

肝癌移植术后免疫监测研究进展

胡安国, 韩东冬*

青海大学研究生院, 青海 西宁

收稿日期: 2022年10月16日; 录用日期: 2022年11月10日; 发布日期: 2022年11月18日

摘要

肝移植是目前治疗肝癌重要的手段之一, 但是受体仍然需要长期的免疫抑制药物治疗, 肝癌肝移植术后短期和晚期发病原因都与免疫抑制有关, 目前肝癌移植术后护理通常是监测肝脏生物化学及免疫抑制药物水平。然而肝癌移植术后病情发展往往与重大并发症相关, 包括感染、排斥和复发, 这表明目前的免疫监测存在不足。许多检测方法已经在研究环境中进行了测试, 以确定用于预测临床事件的生物标志物, 从而指导肝移植术后免疫抑制方案。然而, 这些检测方法很难在研究环境之外的临床上普遍应用。在这篇综述中, 讨论了用于评估肝癌肝移植术后免疫功能监测的检测方法及未来展望。

关键词

肝癌肝移植, 免疫状态监测, 生物标志物

Research Progress of Immune Monitoring after Liver Cancer Transplantation

Anguo Hu, Dongdong Han*

Graduate School of Qinghai University, Xining Qinghai

Received: Oct. 16th, 2022; accepted: Nov. 10th, 2022; published: Nov. 18th, 2022

Abstract

Liver transplantation is one of the most important methods for the treatment of liver cancer, but the recipient still needs long-term immunosuppressive drug therapy, and the short-term and late causes of liver cancer after liver transplantation are related to immunosuppression. At present, nursing care after liver cancer transplantation is usually to monitor the level of liver biochemistry and immunosuppressive drugs. However, the disease progression after liver cancer transplanta-

*通讯作者。

tion is often associated with major complications, including infection, rejection and recurrence, which indicates that the current immune surveillance is inadequate. Many detection methods have been tested in the research environment to determine the biomarkers used to predict clinical events to guide immunosuppressive regimens after liver transplantation. However, these detection methods are difficult to be widely used in clinical practice outside the research environment. In this review, the detection methods and future prospects for the evaluation of immune function monitoring after liver transplantation for liver cancer are discussed.

Keywords

Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma, Immune Status Monitoring, Biomarkers

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球发病率第6位的恶性肿瘤,病死率居第4位,据世界卫生组织预测,到2030年因肝癌病死患者将超过100万,据统计,肝癌居我国癌症死亡第5位,全球新发肝癌病例一半以上来自中国,而肝移植是肝癌根治性治疗的重要手段之一。肝移植患者术后免疫抑制剂的临床应用较为复杂,免疫抑制剂调节窗口狭窄,通过药物浓度调节并不能够及时调整肝移植患者的免疫状态,虽然现代免疫抑制剂的使用,大大增加了肝移植受者的预期寿命,可免疫抑制剂的使用并非没有问题,肝移植术后前三个月死亡的原因包括感染、原发性移植失败、排斥反应和技术并发症,晚期死亡的原因包括新发恶性肿瘤(16%~23%)、心血管疾病(9%~22%)、感染(6%~19%)、慢性排斥和移植失败(5%~19%)和慢性肾衰竭(5%~10%) [1] [2] [3] [4]。肝移植术后短期和晚期死亡的许多原因都和免疫抑制剂应用有关,约40%~70%的移植后死亡原因可归结于免疫抑制或免疫抑制剂[4] [5]。为了尽量减少免疫抑制剂的副作用,临床医生尝试根据经验减少剂量,然而只有极少数病人适用。对个体免疫反应进行功能性检测,从而为每个病人制定个体化免疫方案显然更为可取。

由于缺乏检测患者免疫状态的可靠手段,平衡免疫抑制过度和不足的风险更为复杂,因为与其他实体器官移植相比,肝移植有其独特性。肝脏是一个具有免疫耐受性的器官,但术后排斥反应率仍为30%~40% [6] [7] [8],其外肝移植术后胆道狭窄和复发性疾病为排斥反应的诊断增加了难度,这使得移植术后病人的免疫功能管理变得更为复杂。因此长期以来,监测患者术后的免疫功能用来优化治疗,理想的免疫功能检测,是以全血为标准,只需要最少的操作可在不同实验室间重复和标准化,以便于尽早得到结果以便于调整免疫方案。目前大多数中心检测免疫功能的标准包括肝脏生物化学、血药浓度和临床事件,随着免疫学和医学的不断进步,人们提出了新的生物标志物和诊断参数,在这篇综述中,我们研究了目前可用于检测肝移植术后免疫功能的指标及方案。

2. 免疫状态监测策略

2.1. 血药浓度检测

肝移植术后患者常用免疫抑制剂如钙神经蛋白抑制剂(calcineurin inhibitor, CNI)类药物,环孢素和他克莫司是肝移植术后维持治疗中最常用的两种药物,通过抑制钙神经蛋白的磷酸酶活性从而抑制了T细胞的激活,但由于钙神经蛋白和核因子激活T细胞的途径不是T细胞特异性的,钙神经蛋白抑制剂往往

与明显的毒性有关[9]。特别是他克莫司的糖尿病发生率很高, 而环孢素则与高血压和血脂异常的增加有关[10]。此外, 这两种药物都与终末期肾衰竭有关, 而终末期肾衰竭可使 20%的病人在肝移植术后并发[11]。他克莫司(>90%)和环孢素(>50%)集中在红细胞中, 因此使用全血来测量治疗药物的水平[12]。大多数中心使用 ELISA 来测量他克莫司的谷值水平, 由于 CNI 的剂量相关性较差, 疗效关联不可预测, 个体药代动力学差异较大, 疗效-毒性关系不明确[13] [14]。即使 CNI 水平低于“治疗范围”, 也会出现副反应。鉴于免疫测定法确定的药物水平与免疫抑制药物的疗效或免疫抑制水平不相关[14] [15] [16], 美国食品和药物管理局(FDA)甚至对测量他克莫司和环孢素血液水平的检测方法进行了重新分类, 指出不存在合适的治疗范围, 不应单独使用这些测试来调整药物剂量[17]。除了 CNI 药物, 包括麦考酚酸(mycophenolic acid, MPA), 如麦考酚酸肠溶片、吗替麦考酚酯胶囊; 雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR), 如西罗莫司、依维莫司; 以及糖皮质激素等。通常通过上述药物单药或联合应用来作为肝移植术后免疫抑制治疗的基础方案[18]。

通过血药浓度的监测, 的确有利于找到合适的血药浓度, 从而指导免疫抑制剂的应用, 但即使每一种药物的生物活性能够准确地确定, 这也不能提供一个客观的免疫功能标志物, 因为药物之间的交叉反应作用仍不确定, 所以血药浓度可能会继续协助临床医生管理病人, 而作为未来肝移植术后免疫状态监测的主要方法不太可能。

2.2. 抗原特异性检测

包括供体特异性分析, 混合淋巴细胞反应检测, 酶联免疫吸附斑点检测及嵌合体细胞检测, 以上检测方法要么需要大量的实验室工作, 要么和临床的相关性不一致, 其在临床人群中的有效性并不确定, 从而并不能成为可靠的免疫监测工具被广泛接受[19]。

2.3. 非抗原特异性监测

2.3.1. Cylex 免疫细胞功能评估方法

由于免疫抑制药物针对的是 T 细胞功能, 因此评估 T 细胞的功能作为监测移植后免疫功能提供了一个潜在的生物标志物。CD4⁺ T 淋巴细胞是启动肝移植排斥反应的关键因素之一, 通过监测 CD4⁺ T 淋巴细胞内的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)的活性来反映细胞免疫的功能。ImmuKnow (Cylex Ltd, United State)被作为开发为生物标志物用于指导器官移植后的免疫抑制剂用量, 2002 年获美国食品药品监督管理局批准。研究发现, 肝移植术后将 CD4⁺ T 淋巴细胞内的 ATP 值调整至 175~300 ug/L, 免疫抑制剂用量最少, 排斥反应不会增加, 并肝癌复发和转移风险降到最低。因此在血药浓度的监测下, 通过 Cylex 免疫细胞功能检测, 有利于肝移植术后免疫抑制剂使用及预防肝癌的复发及转移, 但需要更多的证据证明[18]。一项针对肝移植患者的荟萃分析, 确定了 4 项研究评估 ImmuKnow 预测感染风险和排斥反应的敏感性和特异性[20]。未得到诊断排斥反应的结论。有几项纳入 ImmuKnow (ImmuKnow Immune cell function assay)的研究存在问题, 但是由于是唯一的检测方法, 一些中心仍采用此方法。需要一个大型的、正式的、多中心的随机对照试验解决 ImmuKnow 作为肝移植患者免疫功能的客观标志物的能力问题。

2.3.2. 细胞因子监测

细胞因子主要是从肝脏先天免疫细胞产生(如 IL-10、IL-6、TNF- α 等), 通过检测结果反应免疫细胞的功能, 从而体现机体免疫系统的功能状态。然而选择哪种细胞因子作为标志, 仍然存在很大争议。

2.3.3. CTC/CTM 检测

外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)是 1869 年澳大利亚学者 Ashworth 尸检时发现存在于血液中类似肿瘤细胞所首次提出的概念, 而 3 个及以上 CTC 细胞聚集在一起的细胞团块称为循环肿瘤微

栓子(circulating tumor microemboli, CTM)。研究认为肝癌肝移植术后的复发转移, 主要原因是血行转移, 尤其是经门脉系统发生的转移, 而 CTC 在肿瘤转移过程中发挥了重要作用。近年来, 越来越多的研究者将 CTC 作为目前肿瘤的液态活检的“三架马车”之一, 在符合米兰标准的肝移植受体中, 部分肿瘤直径小于 2 cm 的早期 HCC 患者也可以检测出 CTC, 说明 CTC 是独立于肿瘤数目、血管侵犯等肝癌肝移植指征之外的危险因素。肝移植术后服用免疫抑制剂, 因长期处于免疫抑制状态, 使得 CTC 凋亡数目减少, 存活率增加, 从而使得肝癌肝移植术后复发和远端转移的可能性增加, 选择较低水平的 CTC 患者作为移植受体是降低复发转移的关键。CTC/CTM 检测不仅对拟肝移植手术的肝癌患者评估预后提供了新的诊断方法, 而且对肝癌肝移植术后患者的免疫状态评估, 降低复发转移率也尤为关键[21]。

2.3.4. 调节性 T 细胞(Treg)检测

在器官移植领域, 有效地减少排斥反应和诱导耐受是免疫学领域的一个挑战。肝脏作为免疫特权器官, 在移植后具有较高的自发耐受率和手术耐受率, 使其长期维持其正常的功能, 而 Tregs 在调节免疫平衡中起着关键作用, 主要通过细胞接触或间接分泌细胞因子来调节平衡。Tregs 与移植后自发免疫耐受有关, 在肝癌肝移植术后患者中可检测到大量的 Tregs 及在历经急性排斥反应的患者中, 这些调节 T 细胞水平较低, 而完全脱离免疫抑制患者在移植物和外周循环中的数量较高。有证据表明 Tregs 通过直接移植效应 T 细胞参与免疫耐受。近年来, 这也可作为诱导免疫耐受的一种疗法, 多个中心应用体外诱导的 Tregs 应用于诱导肝移植患者的早期或晚期耐受, 并取得了一些进展[22]。

2.3.5. 临床并发症

对肝移植术后药物剂量和免疫抑制的主要影响因素之一是出现并发症。特别是移植后发生败血症或恶性肿瘤的患者, 其免疫抑制通常会根据经验减少, 而出现排斥反应的患者需要增加药物治疗。这只是一直监测免疫抑制的粗略方法[19]。

2.3.6. 活检

根据班夫标准[23], 急性排斥反应是通过组织学诊断的, 与肝脏生物化学相比, 活检更能直观的反映当前的免疫反应, 这也是评估移植器官内免疫活动程度的金标准。但是活检是侵入性操作, 在研究环境之外是不现实的[24]。

3. 现状分析及趋势预测

过去十年中, 诺贝尔生理学和医学奖多数颁给了免疫和细胞研究的专家。免疫科学技术的进步, 特别是干细胞和免疫细胞的临床应用前景, 不仅带来了肿瘤治疗模式的转变, 在其它疾病治疗和健康管理方面, 也带来划时代的变革。

而近几年, 学术界面临的问题是如何做到可量化的全面评估免疫力。学术领域对这方面的研究相对较少, 目前还没有公认的世界范围内免疫力评估的标准技术体系。临床上, 血常规是一个基本的免疫状态评估方法, 即便如此, 国内多数临床医生还不会很好判断血常规里淋巴细胞绝对值和相对值的临床价值。而且如何应用这些数据, 如何分层指导病人治疗, 没有具体可行方案。近几年开展免疫技术检测, 主要是检测淋巴细胞亚群, 一般局限于 CD4⁺ T、CD8⁺ T、B 细胞、NK 细胞等常见指标或者开展抗体、补体、细胞因子检测等。这些对于某些特定疾病的诊断有帮助, 对于判断人整体免疫状态, 帮助不大。总的来说, 不论学术界还是临床应用方面, 目前没有可量化的全面的免疫状态评价标准体系, 因此无法判断人体的整体免疫能力, 也就不能很好的指导临床治疗和健康管理。有中心通过有逻辑性的选择淋巴细胞亚群, 通过淋巴细胞功能和数量分析, 建立统一的数学算法模型, 形成了一个最终的免疫评分。因此推出一个成功的应用于临床的免疫监测评估体系, 即铭道全面免疫状态评估分析技术(MICA)和铭道免

疫量化评分体系(MISS) [25], 这项技术可以说是填补了医学界的空白, 是创新的免疫学技术进步。建立全面的免疫评估体系可能是未来肝癌肝移植术后免疫状态评估发展的趋势。

4. 总结

肝移植术后的免疫功能监测仍然是一个困难的领域, 但即使是很小的进展也可能会显著改善当今肝移植后患者的发病率和长期死亡率。已经考虑了许多免疫监测的选择, 方法不同, 从预测临床并发症的风险到不同剂量的免疫抑制剂浓度的检测等等。没有一种方法或测定能够在满足基本技术要求的同时满足诊断要求: 一种标准化、可重复、具有成本效益、易于执行且直观的测定[24]。根据执行的难易程度、精度、特异性、可重复性和成本, 以及它们提供的信息类型, 大多数承诺的程度各不相同[26]。可能需要在不同时间对同一患者进行多次检测或联合检测, 以区分未来的准确免疫学特征[27]。特别是, 结合免疫系统两个分支(先天性和适应性)的检测可以为临床医生提供更全面的患者免疫状态。在没有可用的免疫功能客观标志物的情况下, 全血被认为是最好的检测方法, 药物水平、肝脏生化和临床并发症通常被用来指导免疫治疗, 但是这种方法很粗糙, 药物副作用和临床并发症仍然很常见[28]。尽管 ImmuKnow 检测提供了方法, 获得了 FDA 的批准, 但一些相互矛盾的结果限制了它的广泛接受。鉴于之前进行的许多试验中的问题, 因此, 没有单一的检测可体现机体整体的免疫状态。因此, 需要一个系统的、全面的免疫评估体系将数据汇集在一起, 以实现个体化免疫抑制治疗, 在肝癌肝移植患者中客观地评估免疫功能和临床并发症风险, 在实体肿瘤治疗、自体免疫性疾病治疗、器官移植药物管理等疾病的临床治疗中, 动态监控个体免疫状态的变化, 建立临床治疗的评估和指导参照指标, 能够提高移植患者的生存质量, 降低免疫移植药物的并发症, 减少肿瘤发生概率。

参考文献

- [1] Neuberger, J. (2000) Liver Transplantation. *Journal of Hepatology*, **32**, 198-207. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(00\)80426-2](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(00)80426-2)
- [2] Sudan, D.L., Venkataramani, A., Lynch, J., et al. (1999) Causes of Late Mortality in Survivors of Liver Transplantation. *Transplantation*, **67**, S564. <https://doi.org/10.1097/00007890-199905150-00110>
- [3] Rabkin, J.M., de La Melena, V., Orloff, S.L., et al. (2001) Late Mortality after Orthotopic Liver Transplantation. *The American Journal of Surgery*, **181**, 475-479. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(01\)00595-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(01)00595-5)
- [4] Gelson, W., Hoare, M., Dawwas, M.F., et al. (2011) The Pattern of Late Mortality in Liver Transplant Recipients in the United Kingdom. *Transplantation*, **91**, 1240-1244. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31821841ba>
- [5] Asfar, S., Metrakos, P., Fryer, J., et al. (1996) An Analysis of Late Deaths after Liver Transplantation. *Transplantation*, **61**, 1377-1381. <https://doi.org/10.1097/00007890-199605150-00016>
- [6] Wallia, A., Parikh, N.D., Molitch, M.E., et al. (2010) Posttransplant Hyperglycemia Is Associated with Increased Risk of Liver Allograft Rejection. *Transplantation*, **89**, 222-226. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181c3c2ff>
- [7] Gómez-Manero, N., Herrero, J.I., Quiroga, J., et al. (2001) Prognostic Model for Early Acute Rejection after Liver Transplantation. *Liver Transplantation*, **7**, 246-254. <https://doi.org/10.1053/jlts.2001.22460>
- [8] Ziolkowski, J., Paczek, L., Niewczas, M., et al. (2003) Acute Liver Transplant Rejection: Incidence and the Role of High-Doses Steroids. *Transplantation Proceedings*, **35**, 2289-2291. [https://doi.org/10.1016/S0041-1345\(03\)00797-8](https://doi.org/10.1016/S0041-1345(03)00797-8)
- [9] Naesens, M. and Sarwal, M.M. (2010) Monitoring Calcineurin Inhibitor Therapy: Localizing the Moving Target. *Transplantation*, **89**, 1308-1309. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181dc13fa>
- [10] Post, D.J., Douglas, D.D. and Mulligan, D.C. (2005) Immunosuppression in Liver Transplant. *Liver Transplantation*, **11**, 1307-1314. <https://doi.org/10.1002/lt.20614>
- [11] Gonwa, T.A., Mai, M.L., Melton, L.B., et al. (2001) End-Stage Renal Disease (ESRD) after Orthotopic Liver Transplantation (OLT) Using Calcineurin-Based Immunosuppression: Risk of Development and Treatment. *Transplantation*, **72**, 1934-1939. <https://doi.org/10.1097/00007890-200112270-00012>
- [12] Nagase, K., Iwasaki, K., Nozaki, K. and Noda, K. (1994) Distribution and Protein Binding of FK506, a Potent Immunosuppressive Macrolide Lactone, in Human Blood and Its Uptake by Erythrocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **46**, 105-110.

- cology, **46**, 113-117. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1994.tb03752.x>
- [13] Naesens, M., Kuypers, D. and Sarwal, M. (2009) Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, **4**, 481-508. <https://doi.org/10.2215/CJN.04800908>
- [14] Venkataramanan, R., Shaw, L.M., Sarkozi, L., *et al.* (2001) Clinical Utility of Monitoring Tacrolimus Blood Concentrations in liver Transplant Patients. *The Journal of Clinical Pharmacology*, **41**, 542-551. <https://doi.org/10.1177/00912700122010429>
- [15] Rovira, P., Mascarell, L. and Truffa-Bachi, P. (2000) The Impact of Immunosuppressive Drugs on the Analysis of T Cell Activation. *Current Medicinal Chemistry*, **7**, 673-692. <https://doi.org/10.2174/0929867003374778>
- [16] Wieland, E., Olbricht, C.J., Süsal, C., *et al.* (2010) Biomarkers as a Tool for Management of Immuno-Suppression in Transplant Patients. *Therapeutic Drug Monitoring*, **32**, 560-572. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e3181efb3d2>
- [17] US FDA Centre for Devices and Radiological Health (2002) Class II Special Controls Guidance Document: Cyclosporine and Tacrolimus Assays, Draft Guidance for Industry and FDA. Devices DoCL. Rockville.
- [18] Sood, S. and Testro, A.G. (2014) Immune Monitoring Post Liver Transplant. *World Journal of Transplantation*, **4**, 30-39. <https://doi.org/10.5500/wjt.v4.i1.30>
- [19] 杨扬, 邓宜南. 肝细胞癌肝移植术后免疫抑制剂的应用[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(2): 263-266.
- [20] Rodrigo, E., López-Hoyos, M., Corral, M., *et al.* (2012) ImmuKnow as a Diagnostic Tool for Predicting Infection and Acute Rejection in Adult Liver Transplant Recipients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Liver Transplantation*, **18**, 1245-1253. <https://doi.org/10.1002/lt.23497>
- [21] 王学浩, 徐静. CTC/CTM 在肝癌肝移植中的应用前景[J]. 医学研究生学报, 2018, 31(1): 1-4.
- [22] Ni, X., Wang, Q., Gu, J., *et al.* (2021) Clinical and Basic Research Progress on Treg-Induced Immune Tolerance in Liver Transplantation. *Frontiers in Immunology*, **12**, Article ID: 535012. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.535012>
- [23] Demetris, A., Adams, D., Bellamy, C., *et al.* (2000) Update of the International Banff Schema for Liver Allograft Rejection: Working Recommendations for the Histopathologic Staging and Reporting of Chronic Rejection. An International Panel. *Hepatology*, **31**, 792-799. <https://doi.org/10.1002/hep.510310337>
- [24] Israeli, M., Klein, T., Brandhorst, G. and Oellerich, M. (2012) Confronting the Challenge: Individualized Immune Monitoring after Organ Transplantation Using the Cellular Immune Function Assay. *Clinica Chimica Acta*, **413**, 1374-1378. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.01.033>
- [25] 寇建涛, 李先亮, 朱继巧, 等. 自创免疫状态量化评分标准评估肝移植受者术后免疫状态的可行性分析[J]. 中华器官移植杂志, 2020, 41(6): 362-366.
- [26] Castellaneta, A., Thomson, A.W., Nayyar, N., de Vera, M. and Maz-ariegos, G.V. (2010) Monitoring the Operationally Tolerant Liver Allograft Recipient. *Current Opinion in Organ Transplantation*, **15**, 28-34. <https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e328334269a>
- [27] Truong, D.Q., Bourdeaux, C., Wieërs, G., Saussoy, P., Latinne, D. and Reding, R. (2009) The Immunological Monitoring of Kidney and Liver Transplant in Adult and Pediatric Recipients. *Transplant Immunology*, **22**, 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2009.09.008>
- [28] Xue, F., Zhang, J., Han, L., *et al.* (2010) Immune Cell Functional Assay in Monitoring of Adult Liver Transplantation Recipients with Infection. *Transplantation*, **89**, 620-626. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181c690fa>