

肝细胞癌患者调节性 T 细胞与 NK 细胞相关性研究

孙丹丹, 马晴晴, 徐元宏, 郑美娟

摘要 目的 探讨肝细胞癌(HCC)患者 CD8⁺调节性 T 细胞和 CD4⁺调节性 T 细胞的表达及其与 NK 细胞的关系。方法 收集 55 例 HCC 患者的外周血和肝组织,流式细胞术检测外周血及肝组织 CD8⁺CD25⁺调节性 T 细胞、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞及 NK 细胞水平。结果 分别检测健康人和 HCC 患者外周血 CD8⁺调节性 T 细胞水平,患者外周血 CD8⁺CD25⁺调节性 T 细胞的比例(6.22 ± 0.49)% 高于健康人(4.56 ± 0.44)% ,差异有统计学意义($P < 0.05$);癌组织 CTLA-4⁺CD8⁺调节性 T 细胞的比例(41.00 ± 4.00)% 高于癌旁组织(6.23 ± 2.75)% ,差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步比较癌组织和癌旁组织的 CD4⁺调节性 T 细胞,表明癌组织 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性 T 细胞的比例(23.28 ± 6.78)% 高于癌旁组织(10.18 ± 4.04)% ,差异有统计学意义($P < 0.05$),且 CTLA-4⁺CD4⁺调节性 T 细胞比例在癌组织(61.53 ± 11.37)% 中也高于癌旁组织(16.33 ± 2.38)% ,差异有统计学意义($P < 0.05$)。对 NK 细胞表达进行分析显示 HCC 患者外周血中 NK 细胞表达比例(13.57 ± 1.39)% 低于健康人(21.44 ± 1.23)% ,差异有统计学意义($P < 0.05$);癌组织中 NK 细胞比例(8.99 ± 1.64)% 也低于癌旁组织(24.13 ± 3.10)% ,差异有统计学意义($P < 0.05$)。HCC 患者外周血中 NK 细胞与 CD8⁺调节性 T 细胞的表达呈负相关($r = -0.66$, $P < 0.05$);癌组织中 CD4⁺调节性 T 细胞的比例与 NK 细胞的表达比例亦呈负相关($r = -0.76$, $P < 0.05$)。结论 HCC 患者 CD8⁺调节性 T 细胞及 CD4⁺调节性 T 细胞的比例高于健康人,且 CTLA-4 在癌组织表达高于癌旁组织。而 HCC 患者外周血及癌组织中 NK 细胞比例低于健康人和癌旁组织,并且 CD8⁺调节性 T 细胞和 CD4⁺调节性 T 细胞均与 NK 细胞呈负相关,表明 HCC 患者调节性 T 细胞参与负向调节 NK 细胞功能,提示靶向 CTLA⁺Treg 可能恢复 NK 细胞的抗肿瘤效应。

关键词 肝细胞癌; CD8⁺调节性 T 细胞; CD4⁺调节性 T 细胞; CTLA-4; NK 细胞

中图分类号 R 730.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)11-1666-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.11.004

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)为最常见的致死性肿瘤之一,乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染在其发病中具有重要作用^[1]。研究表明 HCC 患者 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞可高表达 CTLA-4,从而介导免疫负向调控^[2]。亦有研究表明 CD8⁺T 细胞中存在类似 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的细胞亚群,称为 CD8⁺Treg^[3-4],包括 CD8⁺CD25⁺Treg、CD8⁺CD103⁺Treg 以及 CD8⁺CD28⁻Treg,参与抑制效应性 T 细胞的功能^[5]。NK 细胞是固有免疫系统的重要组成部分,有研究表明在肝癌患者中 NK 细胞比例降低且效应功能降低^[6]。

该研究通过检测 HBV 阳性的 HCC 患者外周血 CD8⁺CD25⁺Treg 以及 CD8⁺CD103⁺Treg 以及 NK 细胞的水平,同时分析 CD8⁺CD25⁺Treg 与 NK 细胞的相关性,进而探讨 HCC 可能的免疫逃逸机制。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集安徽医科大学第一附属医院 2018 年 1 月~2020 年 1 月期间 55 例 HCC 患者及 22 例健康对照者临床资料。

1.2 主要试剂与仪器 FITC-CD4、FITC-CD56、FITC-CD103、PE-CD25、Percep-cy5.5-CD3、Percep-cy5.5-CTLA-4、APC-CD8、APC-FoxP3、红细胞裂解液均购自美国 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;FACS-Calibur 流式细胞仪为美国 BD 公司;4℃离心机为德国 Eppendorf 公司。

1.3 样本采集 采集患者外周血分别置于分离胶管和 EDTA 抗凝管;EDTA 抗凝血用于流式细胞术检测 CD8⁺CD103⁺Treg、CD8⁺CD25⁺Treg、CTLA-4⁺CD8⁺Treg、CD4⁺Treg、CTLA-4⁺CD4⁺Treg 和 NK 细胞的比例。

1.4 PBMC 的分离 取 1 支 15 ml 离心管,加入 2 ml Ficoll 液,采集 2 ml 患者或健康人的抗凝全血,使用 PBS 进行 1:1 稀释。然后将稀释后的血液缓慢加入 Ficoll 液面上方,注意不要破坏液面。然后于水

2020-03-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81771685)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022

作者简介:孙丹丹,女,硕士研究生;

徐元宏,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: xy-hong1964@163.com;

郑美娟,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: zheng-mjzh@163.com

平离心机中 1 900 r/min, 升 0 降 0 离心 30 min 后, 使用平口吸管吸取中间白膜层, 即为外周血 PBMC。

1.5 CD8⁺CD25⁺Treg、CD8⁺CD103⁺Treg、CD8⁺CTLA-4⁺Treg 和 NK 细胞的检测 在流式管中加入全血 50 μ l, 加入 10 μ l 小鼠血清室温避光封闭 10 min, 再分别加入相应抗体 FITC-CD103/PE-CD25/PerCP-eCy5.5-CD3/APC-CD8 或 FITC-CD56/PerCP-eCy5.5-CD3 各 10 μ l; 混匀后流式管置于室温、避光孵育 15 min; 然后加入红细胞裂解液 1 ml, 混匀后流式管置于室温、避光孵育 10 min, PBS 洗涤 2 次, 300 μ l PBS 重悬细胞沉淀, FACSCanto II Plus 仪器检测, Flowjo 软件分析结果。

1.6 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 和 CTLA-4⁺CD4⁺Treg 细胞的检测 在流式管中加入全血 50 μ l, 加入 10 μ l 小鼠血清室温避光封闭 10 min, 再分别加入相应抗体 FITC-CD4/PE-CD25/PerCP-eCy5.5-CTLA-4 各 10 μ l; 混匀后流式管置于室温、避光孵育 15 min; 然后加入红细胞裂解液 1 ml, 混匀后流式管置于室温、避光孵育 10 min, PBS 洗涤 2 次, 加入 100 μ l 细胞固定液置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱避光固定 40 min, 然后加入 1 ml 穿膜液, 洗涤弃上清液后加入 10 μ l APC-FoxP3 抗体。避光孵育 1 h 后, 加入 1 ml PBS 洗涤 2 次, 300 μ l PBS 重悬细胞沉淀, FACSCanto II Plus 仪器检测, Flowjo 软件分析结果。

1.7 统计学处理 所有数据均采用 Graphpad 统计

分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验组间两两比较采用双尾 t 检验, 两组样本相关性分析采用 Pearson 相关系数分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般资料 55 例 HCC 患者中男性 44 例, 女性 11 例, 年龄 35 ~ 73 岁, 中位年龄 58 岁, 四分位数间距为 20.00 岁。22 例健康对照组中男性 13 例, 女性 9 例, 年龄 28 ~ 77 岁, 中位年龄 52 岁, 四分位数间距为 20.75 岁。

2.2 HCC 患者外周血 CD8⁺Treg 比例及组织中 CTLA-4⁺CD8⁺Treg 比例的检测 利用流式细胞术检测外周血 HCC 患者 CD8⁺Treg 的比例, 设计方案如图 1A。我们发现, HCC 患者组外周血 CD8⁺CD25⁺Treg 比例为 $(6.22 \pm 0.49)\%$, 高于健康对照组 $(4.56 \pm 0.44)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $t = 1.996$), 代表性流式图见图 1B, 统计图见图 1E。同时, CTLA-4⁺CD8⁺Treg 在患者癌组织中表达比例 $(41.00 \pm 4.00)\%$ 也高于癌旁组织 $(6.23 \pm 2.75)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $t = 7.158$), 代表性流式图见图 1D, 统计图见图 1G。此外, 我们检测患者组 CD8⁺CD103⁺Treg 比例为 $(2.92 \pm 0.22)\%$, 与健康对照组 $(2.69 \pm 0.37)\%$ 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, $t = 0.437$), 代表性流式图见图 1C, 统计图见图 1F。

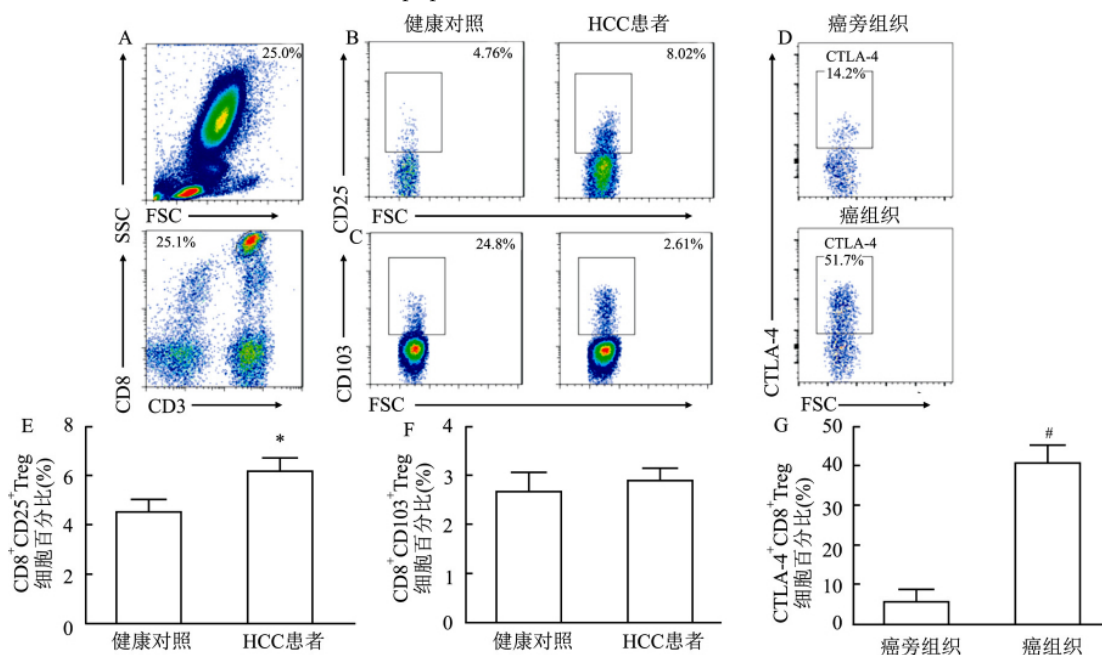


图 1 HCC 患者外周血 CD8⁺Treg 的比例

A: 流式分析的步骤; B: CD8⁺CD25⁺Treg 的表达; C: CD8⁺CD103⁺Treg 的表达; D: CTLA-4⁺CD8⁺Treg 的表达; E: 外周血 CD8⁺CD25⁺Treg 的表达柱状图; 与健康对照组比较: * $P < 0.05$; F: 外周血 CD8⁺CD103⁺Treg 的表达柱状图; G: 组织中 CTLA-4⁺CD8⁺Treg 细胞的表达柱状图; 与癌旁组织比较: # $P < 0.05$

2.3 HCC 患者组织中 CD4⁺Treg 比例的检测

利用流式细胞术检测 HCC 患者癌组织中及癌旁组织中 CD4⁺Treg 的比例,发现癌组织中 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 比例为 $(23.28 \pm 6.78)\%$,高于癌旁组织中 $(10.18 \pm 4.04)\%$,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ $t = 1.965$),代表性流式图见图 2A,统计图见图 2B。CTLA-4⁺CD4⁺Treg 在癌组织中 $(61.53 \pm 11.37)\%$ 比例也高于癌旁组织 $(16.33 \pm 2.38)\%$,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ $t = 3.889$),代表性流式图见图 2C,统计图见图 2D。

2.4 HCC 患者外周血及组织中 NK 细胞表达比例的检测

利用流式细胞术检测 HCC 患者外周血 NK 细胞的比例,患者外周血 NK 细胞表达比例为 $(13.57 \pm 1.39)\%$ 低于健康对照组 $(21.44 \pm 1.23)\%$,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ $t = 4.227$),代表性流式图见图 3A,统计图见图 3B。患者癌组织中 NK 比例为 $(8.99 \pm 1.64)\%$,低于癌旁组织中 NK 细胞比例 $(24.13 \pm 3.10)\%$,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ $t = 4.314$),代表性流式图见图 3C,统计图见图 3D。

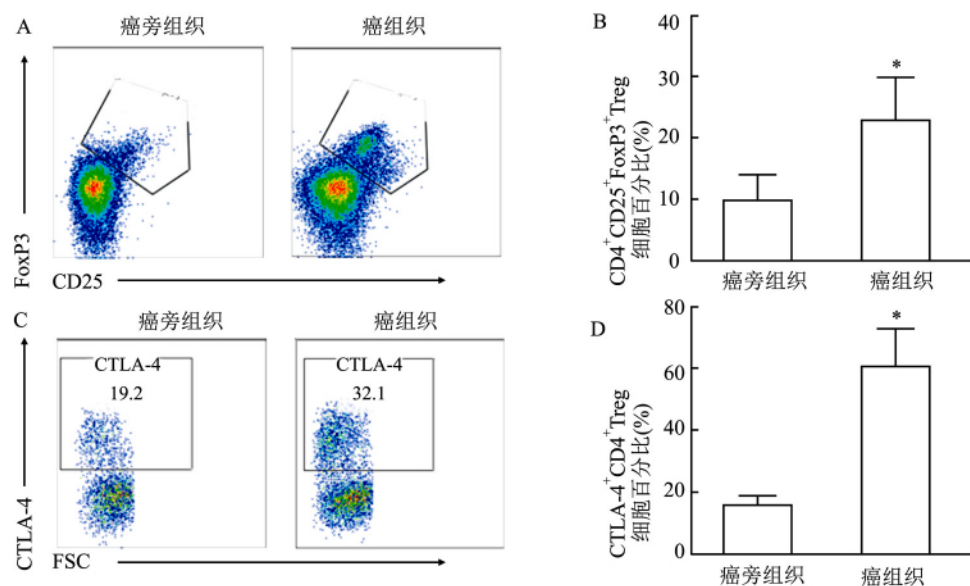


图2 HCC 患者癌组织和癌旁组织中 CD4⁺Treg 的比例

A: CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 的表达; B: 组织中 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 的表达柱状图; C: CTLA-4⁺CD4⁺Treg 的表达; D: 组织中 CTLA-4⁺CD4⁺Treg 的表达柱状图; 与癌旁组织比较: * $P < 0.05$

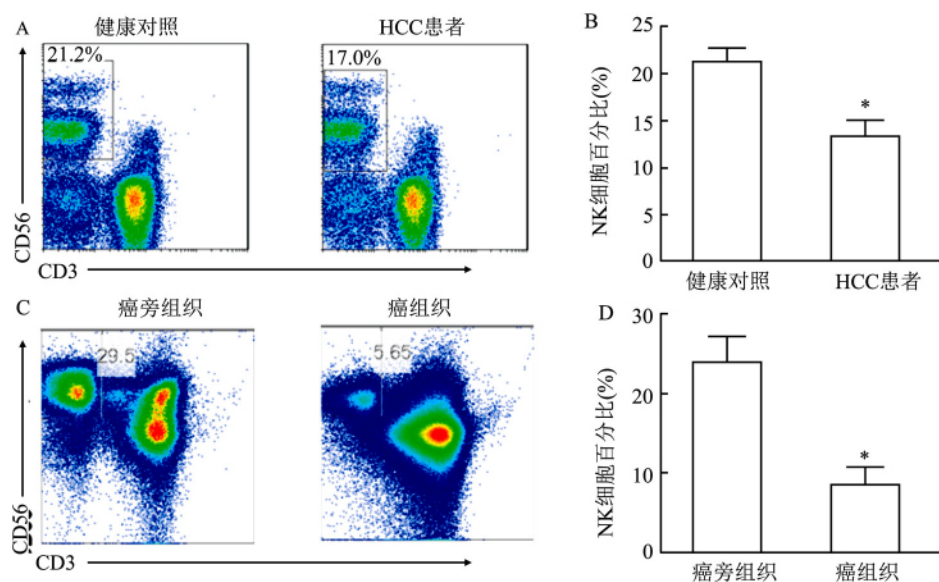


图3 HCC 患者外周血及肝组织中 NK 细胞比例

A: 外周血 NK 细胞的表达; B: 外周血 NK 细胞表达柱状图; 与健康对照比较: * $P < 0.05$; C: 组织中 NK 细胞的表达; D: 组织中 NK 细胞的表达柱状图; 与癌旁组织比较: * $P < 0.05$

2.5 HCC 患者 NK 细胞含量与 CD8⁺Treg 以及 CD4⁺Treg 含量的相关性分析 为进一步探究 HCC 患者 NK 细胞与 CD8⁺Treg、CD4⁺Treg 的相关性,本研究分析了外周血 NK 细胞与 CD8⁺CD25⁺Treg 含量的相关性,结果表明二者呈负相关,差异有统计学意义($r = -0.66, P < 0.05$),见图 4A。接下来分析癌组织中 NK 细胞与 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 的比例相关性,发现二者同样呈负相关($r = -0.76, P < 0.05$),见图 4B。

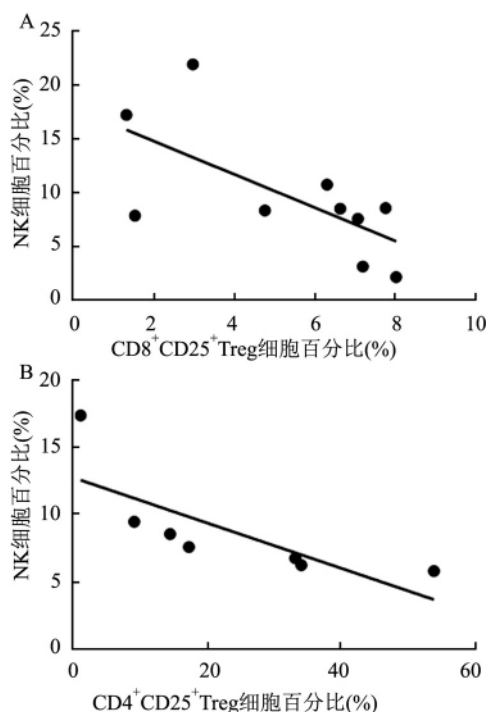


图4 HCC 患者 NK 细胞与 CD8⁺Treg、CD4⁺Treg 的相关性

A: NK 细胞与 CD8⁺Treg 相关性分析; B: NK 细胞与 CD4⁺Treg 相关性分析

3 讨论

HCC 在我国发病例数较高,研究表明肿瘤细胞为避免机体免疫系统的攻击,具有免疫逃逸的机制。CD4⁺Treg、CD8⁺Treg 细胞是具有免疫负调功能的免疫细胞^[7-9],参与肿瘤细胞逃逸、免疫监视和防御。亦有研究^[10]指出 CTLA-4 可以增强 Treg 细胞的免疫抑制功能。NK 细胞作为固有免疫细胞,参与机体抗肿瘤免疫,有研究^[11-12]表明患者的 NK 细胞能够介导肿瘤细胞的免疫逃逸。而在 HCC 患者中,CD4⁺Treg 和 CD8⁺Treg 具体参与何种角色,与 NK 细胞有何相关目前尚不清楚。

研究^[13]表明 HCC 患者与健康对照者比较外周

血中具有高比例的 CD8⁺Treg。在本研究中,HCC 患者外周血 CD8⁺CD25⁺Treg 细胞比例升高且 CTLA-4⁺CD8⁺Treg 细胞在癌组织中比例明显高于癌旁组织,这提示在肿瘤患者体内 CD8⁺Treg 细胞介导的免疫抑制作用可能要高于正常机体。对 CD4⁺Treg 进行研究后发现,在癌组织中同样存在 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 以及 CTLA-4⁺CD4⁺Treg 的高表达,提示 CD4⁺Treg 细胞也参与了这一免疫抑制过程。本研究中显示的上述细胞亚群的上调现象,可能是导致患者抗肿瘤免疫功能减低的重要原因。而在这两种 Treg 细胞中均高表达的 CTLA-4,提示它可能同样参与了肿瘤微环境中的免疫抑制,然而这种现象的产生的原因及其具体影响机制并不清晰。

本研究显示 NK 细胞在 HCC 患者外周血及癌组织中表达降低,这与前期研究^[14]报道相符。通过相关性分析显示外周血 CD8⁺CD25⁺Treg、癌组织中 CD4⁺Treg 的比例与 NK 细胞比例呈负相关,提示他们之间可能存在某种关联,与 HCC 的免疫逃逸相关。

总之,通过分析 Treg 细胞与 NK 细胞的关系,提示这两种细胞都可以参与 HCC 患者体内异常的免疫反应过程,且 CTLA-4 在此过程中可以抑制 NK 细胞的抗肿瘤作用,其可能与 HCC 的进展相关。因而对于设计抗肿瘤免疫方案具有重要的参考价值及临床应用前景。

参考文献

- [1] Chew S A, Moscato S, George S, et al. Liver cancer: current and future trends using biomaterials [J]. Cancers, 2019, 11 (12): 2026.
- [2] Chen X, Du Y, Hu Q, et al. Tumor-derived CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells inhibit dendritic cells function by CTLA-4 [J]. Pathol Res Pract, 2017, 213 (3): 245-9.
- [3] 韦莉莉, 罗周翔, 李金龙, 等. 二甲双胍抑制酸性环境下的调节性 T 细胞增殖及功能 [J]. 南方医科大学学报, 2019, 39 (12): 1427-35.
- [4] Flippe L, Bezie S, Anegón I, et al. Future prospects for CD8⁺ regulatory T cells in immune tolerance [J]. Immunol Rev, 2019, 292 (1): 209-24.
- [5] Zhang S, Ke X, Zeng S, et al. Analysis of CD8⁺Treg cells in patients with ovarian cancer: a possible mechanism for immune impairment [J]. Cell Mol Immunol, 2015, 12 (5): 580-91.
- [6] Han C, Jiang Y, Wang Z, et al. Natural killer cells involved in tumour immune escape of hepatocellular carcinoma [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 73: 10-6.
- [7] Liu X, Zhang Z, Zhao G. Recent advances in the study of regulatory T cells in gastric cancer [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 73: 560

- 7.
- [8] Ohue Y , Nishikawa H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? [J]. *Cancer Sci* ,2019 , 110(7) : 2080 - 9.
- [9] Rouas R , Merimi M , Najari M , et al. Human CD8⁺ CD25⁺ CD127^{low} regulatory T cells: microRNA signature and impact on TGF- β and IL-10 expression [J]. *J Cell Physiol* ,2019 , 234 (10) : 17459 - 72.
- [10] Wang N , Liang S , Jin J , et al. CD226 attenuates Treg suppressive capacity via CTLA-4 and TIGIT during EAE [J]. *Immunol Res* , 2019 , 67: 486 - 96.
- [11] Lu H Q , Hu R. The role of immunity in the pathogenesis and development of pre-eclampsia [J]. *Scand J Immunol* ,2019 , 90(5) : e12756.
- [12] Zheng M , Sun H , Tian Z. Natural killer cells in liver diseases [J]. *Front Med* ,2018 , 12(3) : 269 - 79.
- [13] Langhans B , Nischalke H D , Kramer B , et al. Role of regulatory T cells and checkpoint inhibition in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Immunol Immunother* ,2019 , 68(12) : 2055 - 66.
- [14] Juengpanich S , Shi L , Iranmanesh Y , et al. The role of natural killer cells in hepatocellular carcinoma development and treatment: A narrative review [J]. *Transl Oncol* ,2019 , 12(8) : 1092 - 107.

Analysis on the relationship between regulatory T and NK cells in hepatic carcinoma patients

Sun Dandan , Ma Qingqing , Xu Yuanhong , et al

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

Abstract Objective To investigate regulatory T cell (Treg) , including CD8⁺ Treg and CD4⁺ Treg , and their relationship with NK cells in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) . **Methods** A total of 55 patients with HCC and 22 healthy controls were collected. Peripheral blood and liver tissues were collected from HCC patients. Peripheral blood samples were obtained from healthy controls. CD8⁺ CD25⁺ Treg , CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg and NK cells were detected by flow cytometry. **Results** The levels of CD8⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of healthy people and patients with HCC were measured , and the CD8⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of the patients (6.22 ± 0.49) % were higher than those in the healthy people (4.56 ± 0.44) % ($P < 0.05$) ; The proportion of CTLA-4⁺ CD8⁺ regulatory T cells in cancer tissues (41.00 ± 4.00) % was higher than that in adjacent cancers (6.23 ± 2.75) % ($P < 0.05$) . Further comparison of CD4⁺ regulatory T cells in cancerous tissues and adjacent cancerous tissues revealed that the proportion of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells in cancerous tissues (23.28 ± 6.78) % was higher than that in adjacent cancerous tissues (10.18 ± 4.04) % ($P < 0.05$) . The proportion of CTLA-4⁺ CD4⁺ Treg cells in cancerous tissue (61.53 ± 11.37) % was also significantly higher than that in adjacent cancerous tissue (16.33 ± 2.38) % ($P < 0.05$) . Analysis of NK cell expression revealed that the expression ratio of NK cells in the HCC group (13.57 ± 1.39) % was significantly lower than that in the healthy group (21.44 ± 1.23) % ($P < 0.05$) ; the proportion of NK cells in cancer tissues (7.29 ± 10.82) % was also lower than that in adjacent cancerous tissue (25.65 ± 3.67) % ($P < 0.05$) . The expression of NK cells in peripheral blood of HCC patients was negatively correlated with the expression of CD8⁺ regulatory T cells ($r = -0.66$, $P < 0.05$) ; the proportion of CD4⁺ regulatory T cells in cancer tissue was also negatively correlated with the expression ratio of NK cells ($r = -0.76$, $P < 0.05$) . **Conclusion** The proportions of CD8⁺ Treg and CD4⁺ Treg with increased CTLA-4 expression in HCC patients were detected. The percentage of NK cells in PBMC and cancer tissues from HCC patients was significantly lower than that of adjacent cancerous tissues and healthy controls. The frequencies of CD8⁺ Treg and CD4⁺ Treg were negatively correlated with NK cells. Our results indicate that CD8⁺ and CD4⁺ Tregs mediate suppressive inhibition of NK cell function in HCC patients , suggesting targeting CTLA-4 + Treg mediated suppression contribute to restored NK cell function.

Key words hepatic carcinoma; CD8⁺ regulatory T cells; CD4⁺ regulatory T cells; CTLA-4; NK cells