等. 介入热灌注化疗中晚期肝癌患者免疫功能的影响 [J]. 中国实用医药, 2009, 4(35): 19-20.
- [15] Cabibbo G, Latteri F, Antonucci M, et al. Multimodal approaches to the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2009, 6(3): 159-169.
- [16] Fan WZ, Yang JY, Lü MD, et al. Transcatheter arterial chemoembolization plus percutaneous thermal ablation in large hepatocellular carcinoma: clinical observation of efficacy and predictors of prognostic factors [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2011, 91(31): 2190-2194.
- [17] 王忠, 马亦龙. TACE 及 MWA 治疗对肝癌患者免疫功能的影响 [J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(14): 2027-2031.
- [18] 杨茂, 郭志, 司同国, 等. 化疗栓塞联合冷冻对肝癌患者免疫功能的影响 [J]. 放射学实践, 2011, 26(5): 534-537.
- [19] 章万勇, 查云飞. TACE 联合部分脾栓塞术对肝癌患者免疫功能影响研究 [J]. 临床放射学杂志, 2015, 34(3): 451-454.
- [20] Strebel BM, Dufour JF. Combined approach to hepatocellular carcinoma: a new treatment concept for nonresectable disease [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2008, 8(11): 1743-1749.