

T 细胞亚群在乙肝病毒相关性肝癌患者中的变化及其临床意义

廖钰霖, 何淑娅, 宋晓玉

(四川省肿瘤医院检验科, 四川成都 610041)

摘要:目的 探讨 T 细胞亚群在乙肝病毒相关性原发性肝癌(HBV-PLC)患者中的表达变化及其对临床结局的影响程度。方法 原发性肝癌患者 136 例,依据是否存在 HBV 感染分为 HBV-PLC 组(78 例)和非 HBV-PLC 组(58 例),采用流式细胞仪检测患者血清中 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞和 Treg 细胞百分比,随访患者 6 个月,依据生存和死亡情况将 HBV-PLC 患者分为死亡组和存活组,采用二分类多因素 Logistic 回归分析模型探讨影响 HBV-PLC 患者临床结局的因子及其大小。结果 同非 HBV-PLC 患者相比,HBV-PLC 患者 T 细胞亚群出现了显著失调,HBV-PLC 患者 CD4⁺T 细胞和 Treg 细胞百分比明显增高($P < 0.05$),而 CD8⁺T 细胞百分比明显降低($P < 0.05$)。死亡组患者 CD4⁺T 细胞和 Treg 细胞百分比明显高于存活组($P < 0.05$),而 CD8⁺T 细胞百分比明显低于存活组($P < 0.05$)。T 细胞亚群(CD4⁺T 和 Treg 细胞)均是 HBV-PLC 患者不良临床结局的强风险因素,其 OR 值分别为 3.765 和 2.238($P < 0.05$),而 CD8⁺T 细胞可能是一个保护性因子,其 OR 值为 -3.537($P < 0.05$)。结论 HBV-PLC 患者中存在显著的 T 细胞免疫功能失调,T 细胞亚群可能成为 HBV-PLC 患者临床不良结局的预测因子。

关键词:乙型肝炎病毒; 原发性肝癌; 细胞免疫; T 细胞; 预测分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.03.020

中图法分类号:R446.6;R735.7

文章编号:1673-4130(2019)03-0338-04

文献标识码:A

Change and its clinical significance of T-lymphocyte subset in patients with hepatitis B virus-associated liver cancer

LIAO Yulin, HE Shuya, SONG Xiaoyu

(Department of Clinical Laboratory, Sichuan Cancer Hospital, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To assess the expression of T cell subset in patients with hepatitis B virus-associated primary liver cancer (HBV-PLC) and its influence on the clinical outcome. **Methods** 136 cases with PLC were selected, and divided into HBV-PLC group (78 cases) and non-HBV-PLC group (58 cases) according to HBV infection. The percentage of CD4⁺T cells, CD8⁺T cells and Treg cells in serum was tested by flow cytometry. After 6 months of follow-up, HBV-PLC patients were divided into death group and survival group. Binary logistic regression analysis was performed to explore the factor and degree affecting clinical outcome of HBV-PLC patients. **Results** As compared with non-HBV-PLC group, dysregulated T cell subset was observed in the HBV-PLC group, percentage of CD4⁺T cells and Treg cells in HBV-PLC patients was higher ($P < 0.05$), while CD8⁺T cell percentage was decreased ($P < 0.05$). The percentage of CD4⁺T cells and Treg cells was higher in death group than survival group ($P < 0.05$), but CD8⁺T cell percentage was lower than that of survival group ($P < 0.05$). T-lymphocyte subset (CD4⁺T cells and Treg cells) was a strong risk factor for adverse clinical outcome of HBV-PLC (OR values were 3.765 and 2.238, respectively, $P < 0.05$), but CD8⁺T cell was a protective factor (OR value was -3.537, $P < 0.05$). **Conclusion** Obvious dysfunction of T cellular immune function exists in HBV-PLC patients, and T cell subset may be a predictive factor for clinical outcome of HBV-PLC patients.

Key words: hepatitis B virus; primary liver cancer; cellular immunity; T cell; predictive analysis

原发性肝癌(PLC)是全世界最常见第 5 位癌症,慢性乙型肝炎病毒(HBV)是肝硬化和肝细胞癌的最常见危险因素,在国内所引起的 PLC 病例占 80%,此

外,国内有 7% 的人群感染了 HBV^[1-2]。

HBV 相关的 PLC(HBV-PLC)被认为是一种炎症性癌症。在 HBV 感染的情况下,病毒特异性的 T

作者简介:廖钰霖,女,主管技师,主要从事临床检验、免疫方向研究。

本文引用格式:廖钰霖,何淑娅,宋晓玉. T 细胞亚群在乙肝病毒相关性肝癌患者中的变化及其临床意义[J]. 国际检验医学杂志,2019,40(3):

细胞可能具有保护效应。有研究在 HBV 感染的黑猩猩以及受 HBV 感染的患者中敲除 HBV 特异性 CD8⁺T 细胞可阻滞 HBV 的清除^[3], HBV 的控制与具有多功能性的 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞存在有关。然而在 HBV 感染长期存在的情况下, 患者机体的细胞免疫功能会出现耐受, 其中 T 细胞的功能改变尤为明显^[4]。我国学者在 HBV-PLC 患者中发现其血清中 IL-10 呈现高表达状态, 而且细胞毒性 T 细胞出现了功能抑制^[5], 与非 HBV-PLC 患者相比, 前者血清中调节性 T 细胞比例出现了显著升高^[6], 从而导致患者不良临床预后。可以推测 T 细胞亚群对 HBV-PLC 患者的进展及预后有着一定的联系, 但是目前鲜有这方面的详尽报道。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究为前瞻性研究, 选取 2015 年 5 月至 2017 年 6 月本院收治的所有原发性肝癌患者 136 例, 依据是否存在 HBV 感染分为 HBV-PLC 组 (78 例) 和非 HBV-PLC 组 (58 例), 其中 HBV-PLC 组中男性患者 42 例, 女性患者 36 例, 年龄 31~68 岁平均 (52.54±12.26) 岁, HBV 的感染经血清学及 HBV DNA 定量检测后确诊; 非 HBV-PLC 组中男性患者 34 例, 女性患者 24 例, 年龄 29~65 岁, 平均 (51.82±13.06) 岁, 经统计学分析后发现, 两组患者在年龄及性别构成总体分布上差异无统计学意义 ($P>0.05$), 表明两组患者基线水平一致, 所有 PLC 患者的诊断均经影像学及病理学得到确诊。本次研究经过了医院伦理委员会审查及患者书面知情同意。此外, 符合以下情况的病例需排除: (1) 血清学证实合并有其他肝炎病毒感染; (2) 合并有细菌感染; (3) 免疫缺陷的患者; (4) 服用了影响免疫系统功能的药物;

(5) 合并有严重脏器功能不全的患者。

1.2 方法 T 细胞亚群及免疫炎症因子检测所有患者血清中 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞和 Treg 细胞百分比采用德国 BD 公司生产的流式细胞仪。免疫炎症因子包括 IL(白细胞介素)-10、IL-6、IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 其检测采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法。

1.3 统计学处理 本研究的所有数据处理均采用 SPSS19.0 版软件进行。年龄、T 细胞亚群百分比等计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验; 性别、不良预后事件采用构成比表示, 组间比较采用 χ^2 检验。采用二分类多因素 Logistic 回归分析模型分析 T 细胞亚群对 HBV-PLC 患者不良预后的影响。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者 T 细胞亚群及免疫炎症因子比较 同非 HBV-PLC 患者相比, HBV-PLC 患者 T 细胞亚群出现了显著失调, 见表 1。如表 2 所示, HBV-PLC 患者免疫炎症因子也出现了显著失调, 其 IL-1 β 和 TNF- α 表达水平明显高于非 HBV-PLC 患者, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 而 IL-10 水平明显低于非 HBV-PLC 患者, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 1 两组患者 T 细胞亚群比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T	Treg 细胞
HBV-PLC 组	78	23.54±2.58	26.47±5.42	9.48±1.28
非 HBV-PLC 组	58	17.36±3.19	31.28±4.57	5.67±1.07
<i>t</i>		11.258	8.326	13.245
<i>P</i>		0.001	0.015	<0.001

表 2 两组患者免疫炎症因子比较 ($\bar{x}\pm s, \text{pg/mL}$)

组别	<i>n</i>	IL-1 β	IL-6	IL-10	TNF- α
HBV-PLC 组	78	168.48±26.43	58.52±15.43	43.86±8.76	231.15±28.21
非 HBV-PLC 组	58	78.56±11.48	51.55±13.64	125.44±25.48	101.42±31.28
<i>t</i>		11.548	2.354	15.984	19.683
<i>P</i>		<0.001	>0.001	<0.001	<0.001

表 3 不同临床预后的 HBV-PLC 患者 T 细胞亚群比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T	Treg 细胞
死亡组	31	25.87±3.16	22.51±3.77	11.69±2.23
存活组	47	15.77±2.34	34.26±6.46	4.51±1.14
<i>t</i>		14.587	18.274	19.262
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同临床预后的 HBV-PLC 患者 T 细胞亚群及免疫炎症因子比较 对 HBV-PLC 患者进行出院后

随访 6 个月, 记录患者死亡事件发生数, 并依据是否死亡结局将 78 例 HBV-PLC 患者分为死亡组 (31 例) 和存活组 (47 例), 两组患者在年龄及性别构成比上差异无统计学意义。表 3 所示, 死亡组患者 CD4⁺T 细胞和 Treg 细胞百分比明显高于存活组 ($P<0.05$), 而 CD8⁺T 细胞百分比明显低于存活组 ($P<0.05$)。而且死亡组患者促炎因子水平也要明显高于存活组 ($P<0.05$), 而抗炎因子 IL-10 也要明显低于存活组 ($P<0.05$)。见表 4。

2.3 T 细胞亚群及免疫炎症因子对 HBV-PLC 患者

不良临床结局的影响大小分析 由以上结果可知,不同临床结局患者 T 细胞亚群和免疫炎症因子存在明显差别,意味着这些因素可能对 HBV-PLC 患者的临床结局有不同程度的影响,为了明确这些因素影响大小,笔者将这些指标进行了二分类多因素的 Logistic 回归模型分析,其结果如下表 5 所示。由结果可知,T

细胞亚群(CD4⁺ T 和 Treg 细胞)均是 HBV-PLC 患者不良临床结局的强风险因素,其 OR 值分别为 3.765 和 2.238($P < 0.05$),而 CD8⁺ T 细胞可能是一个保护性因子,其 OR 值为 -3.537($P < 0.05$),而炎症因子(IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 TNF- α)对 HBV-PLC 患者临床结局的影响均不如 T 细胞亚群。

表 4 不同临床预后的 HBV-PLC 患者免疫炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	IL-1 β	IL-6	IL-10	TNF- α
死亡组	31	134.26 \pm 31.49	84.36 \pm 16.51	32.59 \pm 5.85	198.54 \pm 46.85
存活组	47	51.08 \pm 10.24	35.28 \pm 6.47	94.66 \pm 22.18	46.87 \pm 10.08
t		16.542	11.295	13.156	19.685
P		$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$

表 5 不同 HBV-PLC 临床结局患者危险因素 Logistic 回归分析结果

指标	偏回归系数	标准误	Wald	自由度	P	OR	OR 值的 95%CI	
							下限	上限
CD4 ⁺ T	1.432	0.672	4.866	1	0.036	3.765	1.306	19.199
CD8 ⁺ T	-1.269	0.217	15.634	1	0.010	3.537	1.274	6.629
Treg	0.682	0.246	7.916	1	0.003	2.238	1.346	3.626
IL-1 β	0.254	0.121	27.523	1	0.020	0.856	0.841	0.922
IL-6	0.119	0.209	1.887	1	0.081	0.951	0.563	1.299
IL-10	-0.352	0.119	9.764	1	0.062	1.426	1.336	2.640
TNF- α	0.632	0.328	7.606	1	0.083	2.238	1.246	4.316

3 讨 论

在中国,原发性肝癌主要是通过慢性 HBV 感染-肝硬化发展而来的^[7]。因而 PLC 的一个主要危险因素则是 HBV 的感染,因而在 HBV-PLC 和非 HBV-PLC 患者中的免疫功能状态是完全不相同的。在 HBV-PLC 患者中,存在淋巴细胞百分比增高表明了存在一个比较严重的系统性炎症反应过程。T 淋巴细胞对于免疫反应过程是至关重要的。T 淋巴细胞包括 CD4⁺ 辅助性 T 细胞(Th 细胞)、CD8⁺ T 细胞毒性 T 细胞(CTL 细胞)和调节性 T 细胞(Treg)等等, Th 细胞在增强和推进抗肿瘤免疫反应中起到了重要作用,因为它能够促进 B 淋巴细胞中抗体的产生增加和 CD8⁺ T 细胞向 CTL 细胞分化的增加^[8-9]。CTL 细胞能够识别肿瘤抗原从而直接清除肿瘤细胞,因而扮演了肿瘤细胞“清道夫”的角色而发挥出了抗肿瘤效应^[10]。Treg 细胞在抗肿瘤免疫反应应答中主要扮演着负性调控因子的角色,其表达升高会使得 PLC 患者临床结局恶化,意味着此时的 Treg 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用明显减退。T 细胞亚群数量的失调出现在许多类型的癌症中,包括非小细胞肺癌、头颈部癌和卵巢癌中^[11-13]。类似的,本研究也显示出了 HBV-PLC 患者中出现了 T 细胞亚群(CD4⁺ T、CD8⁺ T 和 Treg 细胞)的数量与非 HBV-PLC 患者相比明

显不同,这表明了 T 细胞功能的紊乱和抑制,这就可能与 HBV-PLC 患者不良免疫反应有重要关系。同样,2014 年的研究显示在 HBV-PLC 患者中出现了 Treg 细胞水平的显著上调,并且与患者 HBV DNA 的病毒载荷量呈正相关^[6]。这些结果表明了 Treg 细胞水平与 PLC 患者的不良预后也具有正相关性,正如本研究所示,死亡组患者 Treg 细胞水平要明显高于存活组,意味着降低 Treg 细胞水平可能改善患者临床结局。

免疫系统中的自然杀伤细胞(NK 细胞)能分泌细胞因子(如 TNF- α 、IL-10)和趋化因子来影响宿主免疫反应,还可以通过穿孔素/颗粒酶或受体相关的信号通路(如 Fas、肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导性配体)杀灭受病毒感染的细胞^[14-15], B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞主要分别参与抗体的产生和细胞调控的免疫反应。有研究发现在 HBV-PLC 患者中所出现的淋巴细胞(包括 NK 细胞、T 和 B 淋巴细胞)水平的降低反映出了 HBV-PLC 患者中抗肿瘤和抗病毒免疫反应的受损情况的发生^[16],而且在 HBV-PLC 的病理发生过程中,研究发现胸腺输出功能也出现了受损,这些结果表明了 HBV-PLC 患者中 T 细胞的减少可能至少部分促进了早期胸腺产生的抑制^[16],从而免疫功能出现了抑制。LIU 等^[16]的研究表明 CD4⁺ T 和

CD8⁺T 在 HBV-PLC 患者中呈现高度活化状态,这种过度激活可引起 T 淋巴细胞的死亡,这将消耗掉大量的 T 淋巴细胞并因此减低了 HBV-PLC 患者中的 CD4⁺T 和 CD8⁺T 水平,因此在 HBV-PLC 患者中 T 细胞的减少可能也是部分由于 T 淋巴细胞的过度活化所致。本研究结果也表明了 HBV-PLC 患者和其中的死亡患者中 CD8⁺T 数量要更低,而 CD4⁺T 升高的原因可能是 CD8⁺T 显著下降所引起的相对升高所致。

由于 HBV-PLC 是一种免疫炎性疾病,患者体内的 TNF- α 能够使白细胞活性增加,分泌 IL-1 β 的量也随之增加,IL-1 β 反过来又可刺激免疫细胞分泌 TNF- α ,使之持续性增加,因而在本研究中笔者发现 HBV-PLC 患者中的 TNF- α 和 IL-1 β 水平要明显高于非 HBV-PLC 患者。IL-10 能够调控免疫反应进程,其降低意味着免疫反应受到抑制,对于患者机体来说则是非常不利的,其过表达可抑制促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的过度释放,因而本研究中 HBV-PLC 患者和死亡患者中 IL-10 要明显低于对照患者。CD4⁺T 在抗炎因子 IL-10 的作用可以分化成 Treg 细胞,而 CD8⁺T 则在促炎因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的作用下可分化为 CTL,因而 CD4⁺T 的增加和 CD8⁺T 的减少意味着 HBV-PLC 患者的免疫反应应答减退,患者预后较差。这些结果似乎表明了 T 细胞亚群和免疫炎性因子可能对 HBV-PLC 患者的临床结局都有着重要影响,但是笔者通过进一步 Logistic 回归模型分析显示,T 细胞亚群(CD4⁺T 和 Treg 细胞)均是 HBV-PLC 患者不良临床结局的强风险因素,而 CD8⁺T 细胞可能是一个保护性因子,其降低意味着患者不良结局风险较大,而炎性因子(IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 TNF- α)对 HBV-PLC 患者临床结局的影响均不如 T 细胞亚群,这表明了 T 细胞亚群在 HBV-PLC 患者临床结局中起到了主导作用。

4 结 论

本研究对 PLC 是否存在 HBV 感染的情况进行了 T 细胞亚群变化检测,并探讨了这些亚群变化与患者临床结局的关系,结果表明 HBV-PLC 患者中存在显著的 T 细胞免疫功能失调,T 细胞亚群可能成为 HBV-PLC 患者临床不良结局的预测因子。

参考文献

[1] CUI Y, JIA J. Update on epidemiology of hepatitis B and C in China[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(Suppl 1):7-10.

[2] YEO W, MO F K, CHAN S L, et al. Hepatitis B viral load predicts survival of HCC patients undergoing systemic chemotherapy[J]. Hepatology, 2007, 45(6):1382-1389.

[3] BERTOLETTI A, FERRARI C. Adaptive immunity in HBV infection[J]. J Hepatol, 2016, 64(1 Suppl):S71-S83.

[4] KALLAS E, HUIK K, TURK S, et al. T cell distribution in relation to HIV/HBV/HCV coinfections and intravenous drug use[J]. Viral Immunol, 2016, 29(8):464-470.

[5] XUE H, LIN F H, TAN H W, et al. Overrepresentation of IL-10-Expressing B cells suppresses cytotoxic CD4(+) T cell activity in HBV-Induced hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2016, 11(5):e0154815.

[6] 刘辉, 李建宇, 王凤梅, 等. HBV 感染的肝癌患者外周血中调节性 T 细胞的水平分析[J]. 天津医药, 2014, 42(6):530-532.

[7] EL-SERAG H B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2012, 142(6):1264-1273.

[8] LIU E Y, LIU J F, SHAO W W, et al. Tumor derived IgG suppress the proliferation of T cells in cord blood[J]. Beijing Da Xue Xue Bao, 2017, 49(5):824-828.

[9] BIANCO T M, ABDALLA D R, DESIDERIO C S, et al. The influence of physical activity in the anti-tumor immune response in experimental breast tumor[J]. Immunol Lett, 2017, 190:148-158.

[10] COULIE P G, VAN DEN EYNDE B J, VAN DER BRUGGEN P, et al. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(2):135-146.

[11] WANG W J, TAO Z, GU W, et al. Variation of blood T lymphocyte subgroups in patients with non-small cell lung cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(8):4671-4673.

[12] MILNE K, ALEXANDER C, WEBB J R, et al. Absolute lymphocyte count is associated with survival in ovarian cancer Independent of tumor-infiltrating lymphocytes[J]. J Transl Med, 2012, 10:33.

[13] MILLRUD C R, KVARNHAMMAR A M, UDDMAN R, et al. The activation pattern of blood leukocytes in head and neck squamous cell carcinoma is correlated to survival[J]. PLoS One, 2012, 7(12):e51120.

[14] VIVIER E, TOMASELLO E, BARATIN M, et al. Functions of natural killer cells[J]. Nat Immunol, 2008, 9(5):503-10.

[15] NAIR S, DHODAPKAR M V. Natural killer T cells in cancer immunotherapy[J]. Front Immunol, 2017, 8:1178.

[16] LIU X L, HE L L, HAN J Y, et al. Association of neutrophil-lymphocyte ratio and T lymphocytes with the pathogenesis and progression of HBV-associated primary liver cancer[J]. PLoS One, 2017, 12(2):e0170605.