

Influence of gelatin sponge microparticles-TACE on myeloid-derived suppressor cells in peripheral blood of patients with Barcelona clinic liver cancer classification stage B hepatocellular carcinoma

YUE Yuanxun¹, LIU Ying², REN Zhizhong², HUANG Xin²,
YANG Xiaowei², ZHANG Yuewei^{2*}

(1. Zhongshan Clinical College of Dalian University, Dalian 116001, China;

2. Department of Hepatobiliary Intervention, Beijing Tsinghua
Changgong Hospital, Affiliated to Tsinghua University,
Beijing 102218, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of gelatin sponge microparticles-TACE (GSMs-TACE) on myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in peripheral blood of patients with Barcelona clinic liver cancer (BCLC) classification stage B hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Five patients with clinically diagnosed BCLC B-stage HCC (HCC group) underwent GSMs-TACE. Flow cytometry was used to detect the frequency of MDSCs (the proportion of MDSCs clusters to HLA-DR⁺ cell) in the peripheral blood of patients before GSMs-TACE and 10 days as well as 30 days after operation, respectively. Seven healthy volunteers (normal control group) were enrolled. The MDSCs frequency of normal control group was detected simultaneously with HCC group before GSMs-TACE. Statistical analysis was performed to compare the differences of the frequency of MDSCs in HCC patients before and after GSMs-TACE. And the frequency of MDSCs of HCC group was compared with that of normal control group. **Results** The frequency of MDSCs in peripheral blood of patients with HCC before GSMs-TACE was $(30.26 \pm 12.12)\%$, which decreased to $(10.22 \pm 3.79)\%$ after 10 days and decreased to $(7.33 \pm 3.38)\%$ after 30 days ($P < 0.001$). Pairwise comparison showed that the frequency of MDSCs at 30 days ($P < 0.001$) and 10 days ($P = 0.011$) after GSMs-TACE was lower than that before operation, respectively. The frequency of preoperative MDSCs of HCC group was statistically higher than that of normal control group ($[30.26 \pm 12.12]\%$ vs $[3.41 \pm 1.89]\%$, $t = 5.876$, $P < 0.001$). **Conclusion** The frequency of MDSCs in peripheral blood of patients with BCLC B-stage HCC significantly reduced after GSMs-TACE treatment. GSMs-TACE treatment has positive regulation effect on the immune function of patients.

[Keywords] carcinoma, hepatocellular; Barcelona clinic liver cancer classification; gelatin sponge microparticles; embolization, therapeutic; myeloid-derived suppressor cells; immunomicroenvironment

DOI: 10.13929/j.1672-8475.201901018

[基金项目] 国家自然科学基金(81571783)、北京市医院管理局 2017 年度临床医学发展专项——“扬帆”计划(ZYLX201712)。

[第一作者] 岳元勋(1992—),男,四川巴中人,在读硕士。研究方向:肿瘤微创治疗与免疫。E-mail: yueyuanxun@qq.com

[通信作者] 张跃伟,清华大学附属北京清华长庚医院肝胆介入科,102218。E-mail: zhangyuewei121@sina.com

[收稿日期] 2019-01-09 **[修回日期]** 2019-03-25

明胶海绵微粒 TACE 治疗 Barcelona 临床肝癌分期 B 期肝细胞癌对外周血中髓系来源抑制性细胞的影响

岳元勋¹, 刘影², 任志忠², 黄鑫², 杨晓伟², 张跃伟^{2*}

(1. 大连大学中山临床学院, 辽宁 大连 116001;

2. 清华大学附属北京清华长庚医院肝胆介入科, 北京 102218)

[摘要] 目的 探讨应用明胶海绵微粒 TACE(GSMs-TACE)治疗 Barcelona 临床肿瘤(BCLC)分期 B 期肝细胞癌(HCC)对患者外周血中髓系来源抑制性细胞(MDSCs)的影响。方法 对 5 例临床确诊为 BCLC B 期的 HCC 患者(HCC 组)行 GSMs-TACE 治疗。采用流式细胞仪分别检测患者术前、术后 10 天及术后 30 天外周血中 MDSCs 频率(即 MDSCs 细胞团占 HLA-DR⁺细胞群的比例)。另收集 7 名健康志愿者(正常对照组),于 HCC 组术前同期进行 MDSCs 频率检测。比较 HCC 患者术前及术后不同时间 MDSCs 频率的差异及 HCC 组术前与正常对照组同期 MDSCs 频率的差异。结果 HCC 组 GSMs-TACE 术前外周血中 MDSCs 频率为(30.26±12.12)%,术后 10 天降至(10.22±3.79)%,术后 30 天降至(7.33±3.38)%,总体差异有统计学意义($P<0.001$);两两比较显示术后 30 天($P<0.001$)及术后 10 天($P=0.011$)均明显低于术前。HCC 组术前 MDSCs 频率明显高于正常对照组同期水平[(30.26±12.12)% vs (3.41±1.89)%, $t=5.876$, $P<0.001$]。结论 BCLC B 期 HCC 患者经 GSMs-TACE 治疗后外周血中 MDSCs 频率显著降低;GSMs-TACE 对患者的机体免疫功能具有正向调节作用。

[关键词] 癌,肝细胞;Barcelona 临床肝癌分期;明胶海绵微粒;栓塞,治疗性;髓系来源抑制性细胞;免疫微环境

[中图分类号] R735.7; R815 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-8475(2019)05-0280-05

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球第六大流行癌症,也是癌症相关死亡的第三大常见原因^[1]。多数 HCC 患者确诊时已失去手术切除的机会。目前 TACE 已成为治疗 HCC 的重要方法^[2]。近年来,髓系来源抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)因其在促血管生成、炎症发生和肿瘤进展、肿瘤细胞免疫逃逸中发挥的作用而逐渐受到关注^[3]。国外学者^[4]报道,经肝动脉化疗灌注术(hepatic arterial infusion chemotherapy, HAIC)治疗后,HCC 患者外周血中 MDSCs 频率(即 MDSCs 细胞团占 HLA-DR⁺细胞群的比例)下降,但目前鲜见关于 TACE 治疗对 HCC 患者外周血中 MDSCs 影响的研究报道。本研究对 5 例 Barcelona 临床肿瘤(Barcelona clinic liver cancer, BCLC)分期 B 期 HCC 患者行明胶海绵微粒(gelatin sponge microparticles, GSMs)TACE(GSMs-TACE),观察治疗前后不同时间点外周血中 MDSCs 变化,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2017 年 1 月—2017 年 4 月我院收治的 5 例 BCLC B 期 HCC 患者(HCC 组)。根据慢性肝炎状态、影像学检查结果和肿瘤标志物升高诊

断 HCC,所有患者均存在多个肝内病灶(即经增强 CT 或增强 MR 检查确认左侧和/或右侧叶中有≥3 个病灶),且均为初诊患者,GSMs-TACE 术前均未接受其他治疗,患者年龄、性别、肝功能 Child-Pugh 分级、乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)检测结果及病灶最大径见表 1。同期征集 7 名健康志愿者作为正常对照组,男 5 名,女 2 名,年龄 38~50 岁,平均(44.7±4.5)岁。本研究经医学伦理委员会批注,受试者均知情同意。

1.2 标准化 GSMs-TACE 采用 Siemens Artis Zee DSA 机引导介入治疗。以 Seldinger 法穿刺右侧股动脉后,采用 5F-RH 肝管行腹腔动脉、肝总动脉造影,依据肿瘤部位、大小及肿瘤染色是否完整等情况,选择性进行膈动脉、肠系膜上动脉、胃左动脉、右肾动脉、胸廓内动脉、肋间动脉等造影,以明确肿瘤血供(图 1A)。根据肿瘤大小确定洛铂用量(肿瘤最大径<5 cm,剂量 10 mg;最大径 5~10 cm,剂量 20 mg;最大径>10 cm,剂量 30 mg)^[5],以注射用水稀释至 30 ml 后,与直径 350~560 μm 的 GSMs(杭州艾力康医药科技有限公司)混合成为悬浮液。于肿瘤区域供血动脉内,将 GSMs 与化疗药物的混悬液通过导管缓慢注射,



图 1 患者男,44 岁,因原发性 HCC 接受 GSMs-TACE A. 术中肝动脉造影可见大片肿瘤染色; B. 将 GSMs 与化疗药物充分混合后栓塞肿瘤供血动脉,再次造影显示肿瘤染色消失; C. 术后 30 天上腹部增强 MRI 示原肿瘤区域强化消失

表 1 HCC 患者临床资料

编号	性别	年龄 (岁)	肝功能 Child-Pugh 分级	HBsAg	病灶最大径 (cm)
1	女	28	A	阴性	16.00
2	男	71	A	阳性	9.70
3	男	47	A	阳性	4.90
4	男	44	A	阳性	9.50
5	女	33	A	阳性	13.40

栓塞停止标准为造影显示肿瘤染色完全消失(图 1B)、肿瘤区域动脉内血流停滞。

术后 4~7 天常规予以护肝、补液、抑酸等治疗。术后 30 天复查增强 MRI,参照改良实体瘤疗效评价标准(modified response evaluation criteria in solid tumors, m-RECIST)评价疗效^[6]:完全缓解(complete response, CR),所有目标病灶动脉期增强显影均消失;部分缓解(partial response, PR),目标病灶(动脉期增强显影)最大径之和缩小 $\geq 30\%$;病变进展(progressive disease, PD),目标病灶(动脉期增强显影)最大径之和增加 $\geq 20\%$ 或出现新的病灶;稳定(stable disease, SD),目标病灶(动脉期增强显影)最大径之和缩小未达 PR 或增加未达 PD。

1.3 实验室检查 对 HCC 组患者分别于 GSMs-TACE 术前、术后 10 天及术后 30 天采集空腹外周静脉血 4 ml 置于肝素抗凝管中,用于 MDSCs 检测及血清甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)、异常凝血酶原(protein-Ⅱ induced by vitamin K absence, PIVKA-Ⅱ)检查;对正常对照组于 HCC 患者 GSMs-TACE 术前期采血,仅用于 MDSCs 检测。

MDSCs 检测方法:将 100 μ l 全血加入干燥的空白管中,以 500 μ l OptiLyse C 溶解液(Beckman Coulter 公司)裂解血液并涡旋混匀,将裂解的血液于

室温下孵育 15 min,以确保裂解完成;而后加入 2 ml 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS),涡旋混匀后,以 300 r/min 离心 5 min。吸出上清液,将细胞沉淀重悬于 500 μ l PBS 中,并向其中分别加入 CD14-PC7(Beckman Coulter 公司)、CD11b-APC-Alexa Fluor 750(Beckman Coulter 公司)和 Anti-HLA-DR-ECD(Beckman Coulter 公司)单克隆抗体各 5 μ l,低速混合 5 s 后,用于样品分析。采用 Beckman Coulter DxFLX 流式细胞仪进行细胞收集和分选,通过 Beckman Coulter CytExpert 1.1 系统分析确定 MDSCs 频率。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计分析软件。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差齐性检验显示方差不齐,故采用秩和检验比较 HCC 患者 GSMs-TACE 术前及术后不同时间 MDSCs 频率的差异,两两比较采用 LSD 法。以独立样本 t 检验比较 HCC 组 GSMs-TACE 术前与正常对照组同期 MDSCs 频率的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

HCC 组 5 例患者 GSMs-TACE 术后 30 天疗效评价结果均为 PR(图 1C)。

MDSCs 检测结果见表 2。HCC 患者 GSMs-TACE 术前、术后 10 天及术后 30 天平均 MDSCs 频率分别为 $(30.26 \pm 12.12)\%$ 、 $(10.22 \pm 3.79)\%$ 及 $(7.33 \pm 3.38)\%$,三者间差异有统计学意义($P < 0.001$),且呈逐渐下降趋势;两两比较结果显示:术后 30 天与术后 10 天比较差异无统计学意义($P = 0.189$),但术后 10 天、30 天均明显低于术前($P < 0.001, 0.011$)。GSMs-TACE 术前,HCC 组 MDSCs 频率明显高于正常对照组同期水平 $[(30.26 \pm 12.12)\% \text{ vs } (3.41 \pm 1.89)\%, t = 5.876, P < 0.001$;图 2、3)。

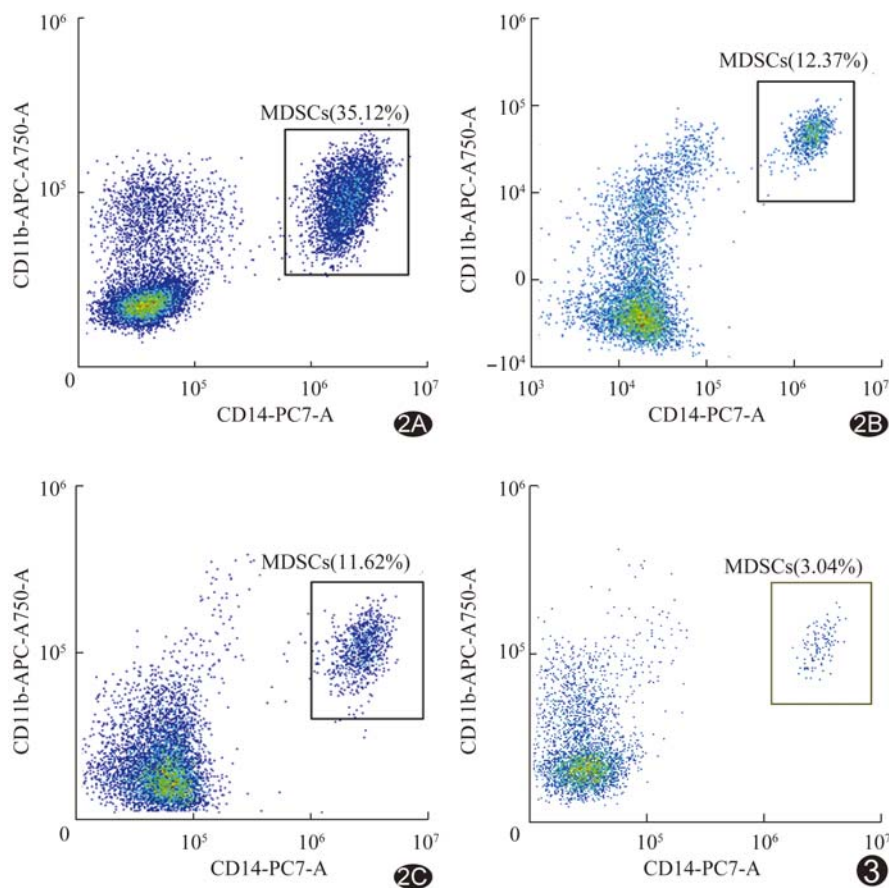


图 2 患者女, 28 岁, 原发性 HCC, GSMs-TACE 术前及术后不同时间流式细胞图 A. 术前 MDSCs 频率为 35.12%; B. 术后 10 天 MDSCs 频率为 12.37%; C. 术后 30 天 MDSCs 频率为 11.62% 图 3 健康志愿者, 男, 46 岁 流式细胞图, MDSCs 频率为 3.04%

HCC 组 GSMs-TACE 术前、术后 10 天及术后 30 天血清 AFP、PIVKA-II 见表 3, 亦表现出与 MDSCs 频率相同的下降趋势。

表 2 2 组不同受试者 GSMs-TACE 术前及术后 10 天、30 天的 MDSCs 频率(%)

受试者	术前/同期	术后 10 天	术后 30 天
HCC 组			
编号 1	35.12	12.37	11.62
编号 2	23.63	4.82	4.02
编号 3	12.29	8.22	3.75
编号 4	41.16	14.56	8.35
编号 5	39.11	11.11	8.92
正常对照组			
编号 1	5.93	—	—
编号 2	0.96	—	—
编号 3	3.04	—	—
编号 4	1.68	—	—
编号 5	2.34	—	—
编号 6	4.80	—	—
编号 7	5.12	—	—

3 讨论

目前虽然不能清晰地定义总的 MDSCs, 但依据表面标记不同, 可将 MDSCs 细分为多形核细胞来源髓系抑制性细胞 (polymorphonuclear-MDSCs, PMN-MDSCs) $CD11b^+/CD14^-/CD15^+$ 或 $CD66^+$ 亚群, 单核细胞来源髓系抑制性细胞 (monocytic-MDSCs, M-MDSCs) $CD11b^+/CD14^+/HLA-DR^{Low/-}$ 亚群及早期髓系抑制性细胞 (early-stage MDSCs, e-MDSC) $Lin^- (CD3/14/15/19/56)/HLA-DR^-/CD33^+$ 亚群^[7]。本研究检测的 MDSC 为 M-MDSCs。

TACE 已成为临床治疗中晚期肝癌的主要方法之一。美国肝病研究学会 (American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD) 指南^[8]推荐, 对肿瘤过大或因多发病灶而无法切除且无血管浸润或肝外播散的中晚期肝癌患者, 可将 TACE 作为一线非根治性治疗

手段, 以提高患者生存率; 在 BCLC 分期中, B 期患者推荐进行 TACE 治疗。本课题组前期研究^[9]也证实 GSMs-TACE 治疗 BCLC B 期 HCC 具有较好的安全性, 且术后随访 6 个月患者生存率为 100%, 1 年生存率为 87.5%, 中位生存时间为 25 个月, 表明该方法可使 HCC 患者获益。此外, 晚期 HCC 患者 T 淋巴细胞亚群和红细胞免疫功能下降, 将免疫治疗与 TACE 相结合有利于提高疗效^[10]。但一些免疫负调控细胞, 如调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 与 MDSCs 过多会影响免疫治疗的疗效。Wang 等^[11]认为 Treg 和 MDSCs 可限制嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法 (chimeric antigen receptor T cell immunotherapy, CAR-T) 细胞的敏感性。

MDSCs 是骨髓中的一组未成熟细胞, 其在恶性肿瘤、感染或创伤等病理条件下扩增, 并失去分化为成熟巨噬细胞、树突细胞或粒细胞的能力^[12]。MDSCs 能够强烈抑制 T 细胞和 NK 细胞的抗肿瘤活性, 同时激

表 3 HCC 患者 GSMs-TACE 术前及术后不同时间血清 AFP 及 PIVKA-II 水平

编号	AFP(ng/mL)			PIVKA-II (mAU/ml)		
	术前	术后 10 天	术后 30 天	术前	术后 10 天	术后 30 天
1	129 126.00	34 452.46	5 117.52	17 118.83	998.11	67.58
2	7.11	4.21	2.11	1 260.48	298.01	78.53
3	986.61	185.82	168.50	>30 000	7 185.80	4 278.23
4	1 822.74	857.71	255.30	799.94	191.89	107.22
5	>80 000	>80 000	>80 000	5 582.28	5 332.78	66.19

活 Treg 扩增,最终导致肿瘤进展。Hoechst 等^[13]研究发现 CD14⁻/HLA-DR^{-low/-} MDSCs 在 HCC 患者外周血与肿瘤微环境中均显著增多,并抑制 T 细胞功能。本研究结果也显示 HCC 组外周血中 MDSCs 频率明显高于正常对照组。肿瘤发生及发展机制复杂,多学科综合治疗是临床广泛采用的治疗模式。不同的局部治疗手段与全身免疫治疗联合的优化治疗模式是目前的研究热点之一,但优化组合和最佳治疗时机是取得良好疗效的关键。本研究表明 GSMs-TACE 治疗可有效降低肿瘤负荷,术后 30 天 5 例 HCC 患者均达到 PR,并可显著降低外周血中 MDSCs 频率,术后 10 天及 30 天均明显低于术前(P 均 <0.05);理论上,该方法联合免疫治疗(如 PD-1 或 PD-L1 免疫治疗)可获得更好的疗效。此外,Weber 等^[14]研究发现在活化的 MDSCs 中 PD-L1 配体呈高表达,其与 T 细胞表面的 PD-1 受体相互作用并最终使得 T 细胞丧失抗肿瘤的能力。未来 PD-L1⁺ MDSC 有望成为肝癌免疫治疗的新靶点。

本研究初步分析 GSMs-TACE 对 HCC 患者外周血中 MDSCs 的影响,发现与术前相比,术后 MDSCs 频率逐渐下降,表明 GSMs-TACE 对 HCC 患者的免疫状态具有正向调节作用,可为 GSMs-TACE 联合各种免疫治疗方法的选择提供理论依据。今后将扩大样本量并长期随访,观察 MDSCs 频率是否与 GSMs-TACE 疗效和 HCC 患者生存时间存在相关性,为进一步临床研究奠定基础。

[参考文献]

- [1] Gaetano B, Shirin D, Annalisa A, et al. The immune system in hepatocellular carcinoma and potential new immunotherapeutic strategies. *Bio Med Res Int*, 2015, 2015:1-12.
- [2] Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol*, 2008, 48 (Suppl 1): S20-S37.
- [3] Chang CJ, Yang YH, Chiu CJ, et al. Targeting tumor-infiltrating Ly6G⁺ r, + \ r, myeloid cells improves sorafenib efficacy in mouse orthotopic hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 2018, 142(9):1878-1889.
- [4] Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, et al. Myeloid-derived suppressor cells correlate with patient outcomes in hepatic arterial infusion chemotherapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 2016, 65(6):715-725.
- [5] Wang N, Lv YZ, Xu AH, et al. Application of lobaplatin in trans-catheter arterial chemoembolization for primary hepatic carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(2):647-650.
- [6] Lencioni R. New data supporting modified RECIST (mRECIST) for hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2013, 19 (6): 1312-1314.
- [7] Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(4):253-268.
- [8] Heimbach J, Kulik LM, Finn R, et al. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2017, 67(1): 358-380.
- [9] Kamran AU, Liu Y, Li FE, et al. Transcatheter arterial chemoembolization with gelatin sponge microparticles treated for BCLC stage B hepatocellular carcinoma: A single center retrospective study. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(52):e2154.
- [10] 刘松, 孟冉冉, 张跃伟. 经肝动脉化疗栓塞与树突状细胞治疗肝癌对机体免疫功能的影响. *介入放射学杂志*, 2014, 23 (2): 181-184.
- [11] Wang Y, Luo F, Yang J, et al. New chimeric antigen receptor design for solid tumors. *Front Immunol*, 2017, 8:1934.
- [12] Nan J, Xing YF, Hu B, et al. Endoplasmic reticulum stress induced Lox-1⁺ CD15⁺ polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma. *Immunology*, 2018, 154(1):144-155.
- [13] Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, et al. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4 (+) CD25 (+) Foxp3 (+) T cells. *Gastroenterology*, 2008, 135(1):234-243.
- [14] Weber R, Fleming V, Hu X, et al. Myeloid-derived suppressor cells hinder the anti-cancer activity of immune checkpoint inhibitors. *Front Immunol*, 2018, 9:1310.