



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.07.009
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2017.07.009
Chinese Journal of General Surgery, 2017, 26(7):870-876.

· 基础研究 ·

肝癌患者 CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺ 调节性 T 细胞的变化及意义

方大正, 吴红伟, 武伦, 万光俊, 沈丰

(湖北医药学院附属东风医院 肝胆外科, 湖北 十堰 442000)

摘要

目的: 探讨肝癌患者外周血和癌组织中 CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺ 调节性 T 细胞 (CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺Tregs) 的改变及意义。

方法: 采用流式细胞仪检测 72 例肝癌患者和 22 例健康对照人群外周血 CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺T 细胞与 CD8⁺T 细胞比值 (CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺Tregs/CD8⁺T), 分析 CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺Tregs/CD8⁺T 与肝癌患者临床病理因素的关系; 分别用免疫组化和 Western blot 检测肝癌患者癌组织及癌旁组织中 Foxp3 阳性细胞与 Foxp3 蛋白表达水平。

结果: 与健康对照人群比较, 肝癌患者外周血 CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺Tregs/CD8⁺T 明显升高 ($P < 0.05$); 外周血 CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺Tregs/CD8⁺T 与患者 TNM 分期、淋巴结转移、分化程度有关 (均 $P < 0.05$); 肝癌组织中平均 Foxp3 阳性细胞数与 Foxp3 蛋白表达量均明显高于癌旁组织 (均 $P < 0.05$); 外周血 CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺Tregs/CD8⁺T, 肝癌组织 Foxp3 阳性细胞数与 Foxp3 蛋白表达量在高、中、低分化的肝癌中均呈依次升高趋势, 但差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

结论: CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺Tregs 在肝癌患者外周血及癌组织中增多, 可能与肿瘤免疫抑制作用有关, 其检测对肝癌患者病情有一定评估价值。

关键词

癌, 肝细胞; T 淋巴细胞, 调节性; 叉头转录因子类
中图分类号: R735.7

Changes in CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺ regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma

FANG Dazheng, WU Hongwei, WU Lun, WAN Guangjun, SHEN Feng

(Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Dongfeng Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract

Objective: To investigate the changes in CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺ regulatory T cells (CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺Tregs) in peripheral blood and tumor tissue of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and the significance.

Methods: The ratio of CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺Tregs to CD8⁺T cells (CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺Tregs/CD8⁺T) in peripheral blood in 72 HCC patients and 22 healthy controls was determined by flow cytometry, and the relations of CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺Tregs/CD8⁺T with clinicopathologic factors of the HCC patients were analyzed. The Foxp3 positive cells and Foxp3 protein expression in tumor tissues and their adjacent tissues from HCC patients

基金项目: 湖北省教育厅中青年人才基金资助项目 (Q20162112)。

收稿日期: 2017-04-25; 修订日期: 2017-06-16。

作者简介: 方大正, 湖北医药学院附属东风医院主治医师, 主要从事普外基础疾病的诊疗方面的研究。

通信作者: 沈丰, Email: shenf7386@163.com

were determined by immunohistochemical staining and Western blot analysis, respectively.

Results: The peripheral blood CD8⁺CD28⁻Fop3⁺Tregs/CD8⁺T was significantly increased in HCC patients compared with that in healthy controls ($P<0.05$), and the peripheral blood CD8⁺CD28⁻Fop3⁺Tregs/CD8⁺T was significantly associated with the TNM stage, lymph node metastasis and degree of tumor differentiation of the HCC patients (all $P<0.05$). The average number of Foxp3 positive cells and Foxp3 protein expression level were significantly higher in tumor tissue than those in adjacent tissue (both $P<0.05$). The peripheral blood CD8⁺CD28⁻Fop3⁺Tregs/CD8⁺T, and number of Foxp3 positive cells and Foxp3 protein expression level in tumor tissue all presented an increasing trend in the order of well, moderately and poorly differentiated HCC, but all differences did not reach a statistical significance (all $P>0.05$).

Conclusion: CD8⁺CD28⁻Fop3⁺Tregs are increased in the peripheral blood and tumor tissue of HCC patients, which may probably be related to tumor immunosuppression, and their detection may have certain value in assessing the disease states of the HCC patients.

Key words

Carcinoma, Hepatocellular; T-Lymphocytes, Regulatory; Forkhead Transcription Factors

CLC number: R735.7

调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)在T细胞亚群中具有重要免疫调节功能,它可以改变机体免疫内环境,和肿瘤细胞免疫逃逸与肿瘤形成密切相关^[1]。目前,较为常用的特异性检测Tregs分子表面标记物的是CD8和CD28,基于CD8⁺CD28⁻Tregs的免疫活性调节,已成为目前肿瘤如黑色素瘤、胰腺癌、卵巢癌等免疫研究的热点^[2-3]。但其在肝细胞癌(以下简称肝癌)临床分期、分化程度等方面报道不一^[4]。叉状头/翼状螺旋转录因子(forkhead/winged helix transcription factor, Foxp3)在胸腺和外周血CD8⁺CD28⁻Tregs中特异性表达,抑制机体增殖与活化肿瘤特异性T效应细胞,与机体荷瘤时的免疫抑制状态有关^[5]。在T细胞亚群中,CD4⁺CD25⁺Tregs具有免疫负调控功能,在原发性肝癌患者中已有研究^[6]。而CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺Tregs在肝癌患者外周血中和肿瘤组织中研究较少^[7],本研究检测肝癌患者外周血和肿瘤组织中CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺Tregs的水平,探讨其与肝癌的关系。基于上述认识,本研究应用流式细胞仪检测和分析肝癌患者外周血Treg细胞表面标记,观察肝癌和癌旁组织中CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺Tregs的差异性,旨在为肝癌的免疫性治疗提供可能的实验基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象外周血标本

72例肝癌标本均为湖北医药学院附属东风

医院肝胆外科2014—2016年经术后病理确诊标本,术前均未经过放、化疗处理,术前取外周血;其中男51例,女21例;年龄41~72岁,平均(49.8±9.5)岁。72例肝癌标本按照国际抗癌联盟(International Union Against Cancer, IUCC)分期标准,高分化肝癌29例患者,中分化肝癌25例,低分化肝癌18例。22名正常对照者为同期我院健康体检中心志愿者外周血,其中男15例,女7例;年龄43~70岁,平均(48.6±9.2)岁,对照组均无急、慢性疾病史。两组均知情同意。

1.2 主要试剂和仪器

人调节性T细胞(T-reg)检测试剂盒包括:抗CD8-PE、CD28-FITC、Foxp3-PE、IgG1-PE、IgG1-FITC等购于美国BD公司;溶血素羊抗人Foxp3多克隆抗体购自美国Bioworld biotechnology公司(工作浓度1:200),即用型免疫组化兔抗羊二抗和3,3'-二氨基联苯胺(DAB)试剂盒均购自北京中杉金桥生物科技有限公司;溶血仪、FACS流式细胞仪为美国BD公司产品。

1.3 流式细胞术检测外周血CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺Tregs

参照文献^[8],抽取入院1 d肝癌患者和健康体检者(对照组)外周血1 mL,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝。取血标本100 μL,分别加入IgG1-FITC、IgG1-PE、CD8-FITC、CD28-APC、Foxp3-PE各10 μL,室温下静置避光孵育15 min后,加红细胞裂解液1 mL溶解红细胞,震荡数秒并静置5 min后,离心1 500 r/min×5 min。选取淋巴细

胞群设门流式细胞仪检测Tregs, 分析 $CD8^+CD28^-$ F $oxp3^+$ Tregs与 $CD8^+$ T细胞比值。Cell Quest软件获取和分析数据, 每个样本检测 1×10^4 个/次。

1.4 免疫组化检测肝癌组织中和癌旁组织中F $oxp3$ 阳性细胞

采用免疫组织化学SP法检测肝癌组织中和癌旁组织中F $oxp3$ 阳性细胞, 严格按照免疫组化试剂盒说明书步骤进行操作。组织切片处理如下: 常规取肝癌组织和癌旁10 cm以上组织, 10%甲醛溶液固定, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 厚5 μ m切片, 脱水透明, 柠檬酸钠煮沸, 微波抗原修复, 山羊血清封闭, 滴加一抗, 羊抗人F $oxp3$ 多克隆抗体4 $^{\circ}$ C冰箱孵育过夜, 次日PBS缓冲液洗涤后, 滴加兔抗羊二抗, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min, PBS缓冲液洗涤, DAB显色, 镜检观察染色程度, 苏木精复染细胞核, 自来水返蓝, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。光镜下观察、摄片。F $oxp3$ 阳性细胞染色呈棕黄色或黄色颗粒, 定位为胞质。每张切片任意选取高倍镜下5个视野, 计数F $oxp3$ 阳性细胞, 按照视场面积计算每 mm^3 F $oxp3$ 阳性细胞数目。阳性细胞计数由与本研究无关的2位病理医师计算并确认取均值。

1.5 Western blot 检测肝癌组织中和癌旁组织中F $oxp3$ 蛋白的表达

每例肝癌组织和相应癌旁正常肝组织约100 mg, 加入1 mL组织细胞裂解液, 冰上剪碎并研磨组织约30 min, 研制成组织匀浆, 放置于1.5 mL EP管

中, 4 $^{\circ}$ C、离心12 000 $r/min \times 30$ min, 取上清进行蛋白定量, 蛋白浓度测定采取BCA法。100 $^{\circ}$ C沸水煮沸变性5 min, 取30 μ g每个样本的总蛋白行SDS-PAGE电泳分离, 转膜至PVDF膜上。5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 1:1 000稀释的羊抗人F $oxp3$ 多克隆抗体4 $^{\circ}$ C孵育过夜, PBS洗涤PVDF膜3次, 室温下放入兔抗羊二抗(1:2 000稀释)孵育2 h, ECL化学发光试剂显色曝光。以 β -actin作为上样内参照, 所得结果以灰度扫描并相对定量分析, 用目的蛋白条带吸光度值/ β -actin条带吸光度值表示F $oxp3$ 蛋白的相对表达强度。

1.6 统计学处理

实验所得数据采用SPSS 17.0软件处理, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 单因素方差分析和SNK- q 检验进行多组数据比较, t 检验比较两组均数, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血 $CD8^+CD28^-$ F $oxp3^+$ Tregs/ $CD8^+$ T细胞表达情况

流式细胞分析结果显示, 外周血 $CD8^+CD28^-$ F $oxp3^+$ Tregs/ $CD8^+$ T细胞表达在肝癌患者明显高于健康对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且随着肝癌患者分化级别的降低, $CD8^+CD28^-$ F $oxp3^+$ Tregs/ $CD8^+$ T细胞表达逐渐升高, 但组间差异无统计学意义(图1)。

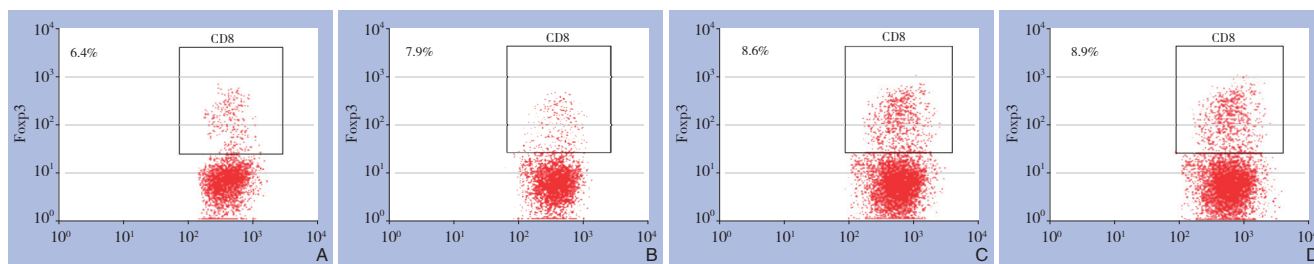


图1 肝癌患者和健康对照人群外周血 $CD8^+CD28^-$ F $oxp3^+$ Tregs/ $CD8^+$ T检测结果 A: 健康对照组; B: 高分化肝癌组; C: 中分化肝癌组; D: 低分化肝癌组

Figure 1 Detection of $CD8^+CD28^-$ F $oxp3^+$ Tregs/ $CD8^+$ T in peripheral blood of HCC patients and healthy population A: Healthy control group; B: Well differentiated HCC group; C: Moderately HCC group; D: Poorly differentiated HCC group

2.2 $CD8^+CD28^-$ F $oxp3^+$ Tregs 表达与肝癌患者临床病理因素的关系

流式细胞分析结果与肝癌患者临床病理因素比较显示, $CD8^+CD28^-$ F $oxp3^+$ Tregs/ $CD8^+$ T的表达

与性别、年龄无关(均 $P > 0.05$), 与TNM分期、有无淋巴结转移、肿瘤分化程度有关($P < 0.05$)(表1)。

表 1 肝癌患者外周血 CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺Tregs/CD8⁺T 与临床病理因素的关系 (% , $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Relations of peripheral blood CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺Tregs/CD8⁺T with clinicopathologic factors of HCC patients (% , $\bar{x} \pm s$)

因素	n	CD8 ⁺ CD28 ⁻ Foxp3 ⁺ Tregs/CD8 ⁺ T	t	P
性别				
男	51	8.43 ± 1.18	0.604	0.582
女	21	8.39 ± 1.20		
年龄 (岁)				
≤ 55	39	8.41 ± 1.32	0.862	0.427
>55	33	8.43 ± 1.63		
TNM 分期				
I/II	35	7.12 ± 0.99	3.981	0.009
III/IV	37	8.01 ± 7.46		
淋巴结转移				
有	41	8.77 ± 1.94	4.536	0.007
无	31	8.16 ± 1.67		
分化程度				
高分化	29	7.96 ± 1.63	3.627	0.042
中、低分化	43	8.78 ± 1.76		

2.3 肝癌患者病理组织 Foxp3 阳性细胞检测

在肝癌病理组织中有 Foxp3 阳性表达, 位于肝癌或癌旁正常组织的细胞胞质中。癌旁组织中 Foxp3 平均阳性细胞数为 (7.26 ± 1.97) 个/mm², 高分化肝癌平均阳性细胞数目为 (26.02 ± 8.34) 个/mm², 中分化肝癌平均阳性数目为 (28.05 ± 8.86) 个/mm², 低分化为 (31.65 ± 8.15) 个/mm²; 与癌旁正常组织中 Foxp3 阳性细胞比较, 肝癌组织中 Foxp3 阳性细胞数明显升高, 差异均有统计学意义 (均 P < 0.05); 但不同分化程度肝癌组织中 Foxp3 阳性细胞数比较差异无统计学意义 (P > 0.05) (图 2)。

2.4 Foxp3 蛋白在肝癌和癌旁组织中的表达

Foxp3 蛋白在肝癌和癌旁组织中均有表达, 但在肝癌细胞中的表达量明显高于癌旁细胞 (图 3)。由图像分析可知, 与正常组 Foxp3 蛋白表达相比, 肝癌组织中 Foxp3 蛋白的表达明显增强, 差异有统计学意义 (P < 0.01); 但不同分化程度的肝癌组织中 Foxp3 蛋白表达间差异无统计学意义 (P > 0.05) (图 3)。

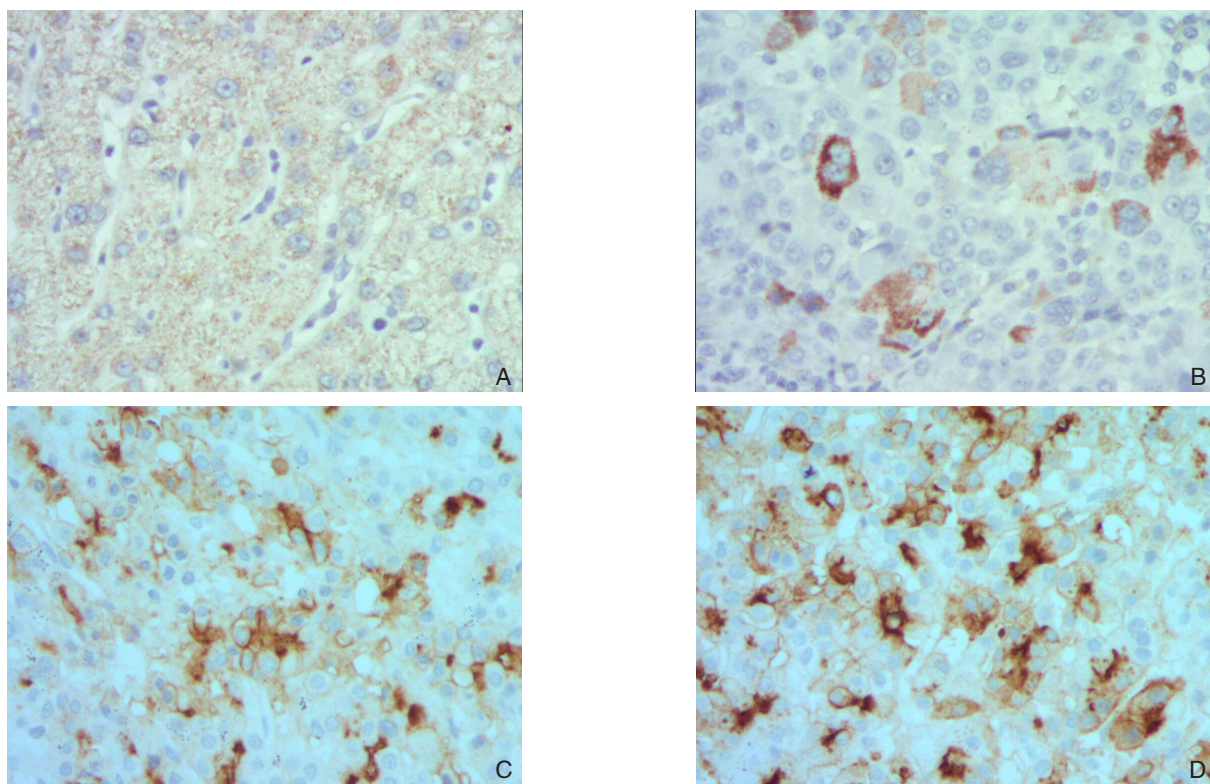


图 2 免疫组化检测 Foxp3 阳性细胞 (×400) A: 癌旁组织 (距肿瘤边缘 5 cm); B: 高分化肝癌组织; C: 中分化肝癌组织; D: 低分化肝癌组织

Figure 2 Immunohistochemical staining for Foxp3 positive cells (×400) A: Tumor adjacent tissue (5 cm away from tumor tissue); B: Well differentiated HCC tissue; C: Moderately differentiated HCC tissue; D: Poorly differentiated HCC tissue

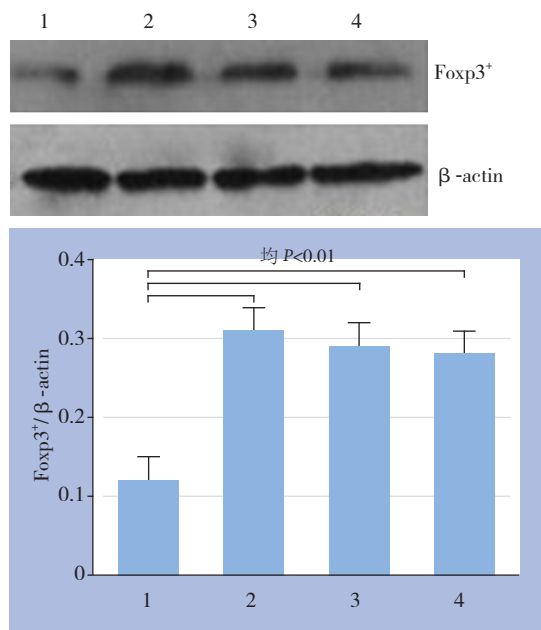


图3 Western blot 检测 Foxp3 蛋白的表达 1: 癌旁组织; 2: 低分化肝癌组织; 3: 中分化肝癌组织; 4: 高分化肝癌组织

Figure 3 Western blot analysis of Foxp3 protein expression

1: Tumor adjacent tissue; 2: Well differentiated HCC tissue; 3: Moderately differentiated HCC tissue; 4: Poorly differentiated HCC tissue

3 讨论

Tregs是影响肿瘤患者预后的潜在因素之一,目前,在肿瘤、转移淋巴结、外周血、恶性腹水、胸腔积液中均有发现^[2-3]。手术、放疗和化疗是传统的肿瘤治疗手段,随着医疗水平的发展,对肿瘤的发病机制认识不断深入,在临床中,调动患者机体主动免疫功能,进行免疫治疗已逐步开展,但其临床上对肝细胞癌的疗效并不确定,可能与患者肿瘤抗原中正常细胞较多,机体T细胞免疫系统对癌细胞免疫“豁免”有关^[4]。Tregs的相关研究如Tregs/CD3、Tregs/CD4、Tregs/CD8等在原发瘤和转移瘤中的比率已见于很多研究^[4-7]。建立Tregs与Foxp3基因或蛋白联系,使Tregs的研究有了进一步的进展^[9]。CD8⁺CD28⁻Tregs在机体调节机制中有重要作用,可控制自身反应性T细胞,限制机体过度免疫应答或破坏自身组织的作用,使机体免疫平衡稳态得以维持^[10-11]。Foxp3在胸腺和外周血CD8⁺CD28⁻Tregs中特异性表达,Foxp3基因编码该蛋白,阻止细胞因子分泌^[12]。CD8⁺CD28⁻Tregs可抑制自身免疫性疾病的发生,

参与调节肿瘤免疫。本研究表明,与对照组比较,肝癌患者外周血中CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺Tregs的比率明显升高,且此改变与患者的年龄和性别比较差异无关,这与王徐等^[13]研究T细胞群和性别无关相一致。本研究的肝癌患者中,Tregs的比率较正常健康对照组明显升高,且Tregs的比率在有淋巴结转移的肝癌患者外周血中明显升高,这与在消化道肿瘤中有淋巴结转移的Tregs显著增高相一致^[14-17]。

目前,多数研究对Tregs的检测基于肿瘤患者外周血进行,对肿瘤病理组织同时进行对照研究较少^[18-19]。本研究通过石蜡包埋免疫组化法和Western blot的研究发现肝癌患者肿瘤组织中Foxp3阳性细胞数及Foxp3蛋白表达水平显著高于癌旁组织,表明在肝癌患者中,Tregs可能通过某种途径向癌周渗透迁移浸润。Foxp3抑制机体增殖与活化肿瘤特异性T效应细胞,与机体荷瘤时的免疫耐受肿瘤抗原和相关抗原可能有关^[20-21],有文献^[22-25]报道Tregs通过趋化因子介导迁移至肿瘤微环境中。本实验中,由于肝癌样本量相对较少,不利于在单项TNM分期和肿瘤分化级别中做Tregs的统计分析,因此基于III/IV期与I/II期、中低分化与高分化肝癌患者Foxp3⁺Tregs的比率明显增高,提示Foxp3⁺Tregs可能在肝癌的发生、发展中起着重要作用。

综上,本实验通过对肝癌患者外周血进行检测,采用病理组织学和分子生物学的对照研究,更加直观和准确为临床检测Tregs提供参考。然而,收集远期的完整随访资料,术后检测早期外周血T细胞结果可能受到抗生素使用等多因素的影响,可能会改变淋巴细胞亚群,因此,本研究还需要扩大样本量以获取准确的研究结果。

参考文献

- [1] Serrels A, Lund T, Serrels B, et al. Nuclear FAK controls chemokine transcription, Tregs, and evasion of anti-tumor immunity[J]. *Cell*, 2015, 163(1):160-173. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.001.
- [2] Tao Q, Pan Y, Wang Y, et al. Regulatory T cells-derived IL-35 promotes the growth of adult acute myeloid leukemia blasts[J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(10):2384-2393. doi: 10.1002/ijc.29563.
- [3] Ouyang Z, Wu H, Li L, et al. Regulatory T cells in the immunotherapy of melanoma[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(1):77-85. doi: 10.1007/s13277-015-4315-0.
- [4] Yuan CH, Sun XM, Zhu CL, et al. Amphiregulin activates regulatory

- T lymphocytes and suppresses CD8⁺ T cell-mediated anti-tumor response in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31):32138–32153. doi: 10.18632/oncotarget.5171.
- [5] Ichikawa A, Miyoshi H, Arakawa F, et al. Detection of Tax-specific CTLs in lymph nodes of adult T-cell leukemia/lymphoma patients and its association with Foxp3 positivity of regulatory T-cell function[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(6):4611–4618. doi: 10.3892/ol.2017.6067.
- [6] Józwicki W, Brożyna AA, Siekiera J, et al. Frequency of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells in peripheral blood in relation to urinary bladder cancer malignancy indicators before and after surgical removal[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10):11450–11462. doi: 10.18632/oncotarget.7199.
- [7] Mishra AK, Kadoishi T, Wang X, et al. Squamous cell carcinomas escape immune surveillance via inducing chronic activation and exhaustion of CD8⁺ T cells co-expressing PD-1 and LAG-3 inhibitory receptors[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(49):81341–81356. doi: 10.18632/oncotarget.13228.
- [8] 吉顺荣, 姚宛彤, 张波, 等. 胰腺癌患者外周血CD8⁺CD28⁺和CD8⁺CD28⁻T淋巴细胞亚群的分析[J]. *上海医学*, 2012, 35(4):316–319.
Ji SR, Yao WT, Zhang B, et al. Expression of CD8⁺CD28⁺ and CD8⁺CD28⁻ in the peripheral blood of pancreatic cancer patients[J]. *Shanghai Medical Journal*, 2012, 35(4):316–319.
- [9] Hasanjani Roushan MR, Bayani M, Soleimani Amiri S, et al. Evaluation of CD4⁺ CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells during treatment of patients with brucellosis[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2016, 30(3):675–682.
- [10] Lexmond WS, Goettel JA, Lyons JJ, et al. FOXP3⁺Tregs require WASP to restrain Th2-mediated food allergy[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(10):4030–4044. doi: 10.1172/JCI85129.
- [11] Chen C, Chen D, Zhang Y, et al. Changes of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ and CD8⁺CD28⁻ regulatory T cells in non-small cell lung cancer patients undergoing surgery[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 18(2):255–261. doi:10.1016/j.intimp.2013.12.004.
- [12] Assadiasl S, Ahmadpoor P, Nafar M, et al. Regulatory T cell subtypes and TGF-β1 gene expression in chronic allograft dysfunction[J]. *Iran J Immunol*, 2014, 11(3):139–152. doi:10.1111/i3A1.
- [13] 王徐, 胡明华, 王小明. 原发性肝癌患者微环境中CD8⁺CD28⁻调节性T细胞表达变化及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(7):976–979. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.022.
Wang X, Hu MH, Wang XM. Change and significance of CD8⁺CD28⁻Treg cells expression in the patients suffering from primary hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2014, 23(7):976–979. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.022.
- [14] Chan IH, Wu V, Bilardello M, et al. PEG-rIL-10 treatment decreases FoxP3(+) Tregs despite upregulation of intratumoral IDO[J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(7):e1197458. doi:10.1080/2162402X.2016.1197458.
- [15] Cheng H, Luo G, Lu Y, et al. The combination of systemic inflammation-based marker NLR and circulating regulatory T cells predicts the prognosis of resectable pancreatic cancer patients[J]. *Pancreatol*, 2016, 16(6):1080–1084. doi: 10.1016/j.pan.2016.09.007.
- [16] Beatty PL, van der Geest R, Hashash JG, et al. Immunobiology and immunosurveillance in patients with intraductal papillary mucinous neoplasms(IPMNs), premalignant precursors of pancreatic adenocarcinomas[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2016, 65(7):771–778. doi: 10.1007/s00262-016-1838-1.
- [17] Choi HS, Ha SY, Kim HM, et al. The prognostic effects of tumor infiltrating regulatory T cells and myeloid derived suppressor cells assessed by multicolor flow cytometry in gastric cancer patients[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(7):7940–7951. doi: 10.18632/oncotarget.6958.
- [18] 薛旦旦, 夏添松, 刘晓安, 等. 乳腺癌肿瘤微环境中CD8⁺T细胞和调节性T细胞的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(1):149–151. doi:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2014.01.052.
Xue DD, Xia TS, Liu XA, et al. Infiltrating CD8⁺ T cells and regulatory T cells in breast cancer microenvironment[J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2014, 31(1):149–151. doi:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2014.01.052.
- [19] McCoy MJ, Hemmings C, Miller TJ, et al. Low stromal Foxp3⁺ regulatory T-cell density is associated with complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2015, 113(12):1677–186. doi: 10.1038/bjc.2015.427.
- [20] 毛丽伟, 廖国清, 王红梅, 等. 胃癌患者不同区域淋巴结和外周血CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞的表达和临床意义[J]. *免疫学杂志*, 2016, 32(11):1001–1004.
Mao LW, Liao GQ, Wang HM, et al. The expression of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulated T cells in different regional lymph nodes of gastric carcinoma and its clinical significance[J]. *Immunological Journal*, 2016, 32(11):1001–1004.
- [21] Lee HE, Park DJ, Kim WH, et al. High FOXP3⁺ regulatory T-cell density in the sentinel lymph node is associated with downstream non-sentinel lymph-node metastasis in gastric cancer[J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(3):413–419. doi:10.1038/bjc.2011.248.
- [22] 陈中, 倪家连, 刘鲁岳, 等. CD4⁺CD25⁺调节性T细胞在肝癌微环境中的分布状况与局部免疫状态的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16(7):690–692. doi:10.3969/j.issn.1005-6947.2007.07.022.
Chen Z, Ni JL, Liu LY, et al. Relationship of the distribution and local immunology of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2007, 16(7):690–692. doi:10.3969/j.issn.1005-6947.2007.07.022.
- [23] Napolitano C, Bellati F, Ruscito I, et al. Immunological and clinical

impact of cancer stem cells in vulvar cancer: Role of CD133/CD24/ABC2-expressing cells[J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(10):5109–5116. doi:10.21873/anticancer.11080.

[24] 王文斌, 刘三光, 刘兵, 等. 肝外胆管癌组织叉状头/翅膀状螺旋转录因子3阳性调节性T细胞浸润及其临床意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(5):1156–1158. doi:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2015.05.075.

Wang WB, Liu SG, Liu B, et al. Significance of forkhead/winged helix transcription factor P3 + regulatory T cells infiltration in extrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2015, 32(5):1156–1158. doi:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2015.05.075.

[25] Wei R, Hu Y, Dong F, Xu X, et al. Hepatoma cell-derived leptin

downregulates the immunosuppressive function of regulatory T-cells to enhance the anti-tumor activity of CD8⁺ T-cells[J]. *Immunol Cell Biol*, 2016, 94(4):388–399. doi: 10.1038/icb.2015.110.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 方大正, 吴红伟, 武伦, 等. 肝癌患者CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺调节性T细胞的变化及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2017, 26(7):870–876. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.07.009

Cite this article as: Fang DZ, Wu HW, Wu L, et al. Changes in CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺ regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Chin J Gen Surg*, 2017, 26(7):870–876. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.07.009

本刊常用词汇英文缩写表

C-反应蛋白	CRP	甲型肝炎病毒	HAV	心电图	ECG
Toll样受体	TLRs	碱性成纤维细胞转化生长因子	bFGF	心脏监护病房	CCU
氨基末端激酶	JNK	聚合酶链反应	PCR	血管紧张素 II	AngII
白细胞	WBC	抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	ABC法	血管内皮生长因子	VEGF
白细胞介素	IL	辣根过氧化物酶	HRP	血管性血友病因子	vWF
半数抑制浓度	IC ₅₀	链霉抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	SABC法	血红蛋白	Hb
变异系数	CV	磷酸盐缓冲液	PBS	肌酐	SCr
标记的链霉抗生物素蛋白-生物素法	SP法	绿色荧光蛋白	GFP	血尿素氮	BUN
表皮生长因子	EGF	酶联免疫吸附测定	ELISA	血小板	PLT
丙氨酸转氨酶	ALT	美国食品药品监督管理局	FDA	血压	BP
丙二醛	MDA	脑电图	EEG	血氧饱和度	SO ₂
丙型肝炎病毒	HCV	内毒素/脂多糖	LPS	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	NADPH
超氧化物歧化酶	SOD	内皮型一氧化氮合酶	eNOS	严重急性呼吸综合征	SARS
磁共振成像	MRI	内生肌酐清除率	CCr	一氧化氮	NO
极低密度脂蛋白胆固醇	VLDL-C	尿素氮	BUN	一氧化氮合酶	NOS
低密度脂蛋白胆固醇	LDL-C	凝血酶时间	TT	乙二胺四乙酸	EDTA
动脉血二氧化碳分压	PaCO ₂	凝血酶原时间	PT	乙酰胆碱	ACh
动脉血氧分压	PaO ₂	牛血清白蛋白	BSA	乙型肝炎病毒	HBV
二甲亚砜	DMSO	热休克蛋白	HSP	乙型肝炎病毒 e 抗体	HBeAb
反转录-聚合酶链反应	RT-PCR	人类免疫缺陷病毒	HIV	乙型肝炎病毒 e 抗原	HBeAg
辅助性 T 细胞	Th	人绒毛膜促性腺激素	HCG	乙型肝炎病毒表面抗体	HBsAb
肝细胞生长因子	HGF	三磷酸腺苷	ATP	乙型肝炎病毒表面抗原	HBsAg
干扰素	IFN	三酰甘油	TG	乙型肝炎病毒核心抗体	HBeAb
高密度脂蛋白胆固醇	HDL-C	生理氯化钠溶液	NS	乙型肝炎病毒核心抗原	HBeAg
谷胱甘肽	GSH	世界卫生组织	WHO	异硫氰酸荧光素	FLTC
固相 pH 梯度	IPG	双蒸水	ddH ₂ O	诱导型一氧化氮合酶	iNOS
核糖核酸	RNA	丝裂原活化蛋白激酶	MAPK	原位末端标记法	TUNEL
核因子-κB	NF-κB	四甲基偶氮唑盐微量酶反应	MTT	杂合性缺失	LOH
红细胞	RBC	苏木精-伊红染色	HE	增强化学发光法	ECL
红细胞沉降率	ESR	胎牛血清	FBS	肿瘤坏死因子	TNF
环氧酶-2	COX-2	体质量指数	BMI	重症监护病房	ICU
活化部分凝血活酶时间	APTT	天冬氨酸氨基转移酶	AST	转化生长因子	TGF
活性氧	ROS	脱氧核糖核酸	DNA	自然杀伤细胞	NK 细胞
获得性免疫缺陷综合征	AIDS	细胞间黏附分子	ICAM	直接胆红素	DBIL
肌酐	Cr	细胞外基质	ECM	总胆固醇	TC
基质金属蛋白酶	MMP	细胞外调节蛋白激酶	ERK	总胆红素	TBIL
计算机 X 线断层照相技术	CT	纤连蛋白	FN		