

• 论 著 •

腹腔热灌注化疗对晚期胃癌患者外周血和腹水调节性 T 细胞的影响及意义*

毛丽伟, 王 阳, 廖国清, 李仁德, 管静芝[△]

(中国人民解放军第三〇九医院肿瘤科, 北京 100091)

摘要:目的 探讨腹腔循环热灌注化疗对晚期胃癌患者外周血和腹水 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg 细胞)的影响和意义。方法 48 例胃癌合并腹水患者, 采用替吉奥(S-1)联合顺铂腹腔循环热灌注化疗方案治疗 2 周期后参照世界卫生组织(WHO)标准进行疗效评价。采用流式细胞术检测有效组和无效组化疗前后外周血及腹水中 Treg 细胞比例变化。结果 48 例患者中, 完全缓解(CR)2 例, 部分缓解(PR)30 例, 无效(NC)11 例, 进展(PD)5 例, 腹水有效控制率(CR+PR)为 66.67%(32/48)。腹水的 Treg 细胞比例均高于外周血($P < 0.05$)。有效组化疗后外周血和腹水中 Treg 细胞比例均较化疗前下降($P < 0.05$); 无效组化疗前后 Treg 细胞比例变化不明显($P > 0.05$)。化疗前两组间外周血及腹水中 Treg 细胞比例比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 化疗后两组间外周血及腹水中 Treg 细胞比例比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 S-1 联合腹腔热灌注化疗可有效治疗胃癌合并腹水, 可能主要通过杀伤肿瘤的方式, 间接解除 Treg 细胞的免疫抑制作用。

关键词:胃癌; 外周血; 腹水; 调节性 T 细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.17.008 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)17-2429-03

The effect of intraperitoneal circulatory thermochemotherapy on the percentage of regulatory T cell in peripheral blood and ascites of patients with advanced gastric cancer*

MAO Liwei, WANG Yang, LIAO Guoqing, LI Rende, GUAN Jingzhi[△]

(Department of Oncology, the 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of S-1 combined with DDP in circulatory thermochemotherapy of intraperitoneal perfusion on the percentage of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell(Treg) in peripheral blood and ascites of patients with advanced gastric cancer. Methods 48 patients with advanced gastric carcinoma and malignant ascites were given S-1 combined with DDP intraperitoneal perfusion circulatory thermochemotherapy for two course. The effects were evaluated according to the common toxicity criteria of world health organization(WHO). The 48 patients were divided into effective group and ineffective group, the percentage of Treg cell in peripheral blood and malignant ascites was detected by using flow cytometry. Results In the 48 patients, there were 2 cases of complete remission(CR), 30 cases of partial remission(PR), 11 cases of ineffective(NC), 5 cases of progression(PD), and the proportion of effective control of ascites(CR+PR) was 66.67%(32/48). The proportion of Treg cells in ascites was higher than that in peripheral blood($P < 0.05$). The proportion of Treg cells in peripheral blood and ascites in the effective group after chemotherapy was lower than that before chemotherapy($P < 0.05$). The proportion of Treg cells didn't change significant after chemotherapy($P > 0.05$). There was no significant difference in the proportion of Treg cells in peripheral blood and ascites between the two groups before chemotherapy($P > 0.05$), while there was a significant difference in the proportion of Treg cells in peripheral blood and ascites between the two groups after chemotherapy($P < 0.05$). Conclusion The way of S-1 combined with DDP in circulatory thermochemotherapy of intraperitoneal perfusion could treat gastric carcinoma effectively by reducing Treg cell and remove its immunosuppressive action indirectly.

Key words: gastric carcinoma; peripheral blood; ascites; regulatory T cell

胃癌是常见的恶性肿瘤之一, 居世界肿瘤死亡原因的第 2 位^[1]。如无效治疗, 胃癌患者平均生存期仅为 6~9 个月且生活质量明显降低^[2-3]。全身化疗或联合腹腔内循环热灌注化疗是目前治疗胃癌合并腹水的主要手段。胃癌的发生、发展与机体免疫功能、状态密切相关。化疗药物除对肿瘤细胞的直接杀伤作用外, 对机体免疫功能也有相应的调节作用, 但其机制尚不清楚。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg 细胞)是由 Sakaguchi 等^[4]首先发现的 T 细胞中的一个亚群, 具有免疫抑制功能, 其上调可抑制功能性 T 细胞的免疫应答, 是肿瘤发生免疫逃避的关键因素之一。为探讨全身化疗联合腹腔内循环热

灌注化疗对胃癌患者免疫功能的影响, 本课题组收集并检测了 48 例晚期胃癌合并腹水患者化疗前后 Treg 细胞的比例变化, 结合临床疗效分析化疗药物对机体免疫功能的影响并初步探讨其可能的机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 1 月至 2015 年 4 月本院收治的经影像学证实的 48 例胃癌合并腹水患者, 腹水肿瘤细胞学检测也均为癌细胞阳性, 男 29 例、女 19 例, 年龄 32~68 岁、平均 49.6 岁。其中, 高分化腺癌 2 例, 中分化腺 4 例, 低分化腺癌 33 例, 印戒细胞癌 4 例, 黏液腺癌 5 例。体力状况 ECOG 评分

* 基金项目: 解放军第三〇九医院院管课题资助项目(2014MS-003)。

作者简介: 毛丽伟, 女, 副主任医师, 主要从事胃癌发病机制与临床研究。△ 通讯作者, E-mail: jzjz1970@hotmail.com。

为 1~2 分,平均 1.9 分,距末次化疗时间大于 6 月,预计生存期 ≥3 月。血常规、肝肾功能、尿常规、心电图检查均正常。所有临床试验程序均经本院伦理委员会审查批准,患者均签署了知情同意书。

1.2 化疗方案及疗效评价 参照本课题组前期研究的方法对患者行腹腔顺铂注射液(江苏豪森药业股份有限公司生产)循环热灌注治疗,顺铂给药第 1 天为 90 mg,第 8 天为 60 mg。灌注化疗第 1 天开始口服替吉奥胶囊(S-1,山东新时代药业公司生产),根据体表面积来确定初始剂量,体表面积 <1.25 m²,S-1 每次 40 mg,每天 2 次;体表面积 1.25~1.50 m²,S-1 每次 50 mg,每天 2 次;体表面积 >1.5 m²,S-1 每次 60 mg,每天 2 次,早、晚饭后口服,连续服用 14 d,停药 7 d,21 d 为 1 周期,2 周期后行疗效评价。所有患者每周检测 2 次血常规,1 次血生化指标。疗效参照 WHO 标准评价:腹水消失并至少维持 4 周以上为完全缓解(CR);腹水量减少 50%并维持 4 周以上为部分缓解(PR);未达上述指标,或虽有效,但治疗 4 周后仍需再次放腹水治疗为无效(NC);腹水量增加为进展(PD);有效控制率按 CR+PR 计算。

1.3 试剂 主要试剂包括 Biolegend 公司的 FITC 标记的鼠抗人 CD4 抗体和 PE 标记的鼠抗人 CD25 抗体,APC 标记的鼠抗人 CD3 抗体,同型对照分别为 FITC、PE、APC 标记的鼠抗人 IgG1;淋巴细胞分离液(密度 1.077 g/mL)购于 Sigma 公司。CD4⁺CD25⁺Treg 分离试剂盒购自 Miltenyi Biotec 公司。红细胞裂解液购自北京天泰科技公司。

1.4 方法 分别于每例患者第 1 周期化疗前 1 天及第 2 周期化疗结束后 2 周采集外周血及腹水标本。腹水标本处理:采集患者无菌腹水标本 50 mL,于 4℃、1 500 r/min 离心 10 min 后 PBS 重悬,用红细胞裂解液去除红细胞,40 μm 滤器过滤,细胞用 RPMI-1640,20%胎牛血清重悬,5%CO₂ 培养箱中过夜,丢弃贴壁细胞,取悬浮细胞制成单细胞悬液。如腹水完全消失,可经腹腔穿刺置管注入 150 mL 无菌生理盐水后回抽 50 mL,作为治疗 CR 腹水标本。外周血标本处理:经 Ficoll-Hypaque 密度梯度法收集中间层单个核细胞层。将上述获得的腹水悬浮细胞及外周血单个核细胞用 PBS 洗涤,调整浓度至 1×10⁶/mL,取每管 200 μL,同时加入 FITC 标记的鼠抗人 CD4 单克隆抗体、APC 标记的鼠抗人 CD3 抗体和 PE 标记的鼠抗人 CD25 单克隆抗体各 10 μL,同时分别设立阴性对照,混匀,4℃避光孵育 30 min,PBS 洗 2 次,流式细胞仪检测,Cellquest 软件数据分析,记录 CD4⁺CD25⁺T 细胞,即 Treg 细胞在 CD3⁺T 细胞中所占比例。根据最终疗效分为有效组(CR+PR)组和无效组(NC+PD),并将结果进行统计学分析。

1.5 统计学处理 采用 SPSS15.0 软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立 *t* 检验,组内治疗前后差异对比采用配对 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 疗效评价 48 例胃癌合并腹水患者经口服 S-1 联合顺铂腹腔循环热灌注化疗后,CR2 例,PR30 例,NC11 例,PD5 例,腹水有效控制率为 66.67%(32/48),见表 1。

表 1 S-1 联合顺铂腹腔热灌注化疗的腹水控制率(%)

组别	<i>n</i>	控制率
CR+PR 组	32	66.67
NC+PD 组	16	33.33

2.2 流式细胞术检测患者化疗前后外周血及腹水中 Treg 细胞的比例 两组化疗前后 Treg 细胞的比例变化参见表 1。化疗前两组患者外周血及腹水中 Treg 细胞比例比较,差异无统计学意义(*P*>0.05);化疗后两组间外周血及腹水中 Treg 细胞比例比较差异有统计学意义(*P*<0.05)。同组患者化疗前后比较,治疗有效组外周血及腹水中 Treg 细胞比例均出现显著变化(*P*<0.05),治疗无效组外周血及腹水中 Treg 细胞比例均变化不显著(*P*>0.05)。腹水中的 Treg 细胞比例均显著高于外周血(*P*<0.05)。

表 1 治疗有效组及无效组化疗前后外周血及腹水中的 Treg 细胞比例(%)

分组	<i>n</i>	化疗前		化疗后	
		外周血	腹水	外周血	腹水
有效组	32	9.39±1.57	12.02±2.01	6.00±1.09 [#]	8.35±1.77 [#]
无效组	16	8.95±1.03	12.42±1.94	8.56±1.36*	12.08±1.48*

注:与有效组化疗后比较,**P*<0.05;与同组化疗前比较,[#]*P*<0.05。

3 讨 论

晚期胃癌常出现腹膜转移,继而导致腹腔积液、肠梗阻、肾盂积水的形成,严重降低患者生存质量,缩短生存期。胃癌的发生、发展、复发、转移及预后与机体的免疫功能状态密切相关。抑制特异性 T 细胞免疫应答是胃癌细胞逃避机体免疫系统监视、突破免疫细胞的攻击、诱导机体产生免疫耐受,最终导致胃癌产生及进展的重要机制^[5]。CD4⁺CD25⁺Treg 细胞作为 T 细胞的一个亚群,具有较强的免疫抑制功能,极少量的 Treg 细胞便可以通过直接接触或细胞因子介导的方式来抑制 T 细胞增殖及活性 T 细胞功能,甚至诱导 T 细胞凋亡,进而产生免疫抑制,是促进肿瘤发生的关键因素之一^[6]。Treg 细胞在肺癌、卵巢癌、肝癌、胰腺癌、乳腺癌等实体瘤和淋巴瘤等血液系统恶性肿瘤患者的外周血及实体瘤局部肿瘤组织、肿瘤浸润淋巴结和引流淋巴结及卵巢癌腹水中的数量均被检测到不同程度的增高,而且数量与疾病进程和预后呈负相关^[7-8]。因此,有效减少或清除 Treg 细胞数量,下调其活性使之不能发挥免疫抑制作用,对于提高机体的抗肿瘤免疫效应起着重要作用,是目前抗肿瘤免疫研究的热点^[9-10]。化疗作为治疗恶性肿瘤的一种主要手段,对肿瘤患者外周血中 Treg 数量及比例可产生一定的影响。Chu 等^[11]报道在 Lewis 肺癌的小鼠模型中,给予多西紫杉醇化疗可使肿瘤细胞减少,小鼠 T 淋巴细胞总量及淋巴结、脾脏和外周血中 CD4⁺、CD8⁺T 细胞数目减少,同时可引起天然的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞减少,推测可能是由于化疗药物选择性清除 Treg 细胞引起。Beyer 等^[12]发现氟达拉滨治疗 B 细胞慢性淋巴性白血病,化疗后 Treg 数目显著减少且 Treg 细胞抑制功能减弱甚至消失。李滢等^[13]研究发现含硼替佐米化疗方案治疗多发性骨髓瘤患者,化疗后缓解患者外周血 Treg 细胞显著下降且 β₂-微球蛋白水平显著降低。但刘莉等^[14]研究发现 B 细胞淋巴瘤患者接受 4~6 周期化疗后,外周血中 CD4⁺CD25⁺Treg 数目较化疗前增多,究其具体原因可能与化疗药物种类、剂量、给药方法、给药时间及化疗后外周血检测 Treg 时间不同有关。

为明确化疗对机体免疫调节作用及可能机制,本课题组进行了上述研究,结果提示:(1)S-1 联合腹腔循环热灌注化疗用于治疗胃癌合并腹水患者疗效较好,腹水有效控制率可达

66.67%，与本课题前期研究结果基本相似^[15]。(2)化疗前两组间癌性腹水中 Treg 细胞比例均高于外周血，提示胃癌细胞可诱导周围组织中 Treg 细胞增高，进而出现免疫逃避。(3)两组患者化疗前外周血及腹水中 Treg 细胞比例无明显差异，提示 Treg 细胞比例不能作为预先判断化疗预后的标志物。(4)两组患者化疗前后自身对比分析中，治疗有效组腹水及外周血中 Treg 细胞比例显著降低，而无效组则无明显差异，提示 Treg 细胞比例与肿瘤控制情况相关。一方面可能是化疗通过直接特异性杀伤或间接下调 Treg 细胞，解除自身免疫抑制状态，从而控制肿瘤生长；另一方面，也可能是化疗通过大量杀伤肿瘤细胞，减轻肿瘤负荷，进而下调 Treg 细胞，增强免疫应答；笔者认为后者可能性更大或占主导地位。

本研究初步表明 S-1 联合顺铂腹腔循环热灌注方案可有效治疗晚期胃癌合并腹水，其机制可能为化疗药物通过杀伤肿瘤细胞进而下调 Treg 细胞比例，解除免疫抑制，增强患者免疫功能。受样本量限制，未进行不同病理类型的分层分析，而且为获得最佳临床效果，本研究中的病例均采用腹腔灌注化疗联合全身化疗，未设置单独热灌注化疗组，其与外周血中 Treg 变化间的相互关系仍需进一步探讨。

参考文献

[1] Orditura M, Galizia G, Sforza V, et al. Treatment of gastric Cancer[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(7):1635-1649.

[2] Yoo CH, Noh SH, Shin DW, et al. Recurrence following curative resection for gastric carcinoma[J]. Br J Surg, 2000, 87(2):236-242.

[3] Wagner AD, Unverzagt S, Grothe W, et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2010, 17(3):CD004064.

[4] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains(CD25):Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. J Immunol, 1995, 155(3):1151-1164.

[5] Raghavan S, Quiding-Jarbrink M. Regulatory T cells in gastrointestinal tumors [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 5(4):489-501.

[6] Shen LS, Wang J, Shen DF, et al. CD4(+) CD25(+)

CD127 (low/-) regulatory T cells Express Foxp3 and suppress effector T cell proliferation and contribute to gastric cancers progression[J]. Clin Immunol, 2009, 131(1):109-118.

[7] Erfani N, Hamed-Shahraki M, Rezaeifard S, et al. FoxP3⁺ regulatory T cells in peripheral blood of patients with epithelial ovarian cancer[J]. Iran J Immunol, 2014, 11(2):105-112.

[8] Wang YY, He XY, Cai YY, et al. The variation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the periphery blood and tumor microenvironment of non-small cell lung Cancer patients and the downregulation effects induced by CpG ODN[J]. Target Oncol, 2011, 6(3):147-154.

[9] Baecher-Allan C, Anderson DE. Regulatory cells and human cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2006, 16(2):98-105.

[10] Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies [J]. Semin Cancer Biol, 2015, 35(Suppl 1):S185-S198.

[11] Chu Y, Wang LX, Yang G, et al. Efficacy of GM-CSF-producing tumor vaccine after docetaxel chemotherapy in mice bearing established Lewis lung carcinoma[J]. J Immunother, 2006, 29(4):367-380.

[12] Beyer M, Kochanek M, Darabi K, et al. Reduced frequencies and suppressive function of CD4⁺ CD25^{hi} regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine [J]. Blood, 2005, 106(6):2018-2025.

[13] 李滢, 李娟, 黄蓓晖, 等. 硼替佐米对多发性骨髓瘤患者 Treg 细胞的影响及与肿瘤负荷、化疗疗效的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(6):985-990.

[14] 刘莉, 姚军霞, 丁乾, 等. 非霍奇金淋巴瘤患者外周血 CD4⁺ CD25^{high} 调节性 T 细胞研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(1):119-122.

[15] 毛丽伟, 管静芝, 廖国清, 等. S-1 联合 DDP 腹腔恒温循环热灌注治疗胃癌合并腹水的临床疗效观察[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 11(22):9920-9923.

(收稿日期:2016-03-13 修回日期:2016-05-21)

(上接第 2428 页)

normal variant puberty: definition, etiology, diagnosis and current management [J]. J Clin Res Pediatr Endocrinol, 2009, 1(4):164-174.

[10] 原中华人民共和国卫生部. 性早熟诊疗指南(试行)[卫办医政发(195)号][J]. 中国儿童保健杂志, 2011, 19(4):390-392.

[11] 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组. 中枢性(真性)性早熟诊疗指南[J]. 中华儿科杂志, 2007, 45(6):426-427.

[12] 王祖芳, 李桂军. ROC 曲线分析卵泡刺激素及黄体生成素辅助诊断女童性早熟的价值[J]. 中国当代儿科杂志, 2012, 14(6):441-444.

[13] Houk CP, Kunselman AR, Lee PA. Adequacy of a single unstimulated luteinizing hormone level to diagnose central precocious puberty in girls[J]. Pediatrics, 2009, 123(6):1059-1063.

[14] 梁进涛. 血清促性腺激素基础值在性早熟女童诊断中的价值[J]. 中国当代儿科杂志, 2012, 14(12):942-945.

[15] Brito VN, Latronico AC, Arnhold IJ, et al. A single luteinizing hormone determination 2 hours after depot leuprolide is useful for therapy monitoring of gonadotropin-dependent precocious puberty in girls[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(9):4338-4342.

(收稿日期:2016-04-02 修回日期:2016-06-11)