

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.17.013
文章编号: 1005-8982 (2018) 17-0069-04

CD44 基因多态性对原发性肝癌细胞 局部 T 细胞亚群浸润的影响*

苗风华, 陈晓, 石磊, 马筱慧

(吉林大学第一医院 肿瘤中心, 吉林 长春 130021)

摘要: **目的** 探讨 CD44 基因多态性对原发性肝癌细胞局部 T 细胞亚群浸润的影响。**方法** 前瞻性收集 2017 年 1 月-2017 年 12 月吉林大学第一医院收治的原发性肝癌患者 109 例, 根据 CD44 基因 rs4756195 位点单核苷酸多态性, 将患者分为 AA 组、AG 组和 GG 组, 观察 3 组患者局部组织 T 细胞亚群浸润情况。采用流式细胞术检测 CD4⁺ T、CD8⁺ T、Treg 及 Th17 细胞, 免疫组织化学法检测白介素-2 (IL-2)、IL-10 肿瘤生长因子-β (TGF-β) 和 IL-17 的阳性表达, 聚合酶链反应检测 CD44 基因 rs4756195 位点单核苷酸多态性。**结果** AA 组、AG 组、GG 组 CD4⁺ T 细胞分别为 (21.08 ± 2.12)%、(19.43 ± 1.98)%、(19.12 ± 2.09)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CD8⁺ T 细胞分别为 (28.83 ± 2.52)%、(25.52 ± 2.71)%、(24.91 ± 2.29)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 调节性 T 细胞分别为 (6.12 ± 1.47)%、(8.12 ± 1.71)%、(8.24 ± 1.92)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); IL-2 阳性表达率分别为 82.09%、47.83%、68.42%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); IL-10 阳性表达率分别为 46.27%、69.57%、73.68%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); TGF-β 阳性表达率分别为 41.79%、77.27%、78.95%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 原发性肝癌患者 CD44 基因 rs4756195 位点呈多态性分布, 与肝癌组织中的免疫抑制有关。

关键词: CD44 基因; 原发性肝癌; T 细胞亚群; 多态性

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

Effect of CD44 gene polymorphism on infiltration of local T cell subsets in primary liver cancer tissue*

Feng-hua Miao, Xiao Chen, Lei Shi, Xiao-hui Ma

(Cancer Center, the First Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of CD44 gene polymorphism on the local infiltration of T cell subsets in primary liver cancer tissue. **Methods** From January to December 2017, 109 cases of primary liver cancer patients were prospectively collected in our hospital. According to the CD44 gene rs4756195 single nucleotide polymorphism (SNP), the patients were divided into group AA, group AG and group GG. The local tissue infiltration of T cell subsets of the three groups was studied. Flow cytometry was used to detect CD4⁺ and CD8⁺ T cells, Treg cells and Th17 cells. Immunohistochemical method was used to study the expressions of IL-2, IL-10, IL-17 and TGF-β. PCR was used to determine SNP of CD44 gene rs4756195. **Results** In the group AA, the group AG and the group GG, CD4⁺ T cells accounted for (21.08 ± 2.12)%, (19.43 ± 1.98)% and (19.12 ± 2.09)% respectively, there was significant difference ($P < 0.05$); CD8⁺ T cells accounted for (28.83 ± 2.52)%, (25.52 ± 2.71)% and (24.91 ± 2.29)% respectively, there was significant difference ($P < 0.05$); regulatory T cell occupied (6.12 ± 1.47)%, (8.12 ± 1.71)% and (8.24 ± 1.92)% respectively, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); the positive expression rate of IL-2 was 82.09%, 47.83% and 68.42% respectively, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); the positive expression rate of IL-10 was 46.27%, 69.57% and 73.68% respectively, the difference was statistically significant

收稿日期: 2018-01-08

* 基金项目: 吉林省卫生计生委资助项目 (No: 2016J053)

[通信作者] 陈晓, E-mail: 1649116926@qq.com

($P < 0.05$); the positive expression rate of TGF- β was 41.79%, 77.27% and 78.95% respectively, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** The polymorphic distribution of *CD44* gene rs4756195 locus in the patients with primary liver cancer is related to the immunosuppression in the liver cancer tissue.

Keywords: *CD44* gene; primary liver cancer; T cell subgroup; polymorphism

原发性肝癌是中老年人的常见病^[1],预后较差^[2-4]。*CD44*是近些年研究较热的一个肿瘤标志物^[5-8],其可与组织间隙中微静脉末端的高柱状上皮细胞表面的透明质酸结合,在淋巴细胞回归到黏膜和引流淋巴结中具有重要作用。*CD44*蛋白可以募集 $CD8^+$ T 细胞等向局部组织转移,而 $CD8^+$ T 细胞可以分化为细胞毒性 T 细胞,因此可能增强机体对肿瘤细胞的杀伤作用。但目前关于 *CD44* 基因多态性与原发性肝癌患者局部组织中 T 细胞亚群的相关性尚未见报道。

1 资料与方法

1.1 研究对象

前瞻性收集 2017 年 1 月-2017 年 12 月吉林大学第一医院收治的原发性肝癌患者临床资料。纳入标准:原发性肝癌(确诊依据为病理诊断);有手术适应证,可行手术治疗;年龄 18~75 岁;同意参与本研究,并签署知情同意书。排除标准:合并其他恶性肿瘤;复发性肝癌;肝、肾、心、脑、肺等重要脏器功能不全;感染性疾病;血液系统疾病;凝血功能障碍;术前接受新辅助化疗等特殊治疗;3 个月内曾使用免疫调节剂;免疫功能不全;远处转移,不宜行手术治疗的晚期肝癌患者。研究期间共纳入原发性肝癌患者 109 例,根据 *CD44* 基因 rs4756195 位点单核苷酸多态性,将患者分为 AA 组、AG 组和 GG 组,分别为 67、23 和 19 例。

1.2 观察指标

主要观察指标为肿瘤组织中 $CD4^+$ T 细胞、 $CD8^+$ T 细胞、Treg 细胞、Th17 细胞。次要观察指标为白介素-2(interleukin-2, IL-2)、白介素-10(interleukin-10, IL-10)、肿瘤生长因子- β (tumor growth factor- β ,

TGF- β)和白介素-17(interleukin-17, IL-17)。

1.3 方法

1.3.1 流式细胞术 术中留取原发性肝癌组织标本(距离肝癌边缘 >1 cm 的肝癌组织),使用流式细胞仪(美国 Beckman coulter 公司 Epics XL 型)检测 $CD4^+$ T、 $CD8^+$ T、Treg 及 Th17 细胞。

1.3.2 免疫组织化学法 采用免疫组织化学法检测 IL-2、IL-10、TGF- β 和 IL-17,相关单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司,抗体比例 1:80。阳性判定标准:根据染色强度和阳性细胞百分比计算,其中不着色、浅黄色、棕黄色、黄褐色分别为 0、1、2 和 3 分,阳性细胞数为 <10%、10%~<40%、40%~<70%、 $\geq 70\%$ 分别计 0、1、2 和 3 分,两者之和为总分,总分 ≥ 2 分为阳性,<2 分为阴性。

1.3.3 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 根据 HapMap 中国人数据库,采用 Haploview 软件。选定 *CD44* 基因 rs4756195 位点作为检测位点,应用 PCR 确定个体基因型,相关试剂购自美国 Santa Cruz 公司。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件,计数资料以构成比表示,比较用 χ^2 检验,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较用方差分析,两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

3 组患者年龄、性别、TMN 分期、肿瘤直径及分化程度比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组患者一般情况比较

组别	例数	年龄/(岁, $\bar{x} \pm s$)	男/女/例	TNM 分期/例		肿瘤直径/(cm, $\bar{x} \pm s$)	肿瘤分化程度/例		
				II 期	III 期		高分化	中分化	低分化
AA 组	67	52.38 \pm 5.48	35/32	41	26	5.12 \pm 2.17	41	15	11
AG 组	23	52.92 \pm 5.92	13/10	15	8	5.28 \pm 2.29	16	4	3
GG 组	19	51.78 \pm 5.88	12/7	13	6	5.35 \pm 1.98	13	4	2
F/χ^2 值		1.785	0.739		0.379	1.085		0.856	
P 值		0.473	0.691		0.827	0.582		0.931	

2.2 肝癌组织中 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞的表达

2.2.1 CD4⁺T 细胞 AA 组、AG 组、GG 组患者 CD4⁺T 细胞表达水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=5.873, P=0.003$)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, AG 组、GG 组患者 CD4⁺T 细胞表达水平低于 AA 组 ($P<0.05$); AG 组与 GG 组患者 CD4⁺T 细胞表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

2.2.2 CD8⁺T 细胞 AA 组、AG 组、GG 组患者 CD8⁺T 细胞表达水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=6.175, P=0.001$)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, AG 组、GG 组患者 CD8⁺T 细胞表达水平低于 AA 组 ($P<0.05$); AG 组与 GG 组患者 CD8⁺T 细胞表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

2.3 肝癌组织中 Treg 和 Th17 细胞的表达

2.3.1 Treg 细胞 AA 组、AG 组、GG 组患者 Treg 细胞的表达水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=7.546, P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, AG 组、GG 组患者肝癌组织中 Treg 水平高于 AA 组 ($P<0.05$)。见表 3。

2.3.2 Th17 细胞 AA 组、AG 组、GG 组患者 Th17 细胞的表达水平比较, 经方差分析, 差异无统计学意义 ($F=1.985, P=0.378$)。见表 3。

表 2 3 组患者肝癌组织中 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞表达水平比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	CD4 ⁺ T 细胞	CD8 ⁺ T 细胞
AA 组 ($n=67$)	21.08 ± 2.12	28.83 ± 2.52
AG 组 ($n=23$)	19.43 ± 1.98	25.52 ± 2.71
GG 组 ($n=19$)	19.12 ± 2.09	24.91 ± 2.29
F 值	5.873	6.175
P 值	0.003	0.001

表 3 3 组患者肝癌组织中 Treg 和 Th17 细胞表达水平比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	Treg 细胞	Th17 细胞
AA 组 ($n=67$)	6.12 ± 1.47	1.64 ± 0.42
AG 组 ($n=23$)	8.12 ± 1.71	1.54 ± 0.38
GG 组 ($n=19$)	8.24 ± 1.92	1.55 ± 0.37
F 值	7.546	1.985
P 值	0.000	0.378

2.4 肝癌组织中 IL-2、IL-10、TGF-β 及 IL-17 的阳性表达

AA 组、AG 组、GG 组患者的 IL-2、IL-10、TGF-β 阳性表达率比较, 经 χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。3 组患者 IL-17 阳性表达率比较, 经 χ^2 检验, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 4。

表 4 3 组患者肝癌组织中 IL-2、IL-10、TGF-β 及 IL-17 的阳性表达率比较 例 (%)

组别	IL-2	IL-10	TGF-β	IL-17
AA 组 ($n=67$)	55 (82.09)	31 (46.27)	28 (41.79)	45 (67.16)
AG 组 ($n=23$)	11 (47.83)	16 (69.57)	17 (77.27)	12 (52.17)
GG 组 ($n=19$)	13 (68.42)	14 (73.68)	15 (78.95)	9 (47.37)
χ^2 值	10.267	6.703	13.554	3.285
P 值	0.005	0.035	0.001	0.194

3 讨论

肿瘤细胞的生物学特性决定肿瘤细胞的生长能力和转移能力, 对患者预后具有重大影响。医学的进步虽然使原发性肝癌患者的死亡率有所下降, 生存质量有所提高, 但是其临床预后仍不理想。目前已知原发性肝癌组织中免疫状态对癌细胞的生长和转移过程具有重大影响, 多数肝癌组织中表现为免疫抑制状态, 为癌细胞的免疫逃脱提供了良好的条件。T 细胞亚群是肿瘤组织中的重要免疫成分, 良好的免疫功能状态可以有效杀灭肿瘤细胞, 抑制其生长和转移。目前研究较热的肿瘤相关的 T 细胞亚群主要包括 CD4⁺T、CD8⁺T、Treg 和 Th17 细胞。研究证实, 在原发性肝癌患者中上述 T 细胞亚群功能失衡, 例如 Treg 细胞升高, 可以抑制免疫系统对肝癌细胞的杀伤作用^[9-10]。

CD44 基因 rs4756195 位点多态性对原发性肝癌患者的影响主要通过影响 CD44 蛋白的合成, 从而发挥生理作用。CD44 蛋白是一种细胞黏附分子, 在肿瘤细胞和 T 细胞表面表达, 主要通过结合细胞外基质, 包括胶原蛋白、层黏连蛋白、硫酸软骨素等, 从而发挥其生理作用, 介导淋巴细胞的归巢、淋巴细胞向炎症部位和黏膜相关淋巴组织归位、黏附细胞外基质。CD44 蛋白可以募集 CD8⁺T 细胞等向局部组织转移^[11-12]。而 CD8⁺T 细胞可以分化为细胞毒性 T 细胞, 其是杀伤肿瘤细胞的重要免疫细胞^[13-14], 因此可能增强机体对肿瘤细胞的杀伤作用。另外, CD44 还可以通过促进 T 细胞向抗原呈递细胞迁移、增强 T 细胞与抗原呈递细胞的反应, 发挥抗肿瘤效应; 其还可以

通过调节 TCR/CD 复合体信号通路,以 T 细胞活化的共刺激因子身份,参与 T 细胞的活化。最后,CD44 还可以通过延长 T 细胞的使用寿命,发挥抗肿瘤细胞效应。目前尚无研究探讨 CD44 基因 rs4756195 位点多态性与肝癌组织中 T 细胞亚群相关性的报道。本研究结果显示,CD44 基因 rs4756195 的多态性分布与原发肝癌组织中 T 细胞亚群的分布有关,表现为 CD44 rs4756195 基因型为 AG、GG 的野生型患者 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞表达降低,Treg 升高,IL-2 降低,而 TGF- β 、IL-10 升高。IL-2 是促炎因子,由活化的免疫性 T 细胞分泌,又可刺激 T 活性细胞的募集和增殖;TGF- β 、IL-10 则是免疫抑制因子,可以抑制体内炎症反应。IL-2 降低,TGF- β 、IL-10 升高表明机体处于一种免疫抑制状态,提示原发性肝癌组织中 CD44 rs4756195 基因型为 AG、GG 的野生型患者局部免疫抑制状态更严重。在结肠癌肝转移、原发性肝癌等患者中,也证实 CD44 基因的多态性对肿瘤的生物特性有重要影响^[15-19]。我国学者周鑫等^[20]在乳腺癌的研究中也证实,CD44 rs4756195 基因型为 AG、GG 的野生型人群更容易发生乳腺癌,且发展更快,预后更差。

综上所述,原发性肝癌患者 CD44 基因 rs4756195 位点呈多态性分布,与肝癌组织中的免疫抑制有关。

参 考 文 献:

- [1] KIM B H, PARK J W. Epidemiology of liver cancer in South Korea[J]. Clin Mol Hepatol, 2017, 12(3): 784-788.
- [2] WILD S H, WALKER J J, MORLING J R, et al. Cardiovascular disease, cancer, and mortality among people with type 2 diabetes and alcoholic or nonalcoholic fatty liver disease hospital admission[J]. Diabetes Care, 2018, 41(2): 341-347.
- [3] WONG M C, JIANG J Y, GOGGINS W B, et al. International incidence and mortality trends of liver cancer: a global profile[J]. Sci Rep, 2017, 7(4): 5846-5851.
- [4] MORALES SORIANO R, MORON CANIS J M, MOLINA ROMERO X, et al. Influence of simultaneous liver and peritoneal resection on postoperative morbi-mortality and survival in patients with colon cancer treated with surgical cytoreduction and intraperitoneal hyperthermic chemotherapy[J]. Cir Esp, 2017, 95(4): 214-221.
- [5] LI W, MA H, ZHANG J, et al. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13856-13861.
- [6] LI W, QIAN L, LIN J, et al. CD44 regulates prostate cancer proliferation, invasion and migration via PDK1 and PFKFB4[J]. Oncotarget, 2017, 8(39): 65143-65151.
- [7] LI X, GRIGALAVICIUS M, LI Y, et al. MtDNA depletion influences the transition of CD44 subtypes in human prostate cancer DU145 cells[J]. Tumour Biol, 2017, 39(8): 1010-1014.
- [8] MAO M, ZHENG X, JIN B, et al. Effects of CD44 and E-cadherin overexpression on the proliferation, adhesion and invasion of ovarian cancer cells[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(6): 5557-5563.
- [9] LI F, GUO Z, LIZEE G, et al. Clinical prognostic value of CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells in peripheral blood of barcelona clinic liver cancer (BCLC) stage B hepatocellular carcinoma patients[J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 52(9): 1357-1365.
- [10] PEDROZA-GONZALEZ A, VERHOEF C, IJZERMANS J N, et al. Activated tumor-infiltrating CD4⁺ regulatory T cells restrain antitumor immunity in patients with primary or metastatic liver cancer[J]. Hepatology, 2013, 57(1): 183-194.
- [11] YAO Y, WANG X, ZHOU H, et al. MHC class II peptides induce CD8(+) CD44(+) Ly49(+) regulatory T cells in C57BL/6 mice[J]. Cell Immunol, 2017, 312(12): 71-77.
- [12] LEE-SAYER SSM, MAESHIMA N, DOUGAN M N, et al. Hyaluronan-binding by CD44 reduces the memory potential of activated murine CD8 T cells[J]. Eur J Immunol, 2018, 48(5): 7895-7899.
- [13] ZAREI O, YAGHOUBI M M. Cytotoxic effects of fritillaria imperialis L. extracts on human liver cancer cells, breast cancer cells and fibroblast-like cells[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 94(21): 598-604.
- [14] BURANRAT B, MAIRUAE N, KANCHANARACH W. Cytotoxic and antimigratory effects of Cratoxy formosum extract against HepG2 liver cancer cells[J]. Biomed Rep, 2017, 6(4): 441-448.
- [15] ROZEIK M S, HAMMAM O A, ALI A I, et al. Evaluation of CD44 and CD133 as markers of liver cancer stem cells in Egyptian patients with HCV-induced chronic liver diseases versus hepatocellular carcinoma[J]. Electron Physician, 2017, 9(7): 4708-4717.
- [16] FANG C, FAN C, WANG C, et al. Prognostic value of CD133(+) CD54(+) CD44(+) circulating tumor cells in colorectal cancer with liver metastasis[J]. Cancer Med, 2017, 6(12): 2850-2857.
- [17] PARK N R, CHA J H, JANG J W, et al. Synergistic effects of CD44 and TGF-beta1 through AKT/GSK-3beta/beta-catenin signaling during epithelial-mesenchymal transition in liver cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 477(4): 568-574.
- [18] FANG C, FAN C, WANG C, et al. CD133⁺ CD54⁺ CD44⁺ circulating tumor cells as a biomarker of treatment selection and liver metastasis in patients with colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(47): 77389-77403.
- [19] HAN S, GUO J, LIU Y, et al. Knock out CD44 in reprogrammed liver cancer cell C3A increases CSCs stemness and promotes differentiation[J]. Oncotarget, 2015, 6(42): 44452-44465.
- [20] 周鑫, 吴诚义. CD44 基因多态性与乳腺癌遗传易感性及临床病理参数的关系 [J]. 四川大学学报 (医学版), 2012, 43(6): 807-811.

(童颖丹 编辑)