

·临床研究·

不同原发病的肝移植患者围术期调节性 T 细胞的变化

李敏如, 肖 峰, 易述红, 张 琪, 陈规划

(中山大学附属第三医院肝移植中心, 广东广州 510630)

摘 要:【目的】探讨因慢性重型肝炎和原发性肝细胞癌(HCC)行肝移植手术患者围术期调节性 T 细胞免疫功能的变化。【方法】前瞻性选取 2008 年 9 月至 2010 年 7 月在中山大学附属第三医院因 HBV 相关性终末期肝病行肝移植手术或肝切除手术患者作为研究对象, 剔除术后合并脓毒症、急性排斥反应或手术相关并发症的患者后, 分为重型肝炎肝移植组(HSNS 组, 10 例), HCC 肝移植组(THC 组, 10 例)和肝癌切除手术组(NTHC 组, 10 例), 另选取 10 例健康人作为正常对照组。各组患者分别于术前、术后 1、3、7、14 d 分别检测外周血 T 淋巴细胞百分比(T%), CD4+CD25+Foxp3+Treg 百分比(Treg%)和 Foxp3 mRNA 表达。观察其于不同组间的表达水平和术后的变化趋势。【结果】术前 HSNS 组 T%较健康人群明显降低($P < 0.0001$), Treg%($P < 0.0001$)和 Foxp3 mRNA 表达($P = 0.002$)均显著高于健康人群; THC 组与 NTHC 组 Treg%和 Foxp3 mRNA 表达亦稍高于健康人群, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。另外, HSNS 组 Treg%显著高于 THC 组和 NTHC 组($P < 0.001$), Foxp3 mRNA 表达也分别高于 THC 组($P = 0.006$)和 NTHC 组($P = 0.002$)。三组患者术后第 1 天外周血 T%显著下降, 术后第 7 天开始回升, 并在术后 14 d 恢复至术前水平, 其中 NTHC 组患者恢复速度较肝移植两组患者迅速。HSNS 组术后 Treg%和 Foxp3 mRNA 表达较术前逐渐下降, 并在术后第 14 天与术前比较有显著性差异($P = 0.004$); THC 组术后 Treg%和 Foxp3 mRNA 表达也有下降趋势, 其中 Foxp3 mRNA 表达在第 14 天与术前比较有显著性差异($P = 0.019$); NTHC 组术后 Treg%和 Foxp3 mRNA 在各时间点与术前比较无明显变化($P > 0.05$)。【结论】HBV 感染患者存在不同程度免疫功能下降, 而且慢性重型肝炎患者下降程度重于 HCC 者, 术后应结合免疫学指标采取个体化免疫抑制治疗。

关键词:肝移植; 围术期; 调节性 T 细胞; 重型肝炎; 原发性肝细胞癌

中图分类号: R617

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2013)04-0558-05

Change of Regulatory T Cell in Patients with Different Primary Disease During Perioperation of Liver Transplantation

LI Min-ru, XIAO Feng, YI Shu-hong, ZHANG Qi, CHEN Gui-hua

(Liver Transplantation Center, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract:【Objective】To investigate the amount and function of regulatory T cell in the patients with chronic severe sepsis or hepatocellular carcinoma in the perioperation of liver transplantation. 【Method】Patients who were underwent liver transplantation or hepatectomy with HBV related end-stage disease from September 2008 to July 2010 were respectively enrolled in this study. Excluded of whom combined with sepsis, acute rejection and surgical related complication, patients were divided into 3 groups: HSNS group (patients with severe hepatitis for liver transplantation, $n=10$), THC group (patients with HCC for liver transplantation, $n=10$), and NTHC group (patients with HCC for hepatectomy, $n=10$). Ten healthy volunteer were selected as control group. Percentage of T lymphocyte and CD4+CD25+Foxp3+regulatory T cell (Treg%), as well as Foxp3 mRNA in peripheral blood were detected at 30 min pre-transplant and on 1 d, 3 d, 7 d, and 14 d post-transplant. The levels of above parameters and the change trend after transplantation were compared between three groups. 【Results】Before transplantation, T% in HSNS group was significant lower than volunteers ($P < 0.0001$), while Treg% ($P < 0.0001$) and Foxp3 mRNA ($P = 0.002$) were higher; Treg% and Foxp3 mRNA in THC group and NTHC group were a little higher than control group, but there was no significant difference ($P > 0.05$). In addition, Treg% in HSNS group was significantly higher than THC group and NTHC group ($P < 0.001$), and Foxp3 mRNA expression was higher than

收稿日期: 2013-01-03

基金项目: 广东省自然科学基金(52012040007964)

作者简介: 李敏如, 博士, 主治医师, 研究方向, 外科围术期管理, E-mail: liminru@163.com

THC group ($P = 0.006$) and NTHC group ($P = 0.002$) too. T% in three groups significantly decreased on day 1, began to increase on day 7 post transplant and recovered to the level pre-transplant on day 14. Among the three groups, NTHC group increase more rapidly than the other two groups. The percentage of Treg and Foxp3 mRNA decreased gradually in HSNS group post transplant, and the value on day 14 post transplant was significantly lower than that of pre-transplant ($P = 0.004$). The percentage of Treg and Foxp3 mRNA both decreased in THC group post transplant, and Foxp3 mRNA on day 14 post transplant was significantly lower than that of pre-transplant ($P = 0.019$). There was no difference of Treg% and Foxp3 mRNA in THC group between post transplant and pre transplant ($P > 0.05$). 【Conclusion】 Patients with HBV infection have weakened immune status. Moreover, the immune status in patients with severe hepatitis was even more weakened than patients with HCC. Individual immunosuppressant therapy should be adopted according to the immunological parameters.

Key words: liver transplantation; perioperation; regulatory T cell; severe hepatitis; hepatocellular carcinoma

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2013, 34(4): 558-562]

我国乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)相关性终末期肝病占了肝移植适应证的绝大部分^[1]。虽然各种新型抗生素的不断涌现和各种脏器支持治疗水平的提高,但慢性重型肝炎肝移植患者的围术期感染率和死亡率仍均显著高于肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)肝移植患者^[2]。现认为机体的免疫抑制状态是导致各种抗感染治疗效果不佳的原因^[3],免疫调理治疗是今后脓毒症治疗的重点发展方向。目前尚未有关于慢性重型肝炎和 HCC 患者肝移植围术期免疫状态的报道。鉴于调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)在乙肝慢性化中起着重要的作用,本研究以 Treg 的数量和功能作为监测指标,观察其分别在慢性重型肝炎和 HCC 患者围术期的变化,为免疫抑制药物的调整提供依据。

1 材料与方法

1.1 对象

前瞻性选取 2008 年 9 月至 2009 年 7 月在中山大学附属第三医院器官移植中心因 HBV 终末期肝病行同种异体原位肝移植手术患者作为研究对象。排除了围术期合并脓毒症、急性排斥反应和手术相关并发症患者后,分为重型肝炎肝移植组(HSNS 组)10 例,HCC 肝移植组(THC 组)10 例,同时选取因 HCC 行肝癌切除术 10 例患者作为阳性对照组(NTHC 组),以及 10 健康人群作为阴性对照组。

1.2 手术方式

手术方式均为改良背驮式原位肝移植术。免疫抑制方案采用巴利昔单抗诱导方案,即术中关腹前和术后第 5 天给予巴利昔单抗 20 mg 静脉推

注,并在术后第 5 天开始给予他克莫司,维持谷浓度在 8 ~ 12 ng/mL。术中和术后第 1 天静脉给予甲基强的松龙 500 mg,以后每天递减 40 mg 至第 8 天改为甲泼尼龙片 48 mg 口服,以后每 3 d 递减 8 mg,至 8 mg 维持。

1.2 监测指标

分别在手术开始前 30 min、术后第 1、3、7、14 天共 5 个时间点留取新鲜血标本检测外周血 T 淋巴细胞百分比(T%)、CD4+CD25+Foxp3+Treg 占 CD4+T 淋巴细胞百分比(Treg%)和 Foxp3 mRNA。术后 2 周每天记录患者生命体征(心率、呼吸、血压、体温)变化、监测血常规、肝肾功能、FK506 浓度。定期复查胸片,留取分泌物和引流液进行培养。

1.3 检测方法

1.3.2 CD4+CD25+Foxp3+Treg 百分比 采用流式细胞计数检测。经肝素抗凝全血加入 CD4 FITC/CD25 APC 标记,室温避光孵育 20 min 后,溶解红细胞,然后固定、破膜 30 min,加入 Foxp3-PE 标记,洗涤细胞后重悬待上机检测 CD4+CD25+Foxp3+Treg 占 CD4+T 细胞百分比。抗体试剂盒均购自 eBioscience 公司。

1.3.2 外周血 Foxp3 mRNA 的表达 用 RT-PCR 检测。血标本采用 Trizol 法提取 RNA,稀释后在紫外分光光度仪上进行纯度检测, D_{260nm}/D_{280nm} 值在 1.8 ~ 2.0,计算出含 2 μ g RNA 的标本量。按照试剂盒(QIAGEN,德国)说明进行逆转录,反应产物应用全自动荧光定量仪(PE 7000,美国)检测外周血 Foxp3 mRNA 表达,以 β -actin 为内参基因。RT-PCR 总反应体积为 20 μ L,一次性加入 Mix、正向引物、反向引物、DNA 模板。反应条件为 93 $^{\circ}$ C 3 min,然后 93 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,共 40

表 1 HSNS 组、THC 组和 NTHC 组患者临床资料
Table 1 The clinical data of the patients in HSNS, THC, and NTHC group

Group	Sex(M/F)	Age/years	MELD score	Cold ischemia time /h	Non hepatic time/min	Blood loss/L	Biological characteristic of tumor					
							No. ≤3/>3	d/cm ≤5/>5	Pathological grading L/M/H	Microvascular invasion N/Y	TNM stage I / II / III A	Milan criteria Y/N
HSNS	8/2	41.9±6.6	27.2±6.9	5.1±1.7	49.1±12.2	2.9±1.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
THC	9/1	47.0±7.1	7.7±2.5	5.6±0.8	43.5±8.2	1.8±0.9	4/6	3/7	1/9/0	6/4	1/3/6	3/7
NTHC	9/1	47.2±8.3	5.8±5.3	NA	NA	0.4±0.6	10/0	3/7	1/8/1	8/2	2/1/7	3/7

循环。Foxp3 上游:5'-CAG CAC ATT CCC AGA GTT CCT C-3';下游:5'-GCG TGT GAA CCA GTG GTA GAT C-3';β-actin 上游:5'-GCA TGG GTC AGA AGG ATT CCT-3';下游:5'-TCG TCC CAG TTG GTG ACG AT-3'。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料使用组间比较 t 检验,计数资料使用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般临床资料

三组患者性别、年龄差异无统计学意义,HSNS 组终末期肝病模型(model for end-stage liver disease,MELD)评分显著高于 THC 和 NTHC 组患者($P < 0.001$),两组肝移植患者冷缺血时间和无肝期时间差异均无统计学意义,但 HSNS 组术中出血量略多于 THC 组($P = 0.045$)。肿瘤生物学特性中除肿瘤数目外,两组 HCC 患者均无明显差别。THC 组术中出血量显著多于 NTHC 组($P < 0.001$)。三组患者一般临床资料如表 1 所示。

2.2 各组患者术前 CD4+CD25+Foxp3+Treg 百分比和 Foxp3 mRNA 表达

HSNS 组($P < 0.001$)与 THC 组($P < 0.001$)术

前 T 淋巴细胞百分比健康人群明显降低,NTHC 组较健康人群有所降低,但差异无统计学意义($P = 0.09$)。HSNS 组术前 CD4+CD25+Foxp3+Treg 百分比显著高于健康人群组($P < 0.001$),THC 组($P = 0.447$)与 NTHC 组($P = 0.341$)亦稍高于健康人群组,但差异无统计学意义;Foxp3 mRNA 表达情况与 CD4+CD25+Foxp3+Treg 百分比相似,HSNS 组术前 Foxp3 mRNA 表达显著高于健康人群组($P = 0.002$),THC 组($P = 0.326$)与 NTHC 组($P = 0.730$)亦稍高于健康人群组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。另外,HSNS 组 Treg%显著高于 THC 组($P < 0.001$)和 NTHC 组($P = 0.002$),Foxp3 mRNA 表达也分别高于 THC 组($P = 0.006$)和 NTHC 组($P = 0.001$)。健康人群与 3 组患者术前各免疫指标的结果详见表 2。

2.3 各组患者肝移植围术期 Treg 和 Foxp3 mRNA 变化

三组患者术后第 1 天外周血 T 淋巴细胞百分比显著下降,术后第 7 天开始回升,并在术后 14 d 恢复至术前水平;其中 NTHC 组患者恢复速度较肝移植两组患者迅速,其在第 7 天水平显著高于 HSNS 组($P = 0.002$)和 THC 组($P < 0.0001$)。

HSNS 组术前和术后各时间点 Treg%和 Foxp3 mRNA 表达均明显高于 THC 组和 NTHC 组,术后两个指标均逐渐下降,至术后第 14 天与术前比较

表 2 健康人群与 HSNS 组、THC 组、NTHC 组术前免疫指标的比较
Table 2 Comparison of pre-transplant immunological parameter between HSNS group, THC group, NTHC group and the health volunteer ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

	Health	HSNS	THC	NTHC
T%	0.32 ± 0.05	0.19 ± 0.08 ¹⁾	0.22 ± 0.04 ¹⁾	0.26 ± 0.09
Treg%	4.06 ± 0.50	5.74 ± 0.79 ¹⁾	4.28 ± 0.74	4.37 ± 0.87
Foxp3 mRNA	0.64 ± 0.12	0.89 ± 0.18 ¹⁾	0.69 ± 0.10	0.66 ± 0.06

T%: percent of T cells, Treg%: percent of CD4+CD25+Foxp3+Treg. 1) vs health, $P < 0.05$

有显著性差异($P = 0.004$ 和 $P = 0.011$),但仍显著高于 THC 组和 NTHC 组;THC 组术后 Treg% 和 Foxp3 mRNA 表达也有下降趋势,其中 Foxp3 mRNA 表达在第 14 天与术前比较有显著性差异($P = 0.019$);NTHC 组术后各时间点与术前比较无

明显变化。变化趋势见图 1。

3 讨论

Treg 细胞是一类具有负性调节作用的 T 淋巴细胞,在感染、肿瘤和移植等方面发挥着重要的免疫调节作用,其中 Foxp3 与 Treg 的功能直接相关,可作为 Treg 表型和功能的标记^[4]。本组资料显示慢性重型肝炎和 HCC 患者 Treg 比例和 Foxp3 mRNA 表达均较健康人群有所上升,其中以慢性重型肝炎患者上升最为显著。研究表明 HCC 患者外周血和肿瘤微环境中 Treg 比例上调,推测 Treg 数量的上调及活化抑制了机体的免疫,有助于促进肝癌细胞的“免疫逃逸”^[5-6]。另外 Treg 在乙型肝炎慢性化中发挥着重要的作用,而且其数量和 Foxp3 表达的强度与病情轻重呈正相关^[7],这提示慢性重型肝炎患者免疫抑制程度要重于 HCC 患者。由于免疫功能下降可增加感染的风险,这可能是慢性重型肝炎患者感染的发生率远高于 HCC 的原因之一,我们认为对于慢性重型肝炎患者,术后早期可适当减少免疫抑制剂的用量,以维持机体的免疫平衡,从而降低感染的风险。

本组资料显示术后顺利恢复的慢性重型肝炎患者外周血 Treg 比例和 Foxp3 mRNA 表达在术后逐渐下降,上述指标在第 14 天与术前相比均明显降低。肝癌肝移植者也呈现类似趋势,其中 Foxp3 mRNA 表达与术前比较也显著下降。移植术后 Treg 的变化一方面可能受免疫抑制剂的影响,据报道钙调磷酸酶(CNI)抑制剂对 Treg 起下调的作用^[8-9]。然而,免疫抑制药物需要使用一定时间才能建立免疫耐受,Kim 等^[10]研究发现,常规使用 CNI 类的肾移植患者,在术后 8 周其外周血 Treg 才较术前显著下降;另外药物剂量对 Treg 也有一定影响,肝移植患者术后 8 周并未发现 Treg 的显著下降,可能由于肝移植使用免疫抑制剂的用量小于肾移植者所致^[5]。

因此我们认为肝移植术后 2 周内免疫抑制药物对机体 Treg 的影响是有限的,术后早期 Treg 的变化可能与原发病的治疗有关。慢性重型肝炎患者经过肝移植手术,去除病肝的同时,全身状态也得以改善,使 Treg 逐渐下降。HCC 肝移植患者术前多处于肝癌 II、III 期,但尚未出现淋巴结转移和大血管浸润,肝移植手术不仅去除肿瘤组织,还切

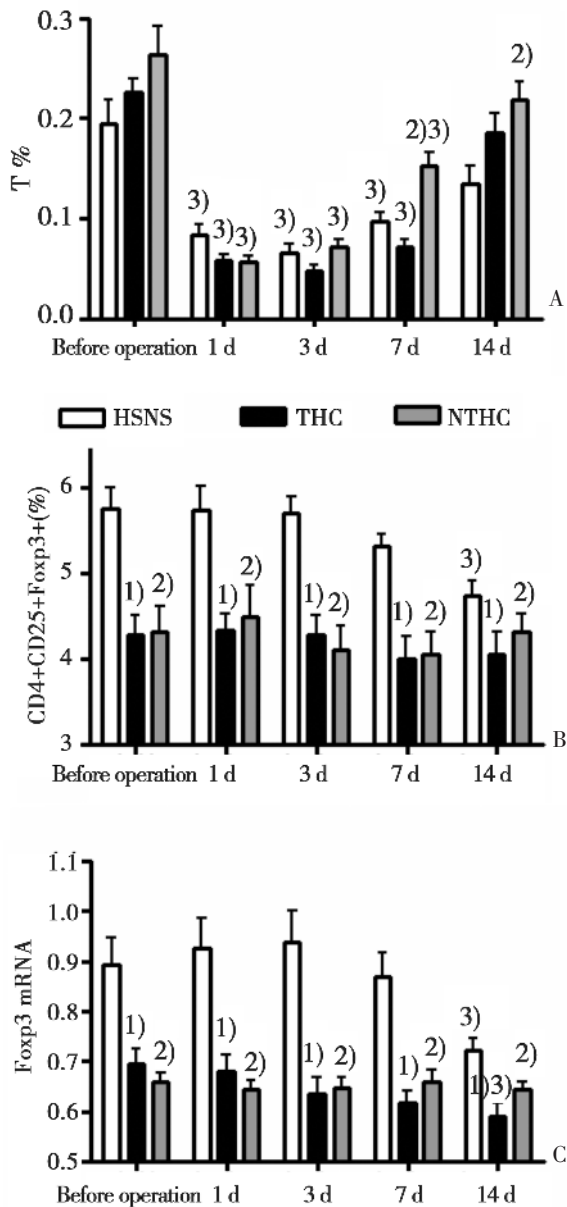


图1 HSNS组(A)、THC组(B)和NTHC组(C)患者肝移植围术期Treg和Foxp3 mRNA变化

Fig.1 The change of Treg and Foxp3 mRNA of patients in HSNS group(A), THC group(B), and NTHC group(C) during the perioperation of liver transplantation

THC group vs HSNS group, 1) $P < 0.05$; NTHC group vs HSNS group, 2) $P < 0.05$; post-transplant vs pre-transplant, 3) $P < 0.05$

除了整个病肝,解除机体病毒和癌负荷^[11],减轻机体免疫抑制,恢复宿主免疫平衡。而肝癌肝切除患者 Treg 比例和 Foxp3 mRNA 表达与术前比较无明显变化,这可能因为该组患者仅切除了肿瘤组织,但整合在肝细胞内的 HBV 可继续诱导机体发生免疫应答,另外肝内可能残存微小转移灶并成为随后复发的根源,因此影响术后免疫状态的改善。由于 HCC 患者免疫状态可能还受肿瘤分期的影响,不同术式对肿瘤患者免疫状态的影响仍待进一步的分层分析以阐明。

综合上述,HBV 感染患者存在不同程度免疫功能下降,而且慢性重型肝炎患者下降程度重于 HCC 患者,术后早期可适当减少慢性重型肝炎患者免疫抑制剂的用量,以维持机体免疫状态的平衡,减少并发症。随着术后肝功能和全身情况的改善,免疫状态在术后 7~14 d 开始恢复,此时应逐渐增加免疫抑制药物的用量以避免急性排斥反应的发生。

参考文献:

- [1] Jiao ZY, Jiao Z. Prophylaxis of recurrent hepatitis B in Chinese patients after liver transplantation using lamivudine combined with hepatitis B immune globulin according to the titer of antibody to hepatitis B surface antigen [J]. *Transplant Proc*, 2007, 39 (5): 1533-1536.
- [2] 郭庆良, 卢实春, 王孟龙, 等. 影响慢性重型肝炎肝移植生存率的相关危险因素分析 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2008, 14(6): 371-377.
Guo QL, Lu SC, Wang ML, et al. Analysis of risk factors related to survival of patients with chronic severe hepatitis after Liver transplantation [J]. *Chin J Hepatobiliary Surg*, 2008, 14(6): 371-377.
- [3] 脓毒症免疫调理治疗临床研究协作组. 乌司他丁 α 1 胸腺肽联合治疗严重脓毒症一种新的免疫调理治疗方法的临床研究 [J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(7): 451-457.
The Cooperative Group of Immunomodulatory Therapy. Clinical trial with a new immunomodulatory strategy: treatment of severe sepsis with Ulinastatin and Malpuxin [J]. *Chin Med J*, 2007, 87(7): 451-457.
- [4] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 [J]. *Science*, 2003, 299(5609): 1057-1061.
- [5] Yoshizawa K, Abe H, Kubo Y, et al. Expansion of CD4 (+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells in hepatitis C virus -related chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatol Res*, 2010, 40 (2): 179-187.
- [6] 苏松, 李波, 贺凯, 等. 肝癌病人外周血中 CD4+CD25+FOXP3+调节性 T 淋巴细胞表达水平的临床研究 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2010, 16(8): 576-578.
Su S, Li B, He K, et al. Expression of CD4+ CD25+ FOXP3 + regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Chin J Hepatobiliary Surg*, 2010, 16(8): 576-578.
- [7] Miyaaki H, Zhou H, Ichikawa T, et al. Study of liver-targeted regulatory T cells in hepatitis B and C virus in chronically infected patients [J]. *Liver Int*, 2009, 29 (5): 702-707.
- [8] Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, et al. Inhibition of CD4 + regulatory T -cell function by calcineurin -dependent interleukin-2 production [J]. *Blood*, 2006, 108(1): 390-399.
- [9] 褚志强, 张佳林, 李晓航, 等. 不同免疫抑制剂对肝移植受者外周血中调节性 T 淋巴细胞比例的影响 [J]. *中华器官移植杂志*, 2011, 32(7): 407-411.
Chu ZQ, Zhang JL, Li XH, et al. Rapamycin increased development of CD4 + CD25high Foxp3 +T cells of peripheral blood in liver transplant recipients [J]. *Chin J Organ Transplant*, 2011, 32(7): 407-411.
- [10] Kim SH, Oh EJ, Yeon JG, et al. Clinical Significance of Monitoring Circulating CD4 +CD25 + Regulatory T Cells in Kidney Transplantation during the Early Posttransplant [J]. *Period J Korean Med Sci*, 2009, 24 (Suppl 1): 135-142.
- [11] Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008 [J]. *J Hepatol*, 2008, 48(Suppl 1): 20-37.

(编辑 徐杰)