

临床研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.08.014

高强度聚焦超声对肝门部胆管癌患者机体免疫功能的影响

张 喆¹, 金成兵², 周 崑², 冉立峰¹, 杨 炜¹, 朱 辉², 王智彪²(1. 重庆医科大学生物医学工程学院、重庆市生物医学工程重点实验室、重庆市超声医学工程中心、
省部共建国家重点实验室培育基地, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第二医院肿瘤中心, 重庆 400010)

【摘要】目的: 观察高强度聚焦超声(High intensity focused ultrasound, HIFU)对肝门部胆管癌(Hilar cholangiocarcinoma, HC)患者机体免疫功能的影响。方法: 对 32 例胆管癌患者经 HIFU 治疗后, 检测治疗前、后外周血 T 淋巴细胞亚群(CD₃⁺、CD₄⁺、CD₈⁺)、NK 细胞活性率及 IgG、IgA 和 IgM 滴度的变化。结果: HIFU 治疗后 CD₃⁺、CD₄⁺、NK 细胞活性率明显升高而 CD₈⁺水平下降($P < 0.05$); IgG、IgA 和 IgM 滴度较 HIFU 治疗前明显升高($P < 0.01$)。结论: HIFU 具有调节胆管癌患者细胞免疫损害状态、克服肿瘤免疫逃逸现象、改善机体免疫功能的作用。

【关键词】高强度聚焦超声; 肝门胆管癌; 免疫功能

【中国图书分类法分类号】R735.8

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-05-02

Effect of high intensity focused ultrasound on immune function of patients with hilar cholangiocarcinoma

ZHANG Zhe¹, JIN Chengbing², ZHOU Kun², RAN Lifeng¹, YANG Wei¹, ZHU Hui², WANG Zhibiao²

(1. School of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Key Laboratory of Biomedical Engineering in Chongqing, Center of Medical Ultrasound Engineering in Chongqing, Training Base of Key Laboratory Co-founded by Provincial Government and Ministry of Education; 2. Clinical Center for Tumor Therapy, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the effect of high intensity focused ultrasound(HIFU) on immune function of patients with hilar cholangiocarcinoma. Methods: HIFU treatment was performed on 32 patients with hilar cholangiocarcinoma. Tests were carried out to find change of T lymphocyte subsets in peripheral blood(CD₃⁺, CD₄⁺, CD₈⁺), cytoactive rate of NK cells and titer of IgG, IgA and IgM before and after HIFU treatment. Results: After HIFU treatment, cytoactive rate of CD₃⁺, CD₄⁺, NK were obviously heightened, however, that of CD₈⁺ was descended($P < 0.05$). Titer of IgG, IgA and IgM was increased obviously($P < 0.01$). Conclusion: HIFU posses some effects in adjusting immune damage in cells, overcoming tumor immunity escaping and improving immune function in organism.

【Key Words】high intensity focused ultrasound(HIFU); hilar cholangiocarcinoma(HC); immune function

肝门部胆管癌(Hilar cholangiocarcinoma, HC)是指发生于肝外胆管, 即左右肝管至胆总管下端的恶性肿瘤, 起病隐匿, 早期即呈多极化浸润生长, 临床发现时多属中、晚期, 因其生物学和解剖学特点, 致使外科手术切除困难, 常常因机体免疫力低下致术后并发症和围手术期死亡率高, 临床疗效不佳^[1,2]。如何在有效切除肿瘤的同时, 积极主动调控机体免疫力成为新的研究方向。近年来, 随着多学科的交流

叉与发展, 高新技术向医学领域深入渗透, 高强度聚焦超声(High intensity focused ultrasound, HIFU)治疗技术是目前临床研究肿瘤无创局部治疗的新方向。本研究应用 HIFU 技术对 32 例肝门部胆管癌进行治疗, 初步探讨 HIFU 技术在灭活肿瘤的同时对机体免疫功能的调节。

1 资料和方法

1.1 一般资料

本组共 32 例, 主要临床症状表现为黄疸、皮肤瘙痒、腹痛、胆汁性肝硬化等。全部病例依据临床表现、实验室检查及

作者介绍: 张 喆(1975-), 女, 主治医师,
研究方向: 肿瘤内科。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目
(编号: 2011CB707902)。

影像学检查明确诊断。其中,男性 18 例,女性 14 例,年龄 38~76 岁,平均年龄 66.9 岁,K 氏评分(Karnofsky physical status, KPS)均 ≥ 70 ,预计生存期 >3 月。研究对象根据 Bismuth 分型^[9], I 型 2 例, II 型 15 例, IIIa 型 5 例, IIIb 型 7 例, IV 型 3 例。全组血清糖类抗原 19-9 均显著高于正常值($>49 \mu\text{mol/L}$),癌胚抗原增高有 5 例,血清总胆红素 93~637 $\mu\text{mol/L}$,血清酶检查提示谷丙转氨酶、谷草转氨酶、谷酰转酞酶、碱性磷酸酶均有 1 项或数项增高。

1.2 入选标准和排除标准

入选标准:(1)血清总胆红素 $<180 \text{ mmol/L}$;(2)血清总胆红素 $\geq 180 \text{ mmol/L}$,先行经皮肝穿刺激胆道引流或经皮经肝内支架或内镜下逆行胰胆管造影术内支架引流;(3)肝功 Child-Pugh 分级 A 级或 B 级。排除标准:(1)肝功重度减损,Child-Pugh 分级 C 级;(2)肿瘤侵犯门静脉主干或双侧分支或肝叶萎缩;(3)肝、胆管梗阻严重无法完成治疗计划者。

1.3 治疗设备与实验仪器

聚焦超声肿瘤治疗系统为重庆海扶(HIFU)技术有限公司提供的 JC 型聚焦超声肿瘤治疗系统,具有自动定位肿瘤治疗靶区、三维立体靶向扫描、实时超声监控及反馈控制治疗剂量等功能。主要治疗参数:(1)治疗频率 0.85 MHz;(2)焦域横径 1.3 mm,长径 9.8 mm;(3)治疗深度 20~120 mm;(4)焦距 140 mm;(5)治疗功率 200~400 W。

FAC Scalibur 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。外周血淋巴细胞的分离^[10],采用密度梯度法 Ficoll-Hypaque 淋巴细胞分离液制得。T 淋巴细胞亚群 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 单克隆抗体为法国 Immunotech 公司产品。IgG、IgA、IgM 采用速率散射比浊法,使用美国 System 公司的 Beckman Array 360 检测,试剂盒由中国医学科学院基础医学研究所提供。

1.4 治疗方法与实验方法

1.4.1 HIFU 治疗 依据影像学检查结果制定 HIFU 治疗方案,确定治疗体位,术前治疗区皮肤脱脂脱气,全身静脉复合麻醉,计算机控制下定位肿瘤靶区,由机载频率 3.5 MHz 的超声诊断探头确定肿瘤的各边界、治疗层面和治疗范围。治疗过程按照由点到线、由线到面、由面到体的重叠方式进行,

并由计算机图像处理系统实时判断 HIFU 治疗效果,从超声图像形态和组织回声变化来反馈控制治疗剂量。

1.4.2 实验方法 全组患者在治疗前和治疗后 7 d,采集静脉血 3 ml,肝素抗凝(50 μml)。取专用试管依次加入 CD_3^+ 、 CD_4^+ 及 CD_8^+ 等单克隆抗体各 20 μl 及肝素抗凝血 100 μl ,充分混匀,室温避光保存 15 min,2 000 r/min,离心 5 min,加入红细胞溶解液,样本在流式细胞仪上进行检测。NK 细胞活性率采用乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)释放法。IgG、IgA、IgM 采用速率散射比浊法。对照组为 32 例健康献血者,其中男 16 例,女 16 例,年龄 33~58 岁,平均年龄 45.5 岁。

1.5 统计学处理

所有数据采用均数 $\pm$ 标准差表示。同一患者治疗前后的指标比较采用配对分析 t 检验;各指标治疗前后比较采用独立方差 t 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HIFU 治疗前后 T 淋巴细胞亚群的变化

全组患者治疗前 CD_3^+ 、 CD_4^+ 及 NK 细胞活性率明显低于正常对照组($P<0.05$),而 CD_8^+ 水平明显高于对照组($P<0.05$);治疗后 CD_3^+ 、 CD_4^+ 及 NK 细胞活性率较治疗前有明显升高,差异显著($P<0.05$),但治疗后仍低于对照组($P<0.05$);而 CD_8^+ 治疗后较治疗前明显下降($P<0.05$),但仍高于对照组($P<0.05$)见表 1。

2.2 HIFU 治疗前后体液免疫的变化

全组患者治疗前 IgG、IgA 及 IgM 滴度明显低于正常对照组,差异非常显著($P<0.05$),治疗后 IgG、IgA 及 IgM 滴度较治疗前明显升高,差异非常显著($P<0.05$),但仍低于正常对照组($P<0.05$),见表 2。

3 讨 论

胆管癌发病率占人类恶性肿瘤的 2%,男性发病

表 1 HIFU 治疗前后 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞水平的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Changes in T-lymphocyte subsets and NK cells level before and after HIFU treatment ($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数(n)	CD_3^+	CD_4^+	CD_8^+	NK细胞活性
对照组	32	70.00 $\pm$ 3.11	58.03 $\pm$ 2.19	21.93 $\pm$ 2.86	23.25 $\pm$ 1.44
实验组	治疗前	40.73 $\pm$ 3.17*	28.10 $\pm$ 3.25*	34.14 $\pm$ 5.25*	8.99 $\pm$ 0.94*
	治疗后 7 d	64.53 $\pm$ 4.88**	46.66 $\pm$ 5.54**	28.64 $\pm$ 3.28**	17.73 $\pm$ 2.62**

注:*,与对照组比较, $P<0.05$;**,与治疗前比较, $P<0.05$

表 2 HIFU 治疗前后体液免疫的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Changes in humoral immunity before and after HIFU treatment ($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数(n)	IgG (g/L)	IgA (g/L)	IgM (g/L)
对照组	32	14.61 $\pm$ 1.09	2.13 $\pm$ 0.36	2.07 $\pm$ 0.12
实验组	治疗前	8.51 $\pm$ 1.76*	1.39 $\pm$ 0.31*	1.59 $\pm$ 0.25*
	治疗后 7 d	12.08 $\pm$ 1.97**	1.83 $\pm$ 0.22**	1.98 $\pm$ 0.13**

注:*,与对照组比较, $P<0.05$;**,与治疗前比较, $P<0.05$

略高于女性,其中 58%~75%发生在肝胆管分叉处,称 HC,又称 Klatskim 肿瘤^[5],国内外文献报道高位胆管癌的 5 年生存率仅为 9%~18%,肝门部受累的病人中位生存期仅为 12~24 个月^[6]。所以,目前提倡多手段联合综合治疗 HC,如门静脉切除重建、肝动脉切除重建、肝胰十二指肠切除、肝移植及姑息性胆道引流术等。但由于解剖部位特殊,手术风险大,HC 一直是外科治疗的难点^[7]。HIFU 是近年来发展起来的局部无创性治疗实体肿瘤的新技术,通过超声波聚焦将体外低能量超声作用于体内肿瘤靶区处形成高能量的焦点,产生瞬态高温效应、空化效应和机械效应,致靶区组织发生凝固性坏死^[8]。有研究表明组织细胞受到高温效应后,可合成具有抗原递呈作用和激发抗肿瘤特异性的 CD₈⁺细胞反应的热休克蛋白,并诱发针对同源肿瘤细胞的特异性细胞毒 T 淋巴细胞,激发细胞介导的抗肿瘤免疫反应^[9]。高温效应还可影响肿瘤细胞抗原决定簇的空间构象,出现新的抗原性,激发特异性的免疫应答杀伤同源性肿瘤细胞^[10]。而 HIFU 治疗可以瞬间使靶区肿瘤细胞温度迅速升至 65℃~100℃^[11],这样在使肿瘤细胞凝固性坏死的同时,还能在一定程度上对 T 淋巴细胞亚群的免疫功能产生影响。

T 淋巴细胞亚群是构成机体免疫系统的重要成分,机体通过辅助性 T 细胞 CD₄⁺和抑制性 T 细胞 CD₈⁺,形成 T 细胞网络以维持调节免疫功能的平衡,肿瘤生长致使机体免疫力受到抑制,主要表现在 CD₄⁺细胞水平明显低于正常健康人,CD₈⁺细胞水平明显高于正常健康人。CD₄⁺细胞减少可使肿瘤细胞发生免疫逃逸,CD₈⁺细胞增多是引起细胞免疫损害的基础^[12]。机体免疫功能的强弱是影响治疗效果的关键。已有临床研究证实,HIFU 治疗能一定程度地改善原发性中、晚期肝癌患者的机体免疫功能^[13]。

本研究结果表明全组病例经 HIFU 治疗后,患者外周血 CD₃⁺、CD₄⁺及 NK 细胞活性率较治疗前明显升高($P<0.05$),且参与体液免疫反应的 IgG、IgA 及 IgM 水平较治疗前亦明显升高($P<0.01$),本研究结果表明通过 HIFU 治疗可以有效破坏肿瘤细胞,改善患者机体的免疫抑制状态,并对机体具有一定的免疫激活作用,能在一定程度改善机体细胞免疫功能,缓解患者免疫抑制状态,提高抗肿瘤的免疫反应能力,从而达到有效延长患者的生存时间,改善生存质量的目的。

参 考 文 献

- [1] Igami T, Nishio H, Ebata T, et al. Surgical treatment of hilar cholangiocarcinoma in the "new era": the Nagoya university experience[J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2010, 17(4): 449-454.
- [2] Young A L, Prasad K R, Toogood G J, et al. Surgical treatment of hilar cholangiocarcinoma in a new era: comparison among leading Eastern and Western centers, Leeds[J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2010, 17(4): 497-504.
- [3] Bismuth H, Castaing D, Traynor O. Resection or palliation: priority of surgery in the treatment of hilar cancer[J]. World J Surg, 1988, 12(1): 39-47.
- [4] Gately M K, Wolitzky A G, Quinn P M, et al. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12[J]. Cell Immunol, 1992, 143(1): 127-142.
- [5] Malhi H, Gores G J. Review article: the modern diagnosis and therapy of cholangiocarcinoma[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2006, 23(9): 1287-1296.
- [6] De Oliveira M L, Cunningham S C, Cameron J L, et al. Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution[J]. Ann Surg, 2007, 245(5): 755-762.
- [7] Blehacz B, Gores G J. Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment[J]. Hepatology, 2008, 48(1): 308-321.
- [8] 王智彪, 伍 烽, 王芷龙, 等. 高强度聚焦超声对香猪肝组织定位损伤的研究[J]. 中国超声医学杂志, 1997, 13(2): 1-3.
- [9] Wang Z B, Wu F, Wang Z L, et al. The orientated injury effects of high intensity focused ultrasound upon mini swine liver tissues[J]. Chin J Ultrasound Med, 1997, 13(2): 1-3.
- [10] Kruse D E, Mackanos M A, O Connell-Rodwell C E, et al. Short-duration-focused ultrasound stimulation of Hsp 70 expression in vivo[J]. Phys Med Biol, 2008, 53(13): 3641-3660.
- [11] Schueller G, Stift A, Friedl J, et al. Hyperthermia improves cellular immune response to human hepatocellular carcinoma subsequent to co-culture with tumor lysate pulsed dendritic cells[J]. Int J Oncol, 2003, 22(6): 1397-1402.
- [12] Wu F, Wang Z B, Chen W Z, et al. Advanced hepatocellular carcinoma: treatment with high-intensity focused ultrasound ablation combined with transcatheter arterial embolization[J]. Radiology, 2005, 235(2): 659-667.
- [13] Liu Y, Poona R T, Hughes J, et al. Chemokine receptors support infiltration of lymphocyte subpopulations in human hepatocellular carcinoma[J]. Clin Immunol, 2005, 114(2): 174-182.
- [14] 曹 玮, 吴发伟, 刘毅勇, 等. 高强度聚焦超声对中晚期肝癌患者机体免疫细胞及其活性的影响[J]. 介入放射学杂志, 2009, 18(4): 308-310.
- [15] Cao W, Wu F W, Liu Y Y, et al. The effect of high intensity focused ultrasound on the immunocyte and its activity in patients with advanced hepatic carcinoma[J]. J Intervent Radiol, 2009, 18(4): 308-310.

(责任编辑:唐秋姗)