

化疗栓塞联合冷冻对肝癌患者免疫功能的影响

杨茂, 郭志, 司同国, 邢文阁, 李保国, 刘方

【摘要】 目的:探讨肝动脉化疗栓塞(TACE)联合冷冻消融对中晚期肝癌患者免疫功能的影响及临床意义。**方法:**搜集 59 例中晚期原发性肝细胞癌(经影像学检查显示无远处转移)患者资料,依据接受治疗方式不同分为两组:TACE 联合冷冻消融治疗组 27 例为研究组;单纯接受 TACE 32 例为对照组;研究组在 TACE 术后 2~3 周行冷冻消融术。两组分别于治疗前 1 周、治疗后 1 月取外周血,测定 AFP、T 淋巴细胞亚群(CD3+、CD4+、CD8+、CD4+/CD8+、Treg)水平变化;术后 1 个月采用增强 CT、MRI 评价肿瘤坏死程度。**结果:**两组治疗后甲胎蛋白(AFP)均下降,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。研究组肿瘤坏死率(53.9%)较对照组(32.8%)高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。研究组调节 T 细胞(Treg 细胞)比例由(8.43±2.58)%下降至(7.33±2.56)%,治疗前后差异具有统计学意义($P<0.01$);CD3+、CD4+ 细胞比例及 CD4+/CD8+ 分别由(49.07±6.59)%(46.51±8.17)%,1.23±0.32 上升至(52.16±6.44)%(50.63±8.27)%,1.52±0.46,治疗前后差异均具有统计学意义($P<0.01$);CD8+ 由(39.15±6.54)%下降至(34.79±6.16)%,治疗前后差异具有统计学意义($P<0.01$)。对照组治疗后 Treg 细胞、CD8+ 比例略有增加,CD4+ 细胞比例及 CD4+/CD8+ 略有下降,但治疗前后差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**TACE 联合冷冻消融治疗中晚期肝癌能提高肿瘤坏死率,降低 Treg 细胞比例,改善患者细胞免疫抑制状态,增强机体的抗肿瘤免疫效应。

【关键词】 癌,肝细胞;冷冻外科手术;T 淋巴细胞;栓塞;药物疗法

【中图分类号】 R735.7; R814.47. **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2011)05-0534-04

Effects of transcatheter arterial chemoembolization (TACE) combined with cryoablation on immunologic function in patients with advanced primary hepatocellular carcinoma YANG Mao, GUO Zhi, SI Tong-guo, et al. Department of Interventional Therapy, Cancer Hospital and Institute of Tianjin Medical University, Tianjin 300060, P. R. China

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of transcatheter arterial chemoembolization (TACE) combined with cryoablation on the immunologic function of patients with advanced primary hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** A total of 59 cases of HCC without metastasis in radiological examination were divided into the study group (27 patients treated with cryoablation after TACE) and the control group (32 patients treated only with TACE). The levels of AFP and T lymphocyte subsets cell (CD3+, CD4+, CD8+, CD4+/CD8+, Treg) in peripheral blood of HCC patients before and after treatment were measured. The extent of tumor necrosis was evaluated by enhanced CT and MRI month after the treatment. **Results:** The serum AFP significantly decreased after treatments in the two groups ($P<0.01$). The tumor necrosis ratio of the study group was 53.9%, significantly higher than that of the control group, which showed 32.8% ($P<0.01$). In the study group, the percentages of Treg cells significantly decreased from (8.43±2.58)% to (7.33±2.56)% ($P<0.01$). CD3+, CD4+ and the proportion of CD4+/CD8+ significantly increased from (49.07±6.59)%, (46.51±8.17)%, 1.23±0.32 to (52.16±6.44)%, (50.63±8.27)%, 1.52±0.46, while CD8+ cells decreased from (39.15±6.54)% to (34.79±6.18)% ($P<0.01$). In the control group, the percentages of Treg, CD3+, CD4+, CD8+ and the proportion of CD4+/CD8+ had no significant changes ($P>0.05$). **Conclusion:** TACE combined with cryoablation can increase tumor necrosis ratio, reduce the percentage of Treg cells and efficiently improve the immunological status in HCC patients.

【Key words】 Carcinoma, hepatocellular; Cryosurgery; T-Lymphocytes; Embolisation; Drug therapy, combination

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)病程发展快,患者就诊时往往已属中晚期,仅有 30%~40% 的患者可以进行手术切除。肝动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)被认为是 HCC 非手术治疗的首选^[1],可以显著提

高患者的 2 年生存率,但术后仍有相当部分癌灶残存,越来越多的学者认识到对肝癌采用综合介入治疗的必要性和重要性。冷冻消融是治疗 HCC 的技术之一^[2],其作用机制是通过超低温直接杀伤肿瘤细胞,短时间内减低肿瘤负荷,更重要的是在一定程度上激活机体抗肿瘤免疫反应。本文通过研究 TACE 联合冷冻消融治疗前后肝癌患者外周血 T 淋巴细胞亚群变化,尤其是调节 T 细胞(regulatory T cells, Treg cells)变化,初步探讨 TACE 联合冷冻消融治疗对肝癌患者细胞免疫状态的影响。

作者单位: 300060 天津,天津医科大学附属天津肿瘤医院肿瘤介入治疗科,天津肿瘤防治重点实验室

作者简介: 杨茂(1984—),男,河北保定人,硕士研究生,主要从事肿瘤微创治疗与影像诊断研究工作。

通讯作者: 郭志, E-mail: guozh@163.vip.com

基金项目: 国家十一五科技支撑计划课题资助项目(2007BAI05B06)

材料与方法

1. 临床资料

天津肿瘤医院介入治疗科从 2006 年 1 月~2009 年 12 月期间收治的病例资料完整的不能手术切除的原发性肝细胞癌患者 59 例,男 38 例,女 21 例,年龄 35~81 岁,平均 56 岁。HCC 诊断标准:①至少有通过两种影像学检查证实病变具有 HCC 特征;②通过一种影像学检查证实同时 AFP>400 μg/l;③有细胞学或组织学证据。影像学检查结果由至少两位不同放射科医生共同确认。肿块最大直径为 4~15 cm,平均 6.5 cm,无远处转移,肝功能为 Child-Pugh A 或 B 级,美国东部肿瘤协作组(ECOG)评分小于 2 分,均排除合并免疫系统或感染性疾病;治疗前 60 天均未接受过放化疗或影响免疫功能药物。接受 TACE 联合冷冻消融 27 例为研究组;接受单纯 TACE 32 例为对照组。两组病例患者一般状况分布见表 1。

表 1 两组患者基本情况对比

项目	研究组 (例)	对照组 (例)	χ ² 值	P 值
年龄(岁)			0.001	0.971
<60	17	20		
≥60	10	12		
性别			0.007	0.933
男	18	21		
女	9	11		
血清 AFP			0.145	0.703
<400ng/ml	13	17		
≥400ng/ml	14	15		
BCLC 分期			0.087	0.767
B	15	19		
C	12	13		
肿瘤最大直径(cm)			6.000	0.306
<5	3	5		
5~10	17	18		
>10	7	9		
Child-Pugh 分级			0.062	0.803
A 级	21	24		
B 级	6	8		
ECOG 评分			0.151	0.698
0~1	19	21		
2	8	11		
肝炎病史			0.273	0.601
是	17	18		
否	10	14		

2. 仪器和主要试剂

氩氦冷冻系统(CryocareTM surgical system)配有 1.7 mm、2.4 mm、3.8 mm 插入式冷冻探头(美国 Endocare 公司产品);PQ2000 型螺旋 CT 机(美国 PICKER 国际公司产品);东芝数字减影机(DEP22000A 型);FACS AriaTM 流式细胞仪(美国 BD 公司产品);流式细胞抗体包括:CD4+PerCP 单克隆抗体、CD25+FITC 单克隆抗体、CD127-PE 单克隆

抗体、ThriTESTCD3-FITC/CD16+CD56-PE/CD45-PerCP 单克隆抗体、ThriTESTCD4-FITC/CD8-PE/CD3-PerCP 单克隆抗体(均为美国 BD 公司产品)。

3. 治疗方法

TACE:采用 Seldinger 技术,经皮股动脉穿刺,导管选择至肿瘤供血动脉行数字减影造影,根据肿瘤血供情况进行栓塞。所有患者进行 TACE 治疗。TACE 治疗方案为氟尿嘧啶 750~1000 mg、顺铂 40~80 mg、丝裂霉素 20 mg 或表阿霉素 40~60 mg 加超液化碘油 5~20 ml。

冷冻消融治疗:选择 10 mm 层厚肝脏平扫,计算肿瘤区域,预计靶冷冻体积。CT 定位线做体表标志,选择、确定不同进针角度、深度,靶向穿刺点。操作步骤:取仰卧位,常规消毒、铺巾。局麻后,按预定穿刺途径将冷冻器穿入冷冻靶区。氩气工作压力 17,225 kPa (2500 PSI),100%输出功率条件下,冷冻至-140℃~-160℃,持续 15~20 min,氦气复温至 10℃,为第 1 冷冻循环。第 2 循环方法同前。肿瘤巨大者可分别应用 2~4 把冷冻器同时进行冷冻。对瘤体巨大者或 3 个以上病灶者可间隔 1 周分数次治疗。术毕,撤出冷冻器。全部技术操作均在心电、呼吸、脉搏、血氧饱和度监护监测下进行。术后常规预防感染治疗。

TACE 联合冷冻消融治疗:患者均先行 TACE 治疗,术后 2~3 周接受冷冻消融。研究组患者接受 1~2 次联合治疗。

4. 免疫指标的检测

检测治疗前 1 周及治疗后 1 月患者外周血 T 淋巴细胞亚群(CD3+、CD4+、CD8+、CD4+/CD8+、Treg 细胞)水平变化。

5. 随访

研究组与对照组 1 个月后复查血浆 AFP,评价肿瘤标志物变化;根据入院时影像学检查复查腹部增强 CT 或 MRI,采用 Cavalieri 方法计算肿瘤坏死率。

6. 统计学方法

利用 SPSS 16.0 软件包处理所有数据,连续性变量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用均数间 *t* 检验进行比较,治疗前后比较采用配对资料 *t* 检验。

结 果

1. 近期疗效

血清甲胎蛋白(alpha-fetal protein, AFP)下降情况:两组治疗后 AFP 均有所下降,差异均具有统计学意义(*P*<0.01),研究组 AFP 下降程度更为明显(表 2)。

肿瘤坏死率比较:研究组肿瘤坏死率为(53.9±12.4)%、对照组肿瘤坏死率为(32.8±7.1)%,二者差

异具有统计学意义($t=7.836, P<0.01$)(图 1)。

表 2 两组治疗前后血清 AFP 变化

组别	治疗前	治疗后	<i>t</i> 值
研究组	477.5±432.5	199.4±185.1	4.992
对照组	482.9±457.5	298.9±272.2	4.741

注: P 值 <0.01 。

2. T 淋巴细胞亚群比例变化

研究组治疗后 CD3+、CD4+ 细胞的比例和 CD4+/CD8+ 比值上升, CD8+ 和 Treg 细胞比例下降, 治疗前后差异均具有统计学意义($P<0.01$)。对照组治疗后 Treg 细胞、CD8+、CD3+ 比例略有增加, CD4+ 细胞比例及 CD4+/CD8+ 略有下降, 治疗前后差异均无统计学意义($P>0.05$)(表 3)。

3. 不良反应

两组患者术后均有不同程度的疼痛、发热等反应, 对症处理后逐渐缓解。术后均予抗炎、保肝治疗, 均无感染、肝肾功能损害加重等情况出现。

讨 论

研究不能切除的肝癌的综合治疗方法, 提高肝癌特别是中晚期肝癌的治疗效果是当今亟待解决的重要问题。TACE 已成为国内外公认的中晚期原发性肝癌的主要疗法之一, 但单纯 TACE 治疗肝癌病灶完全坏死率低, 且化疗药物可能对患者免疫功能进一步抑制, 对患者预后产生一定影响。研究发现^[3], 冷冻消融能使肿瘤大范围坏死, 同时具有刺激产生抗肿瘤免疫的潜能, 与 TACE 具有协同作用和优势互补作用, 为两者的联合使用创造了契机。本组治疗结果显示, 对

照组在经单纯 TACE 治疗后, 肿瘤平均坏死率为 32.8%, 与治疗前比较, AFP 下降幅度较小。研究组肿瘤坏死率为 53.9%, 明显高于对照组, AFP 下降幅度较为明显, 差异具有统计学意义($P<0.01$), 说明 TACE 联合冷冻消融近期疗效满意, 能更大程度降低肿瘤负荷。

我国 HCC 的主要病因是乙型肝炎病毒慢性感染, 患者均存在不同程度的免疫功能缺陷^[3,4], 表现为 CD3+、CD4+ 比例降低, CD8+ 比例增高, CD4+/CD8+ 比值下降。CD4+CD25+Treg 细胞是近年发现的一种新型免疫抑制细胞, 它具有免疫无能和免疫抑制两大特征^[5]。临床研究表明^[6-8], 肝癌患者 Treg 细胞比例升高, 与肝癌的发生、发展密切相关, 对机体的抗肿瘤免疫反应起负向调节作用, 比例增加提示预后不良。通

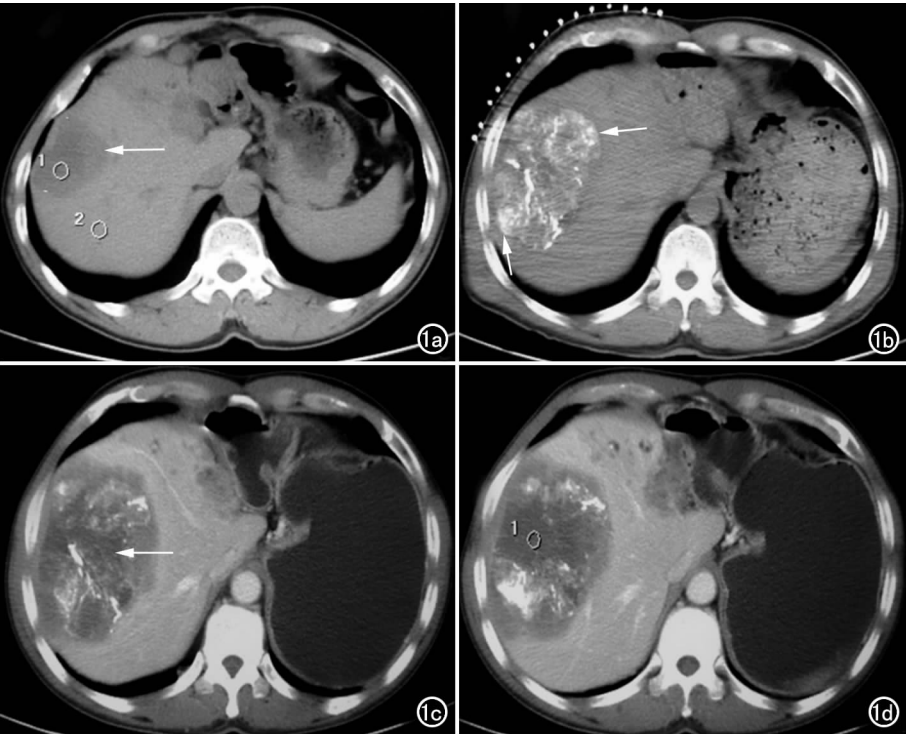


图 1 男, 55 岁, 原发性肝细胞癌。a) 入院 CT 显示肝右叶巨大肿瘤(箭); b) TACE 术后 1 个月, 冷冻消融前 CT 显示肿瘤部位碘油沉积增强(箭), 中间可见部分坏死区; c) 冷冻消融后, 中心区大范围无强化, 可见低密度液化坏死(箭), 周边碘油沉积部分增强, 表明肿瘤大部分呈无活性状态; d) 冷冻消融后另一层面图像。

表 3 两组治疗前后 T 淋巴亚群比例变化

组别	CD3+	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	Treg
研究组					
治疗前	49.07±6.59	46.51±8.17	39.15±6.54	1.23±0.32	8.43±2.58
治疗后	52.16±6.44	50.63±8.27	34.79±6.16	1.52±0.46	7.33±2.56
<i>t</i> 值	3.154	3.393	4.065	4.337	2.986
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
对照组					
治疗前	50.96±8.91	47.30±10.05	39.28±9.40	1.27±0.43	8.33±1.15
治疗后	51.12±5.67	45.76±7.87	41.37±6.57	1.14±0.27	8.50±1.53
<i>t</i> 值	0.102	0.793	0.967	1.506	0.585
<i>P</i> 值	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

过各种途径降低 Treg 细胞比例或者下调其活性可显著改善机体抗肿瘤免疫状态,有助于降低肿瘤的复发和转移^[9]。崔明等^[10]研究结果表明,去除或者降低肿瘤负荷可使患者的细胞免疫功能得到改善。本组结果显示:对照组 T 淋巴细胞亚群治疗前后差异无统计学意义($P>0.05$),但有降低机体细胞免疫功能的趋势,考虑可能与化疗药物的使用有关;研究组冷冻消融治疗后,Treg 细胞比例下降,治疗前后差异具有统计学意义($P<0.01$),同时 CD3+、CD4+ 细胞比例和 CD4+/CD8+ 比值上升,CD8+ 细胞比例下降,治疗前后差异均具有统计学意义($P<0.01$),说明冷冻消融有助于提高和改善细胞免疫功能,增强机体抗肿瘤能力。分析可能原因,TACE 联合冷冻消融使肿瘤细胞大范围坏死崩解,降低肿瘤负荷同时释放肿瘤相关抗原,刺激机体免疫应答及 IFN- γ 、TNF- β 升高等 Th1 样反应偏移^[11],对抗 Treg 细胞的免疫抑制作用,从而改善机体细胞免疫功能。

总之,TACE 联合冷冻消融治疗中晚期原发性肝癌是一种安全、有效的方法,其有效率优于单纯 TACE,并可以在短时期内改善患者细胞免疫抑制状态。在有效降低肿瘤负荷基础上辅以免疫治疗是否有助于提高疗效,有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008[J]. J Hepatol, 2008, 48 (Suppl 1): S20-S37.
- [2] Zhou XD, Tang ZY, Yu YQ, et al. Clinical evaluation of cryosur-

- gery in the treatment of primary liver cancer: report of 60 cases [J]. Cancer, 1988, 61(9): 1889-1892.
- [3] 郭志, 邢文阁, 刘方, 等. 氩氦冷冻在原发巨块状肝癌介入治疗中的临床应用[J]. 中华放射学杂志, 2005, 39(2): 198-203.
- [4] Ladhams A, Schmidt C, Sing G, et al. Treatment of non-resectable hepatocellular carcinoma with autologous tumor-pulsed dendritic cells[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2002, 17(8): 889-896.
- [5] Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, et al. Stimulation of CD4 (+)CD25 (+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance[J]. Nat Immunol, 2002, 3(2): 135-142.
- [6] Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2005, 65 (6): 2457-2464.
- [7] Gao Q, Qiu SJ, Fan J, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection[J]. J Clin Oncol, 2007, 25 (18): 2586-2593.
- [8] Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, et al. FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(3): 902-911.
- [9] Imai H, Saio M, Nonaka K, et al. Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells enhances interleukin-2-induced antitumor immunity in a mouse model of colon adenocarcinoma[J]. Cancer Sci, 2007, 98(3): 416-423.
- [10] 崔明, 王杉, 叶颖江, 等. 肿瘤负荷对大肠癌患者外周血 T 细胞分化的影响[J]. 中华医学杂志, 2007, 87(1): 16-19.
- [11] Osada S, Imai H, Tomita H, et al. Serum cytokine levels in response to hepatic cryoablation[J]. J Surg Oncol, 2007, 95(6): 491-498.

(收稿日期: 2010-10-11 修回日期: 2010-12-22)

• 外刊摘要 •

胶原网状系统的完整性对以钆为基础的磁共振对比剂在关节软骨上的积聚的影响

Wiener E, Settles M, Weirich G, et al

目的: 软骨的钆剂延时增强 MR 成像, 已被用来定量评价早期骨关节炎的蛋白多糖的丢失。假定在注射 Gd-DTPA 后接近平衡状态时的 T_1WI 可以反映软骨中选择性的蛋白多糖的减少。建立一个很好的骨性关节炎的模型, 在注射对比剂后, 通过对比弛豫率 $\Delta R1$ 和 $\Delta R2$ 来调查胶原网状系统完整性对对比剂在软骨上积聚的影响。**方法:** 在健康的牛的膝盖软骨上通过使用蛋白水解酶、木瓜酶和胶原蛋白酶来诱导胶原或蛋白多糖的缺失。使用专一的 MRI 序列, T_1 和 T_2 maps 在注射 Gd-DTPA 前或者是 11h 后同时获得。计算健康的和胶原或蛋白多糖的缺失的关节软骨的 $\Delta R1$ 和 $\Delta R2$ 的值, 软骨的不同层次的平均值使用曼-惠特尼 U 检验。**结果:** 在软骨的浅层 (1mm), 关节软骨中蛋白多糖减少 [$(16.6 \pm 1.2)s^{-1}$, $(15.9 \pm 1.0)s^{-1}$] 和

胶原减少 [$(15.3 \pm 0.9)s^{-1}$, $(15.5 \pm 0.9)s^{-1}$] 无论在 $\Delta R1$ 和 $\Delta R2$ 上差别不具统计学意义 ($P>0.05$)。在软骨的深层 (3mm), 这两个参数都具有统计学意义 ($P=0.005, 0.003$), 蛋白多糖减少的关节软骨 [$(12.3 \pm 1.1)s^{-1}$, $(9.8 \pm 0.8)s^{-1}$] 比胶原减少的关节软骨 [$(9.1 \pm 1.1)s^{-1}$, $(8.7 \pm 0.7)s^{-1}$] 更有意义。**结论:** 在胶原网状系统内蛋白多糖的丢失和改变都会影响 Gd-DTPA 在关节软骨内的积聚, 而且在软骨的浅层和深层具有明显的差别。

华中科技大学同济医学院附属同济医院 韩瑞译 夏黎明校
摘自 Fortschr Röntgenstr, 2011, 183(3): 226-232