

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.18.026

不同临床分期肝癌患者抗 AFP Th1 和 Tc1 应答反应研究*

李林均¹ 余建云¹ 许涛¹ 张军¹ 程雄飞¹ 焦娇¹ 曹凤军^{1△} 姜孝新^{2△}

(1 湖北医药学院附属人民医院肿瘤科 湖北 襄阳 442000; 2 南华大学附属第一医院 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的:研究 CD4(Th1)和 CD8(Tc1)T 细胞对肝癌患者的 AFP 的应答反应及其与临床特征的相关性,为其早期诊断与预防提供新策略。**方法:**研究对象为 62 例 HCC 患者,30 例肝硬化患者及 30 例健康志愿者;重点分析 CD4 T 细胞和 CD8 T 细胞对 HCC 患者的 AFP- 衍生肽的反应;用胞内细胞因子检测法对 IFN- γ 进行检测。**结果:**抗 AFP 的 Tc1 反应检测阳性结果在对照组为 28.5%,在 Okuda I 期的肝癌患者中为 25.0%,在 II 或 III 期的 HCC 患者中为 31.6%。抗 AFP Th1 阳性反应仅在 HCC 患者中检测到。抗 AFP Th1 阳性反应在 44.4%的 Child-Pugh A 级的 HCC 患者中检测到,但是在 Child-Pugh B 或 C 级中仅 15.4%。Tc1 型反应在 Child-Pugh A 级肝功的患者中为 16.7%,在 Child-Pugh B 或 C 级患者中为 46.2%。**结论:**抗 AFP Th1 应答更多出现在早期肝硬化的 HCC 的患者中,而抗 AFP Tc1 应答更可能出现在晚期肝硬化患者中,这些结论为抗肝癌疫苗药物设计提供了理论基础。

关键词: 甲胎蛋白(AFP);肝细胞癌(HCC);疾病分期;Okuda;Child-Pugh

中图分类号:R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)18-3506-04

Immune Response of Hepatocellular Carcinoma of in Patients with Different Stages of Liver Function*

LI Lin-jun¹, YU Jian-yun¹, XU Tao¹, ZHANG Jun¹, CHEN Xiong-fei¹, JIAO Jiao¹, CAO Feng-jun^{1△}, JIANG Xiao-xin^{2△}

(1 Department of Oncology, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine; Department of Oncology, Xiangyang, Hubei, 442000, China; 2 The First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan, 421001, China)

ABSTRACT Objective: Alpha-Fetoprotein (AFP) is a kind of tumor associated antigen in hepatocellular carcinoma (HCC), and it is also the target of immune therapy. However, there is little information on the pattern of CD4 (Th1) and CD8 (Tc1) T-cell response to AFP in patients with HCC or on their association with clinical characteristic of patients. Therefore, we observed the CD4 (Th1) and CD8 (Tc1) response of T cells in patients with hepatocellular carcinoma AFP and its clinical features. **Methods:** The subjects were 62 Patients with HCC, 30 patients with liver cirrhosis and 30 healthy people as control. CD4 and CD8T-cell responses to AFP-derived peptides of 62 HCC patients were studied, and intracellular cytokine method was applied to detect IFN- γ . **Results:** The rate of positive results of Tc1 reaction of anti AFP was 28.5% in the control group, 25.0% in patients with hepatocellular carcinoma in Okuda I, and in phase II or III of HCC patients was 31.6%. Anti AFP Th1 positive reaction was detected only in HCC patients. 44.4% of HCC patients with Child-Pugh A were Th1 reaction; however, this was detected in only 15.4% with B or C score. Tc1 reaction was detected in 16.7% of patients with Child-Pugh A and Child-Pugh B or C level was 46.2%. **Conclusion:** The results show that anti-AFP Th1 reactions mainly occurred in patients with disease in early stage, anti AFP Tc1 responses are more likely to occur in patients with late stage cirrhosis, therefore, these data provide effective information for vaccine design against hepatocellular carcinoma.

Key words: Alpha-fetoprotein (AFP); Hepatocellular carcinoma (HCC); Stage of disease; Okuda; Child - Pugh

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

Article ID:1673-6273(2015)18-3506-04

前言

AFP 的表达在出生后显著降低且在成人的肝脏中仅有痕量的表达,而在肝细胞癌(HCC)和睾丸癌中特异性表达。肝再生和肝癌发生过程中,AFP 基因被重新被激活并表达,导致大部分肝癌患者会出现血清中 AFP 含量明显升高^[1-3]。在动物模型中,通过抗 AFP 诱导细胞介导的免疫反应可以控制肿瘤生

长^[4-6]。在人类中,B 细胞和 T 细胞可以识别 AFP 序列内部的抗原决定簇并分化成为效应物或 / 和调节淋巴细胞,一些由 AFP 衍生出的 HLA I 类(HLA-A2 和 HLA-A24)和 II 类(HLA-DR)分子限制的 CD4(Th1)和 CD8(Tc1)抗原决定簇已经被鉴定出来。为了揭示肝细胞癌患者疾病不同阶段的抗 AFP Th1 和 Tc1 应答,我们对同组平行的 HCC 的患者进行了研究,为 HCC 的早期诊断、早期预防及免疫治疗提供指导。

* 基金项目:湖南省自然科学基金项目(14JJ2092)

作者简介:李林均(1970-),男,硕士,主任医师,主要研究方向:肿瘤放化疗

△通讯作者:姜孝新,博士,主任技师,主要从事肿瘤免疫基础与临床研究,E-mail:jiangxiaoxin168@126.com;

曹凤军,电话:13593763358,E-mail:ilinjunhb@163.com

(收稿日期:2014-10-12 接受日期:2014-11-20)

1 材料和方法

1.1 研究对象

试验组为 62 例 HCC 患者, 对照组为 30 例肝硬化患者和 30 例健康志愿者。肝硬化诊断标准: 符合中华医学会肝病分会制定的肝硬化诊断标准, 患者有病毒性肝炎、自身免疫性肝炎、长期大量饮酒等可导致肝硬化的有关病史; 出现肝功能减退和门静脉高压特征性的临床表现, 肝功能检验提示血清白蛋白、转氨酶、胆红素、凝血酶原时间等检查提示肝功能失代偿; 超声或 CT 提示肝硬化。肝癌诊断标准: 符合中国抗癌协会制定的肝癌标准, 组织学病理或穿刺细胞学病理证实的肝癌。肝癌患者同时满足, 在就诊前未经手术、放疗、化疗或介入栓塞治疗等抗癌治疗。外周血单核细胞(PBMC)均来自 HCC 患者和健康志愿者的血液。本研究由医院伦理委员会批准, 所有患者均签署知情同意书。

1.2 T 细胞的体外扩增

RPMI1640 培养基、MEM 培养基、青霉素和链霉素和 10% 胎牛血清(FCS)购自 Life Technologies 公司。外周血单核细胞(PBMC)重悬浮于含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基中, 细胞浓度为 $1.5 \times 10^6/\text{ml}$, 用特异性多肽($1 \mu\text{M}$), 或置于 96 孔板中的多肽中对细胞进行刺激。重组 IL-2($50 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$)在第 3 天加入到培养基中, 培养 10-12 d 后对细胞进行分析。

1.3 胞内 IFN- γ 染色

T 细胞用 Cy-chrome 标记的抗 CD4 和 CD8 抗体表面染色, 然后用 Cytofix/Cytoperm 试剂固定和破膜渗透, 再用 FITC 标记的抗 IFN- γ 对胞内细胞因子染色, 并采用流式细胞仪分析。

1.4 血清 AFP 浓度检测

微粒子酶免疫分析试剂盒(雅培公司)测量血清 AFP 浓度, 按说明书进行操作。

1.5 统计分析

采用 Mann-Whitney U 检验比较 HCC 患者血清 AFP 浓度和 T 细胞对识别的抗原表位(应答与无应答)的应答能力。X² 检验 Okuda 肿瘤分期中 I 或 II + III 期的 HCC 患者中 CD4 T

细胞应答的百分率是否占主导地位。P ≤ 0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC 患者抗 AFP Th1 应答

从 62 例 HCC 患者分 20 例患者(32.3%)出现抗 AFP 的 CD4 T 细胞应答, 但是在对照组中 CD4 T 细胞应答未检测到, 差异极显著(P <0.01)。相比之下, 18 例(29.0%)患者中出现抗 AFP CD8 T 细胞应答, 而对照组患者中出现 16 例(26.7%), 差异无统计学意义(P >0.05)(表 1)。说明抗 AFP Tc1 应答在对照组和 HCC 患者中都检测到, 而抗 AFP Th1 应答只在 HCC 患者中检测到。在 62 例 HCC 患者中, 抗 AFP CD4 T 细胞和 CD8 T 细胞均应答在 6 个 HCC 患者中检测到, 仅 CD4 T 细胞应答患者 14 例, 仅 CD8 T 细胞应答患者 12 例, 而两者均无应答者为 30 例。

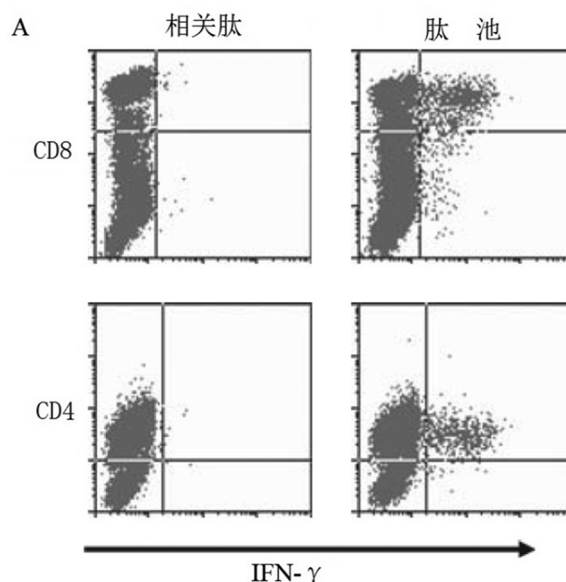


图 1 (A) 流式细胞仪测定 CD4 和 CD8 T 细胞表达的肽特异性 IFN- γ
Fig.1 Peptide-specific IFN- γ production by CD4 and CD8 T cells using flow cytometry

表 1 HCC 组和对照组 AFP 衍生肽 CD4 T 细胞和 CD8 T 细胞应答比较

Table 1 Comparison of HCC patients and controls with CD4 and CD8 T cells reacting to AFP-derived peptides

Groups	CD4 T cells reacting n(%)	CD8 T cells reacting n(%)
Group HCC (n=31)	20(32.3)	18(29.0)
The control group (n=30)	0(0)	16(26.7)
X ²	20.37	0.34
P	<0.01	0.57

2.2 早期肿瘤患者抗 AFP Th1 应答

AFP 特异性 CD4 T 细胞应答主要在血清 AFP 正常或轻度升高的 HCC 患者中检测到(P=0.018)。CD8 T 细胞应答和非应答之间的 AFP 浓度没有显著差异(图 2A-C)。无 CD4 T 细胞应答者的 HCC 患者血清 AFP 浓度为 CD4 T 细胞应答者 HCC 患者 AFP 浓度的 7.5 倍(图 2B)。Okuda 肿瘤 I 期与 II 或 III 期的

患者相比, CD4 T 细胞应答具有显著差异(P=0.04), 但是在 Okuda 肿瘤 I 期与 II 或 III 期的患者中, CD8 或总 T 细胞应答反应没有显著性差异(P >0.05)。这表明 II 或 III 期的患者未出现抗 AFP Th1 细胞应答。CD8 T 细胞对 AFP 的应答反应较敏感, 对照组(28.5%), Okuda 肿瘤 I 期 HCC 患者(25.0%)和 Okuda 肿瘤 II + III 期的 HCC 患者(31.6%)。AFP 特异性 CD4 T 细胞应

答反应仅在 HCC 患者中检测出,而且主要是在 Okuda 肿瘤 I 期的 HCC 患者检测出(15.8%)。期 HCC 患者中检测出(58.3%)和很少的 Okuda 肿瘤 II 或 III 期

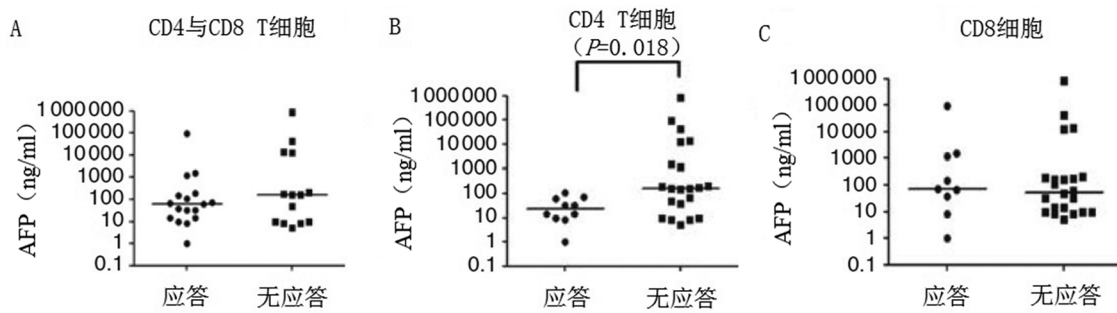


图 2 抗 AFP CD4 和 CD8T 细胞应答患者血清 AFP 水平

Fig. 2 Serum AFP levels in anti-AFP CD4 and CD8 T cells responses patients

抗 AFP 总 T 细胞应答(CD4 和 CD8)的 HCC 患者的血清 AFP 水平 (A);CD4 T 细胞应答的 HCC 患者的血清 AFP 水平 (B);CD8 T 细胞应答的 HCC 患者的血清 AFP 水平 (C);抗 AFP CD4 T 细胞应答在血清 AFP(n=0.018)低或中度升高的患者被检测到。应答或无应答的血清 AFP 水平中值如图所示,每一个点表示一个 HCC 患者。

2.3 肝硬化发展与抗 AFP Tc1 应答转移

在试验的 62 个 HCC 患者中 36 例被评为 Child-Pugh A 级,26 例被评为 Child-Pugh B 或 C 级。我们使用不同的 Child-Pugh 评分分析 HCC 患者中的 AFP 特异性 CD4 和 CD8 T 细胞应答,44.4%的 Child-Pugh A 级 HCC 患者有 CD4 T 细胞应答,但是仅有 15.4%的 Child-Pugh B 或 C 级 HCC 患者有

CD4 T 细胞应答,差异极显著($P<0.01$),表明 AFP 特异性 Th1 应答主要发生在 Child-Pugh A 级的 HCC 患者中(表 2)。CD8 T 细胞应答在 16.7%的 Child-Pugh A 级 HCC 患者中检测到,在 46.2% Child-Pugh B 或 C 级 HCC 患者检测到,差异极显著($P<0.01$)。这些结果表明,相比较于 Th1 应答 Tc1 应答主要在 Child-Pugh B 或 C 级 HCC 患者检测到。然而,总的 T 细胞应答(CD4 和 CD8)分别是在 Child-Pugh A 级 50.0%的 HCC 患者中检测到,在 Child-Pugh B 或 C 级 53.8% HCC 患者中检测到,差异不具有统计学意义($P=0.18$)。上述结果表明,抗 AFP Th1 和 Tc1 应答之间的平衡随着肝硬化的程度逐步向抗 AFP Tc1 应答偏移。

表 2 抗 AFP CD4 和 CD8 T 细胞在不同 Child-Pugh 时期所占百分比

Table 2 The percentages of anti-AFP CD4 and CD8 T-cell response in different Child-Pugh scores

During the period of Child-Pugh	n(%)CD4 T cell response, n (%)	n(%)CD8T cell response, n (%)	n(%)CD4 and CD8 T cell responses, n (%)
Child-Pugh A (n=36)	16(44.4)	6(16.7)	18(50.0)
Child-Pugh B+C (n=26)	4(15.4)	12(46.2)	14(53.8)
χ^2	8.47	6.83	1.71
P	<0.01	<0.01	P=0.18

3 讨论

以前有关抗 AFP T 细胞应答的出现类型和患者临床特征的相关性方面的报道与我们的实验结果有明显差异^[7-11],如血清 AFP 浓度、患病时期等。我们假设这些相反的报道,可能是由于在整个疾病过程中,抗 AFP CD4 和 CD8 T 细胞应答出现时间不同。在我们的研究中发现,对同一组患者的抗 AFP CD4 和 CD8T 细胞反应的分析表明:抗 AFP CD4T 细胞反应存在于 HCC 患者中,对照组中未出现应答,而抗 AFP CD8 T 细胞反应在 HCC 患者和对照组中都存在。AFP 特异性 Th1 细胞可以产生 IFN- γ , IL-2 和 TNF- α 。IL-2 通常与记忆性应答相关,而且可以由抗原特异性 CD4 和 CD8T 细胞产生。由于并非所有表达 AFP 特异性 IFN- γ 的 T 细胞都表达 IL-2, 因此我们分析了由 IFN- γ 的产物为特征的抗原特异性 Th1 细胞。相关研究表明健

康者细胞对整个 AFP 蛋白仅有微弱的反应,而且这种反应仅在抗原被树突状细胞(DCs)结合时才检测得到^[12-17]。肽抗原表位被树突状细胞递呈给 T 细胞已经被证明可以扩大潜在的应答反应,并且提高检测的灵敏度。这表明一个弱抗 -AFP 的 Th1 反应是存在于健康者中,而这种反应的检测需要专门的抗原细胞^[18,19]。因此我们能够在健康对照组中检测产生 IFN- γ 的 AFP 特异性 CD8 T 细胞,本研究结果表明抗 -AFP Tc1 反应在所有患者组中都可检测到。相比之下,抗 AFP Th1 反应更多的发生在疾病早期阶段和血清 AFP 浓度低的情况下的 HCC 患者中检测到。这些结果提示在伴随有疾病的早期阶段与低血清 AFP 浓度相关的 CD4 T 细胞应答扩大,与在高血清 AFP 浓度水平的疾病后期阶段的应答衰竭的 HCC 患者中抗 -AFP CD4 和 CD8 T 细胞是有所不同的,从高血清 AFP 浓度的 HCC 患者中分离的 CD4T 细胞是缺陷的,即在体外高 AFP 浓度时,抑制

免疫细胞功能,这些与之前的相关报道相一致^[20]。另外,我们的结果还表明 Th1 反应主要在 Child-Pugh A 级 HCC 患者中检测到,而 Tc1 反应主要在 Child-Pugh 分级 B 或 C 的患者中检测到。本研究是第一次报到关于抗 AFP Th1 和 Tc1 应答的平衡伴随着肝硬化的发展向抗 AFP Tc1 应答偏移;但是目前还不清楚 Tc1 应答优先在严重的肝硬化患者中扩大的原因^[21,22]。

总之,这些结果表明抗 AFP Th1 应答更多的存在于疾病早期阶段,但是抗 AFP Tc1 反应则多出现在肝硬化严重的阶段。本文结果有助于促进我们对 HCC 患者的抗肿瘤免疫反应的理解,并且对疫苗药物设计和疫苗接种的发展有着重要临床意义。

参考文献(References)

- [1] Qingyu Shen, Hyun Jin Bae, Jung Woo Eun, et al. MiR-101 functions as a tumor suppressor by directly targeting nemo-like kinase in liver cancer[J]. Cancer Letters, 2014, 344(2): 204-211
- [2] Zhang XF, Qi X, Meng B, et al. Prognosis evaluation in alpha-fetoprotein negative hepatocellular carcinoma after hepatectomy: comparison of five staging systems[J]. Eur J Surg Oncol, 2010, 36(8): 718-724
- [3] Behboudi S, Alisa A, Boswell S, et al. Expansion of anti-AFP Th1 and Tc1 responses in hepatocellular carcinoma occur in different stages of disease[J]. Br J Cancer, 2010, 102(4): 748-753
- [4] Alisa A, Ives A, Pathan AA, et al. Analysis of CD4⁺ T-Cell responses to a novel alpha-fetoprotein-derived epitope in hepatocellular carcinoma patients[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(18): 6686-6694
- [5] Kumar AI, Srivastava DN, Chau TT, et al. Inoperable hepatocellular carcinoma: transarterial 188Re HDD-labeled iodized oil for treatment--prospective multicenter clinical trial [J]. Radiology, 2007, 243(2): 509-519
- [6] Liang Wei, Chen Jie. The clinical value of determining serum GGT, AFU, ALP and AFP in the diagnosis of hepatic carcinoma [J]. China Medical Herald, 2010, 7(13): 24-25
- [7] Behboudi S, Boswell S, Williams R. Cell-mediated immune responses to alpha-fetoprotein and other antigens in hepatocellular carcinoma [J]. Liver Int, 2010, 30(4): 521-526
- [8] Ragesh B. Thandassery, Usha Goenka, Mahesh K. Goenka. Role of Local Ablative Therapy for Hepatocellular Carcinoma [J]. Journal of Clinical and Experimental Hepatology, 2014, 4(3): S104-S111
- [9] Greten TF, Ormandy LA, Fikuart A, et al. Low-dose cyclophosphamide treatment impairs regulatory T cells and unmasks AFP-specific CD4⁺ T-cell responses in patients with advanced HCC [J]. J Immunother, 2010, 33(2): 211-218
- [10] Josep M. Llovet (EASL), Michel Ducreux (EORTC). EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma[J]. European Journal of Cancer, 2012, 48(5): 599-641
- [11] Shashi B. Paul, Hanish Sharma. Role of Transcatheter Intra-arterial Therapies for Hepatocellular Carcinoma [J]. Journal of Clinical and Experimental Hepatology, 2014, 4(3): S112-S121
- [12] Faeza Ebrahimi, Vinod Gopalan, Robert Anthony Smith, et al. miR-126 in human cancers: Clinical roles and current perspectives [J]. Experimental and Molecular Pathology, 2014, 96(1): 98-107
- [13] Wang Z, Song P, Xia J, et al. Can gamma-glutamyl transferase levels contribute to a better prognosis for patients with hepatocellular carcinoma?[J]. Drug Discov Ther, 2014, 8(3): 134-138
- [14] Butterfield LH, Ribas A, Potter DM, et al. Spontaneous and vaccine induced AFP-specific T cell phenotypes in subjects with AFP-positive hepatocellular cancer[J]. Cancer Immunol Immunother, 2007, 56(12): 1931-1943
- [15] Filmus J, Capurro M. Glypican-3: a marker and a therapeutic target in hepatocellular carcinoma[J]. Febs J, 2013, 280(10): 2471-2476
- [16] Dai Ya-xin, Zhang Shi-liang, Pei Hao. The Significance of Measurement of AFP-L3 Variant in Patients with hepatocellular carcinoma and liver diseases [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2013, 17(2): 296-298
- [17] Chi Zhao-cheng, Wan Guang-yi, Zhao Jin-wei, et al. Effect of p38 MAPK on the AFP-mediated apoptosis of dendritic cells [J]. Chin J Lab Diagn, 2009, 13(12): 1707-1709
- [18] Evdokimova VN, Liu Y, Potter DM, et al. AFP-specific CD4⁺ helper T-cell responses in healthy donors and HCC patients [J]. J Immunother, 2007, 30(4): 425-437
- [19] Witkowski M, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, et al. Lack of ex vivo peripheral and intrahepatic alpha-fetoprotein-specific CD4⁺ responses in hepatocellular carcinoma [J]. Int J Cancer, 2010, 129(9): 2171-2182
- [20] Gehring AJ, Ho ZZ, Tan AT, et al. Profile of tumor antigen-specific CD8 T cells in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2009, 137(2): 682-690
- [21] Kittaka N, Takemasa I, Takeda Y, et al. Molecular mapping of human hepatocellular carcinoma provides deeper biological insight from genomic data[J]. Eur J Cancer, 2008, 44(6): 885-897
- [22] Vlad N, Gouillat C, Moldovanu R, et al. Radiofrequency ablation device assisted liver resection for hepatocellular carcinoma [J]. Chirurgia (Bucur), 2014, 109(4): 500-506