



肝癌患者PBMC的TNFR I、II的表达及治疗对表达率的影响

近年的研究表明[1][2],正常人体液及肿瘤患者肿瘤细胞培养上清中存在着可溶性的肿瘤坏死因子受体(soluble tumor necrosis factor receptor, sTNFR),而sTNFR I和sTNFR II分别来源于TNFR P55和TNFR P75的膜外区域,并保持与TNF结合的特性,在体内能影响调节TNF的功能,具有重要的生物学意义。我们以往的研究显示肝癌患者血清中的sTNFR I和sTNFR II水平明显高于正常人,且其升高程度与病人的肝功损害、恶液质、不良预后程度明显相关[3]。为进一步探讨肝癌患者升高的sTNFR的来源,我们检测了30例健康成人外周血单个核细胞(PBMC)的TNFR I, TNFR II的表达;在获得国人PBMC TNFR I、TNFR II 表达率正常值的基础上,同时检测了31例肝癌患者的TNFR I、TNFR II 的表达以及生物治疗、化疗对表达率的影响,从而揭示肝癌患者存在的异常免疫状态,为肝癌的免疫生物治疗提供了一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

分别抗TNFR P55和TNFR P75的特异性单抗Htr20和Utr4由瑞士的Manfred Brockhaus 博士赠送;荧光标记的羊抗鼠抗体购于Sigama公司;S-P一步染色试剂盒购于福建三明日通生命技术有限公司。

1.2 主要仪器

流式细胞仪(EPICS R ELIPE COULTER 公司)。

1.3 研究对象

30例健康成年人为广州市中心血站自愿献血员,其中男性28例,女性2例,年龄(40.38±10.58)岁。31例肝癌患者均为本院住院病人,其中男性28例,女性3例,年龄(49.69±11.78)岁,均根据临床、实验室、影像学及病理资料确诊。31例中有29例为乙型肝炎病毒感染阳性,入院后根据病情选择肝动脉插管栓塞并TAE(丝裂霉素10 mg,卡铂200 mg,表阿霉素20 mg,碘油15 ml)或LAK细胞 1×10^9 加IL-2 20万U/d×6 d进行生物治疗。

1.4 流式细胞仪检测PBMC的TNFR I、TNFR II 表达

取受试者外周静脉血5 ml,肝素抗凝,用淋巴细胞分离液常规分离,获PBMC后用D-Hanks液洗2遍,将细胞浓度调至 1×10^6 /ml。取单细胞悬液0.5 ml加入单抗 Htr20或Utr4 0.5 μg, 4 °C 1 h。用Hanks溶液洗3遍,再加入荧光标记的二抗1:100 50 μl, 4 °C, 30 min。洗后固定,流式细胞仪分析检测。

1.5 S-P一步法检测PBMC的TNFR I、TNFR II表达

同样取PBMC单细胞悬液0.5 ml分别与Htr20、Utr4培养,而后按试剂盒说明进行染色操作,显微镜下观察。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,按未配对资料的t检验进行处理比较。

2.1 健康成人PBMC的TNFR表达

用流式细胞仪技术及S-P一步染色法检测30例正常成人PBMC的TNFR I 表达阳性率分别为 $(38.54 \pm 8.51)\%$ 和 $(39.62 \pm 7.55)\%$ ，而TNFR II分别为 $(44.89 \pm 9.08)\%$ 和 $(46.38 \pm 7.9)\%$ ，2种方法检测结果无显著差异($P > 0.05$)。

2.2 肝癌患者PBMC的TNFR表达

本组31例肝癌患者PBMC的TNFR I 和TNFR II 表达率分别为 $(28.35 \pm 9.09)\%$ 和 $(37.45 \pm 9.51)\%$ ，均显著低于健康成人($P < 0.001$)。

2.3 治疗对肝癌患者TNFR表达的影响

生物治疗和化疗前后肝癌患者PBMC的TNFR表达率如表1所示。可见12例肝癌患者经LAK 1×10^9 加IL-2 20万U/d连续6 d治疗后，其PBMC的TNFR I 阳性率较治疗前明显升高($P < 0.001$)；TNFR II 的表达亦有升高，但较治疗前无显著性差异($P > 0.05$)。肝癌患者经TAE治疗后1周和3周其PBMC的TNFR I 、TNFR II 表达率均与治疗前无明显差异($P > 0.05$)。

表 1 生物治疗和化疗前后肝癌患者 PBMC 的 TNFR 表达率

(%, $\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effects of the treatment on TNFR expression in patients with primary hepatocellular carcinoma (%, Mean \pm SD)

TNFR type	Expression rate			
	Before treatment (n=31)	One week after LAK therapy (n=12)	One week after TAE therapy (n=10)	Three weeks after TAE therapy (n=6)
TNFR I	28.35 \pm 9.09	42.86 \pm 9.02*	29.86 \pm 9.24	23.35 \pm 6.19
TNFR II	37.45 \pm 9.51	40.46 \pm 7.08	36.22 \pm 9.91	31.54 \pm 8.13

* $P < 0.001$ vs before treatment; LAK: Lymphokine activated

killer cells; TAE: Transcatheter arterial embolization

3 讨论

众所周知，TNF是一种在体内具有多种重要生物活性的细胞因子，其体内作用的发挥有赖于细胞膜TNFR的介导。血循环中的TNF水平及其活性检测已广泛用于多种疾病的免疫状态评估，而对PBMC的TNFR表达的检测尚不多[4][5]。我们同时用2种方法测定了30例健康成人PBMC 的TNFR I 和TNFR II 阳性表达率，结果可靠稳定，使其有望成为新的临床免疫指标之一。

肝癌患者的免疫异常已被公认。我们以往的研究[2]已显示肝癌患者血清中的sTNFR I 、sTNFR II 均显著高于正常，并且化疗和LAK治疗可使sTNFR I 水平又明显高于治疗前。关于血中升高sTNFR的来源尚不明确，既可源于多量PBMC的TNFR高表达和释放，也可来源于肝脏或其他器官内的TNFR表达阳性细胞。本文结果显示肝癌患者PBMC 的TNFR I 和TNFR II 的表达不仅不高，反而显著低于正常对照，这一方面显示肝癌患者的异常免疫状态；另一方面也提示肝癌患者血中高水平sTNFR并非来源于PBMC的高表达率(但还没证实单个淋巴细胞的受体表达数量)，而可能来源于肝内的肝癌细胞或激活的免疫细胞；同时也说明了TNFR分布及sTNFR来源的复杂性。LAK细胞加IL-2可使PBMC TNFR I 表达增高，并释放多量sTNFR[6][7]，肝动脉化疗不能使PBMC表达TNFR

增多, 却有可能使肝内的免疫活性细胞或肝癌细胞表达TNFR增多, 释放多量sTNFR入血, 其直接证据正待于我们进一步的研究探讨。

总之, 肝癌患者存在着明显的免疫异常, 其PBMC的TNFR I、TNFR II表达阳性率均明显低于正常对照, 生物治疗可使TNFR I表达显著提高, 从而提示肝癌患者的生物治疗具有一定的理论基础。

参考文献:

- [1] 白 岚, 姜云飞. 可溶性肿瘤坏死因子受体的检测及临床意义[J]. 国外医学·免疫分册, 1995, 18(2): 95-7.
- [2] 高 蕾, 白 岚, 南清振, 等. 肿瘤坏死因子受体-p55在大肠癌中的表达及其意义[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(2): 90-2.
- Gao L, Bai L, Nan QZ, et al. Expression and its significance of tumor necrosis factor receptor-p55 in human colorectal cancer[J]. J First Mil Med Univ, 2001, 21(2): 90-2.
- [3] 白 岚, 袁爱力, 牛杰志, 等. 肝病患者的可溶性肿瘤坏死因子受体测定[J]. 临床肝胆杂志, 1997, 13(2): 86-8.
- Bai L, Yuan AL, Niu JZ, et al. Detection of soluble tumor necrosis factor receptor in patients with liver diseases[J]. Clin Liver Gall J, 1997, 13(2): 86-8.
- [4] 刘小菁, 陶 冶, 许国章. 可溶性TNF受体及膜TNF受体检测方法的初步应用[J]. 上海免疫学杂志, 1995, 15(3): 160-1.
- [5] 高 蕾, 南清振, 白 岚, 等. 食道癌患者血清可溶性肿瘤坏死因子受体1测定及临床意义[J]. 第一军医大学学报, 1995, 15(4): 365-7.
- Gao L, Nan QZ, Bai L, et al. Determination of the levels of serum soluble tumor necrosis factor receptor 1 in esophageal carcinoma patients[J]. J First Mil Med Univ, 1995, 15(4): 365-7.
- [6] Cope AP, Aderka D, Wallach D, et al. Soluble TNF receptor production by activated T lymphocytes: differential effects of acute and chronic exposure to TNF[J]. Immunology, 1995, 84(1): 21-30.
- [7] Abe Y, Yamauchi K, Kimura S. 75- but not 55-kDa tumor necrosis factor receptor is active in the homotypic aggregation and proliferation of human lymphokine-activated T killer (T-LAK) cells in vitro[J]. J Leukoc Biol, 1995, 57(3): 462-8.

参考文献:

- [1] 白 岚, 姜云飞. 可溶性肿瘤坏死因子受体的检测及临床意义[J]. 国外医学·免疫分册, 1995, 18(2): 95-7.
- [2] 高 蕾, 白 岚, 南清振, 等. 肿瘤坏死因子受体-p55在大肠癌中的表达及其意义[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(2): 90-2.
- Gao L, Bai L, Nan QZ, et al. Expression and its significance of tumor necrosis factor receptor-p55 in human colorectal cancer[J]. J First Mil Med Univ, 2001, 21(2): 90-2.
- [3] 白 岚, 袁爱力, 牛杰志, 等. 肝病患者的可溶性肿瘤坏死因子受体测定[J]. 临床肝胆杂志, 1997, 13(2): 86-8.
- Bai L, Yuan AL, Niu JZ, et al. Detection of soluble tumor necrosis factor receptor in patients with liver diseases[J]. Clin Liver Gall J, 1997, 13(2): 86-8.
- [4] 刘小菁, 陶 冶, 许国章. 可溶性TNF受体及膜TNF受体检测方法的初步应用[J]. 上海免疫学杂志, 1995, 15(3): 160-1.
- [5] 高 蕾, 南清振, 白 岚, 等. 食道癌患者血清可溶性肿瘤坏死因子受体1测定及临床意义[J]. 第一军医大学学报, 1995, 15(4): 365-7.

Gao L, Nan QZ, Bai L, et al. Determination of the levels of serum soluble tumor necrosis factor receptor 1 in esophageal carcinoma patients[J]. J First Mil Med Univ, 1995, 15(4): 365-7.

[6] Cope AP, Aderka D, Wallach D, et al. Soluble TNF receptor production by activated T lymphocytes: differential effects of acute and chronic exposure to TNF[J]. Immunology, 1995, 84(1): 21-30.

[7] Abe Y, Yamauchi K, Kimura S. 75- but not 55-kDa tumor necrosis factor receptor is active in the homotypic aggregation and proliferation of human lymphokine-activated T killer (T-LAK) cells in vitro[J]. J Leukoc Biol, 1995, 57(3): 462-8.

[回结果列表](#)