

原发性肝癌患者 Th₁/Th₂ 亚群研究 *黄萍¹ 陈铭声² 牛杰³ 安银东¹ 顾娟玲¹

(第四军医大学 1 口腔医院检验科 2 西京医院检验科 陕西 西安 710032 ;

3 交通大学口腔医院检验科 陕西 西安 710004)

摘要 目的: 探讨原发性肝癌患者血清中淋巴细胞亚群中 Th₁/Th₂ 的变化, 为分析肝癌的发生发展状态和临床治疗提供免疫学指标。方法: 应用放射免疫分析及酶联免疫分析法(ELISA) 测定 46 例肝癌患者, 及 43 例正常对照组进行比较。以 IL-2、INF- γ 和 TNF- α 水平代表 Th₁ 型细胞因子, 以 IL-4、IL-6、IL-8、IL-10 的水平代表 Th₂ 型细胞因子。结果: 肝癌患者 IL-2、TNF- γ 、IL-6 的水平明显低于正常对照组, $P < 0.01$ 。IL-4、IL-8、IL-10、TNF- α 的水平明显高于正常对照组, $P < 0.01$ 。结论: 肝癌患者体内存在 Th₁/Th₂ 细胞因子失衡, 其中 Th₁ 亚群功能抑制, Th₂ 亚群功能亢进, 其与肿瘤在宿主体内生长密切相关。通过纠正这些免疫失调将成为肝癌治疗的重要手段。

关键词 肝癌 辅助性 T 淋巴细胞亚群 细胞因子

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)15-2901-03

Deregulation in Th₁/Th₂ Subsets of CD₄⁺ T Cells in Peripheral Blood of Patients with Primary Hepatocellular Carcinoma*HUANG Ping¹, CHEN Ming-Sheng², NIU Jie³, AN Yin-Dong¹, GU Juan-Ling¹

(1 Department of Clinical Laboratory, Stomatology Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China;

2 Department of Clinical Laboratory, XiJing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China;

3 Department of Clinical Laboratory, Jiao Tong University Stomatology Hospital, Xi'an, 710004, China)

ABSTRACT **Objective:** To study the changes of Th₁/Th₂ subsets of CD₄⁺ cells in peripheral blood of patients with primary hepatocellular carcinoma (PHC) to analyze the occurrence and progression of primary PHC and provide a immunological data for clinical treatment. **Methods:** RIA and ELISA were used to detect the level of serum IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 TNF- γ and TNF- α in 46 patients with PHC 43 normal serum as control. IL-2, TNF- γ and TNF- α were used to represent cytokines of Th₁ type, and IL-4, IL-6, IL-8 and IL-10 to represent cytokines of Th₂ type. **Results:** The level of IL-2, TNF- γ , IL-6 in PHC group were significantly lower than those in the normal group ($P < 0.01$), but the levels of IL-4, IL-8, IL-10 and TNF- α were significantly higher in patients with PHC than those in normal control group ($P < 0.01$). **Conclusions:** The levels of IL-2, IL-4, IL-8 and IL-10 were relatively sensitive for diagnosis of PHC. In the peripheral blood of the patients, there seems to be deregulation in the function of Th₁/Th₂ subsets of CD₄⁺ T cells with enhancement of Th₂ function and a malfunction in Th₁ cells. These changes are closely related to tumor progresses in the host. Correcting this immune malfunction may become an important method in hepatocellular carcinoma.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Th₁/Th₂ subsets; Cytosine

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)15-2901-03

前言

原发性肝癌是常见的恶性肿瘤之一, 由于发病前比较隐蔽, 患者在就诊时已处于病程的中晚期, 手术、放化疗的效果均不佳, 以细胞和细胞因子为核心的免疫治疗为这类病人提供了新的希望^[1]。辅助性 T 淋巴细胞处于整个肿瘤免疫的核心位置, 根据分泌细胞因子的不同, 可分为 Th₁ 和 Th₂ 两个亚群, 它们在肿瘤免疫中的作用不同, 甚至相反。通过对细胞因子水平的测定, 可以了解 Th₁ 和 Th₂ 的平衡状态^[2-3], 我们以 IL-2、TNF- γ 、TNF- α 作为 Th₁ 型细胞因子, IL-4、IL-6、IL-8、IL-10 作 Th₂ 型细胞因子, 测定各项细胞因子水平, 旨在为该类患者的免疫治疗

提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

第四军医大学西京医院 2009 年 8 月 -2011 年 11 月收治原发性肝癌患者 46 例, 均经影像学 B 超、CT 或 MRI 证实及病理学确诊。男性 37 例, 女性 9 例, 年龄范围 36-57 岁, 平均年龄 46.8 岁。手术治疗 28 例, 其中肝细胞癌 26 例, 胆管细胞癌 6 例, 混合细胞癌 4 例, 非手术治疗 10 例。对照组均是健康查体者 43 例, 男性 28 例, 女性 15 例, 年龄 35-60 岁, 平均年龄 48.6 岁。肿瘤直径 1-18 cm。其中 28 例 AFP 大于 500-5000 ng/ml, 15

* 基金项目: 陕西省社发攻关项目(2010K16-01-09)

作者简介: 黄萍(1975-) 女, 博士研究生, 主管检验师, 主要从事恶性肿瘤免疫学研究,

Tel: 029-84776185 E-mail: huangping@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2012-02-23 接受日期: 2012-03-19)

例 25-500 mg/ml, 13 例小于 25 ng/ml, HBsAg 阳性 39 例, HBsAb 阳性 2 例, HBeAg 阳性 5 例, HBeAb 阳性 4 例, HBcAb 阳性 34 例, HCV 阳性 5 例。按 1977 年肝癌防治协作会议制定的分期标准, 期 10 例, 期 22 例, 期 8 例, 期 6 例。

1.2 试剂

IL-2 RIA 试剂盒由上海原子能研究所提供, IL-4, IL-10, ELISA 试剂盒由 parmagen 公司提供。IL-6, TNF- α , IL-8 试剂盒由北京北方所提供。IFN- γ 试剂盒由深圳品美公司提供。

1.3 实验方法

所有原发性肝癌患者均在手术或非手术前早晨空腹 6:30-7:30 采取周静脉血, 分离血清放 -70℃ 冰箱保存待测。采用

双盲法, 由专人按说明书进行操作。

1.4 统计学处理

均采用 t 检验, 运用期别血清细胞因子水平比较采用方差分析, 用 SPSS 10.0 软件分析。

2 结果

2.1 原发性肝癌患者血清 IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 的水平与正常对照组比较

由表 1 可见, 原发性肝癌患者血清 IL-2, IFN- γ 和 IL-6 水平明显低于正常对照组 ($P < 0.01$), 肝癌患者血清 IL-4, IL-8, IL-10 显著高于正常对照组 $P < 0.01$ 结果见表 1。

表 1 血清 IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 的测定水平

Table 1 Serum level of IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10

Group	n	IL-2 (ng/ml)	IFN- γ (μ g/L)	TNF- α (μ g/L)	IL-4 (μ g/L)	IL-6 (μ g/L)	IL-8 (μ g/L)	IL-10 (μ g/L)
HCC	46	13.45 $\pm$ 5.17	68.76 $\pm$ 12.94	2.71 $\pm$ 1.13	237.60 $\pm$ 57.08	14.73 $\pm$ 3.96	0.57 $\pm$ 0.11	10.45 $\pm$ 4.97
Control	43	23.95 $\pm$ 3.11	115.42 $\pm$ 11.55	0.96 $\pm$ 0.117	109.16 $\pm$ 41.07	23.78 $\pm$ 5.59	0.33 $\pm$ 0.05	4.68 $\pm$ 2.72

2.2 原发性肝癌患者血清细胞因子不同临床分期

由表 2 可见, 原发性肝癌患者血清 IL-2, IFN- γ 水平、期高于、期有明显差异 ($P < 0.01$), IL-6、期与、期末

见明显变化 $P > 0.05$,、期肝癌患者血清 TNF- α , IL-4, IL-8, IL-10 水平明显高于、期差异显著 $P < 0.01$ 。

表 2 不同临床分期血清细胞因子水平

Table 2 Serum level of cytokines in different clinical stages

Group	n	IL-2	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10
、stages	32	14.89 $\pm$ 4.74	91.55 $\pm$ 17.08	1.85 $\pm$ 0.96	177.44 $\pm$ 37.08	15.31 $\pm$ 3.86	0.46 $\pm$ 0.07	7.34 $\pm$ 2.31
、stages	14	8.65 $\pm$ 4.92	64.09 $\pm$ 14.16	2.95 $\pm$ 1.34	259.86 $\pm$ 71.39	16.03 $\pm$ 4.11	0.87 $\pm$ 0.09	15.67 $\pm$ 5.07

3 讨论

细胞因子在免疫调节过程中发挥主导作用, 而辅助 T 淋巴细胞亚群居于细胞免疫应答的中心, 在肿瘤免疫中具有重要作用, 由血液中各种活化的细胞分泌, 包括淋巴细胞, 吞噬细胞, NK 细胞等活性, 少数可直接杀伤肿瘤细胞。在恶性肿瘤、结核患者辅助性 T 淋巴细胞数量减少, 功能减弱^[3-5]。T 淋巴细胞及其亚群在体内水平的高低及功能状况直接影响机体免疫力, 一旦机体免疫细胞分布失衡, 就可能造成机体免疫功能紊乱。

一些学者在研究中发现, 根据分泌细胞因子的不同, 可将辅助性 T 淋巴细胞亚群分为 Th₁ 和 Th₂ 两个亚群, Th₁ 亚群以分泌 IL-2, IFN- γ , TNF- β , TNF- α , IL-12 为主, Th₂ 亚群以分泌 IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 和粒-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF), 其中的亚群中单个细胞不一定分泌所有细胞因子, 可分泌在亚群细胞因子中的一种或几种。Th₁ 主要功能为增强杀伤细胞的细胞毒作用, 介导细胞免疫应答^[6-7]。Th₂ 型细胞用可促进抗体的产生, 促进变态反应, 并且抑制 Th₂ 细胞, 介导体液免疫应答^[8-9]。

在肿瘤发生后, 机体通过免疫机体发挥抗肿瘤作用。其中细胞免疫是肿瘤免疫的主要途径, 体液免疫通常仅在某些情况下起协同作用。当机体 Th₁ 细胞及其分泌的细胞因子, 如 IL-2,

IFN- γ 占优势, 则表明抗体对肿瘤具有活跃的免疫力, 一旦 Th₁/Th₂ 细胞失衡, Th₂ 型细胞因子 IL-4, IL-10, IL-5 等占优势, 提示机体抗肿瘤反应受抑制^[10]。机体的抗肿瘤免疫将受到严重干扰, Yamamura 等^[11]最先发现肿瘤病人体内 Th₂ 型细胞因子占优势状态, 之后发现小细胞肺癌、绒毛膜癌、卵巢癌、胃癌等多种类型肿瘤发生 Th₂ 漂移, 并且与肿瘤的恶性程度密切相关。Zhu J 等研究发现肝癌患者 IL-2 明显低表达, Th₁ 类细胞因子分泌受到抑制, 而 Th₂ 类型细胞因子占优势^[12-14]。

本研究发现原发性肝癌患者血清中 Th₁ 细胞分泌的细胞因子 IL-2, IFN- γ 水平显著低于正常对照组, 与文献报道相近^[15-16], 但 TNF- α 较正常对照组有明显升高, 差异显著。从我们的结果分析, 可能与原发性肝癌患者机体免疫功能亢进, 细胞免疫紊乱, 虽然 TNF- α 水平升高, 但其抗肿瘤的活性可能被增高的 Th₂ 型细胞因子抑制, 造成免疫抑制状态, 但这一推理有待累积资料, 进一步证实。Th₂ 型分泌的细胞因子 IL-4, IL-8, IL-10 水平较正常对照组升高明显, 差异显著 $P < 0.01$ 。但 IL-6 水平较正常对照组低, IL-2 在体内主要由 Th₁ 亚群产生, IL-4 主要是由 Th₂ 亚群产生, 因此原发性肝癌患者体内 Th₁/Th₂ 向 Th₂ 亚群方向漂移, 从而使细胞免疫应答抑制。我们测定了原发性肝癌患者的 Th₁ 和 Th₂ 细胞因子水平, 结果显示原发性肝癌患者, 血清 IL-2, IFN- γ 水平显著降低, 原发性肝癌患者存在 Th₂

型细胞优势表达现象。

IL-10 和 IL-4 是抑制 Th₁ 型细胞因子应答和介导 Th₂ 型细胞发育的主要细胞因子, 而 IL-10 是最强烈的细胞免疫抑制剂, 它的产生则进一步抑制 Th₁ 型细胞因子的产生和应答, 产生恶性循环, 使细胞免疫应答进一步受抑制, 无法杀灭肿瘤细胞, Th₂ 细胞产生的 IL-6, TNF- α 可以促进肿瘤间质的生长, 以及肿瘤血管的形成, 为肿瘤细胞的增殖提供良好的环境。在原发性肝癌患者临床分期中, 研究结果显示, 肝癌患者血清 IL-2, IFN- γ 、期低于、期, 差异显著 $P < 0.01$, IL-4, IL-8, IL-10, TNF- α 、期高于、期 $P < 0.01$, 尤其是 IL-10 水平高达正常对照组 3.5 倍以上, 并随临床病情加重呈升高趋势。但 IL-6、期与、期末无明显差别 $P > 0.05$ 。结果显示, 肝癌患者确实存在 Th₁ 向 Th₂ 漂移, 表明 Th₂ 细胞因子表达可能与肝癌病变的进程相关。在 46 例原发性肝癌患者中 Th₁ 细胞亚群、期低于、期、期以 Th₁ 型细胞亚群表达为主。研究结果与文献报道一致^[17-19], 其中以、期 Th₁ 细胞亚群高表达, 其原因可能与其他恶性肿瘤不同。肝癌的发生与病毒性肝炎有一定的相关性, 病毒性肝炎与 Th₁/Th₂ 亚群相关性研究, 新近文献已有报道^[20], 在丙型肝炎中 CD₄⁺CD₅₇⁺ T 细胞表达升高。本组 46 例原发性肝癌患者中 37 例 HBsAg 阳性, 34 例 HBeAb 阳性, 5 例 HCV 阳性。其次, 肝脏是免疫特异器官, 恶性肿瘤发生中细胞因子网络变化可能有所不同。Th₁/Th₂ 漂移在肝癌中真正的作用机制有待进一步研究。

综上所述原发性肝癌患者体内存 Th₁/Th₂ 向 Th₂ 漂移的现象, 为肿瘤免疫治疗提供线索, 一方面, 可以向患者机体补充 IL-2, IFN- γ 等 Th₁ 型细胞因子; 另一方面可以应用抗 IL-4 抗体进行治疗, 纠正 Th₁/Th₂ 亚群细胞因子比例失调的必要性。因此, 临床科室已根据我们的测定结果向 IL-2 水平明显降低的患者注射 IL-2, IFN- γ 等细胞因子, 初步显示有一定的临床效果, 我们将跟踪分析, 以期临床提供更有有效的治疗方案。

参考文献(References)

- [1] Han YF, Zhao J, Ma LY, et al. Factors predicting occurrence and prognosis of hepatitis-B-virus-related hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(38):4258-4270
- [2] Xu D, Wang FS. Are non-traditional CD4 (+) CD69 (+) CD25 (-) regulatory T cells involved in disease progression of human hepatocellular carcinoma? [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(10): 1469-1470
- [3] Tomova R, Pomakov J, Jacobs JJ. Changes in cytokine profile during local IL-2 therapy in cancer patients [J]. Anticancer Res, 2006, 26(3A): 2037-2047
- [4] 周立平, 董西华, 梁虹, 等. CXCR4 和 CCR5 在 T 淋巴细胞中的表达及与乳腺癌进展的相关性 [J]. 中华检验医学杂志, 2011, 4(1): 66-67
Zhou Li-ping, Dong Xi-hua, Luan Hong, et al. Lymphocyte activation expression of its surface receptor CXCR4 and CCR5 in breast cancer patients [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2011, 4(1): 66-67
- [5] 叶军, 罗军敏. 结核病 T 细胞亚群的研究进展 [J]. 免疫学杂志, 2011, 27(5): 445-448
Ye Jun, Luo Jun-min. Progress of T lymphocyte subsets in tuberculosis [J]. Immunological Journal, 2011, 27(5): 445-448
- [6] Wu TN, Lin KH, Chang YJ, et al. Avidity of CD1d-ligand-receptor ternary complex contributes to T-helper 1 (Th1) polarization and anticancer efficacy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108 (42): 17275-17280
- [7] Li CH, Kuo WH, Chang WC, et al. Activation of regulatory T cells instigates functional down-regulation of cytotoxic T lymphocytes in human breast cancer [J]. Immunol Res, 2011, 51(1): 71-79
- [8] Gao YW, Chen YX, Wang ZM, et al. Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and the presence of CD4+ infiltrating T-lymphocyte in human primary hepatocellular carcinoma [J]. Hepatogastroenterology, 2008, 55(82-83): 345-350
- [9] Kitajima M, Ito T, Tumes DJ, et al. Memory type 2 helper T cells induce long-lasting antitumor immunity by activating natural killer cells [J]. Cancer Res, 2011, 71(14): 4790-4798
- [10] Lauerova L, Dusek L, Simickova M, et al. Malignant melanoma associates with Th₁/Th₂ imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response [J]. Neoplasma, 2002, 49(3): 159-166
- [11] Yamamura M, Modlin R L, Ohmen J D, et al. Local expression of anti-inflammatory cytokines in cancer [J]. J Clin Invest, 1993, 91 (3): 1005-1010
- [12] Zhu J, Feng A, Sun J, et al. Increased CD4 (+) CD69 (+) CD25 (-) T cells in patients with hepatocellular carcinoma are associated with tumor progression [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26 (10): 1519-1526
- [13] Krastev Z, Koltchakov V, Popov D, et al. A case of hepatocellular carcinoma (HCC): treatment with local application of alcohol and interleukin 2 (IL-2) [J]. Hepatogastroenterology, 2003, 50(53): 1647-1649
- [14] Thakur S, Singla A, Chawla Y, et al. Expansion of peripheral and intratumoral regulatory T-cells in hepatocellular carcinoma: a case-control study [J]. Indian J Pathol Microbiol, 2011, 54(3): 448-453
- [15] Li P, Du Q, Cao Z, Guo Z, et al. Interferon-gamma induces autophagy with growth inhibition and cell death in human hepatocellular carcinoma (HCC) cells through interferon-regulatory factor-1 (IRF-1) [J]. Cancer Lett, 2012, 314(2): 213-222
- [16] Ishikawa M, Nishioka M, Hanaki N, et al. Hepatic resection induces a shift in the Th₁/Th₂ balance to ward Th2 and produces hyper metabolic and hypohemodynamic states [J]. Hepatogastroenterology, 2004, 51 (59): 1422-1427
- [17] Lee WC, Wu TJ, Chou HS, et al. The impact of CD4+ CD25+ T cells in the tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma [J]. Surgery, 2012, 151 (2): 213-222
- [18] Sakaguchi E, Sakaida I, Okita K. Th₁/Th₂ balance in HCV-related liver cirrhosis and the effect of TGF-beta on Th1 response: possible implications for the development of hepatoma [J]. Nippon Rinsho, 2004, 7(pt1): 175-178
- [19] Yoshizawa K, Abe H, Kubo Y, et al. Expansion of CD4 (+) CD25 (+) FoxP3 (+) regulatory T cells in hepatitis C virus-related chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J]. Hepatol Res, 2010, 40 (2): 179-187
- [20] Shiraki T, Takayama E, Magari H, et al. Altered cytokine levels and increased CD4+CD57+ T cells in the peripheral blood of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma patients [J]. Oncol Rep, 2011, 26(1): 201-208