

肝细胞癌患者 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞和 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞免疫耗竭及其与疾病进展的关系

袁润林^{1,2}, 郑美娟^{1,3}, 陈正徐², 徐元宏^{1,3}

摘要 目的 探讨肝细胞癌(HCC)患者外周血中 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞免疫耗竭及其与疾病进展的关系。方法

收集 30 例 HCC 患者,同时收集健康体检者(HC) 20 例,利用流式细胞术检测外周血 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞表面抑制性受体 PD-1、TIGIT、TIM-3 以及胞内 IL-10 表达比例,细胞微球阵列(CBA)检测血清细胞因子(IL-10)的含量。结果 HCC 患者组外周血 TIM-3⁺ CD4⁺ T 细胞、TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞、PD-1⁺ CD4⁺ T 细胞、TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞、IL-10⁺ CD4⁺ T 细胞、TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞比例均高于健康对照组($P < 0.001$),TIM-3⁺ CD8⁺ T 细胞、TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞、PD-1⁺ CD8⁺ T 细胞比例高于健康对照组($P < 0.01$)。此外,HCC 患者组 PD-1⁺ TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞、PD-1⁺ TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞比例分别高于 PD-1⁺ TIM-3⁻ TIGIT⁻ CD4⁺ T 细胞、PD-1⁺ TIM-3⁻ TIGIT⁻ CD8⁺ T 细胞比例($P < 0.001$),且 HCC 患者组血清 IL-10 含量高于健康对照组($P < 0.05$)。工作特征曲线(ROC)分析 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞、TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞比例在 HCC 的诊断效能均大于单分子阳性细胞比例。高 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞、高 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞比例组中性粒细胞/淋巴细胞比值(NLR)结果分别高于低 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞、低 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞比例组($P < 0.05$)。结论 HCC 患者外周血 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞及 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞比例均高于对照者,上述细胞均高表达 PD-1,并与 IL-10 的含量密切相关;且高 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞比例及 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞比例与 HCC 疾病进展加快和不良预后有关,提示 HCC 患者 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞存在免疫耗竭,且有意义的双分子靶向治疗可能会为 HCC 提供了更新颖、更有效的治疗靶点,促进了 HCC 患者免疫检查

点靶向治疗的发展。

关键词 肝细胞癌; CD4⁺ T 细胞; CD8⁺ T 细胞; 免疫耗竭; 抑制性受体

中图分类号 R 730.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)12-1980-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.025

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)作为世界范围内常见的恶性肿瘤,临床医师对晚期肝癌的治疗面临着巨大挑战^[1]。许多恶性肿瘤的治疗选择靶向免疫检查点抑制剂^[2]。T 细胞免疫球蛋白和 ITIM 结构域蛋白(TIGIT)是 T 细胞或 NK 细胞抑制性受体,T 细胞免疫球蛋白黏蛋白-3(TIM-3)是一种免疫负性调控因子,程序性死亡受体 1(PD-1)是一种常见的免疫抑制受体。CD4⁺和 CD8⁺调节性 T 淋巴细胞参与肿瘤微环境中的免疫抑制^[3],在肿瘤微环境中,CD8⁺和 CD4⁺ T 细胞等免疫细胞通常伴随着细胞表面异常表达的抑制性受体谱系^[4]。而且,针对单个免疫检查点的单克隆抗体在 HCC 患者的治疗中应答率较低^[5]。

该研究通过检测 HCC 患者外周血 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞中 PD-1、TIM-3、TIGIT 和白介素(interleukin,IL)-10 的表达,探讨免疫检查点的表达状态与 HCC 进展、预后的关系,进而为逆转免疫细胞耗竭及 HCC 的临床治疗提供目标靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 收集安徽医科大学第一附属医院 2019 年 10 月—2020 年 11 月 30 例 HCC 患者临床资料。健康对照组(health controls,HC)根据患者的依从性和年龄选择 20 例健康人;所有 HCC 患者诊断均符合《原发性肝癌诊断标准》,所有健康者排除患肿瘤、病毒性肝炎、自身免疫性肝炎。

1.1.2 试剂与仪器 抗体 PE-PD-1、BV421-TIM-3、APC-H7-CD8、BV421-IL-10、BV510-CD3 均购自美国 BD 公司;抗体 APC-TIGIT 购自美国 Biolegend 公司;

2021-09-11 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81771685)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022

² 安徽医科大学附属合肥医院(合肥市第二人民医院)检验科,合肥 230011

³ 安徽省病原生物学重点实验室,合肥 230032

作者简介:袁润林,男,主管检验师,硕士研究生;

陈正徐,男,博士,副主任检验师,硕士生导师,责任作者,E-mail: hf2yczx@163.com;

徐元宏,男,教授,主任技师,博士生导师,责任作者,E-mail: xyhong1964@163.com

红细胞裂解液、CBA Human Th1 / Th2 Cytokine Kit (IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF、IFN- γ) 购自美国 BD 公司; 细胞固定液和穿膜液购自美国赛默飞公司; Ficoll 液购自天津 TBD 公司; 佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯 (PMA)、莫能霉素 (MON) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 离子霉素 (ION) 购自美国 Merck Millipore 公司。FACS CANTO II PLUS 型流式细胞仪购自美国 BD 公司; DXH800 全自动血液分析仪购自美国 Beckman 公司。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 分别采集 HCC 患者和健康体检者外周血, 置于血清管和 EDTA 抗凝管; EDTA 抗凝血用于流式细胞术检测 PD-1⁺ CD4⁺ T 细胞、TIM-3⁺ CD4⁺ T 细胞、TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞、PD-1⁺ CD8⁺ T 细胞、TIM-3⁺ CD8⁺ T 细胞、TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞和 IL-10⁺ CD4⁺ T 细胞的比例, 全自动血液分析仪进行白细胞计数与分类; 血清用于 Th1 / Th2 细胞因子检测。

1.2.2 分离单个核细胞 (PBMC) 准备 15 ml 离心管 1 支, 同时加入 2 ml Ficoll 液, 将 2 ml PBS 加入患者和健康人 2 ml 抗凝全血中进行 1 : 1 稀释。然后将稀释后的全血缓慢加在 Ficoll 液面, 注意沿管壁进行缓慢加样, 保持两液面清晰, 不要让血液混入至分层液内。然后置于离心机中 1 900 r/min 配平离心 30 min 后, 用吸管将白膜层细胞缓慢吸至流式试管中, 即为外周血分离 PBMC。

1.2.3 PD-1⁺ CD4⁺ T 细胞、TIM-3⁺ CD4⁺ T 细胞、TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞、PD-1⁺ CD8⁺ T 细胞、TIM-3⁺ CD8⁺ T 细胞、TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞的检测 分离 1×10^6 PBMC 后, 在流式管中用加样枪分别加入相应抗体 BV510-CD3、APC-H7-CD8、PE-PD-1、APC-TIGIT、BV421-TIM-3 各 10 μ l 并混匀, 将流式管室温及避光条件下孵育 20 min, 然后加入 2 ml PBS 1 800 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 200 μ l PBS 重悬细胞沉淀, BD 流式细胞仪上机检测, 采用 Flowjo 软件分析检测结果。

1.2.4 IL-10⁺ CD4⁺ T 细胞的检测 分离 PBMC 后, 将含 10% FBS 的 DMEM 培养基、PMA、MON 及 ION 按照比例配置成内标刺激液, 在细胞中加入 1 ml 培养基, 混匀之后放入温箱内孵育 4 h, 然后离心、弃上清液, PBS 洗涤 1 次, 分别加入相应抗体 BV510-CD3、APC-H7-CD8 并混匀, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内避光孵育 30 min, 加入 100 μ l 固定液 4 $^{\circ}$ C 冰箱避光孵育 40 min 后加入 1 ml 穿膜液破膜, PBS 洗涤弃上

清液后分别加入 BV421-IL-10 抗体 10 μ l, 混匀后放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱内孵育 60 min。然后加入 1 ml PBS 1 800 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 300 μ l PBS 重悬细胞沉淀, BD 流式细胞仪上机检测, 采用 Flowjo 软件分析检测结果。

1.2.5 CBA 技术用于检测 Th1 / Th2 细胞因子 准备标准品, 采用倍比稀释方法, 将 9 个试管分别标记为原液, 1 : 2、1 : 4、1 : 8、1 : 16、1 : 32、1 : 64、1 : 128 和 1 : 256; 除原液管外, 每根管子内加入 50 μ l 稀释液, 再依次转移 50 μ l 至下一管内, 完成梯度稀释; 然后根据实验的样本和标准曲线的数量确定配置 Mixbeads 所需量, 配好的 Mixbeads 3 500 r/min 离心 5 min, 倒去上清液, 并加入体积相同的 Serum Enhancement Buffer 液, 混匀后避光孵育 30 min; 取新流式管编号, 在每管中依次加入 50 μ l Mixbeads、50 μ l 抗体 B 液、50 μ l 标本血清或配备的标准品, 振荡混匀, 避光孵育 3 h, 然后每管中加 1 ml PBS 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 300 μ l PBS 重悬, BD 流式细胞仪上机检测, 细胞因子浓度采用 DIVA 软件和 OriginPro 软件分析。

1.3 统计学处理 该实验所有数据均采用 Graph-Pad Prism 5.0 统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间比较采用非配对双尾 t 检验 (正态分布) 或者非参数检验 (非正态分布), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。绘制受试者工作特征曲线 (receive operating characteristic curve, ROC) 进行诊断效能分析。

2 结果

2.1 病例资料 30 例 HCC 患者中男性 20 例, 女性 10 例, 年龄 37 ~ 70 (55.2 ± 7.6) 岁。20 例健康对照组 (HC 组) 中男性 13 例, 女性 7 例, 年龄 35 ~ 66 (51.8 ± 7.1) 岁。HCC 组与健康对照组性别、年龄比较差异无统计学意义。

2.2 HCC 患者外周血中 CD4⁺ T 细胞相关表型表达比例的检测 采用流式细胞术检测外周血 PBMC 中 CD4⁺ T 细胞, HCC 患者组外周血 TIM-3⁺ CD4⁺ T 细胞、TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞、PD-1⁺ CD4⁺ T 细胞、TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞比例高于健康对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$, $t = 4.042、3.533、3.867、4.327$), 见图 1A、B、C。进一步检测 PD-1 在 HCC 患者组外周血 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞和 TIM-3⁻ TIGIT⁻ CD4⁺ T 细胞两组中的表达, 研究表明 PD-1⁺ TIM-3⁻ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞比例高于 PD-1⁺ TIM-3⁻ TIGIT⁻ CD4⁺ T 细胞比例, 差异有统计学

意义($P < 0.001$, $t = 5.106$) 统计图见图 1D。

2.3 HCC 患者外周血中 CD8⁺ T 细胞相关表型表达比例的检测 采用流式细胞术检测外周血 PBMC 中 CD8⁺ T 细胞, HCC 患者组外周血 TIM-3⁺ CD8⁺ T 细胞、TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞、PD-1⁺ CD8⁺ T 细胞比例高于健康对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$, $t = 3.346$ 、 2.782 、 2.938)。此外, 该研究进一步检测患者组 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞比例明显高于

健康对照组, 差异有统计学意义($P < 0.001$, $t = 3.852$)。见图 2A、B、C。进一步检测 PD-1 在 HCC 患者组外周血 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞和 TIM-3⁻ TIGIT⁻ CD8⁺ T 细胞两组中的表达, 研究表明 PD-1⁺ TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞比例高于 PD-1⁺ TIM-3⁻ TIGIT⁻ CD8⁺ T 细胞比例, 差异有统计学意义($P < 0.001$, $t = 4.642$) 见图 2D。

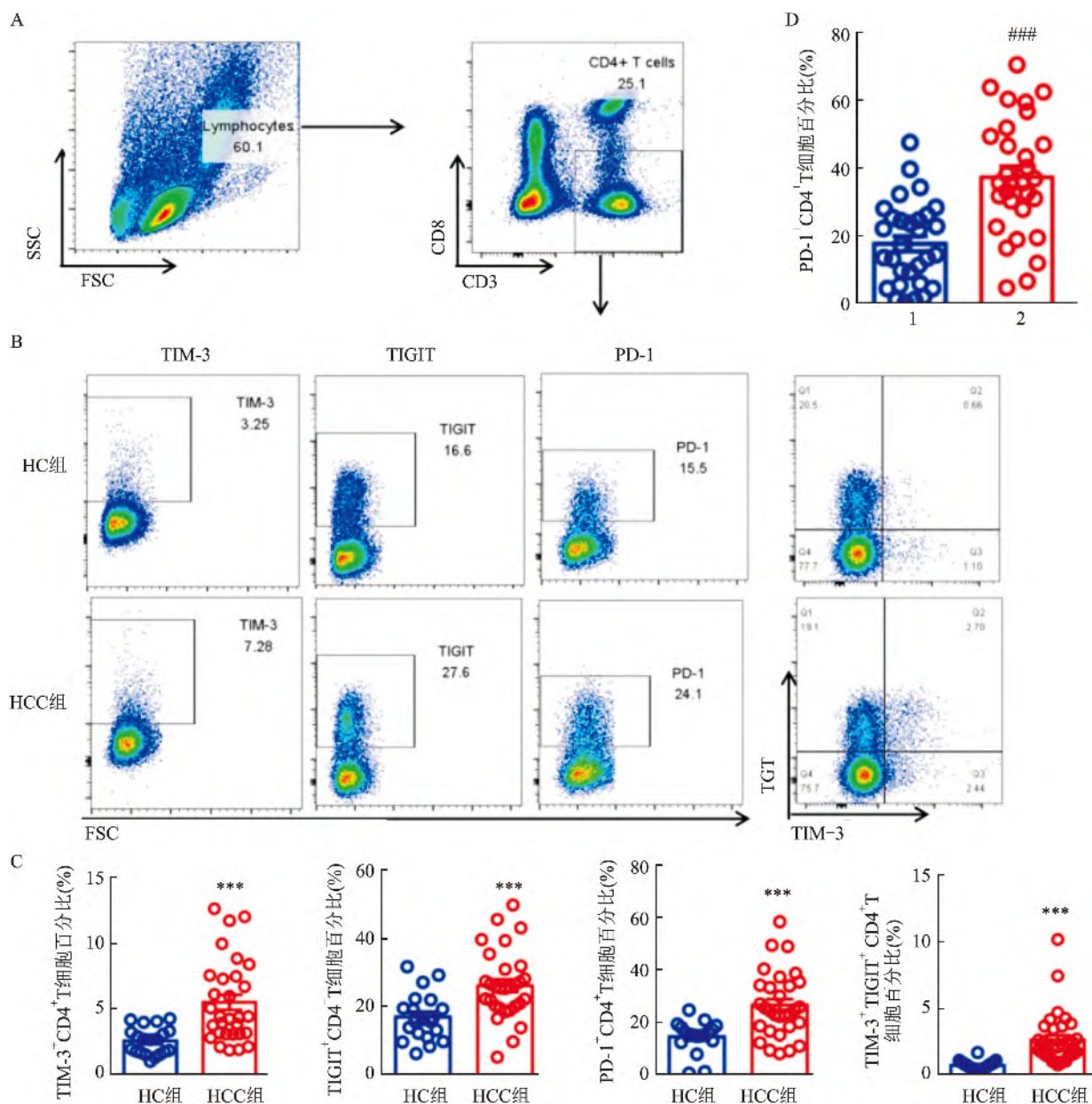
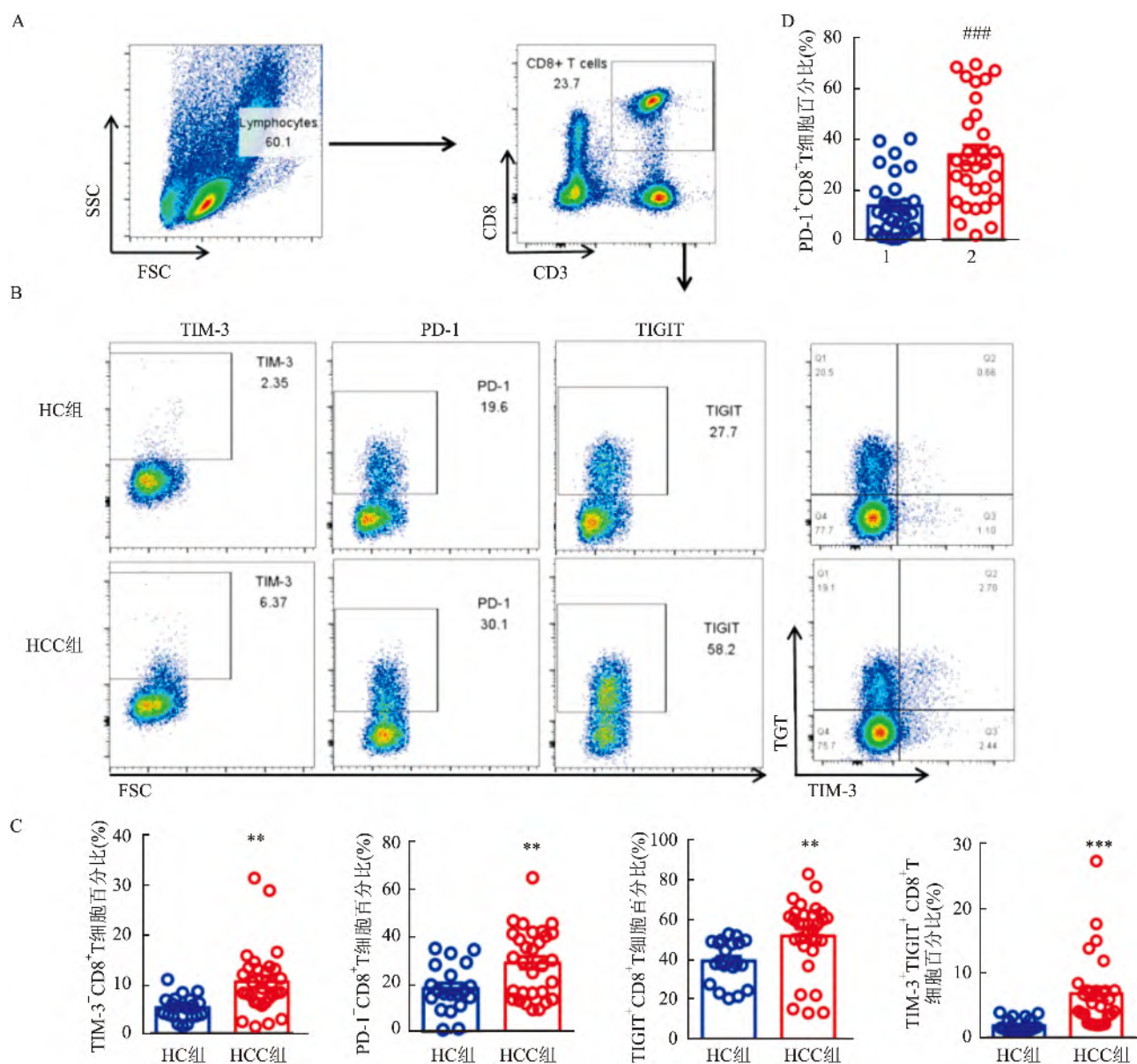


图1 HCC 患者及健康对照者外周血 CD4⁺ T 细胞表型检测

A: 利用流式细胞术检测外周血 PBMC 中 CD4⁺ T 细胞的分析步骤; B: 健康对照组和 HCC 患者中 TIM-3⁺ CD4⁺ T 细胞、TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞、PD-1⁺ CD4⁺ T 细胞、TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞的表达流式图; C: 健康对照组和 HCC 患者中 TIM-3⁺ CD4⁺ T 细胞、TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞、PD-1⁺ CD4⁺ T 细胞、TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞的表达统计图; D: HCC 患者中 PD-1⁺ TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞、PD-1⁺ TIM-3⁻ TIGIT⁻ CD4⁺ T 细胞表达统计图; 1: PD-1⁺ TIM-3⁻ TIGIT⁻ CD4⁺ T 细胞组; 2: PD-1⁺ TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞组; 与 HC 组比较: *** $P < 0.001$; 与 PD-1⁺ TIM-3⁻ TIGIT⁻ CD4⁺ T 细胞组比较: ### $P < 0.001$

图2 HCC患者及健康对照者外周血CD8⁺T细胞表型检测

A: 利用流式细胞术检测外周血 PBMC 中 CD8⁺ T 细胞的分析步骤; B: 健康对照组和 HCC 患者中 TIM-3⁺ CD8⁺ T 细胞、TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞、PD-1⁺ CD8⁺ T 细胞、TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞的表达流式图; C: 健康对照组和 HCC 患者中 TIM-3⁺ CD8⁺ T 细胞、TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞、PD-1⁺ CD8⁺ T 细胞、TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞的表达统计图; D: HCC 患者中 PD-1⁺ TIM-3⁻ TIGIT⁻ CD8⁺ T 细胞、PD-1⁺ TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞表达统计图; 1: PD-1⁺ TIM-3⁻ TIGIT⁻ CD8⁺ T 细胞组; 2: PD-1⁺ TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞组; 与 HC 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 PD-1⁺ TIM-3⁻ TIGIT⁻ CD8⁺ T 细胞组比较: ### $P < 0.001$

2.4 HCC 患者外周血中 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞比例与 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞比例的 ROC 曲线分析 利用 ROC 曲线分析外周血中 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞比例与 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞比例在 HCC 的诊断价值, 该研究表明 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞比例在 HCC 的诊断效能 (AUC = 0.915, cutoff value = 1.95%, 95% CI: 0.839 ~ 0.991) 均大于 TIM-3⁺ CD8⁺ T 细胞比例

(AUC = 0.796) 和 TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞比例 (AUC = 0.772), 见图 3A。同时, TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞比例在 HCC 的诊断效能 (AUC = 0.950, cutoff value = 1.05%, 95% CI: 0.897 ~ 1.004) 均大于 TIM-3⁺ CD4⁺ T 细胞比例 (AUC = 0.835) 和 TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞比例 (AUC = 0.780), 见图 3B。

2.5 比较 HCC 患者及健康对照者外周血 IL-10⁺ CD4⁺ T 细胞表达的百分比及血清 IL-10 含量

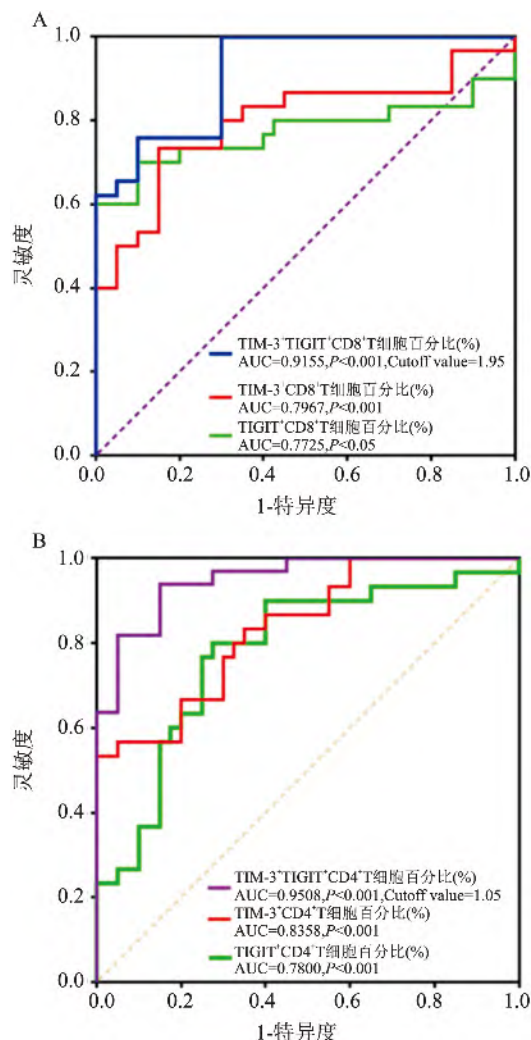


图3 HCC患者外周血中CD8⁺T细胞与CD4⁺T细胞高表达抑制性受体的ROC曲线分析

A: CD8⁺T细胞高表达抑制性受体的ROC曲线; B: CD4⁺T细胞高表达抑制性受体的ROC曲线

HCC患者组外周血IL-10⁺CD4⁺T细胞在患者外周血中表达比例明显高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.001$, $t = 4.579$),见图4A。此外,该实验检测患者组血清IL-10含量也高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$, $t = 2.046$),见图4B。

2.6 TIM-3⁺TIGIT⁺CD8⁺T细胞、TIM-3⁺TIGIT⁺CD4⁺T细胞比例高低两组HCC患者中性粒细胞/淋巴细胞比值(NLR)的比较 依据HCC中TIM-3⁺TIGIT⁺CD8⁺T细胞比例cutoff value = 1.95%将HCC患者分为高TIM-3⁺TIGIT⁺CD8⁺T细胞比例组和低TIM-3⁺TIGIT⁺CD8⁺T细胞比例组,比较两组患者NLR,高TIM-3⁺TIGIT⁺CD8⁺T细胞比例组NLR结果高于低TIM-3⁺TIGIT⁺CD8⁺T细胞比例组,差异有统计学意义($P < 0.05$, $t = 2.593$),

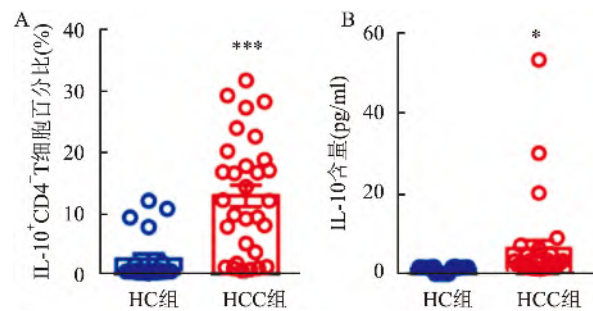


图4 HCC患者及健康对照者外周血IL-10⁺CD4⁺T细胞的百分比及血清IL-10含量检测

A: IL-10⁺CD4⁺T细胞的表达统计图; B: 血清IL-10含量统计图; 与HC组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

见图5A。同时,依据HCC中TIM-3⁺TIGIT⁺CD4⁺T细胞比例cutoff value = 1.05%将HCC患者分为高TIM-3⁺TIGIT⁺CD4⁺T细胞比例组和低TIM-3⁺TIGIT⁺CD4⁺T细胞比例组,比较两组患者NLR,研究结果表明高TIM-3⁺TIGIT⁺CD4⁺T细胞比例组NLR结果高于低TIM-3⁺TIGIT⁺CD4⁺T细胞比例组,差异有统计学意义($P < 0.05$, $t = 2.054$),见图5B。

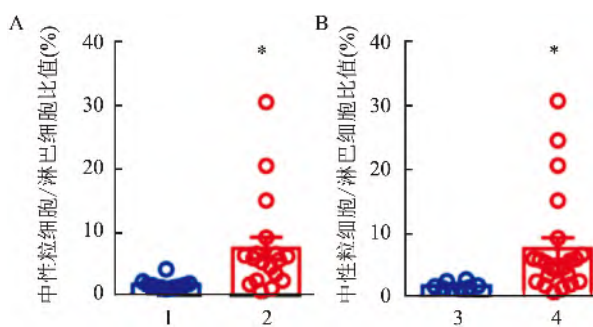


图5 比较TIM-3⁺TIGIT⁺CD8⁺T细胞比例高低两组

以及TIM-3⁺TIGIT⁺CD4⁺T细胞比例高低两组HCC患者NLR

A: TIM-3⁺TIGIT⁺CD8⁺T细胞比例高低两组NLR比较; B: TIM-3⁺TIGIT⁺CD4⁺T细胞比例高低两组NLR比较; 1: TIM-3⁺TIGIT⁺CD8⁺T高细胞比例组; 2: TIM-3⁺TIGIT⁺CD8⁺T低细胞比例组; 3: TIM-3⁺TIGIT⁺CD4⁺T高细胞比例组; 4: TIM-3⁺TIGIT⁺CD4⁺T低细胞比例组; 与低比例组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

淋巴细胞免疫耗竭现象普遍存在于肿瘤及慢性感染中,其不利于免疫系统对肿瘤细胞杀伤以及病毒感染的清除^[6]。在肿瘤及慢性感染中,T细胞及NK细胞逐渐失去效应功能,并且普遍高表达抑制性受体^[7]。已有研究^[8]表明免疫细胞表达多种共刺激、共抑制性受体和其相应的配体相结合后,通过

对细胞的刺激信号促进细胞活化,或抑制信号削弱免疫细胞的功能,抑制抗肿瘤反应,通过阻碍肿瘤清除来促进癌症免疫逃逸。免疫耗竭的细胞会出现多种抑制性受体持续高表达,抑制性受体在慢性病毒感染和肿瘤微环境中发挥其作用,如:PD-1、TIM-3、CTLA-4、LAG-3 及 TIGIT 等^[9]。TIGIT 属于脊髓灰质炎病毒受体家族,在淋巴细胞表达,在效应和调节性 CD4⁺ T 细胞、滤泡辅助 CD4⁺ T 细胞、效应 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞中高表达^[10]。该研究 TIGIT 在 HCC 患者外周血中 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞表达比例均高于健康对照组,提示 TIGIT 与 T 细胞耗竭有关,阻断 TIGIT 可防止 T 细胞衰竭并促进 T 细胞依赖性肿瘤免疫。Zhou et al^[11] 研究表明从 HCC 组织分离的 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞上的 TIM3、LAG3 和 CTLA4 的表达明显高于无肿瘤组织或外周血。该研究表明 HCC 患者组外周血中 TIM-3 在 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞的表达比例也均高于健康对照组。

TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞和 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞在 HCC 患者外周血中的表达比例上调,这与 Liu et al^[12] 报道的结果相似,该研究进一步表明 PD-1 在 HCC 患者组外周血 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞和 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞两组中高表达,同时 HCC 的 ROC 效能分析显示 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞、TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞比例曲线下面积均高于单一抑制性受体,可见,相较于单一抑制性受体,两种抑制性受体共表达的水平对 HCC 的诊断更具有价值,此外,该研究表明 HCC 患者组外周血 PD-1⁺ CD4⁺ T 细胞、PD-1⁺ CD8⁺ T 细胞比例高于健康对照组;PD-1 与 HCC 的发生及演进有关,外周淋巴细胞 PD-1 的表达可作为 HCC 监测的分子标志;提示免疫细胞衰竭的程度与抑制性受体在细胞上的表达有关,2 个或 2 个以上抑制性受体的共同表达比单一抑制性受体的高表达更能代表免疫细胞衰竭的状态。

病毒慢性感染和肿瘤发生时,抑炎因子 IL-10 通过促进 T 细胞耗竭与维持病毒长期存活发挥重要作用。有研究^[13] 报道 IL-10 在 HCC 组织中的表达增加,因为 Th1 类细胞因子在机体抗肿瘤免疫中发挥非常重要的作用,而 IL-10 升高抑制了 Th1 细胞功能,所以 IL-10 升高能够促进 HCC 的发生发展。该研究显示 HCC 患者组外周血中 IL-10⁺ CD4⁺ T 细胞比例高于健康对照组,此外,患者组血清 IL-10 含量也高于健康对照组,进一步证实 IL-10 在 HCC 免疫逃逸中起重要作用。

有研究^[14] 表明 NLR 可以反映促进肿瘤的炎症反应和抗肿瘤的炎症反应之间的平衡,NLR 水平与 HCC 患者的预后有一定的相关性,NLR 值越高,预后越差。该研究结果显示高值组 NLR 均高于低值组,提示 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞、TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞与 HCC 疾病进展加快和不良预后有关,这可能不仅对预后具有重要的临床意义,而且还为免疫治疗中的新靶点提供了理论依据。

综上所述,免疫耗竭现象普遍存在于肿瘤微环境中,HCC 患者外周血中普遍高表达抑制性受体,同时存在几种抑制性受体共表达。而且,相较于单一抑制性受体,两种抑制性受体共表达水平对 HCC 的诊断更具有价值,高 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T 细胞表达及 TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T 细胞表达与 HCC 疾病进展加快和不良预后有关。针对于单分子靶向治疗较低反应率、双分子或多分子靶向治疗可能会具有更大的临床意义。该研究通过分析 HCC 患者外周血中 T 细胞表面高表达抑制性受体及其相关性研究可能为临床治疗提供了更多、更新颖的靶点,可能在肿瘤患者的免疫检查点阻断治疗中发挥作用。

参考文献

- [1] Gong X, Qin S. Study progression of anti-angiogenetic therapy and its combination with other agents for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma [J]. Hepatobiliary Surg Nutr, 2018, 7 (6): 466 - 74.
- [2] Ziogas I A, Evangelou A P, Giannis D, et al. The role of immunotherapy in hepatocellular carcinoma: a systematic review and pooled analysis of 2 402 patients [J]. Oncologist, 2021, 26 (6): e1036 - 49.
- [3] 孙丹丹, 马晴晴, 徐元宏, 等. 肝细胞癌患者调节性 T 细胞与 NK 细胞相关性研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2020 (11): 1666 - 70.
- [4] Wang X, Lu X J, Sun B. The pros and cons of dying tumour cells in adaptive immune responses [J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17 (9): 591.
- [5] El-Khoueiry A B, Sangro B, Yau T, et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial [J]. Lancet, 2017, 389 (10088): 2492 - 502.
- [6] Bi J, Tian Z. NK Cell exhaustion [J]. Front Immunol, 2017, 28 (8): 760.
- [7] Wang Q, Pan W, Liu Y, et al. Hepatitis B virus-specific CD8⁺ T cells maintain functional exhaustion after antigen reexposure in an acute activation immune environment [J]. Front Immunol, 2018, 12 (9): 219.
- [8] Okagawa T, Konnai S, Deringer J R, et al. Cooperation of PD-1 and LAG-3 contributes to T-Cell exhaustion in anaplasma margin-

- le-infected cattle[J]. *Infect Immun* 2016, 84(10): 2779–90.
- [9] Gholami M D, Kardar G A, Saeedi Y, et al. Exhaustion of T lymphocytes in the tumor microenvironment: significance and effective mechanisms[J]. *Cellular Immunology*, 2017, 322: 1–14.
- [10] Zhang Q, Bi J, Zheng X, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity[J]. *Nature Immunology*, 2018, 19(7): 723–32.
- [11] Zhou G, Sprengers D, Boor P P C, et al. Antibodies against immune checkpoint molecules restore functions of tumor-infiltrating T cells in hepatocellular carcinomas[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(4): 1107–19.
- [12] Liu X L, Li M G, Wang X H, et al. PD-1(+) TIGIT(+) CD8(+) T cells are associated with pathogenesis and progression of patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(12): 2041–54.
- [13] Langhans B, Nischalke H D, Krämer B, et al. Role of regulatory T cells and checkpoint inhibition in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(12): 2055–66.
- [14] Zheng J, Cai J Y, Li H, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio and platelet to lymphocyte ratio as prognostic predictors for hepatocellular carcinoma patients with various treatments: a meta-analysis and systematic review[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(3): 967–81.

TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T cell and TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T cell immune exhaustion in patients with hepatocellular carcinoma and its relationship with disease progression

Yuan Runlin^{1,2}, Zheng Meijuan^{1,3}, Chen Zhengxu², et al

(¹Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Clinical Laboratory of Hefei Hospital, Anhui Medical University Hefei Second People's Hospital, Hefei 230011;

³The Key Laboratory of Pathogen Biology of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the immune exhaustion of CD4⁺T cells and CD8⁺T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and its relationship with disease progression. **Methods** 30 patients with HCC and 20 healthy subjects (HC) were collected. Flow cytometry was used to detect the frequencies of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cell expressing surface inhibitory receptors PD-1, TIGIT, TIM-3 and intracellular IL-10. Cell microsphere array (CBA) was used to detect the content of serum cytokine (IL-10). **Results** The percentages of TIM-3⁺ CD4⁺ T cells, TIGIT⁺ CD4⁺ T cells, PD-1⁺ CD4⁺ T cells, TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T cells, IL-10⁺ CD4⁺ T cells, TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T cells in peripheral blood of HCC patients was higher than those of healthy control group ($P < 0.001$), the percentages of TIM-3⁺ CD8⁺ T cells, TIGIT⁺ CD8⁺ T cells and PD-1⁺ CD8⁺ T cells in peripheral blood of HCC patients were higher than those in healthy control group ($P < 0.01$). In addition, the proportions of PD-1⁺ TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T cells and PD-1⁺ TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T cells in HCC patients were respectively higher than those in PD-1⁺ TIM-3⁻ TIGIT⁻ CD4⁺ T cells and PD-1⁺ TIM-3⁻ TIGIT⁻ CD8⁺ T cells ($P < 0.001$), and serum IL-10 levels in HCC patients were higher than that in healthy controls ($P < 0.05$). ROC curve analysis showed that the frequencies of TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T cells and TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T cells in the diagnosis of HCC was higher than the percentage of mono-molecule positive cells. The neutrophil/lymphocyte ratio (NLR) of the groups with high TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T cells and high TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T cells ratio were higher than those of the groups with low TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T cells and low TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T cells ratio group ($P < 0.05$). **Conclusion** The proportion of TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T cells and TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T cells in peripheral blood of HCC patients is higher than that of the control group, and PD-1 is highly expressed in all above cells, which is closely related to IL-10 concentration. And high percentages of TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD4⁺ T cell and TIM-3⁺ TIGIT⁺ CD8⁺ T cell are associated with HCC progression disease and poor prognosis, indicating that double molecular targeted therapy may have greater clinical significance than single molecule targeted therapy. Therefore, this work may provide a new and more effective therapeutic target for HCC according to the bimolecular targeted therapy, and promote the development of immune checkpoint targeted therapy for HCC patients.

Key words hepatocellular carcinoma; CD4⁺ T cells; CD8⁺ T cells; immune exhaustion; inhibitory receptor