

网络出版时间: 2020-8-21 16:54 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200820.1450.029.html>

◇经验与体会◇

继发性白血病患者 T 细胞亚群检测

叶倩龄, 宋明珠, 王会平, 肖浩, 翟志敏

摘要 采用直接荧光标记法和多参数流式细胞术检测收集的继发性髓系白血病(S-AML)患者不同的T淋巴细胞亚群,例如总T淋巴细胞、辅助性T淋巴细胞、细胞毒性T淋巴细胞、调节性T细胞(Treg cells)和活化效应性T细胞(Teff cells)。Treg和Treg/Teff在S-AML、原发性髓系白血病(P-AML)和健康对照3组之间,差异有统计学意义($P < 0.05$)。急性髓系白血病患者免疫状态存在失衡,且S-AML患者免疫失衡较P-AML更为显著,这可能为将来预防和治疗S-AML提供新的思路。

关键词 急性髓系白血病; T细胞; 流式细胞术; 治疗

中图分类号 R 733.712

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)09-1469-03

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.09.030

急性髓系白血病发病机制复杂,据既往有无治疗和疾病史,通常可将其分为原发性急性髓系白血病(primary acute myeloid leukemia, P-AML)和继发性髓系白血病(secondary acute myeloid leukemia, S-AML)两类。S-AML是指前期存在骨髓增生异常综合征或有明确职业及环境暴露史,或继发于放、化疗之后所形成的白血病^[1]。与P-AML比较, S-AML发病率较低,但治疗过程更为复杂,生存期更短,预后更差^[2]。该文旨在了解与分析S-AML患者的T细胞亚群,为进一步探究其发病机制奠定相关的理论基础。

1 材料与方法

1.1 病例资料 2010年1月~2019年11月安徽医科大学第二附属医院收住的17例S-AML患者、23例P-AML患者。

1.2 主要试剂与仪器 CD25-FITC、CD127-PE、CD4-PC5、CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5试剂盒,以

及相关同型对照抗体购自美国Beckman-Coulter公司;溶血剂为0.83%的氯化铵溶液,由本实验室加去离子蒸馏水自行配制;流式细胞仪为美国Beckman-Coulter公司临床应用型流式细胞仪FC500,分析软件为CXP软件。

1.3 实验方法 外周静脉血2 ml,肝素钠抗凝。采用直接荧光法标记细胞膜表面各个抗原(包括CD3、CD4、CD8、CD25和CD127),检测不同T淋巴细胞亚群比:识别总T淋巴细胞($CD3^+T$ 细胞)、辅助性T淋巴细胞($CD3^+CD4^+T$ 细胞)、细胞毒性T淋巴细胞($CD3^+CD8^+T$ 细胞)、调节性T细胞(Treg细胞, $CD4^+CD25^+CD127^{low}$)和活化效应性T细胞(Teff细胞群, $CD4^+CD25^+CD127^{hi}$)。具体方法如下:取2个试管分别加入抗凝全血100 μ l,其中一管加入检测抗体各10 μ l,另一管加入相应的同型对照抗体各10 μ l,混匀后室温下避光反应15 min;加溶血剂1 000 μ l混匀,室温下放置10 min;立即上流式细胞仪检测。

开机后对流式细胞仪进行光路和流路质量控制和荧光补偿,使仪器各项指标在质量控制的允许值范围。检测样本时根据前向散射光信号(forward sCattering, FSC)和侧向散射光信号(side sCattering, SSC)对淋巴细胞群设门,每份标本获取淋巴细胞10 000个以上,数据以Listmode文件形式保存。

1.4 统计学处理 Excel 2007录入数据,IBM-SPSS 23.0软件进行统计分析,正态分布采用均值标准差描述,组间比较采用单因素方差分析,差异有统计学意义时采用LSD法进行多组间两两比较;偏态分布资料采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 描述,组间比较采用Kruskal-Wallis H检验,差异有统计学意义时采用Mann-Whitney U检验进行多组间两两比较(调整检验水准 $\alpha = 0.017$);定性资料组间比较采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 S-AML患者17例,男10例,年龄

2020-06-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81602914)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院血液内科,合肥 230601

作者简介:叶倩龄,女,主治医师;

翟志敏,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-

mail: zzzm889@163.com

25 ~ 78(56.94 ± 16.52) 岁; 阳性对照组, P-AML 患者 23 例, 男 10 例, 年龄 20 ~ 82(56.74 ± 16.44) 岁; 健康对照 34 例, 男 13 例, 年龄 26 ~ 77(48.38 ± 14.95) 岁。3 组年龄($F = 2.629$, $P = 0.079$)、性别($\chi^2 = 1.961$, $P = 0.375$) 间差异无统计学意义。其中 S-AML、P-AML 诊断均符合世界卫生组织急性髓系白血病诊断标准。S-AML 组患者一般信息见表 1。

表 1 S-AML 组研究对象一般情况

编号	性别	年龄 (岁)	原疾病	转化为 AML 的类型
1	男	46	慢性髓系白血病	AML(未分类)
2	女	56	原发性骨髓纤维化	AML(M2)
3	男	73	骨髓增生异常综合征	AML(M7)
4	女	77	骨髓增生异常综合征	AML(M2)
5	男	61	慢性粒单核细胞白血病	AML(M2)
6	男	62	骨髓增生异常综合征	AML(未分类)
7	男	44	慢性髓系白血病	AML(M2)
8	男	76	骨髓增生异常综合征	AML(M2)
9	女	32	骨髓增生异常综合征	AML(未分类)
10	男	65	骨髓增生异常综合征	AML(未分类)
11	女	25	急性 B 淋巴细胞白血病	AML(未分类)
12	男	38	原发性骨髓纤维化	AML(M5)
13	女	67	骨髓增生异常综合征	AML(M2)
14	男	78	骨髓增生异常综合征	AML(未分类)
15	女	67	直肠癌	AML(未分类)
16	女	40	骨髓增生异常综合征	AML(M2a)
17	男	61	骨髓增生异常综合征	AML(未分类)

2.2 不同 T 淋巴细胞亚群的检测结果 Treg 细胞在 3 组间差异存在统计学意义($P < 0.001$) ,其中 S-AML 组 Treg 水平高于健康对照组与 P-AML 组($P < 0.05$) ,P-AML 组高于健康对照组($P < 0.05$) ; Treg/Teff 比例在 3 组间差异也存在统计学意义($P = 0.014$) ,S-AML 组比值高于健康对照组($P = 0.009$) 。与健康对照组相比, P-AML 和 S-AML 患者其余的 T 细胞亚群包括 CD3⁺CD4⁺T、CD3⁺CD8⁺T

细胞数量及 CD4/CD8 比值差异均无统计学意义($P > 0.05$) ,见表 2。

3 讨论

继发性白血病由外国学者 Smit et al^[3] 于 1970 年首次报道,发病率远低于 P-AML。由于该病致病因素复杂,人们虽对其发病机制进行了近 50 年的探索,然而迄今尚无法明确它的病理机制。现一般被分为两类:一类为实体肿瘤经过综合化疗继发的 S-AML,认为与拓扑异构酶抑制剂、烷化剂等化疗治疗相关;另一类则由多种髓系相关血液疾病转化形成,包括骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)、原发性骨髓纤维化(primary myelofibrosis, PMF)、慢性髓系白血病(chronic myeloid leukemia, CML)等,其中以 MDS 为主,这一类疾病均有着不同程度向急性白血病转化的风险。

MDS 是一组起源于异质性恶性造血干祖细胞的克隆性疾病,特征包括血细胞异型增生、无效造血,多见于老年人,具有程度不一的急性白血病转化风险;造血细胞从正常的干细胞转化成 MDS 细胞是一个复杂的过程,包括基因突变、抑癌基因缺失或功能不全、以及与分化增殖有关的信号传导异常等^[4]。PMF、CML 等这一类骨髓增殖性疾病,其主要特点包括骨髓纤维组织增生,一系或多系髓系细胞过度增殖以致外周血过度聚集,疾病终末期多形成无效造血及转化为急性白血病^[5-6]。相较于原发性白血病,上述髓系血液系统疾病患者一旦转化为急性白血病,自然病程更短,对化疗药物反应敏感性及其反应性均较差,给临床治疗带来极大困难。Treg 细胞是机体内一群特殊的免疫细胞,在人类外周血 CD4⁺T 细胞中不足 10%,但具有免疫抑制和免疫无能功能,被认为在肿瘤性疾病中发挥着重要作用^[7]。现已发现,在肺癌、乳腺癌、卵巢癌、消化系

表 2 S-AML、P-AML 与对照组 T 淋巴细胞亚群各亚群检测结果($\bar{x} \pm s$)

变量	S-AML 组($n = 17$)	P-AML 组($n = 23$)	健康对照组($n = 34$)	F/χ^2	P
年龄(岁)	56.94 ± 16.52	56.74 ± 16.44	48.38 ± 14.95	2.629	0.079
CD3 ⁺ T%	73.61 ± 20.26	71.35 ± 11.15	72.15 ± 9.08	0.150	0.861
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T%	37.48 ± 15.46	41.64 ± 11.84	40.82 ± 7.94	0.734	0.483
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T%	32.38 ± 13.11	27.75 ± 9.24	27.57 ± 8.22	1.519	0.226
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T/CD3 ⁺ CD8 ⁺ T	1.31 ± 0.76	1.69 ± 0.77	1.64 ± 0.64	1.661	0.197
Treg/CD4 ⁺ T	6.21 ± 1.57 ^a	4.86 ± 1.14	4.01 ± 1.53 ^{ab}	13.411	<0.001
Teff/CD4 ⁺ T	4.31 ± 2.34	3.72 ± 0.99	3.66 ± 1.50	0.992	0.376
Treg/Teff	1.54(1.11, 2.51)	1.36(0.99, 1.62)	1.06(0.88, 1.43) ^b	8.477 ^c	0.014

与 P-AML 组比较: ^a $P < 0.05$; 与 S-AML 组比较: ^b $P < 0.05$; ^c: 非参数检验

统肿瘤、急性淋巴细胞白血病等多种肿瘤性疾病中, Treg 细胞水平均明显升高^[8-9], 这可能是因为 Tregs 细胞能够抑制 T、B 淋巴细胞、NK、NKT 等多种免疫细胞功能, 导致机体处于免疫抑制状态, 从而使肿瘤发生的风险升高^[10-11]。

因此, 对 S-AML 这种血液肿瘤的 Treg 细胞进行检测与分析有着重要的临床意义。本研究表明, S-AML 患者的 Treg 细胞比例及 Treg/Teff 细胞比值明显高于健康对照及 P-AML, 提示这一类型白血病免疫状态向抑制性偏移, 其免疫失衡更为严重。Treg 细胞的改变可能是 S-AML 形成的重要诱因之一, 同时, S-AML 患者化疗效果不佳及生存期短也极有可能是由 Treg 细胞的改变造成的。

现今, 随着免疫学新技术的快速发展, 去除机体某些特定细胞的技术日臻成熟。近期已有学者^[12]提出在治疗急性白血病及其它恶性肿瘤过程中, 可以将对 Treg 细胞水平的调控作为一个新的潜在靶点。而 S-AML 患者免疫状态更为失衡, 外周血 Treg 细胞数量异常升高, 降低或去除机体 Treg 细胞, 使机体免疫抑制状态解除, 以及通过各种方式提高机体免疫功能, 都有可能成为今后延缓 S-AML 病程, 甚至达到治疗目的的手段。而在大剂量化学治疗的同时, 找到如何调控机体免疫平衡这一研究亮点可能也为治疗该类白血病提供新的方向。

参考文献

[1] Arber D A, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms

and acute leukemia[J]. *Blood*, 2016, 127(20): 2391-405.

[2] 程平, 关军, 周英, 等. 继发性白血病 15 例临床分析[J]. *白血病·淋巴瘤*, 2019, 28(7): 431-3.

[3] Smit C G, Meyler L. Acute myeloid leukaemia after treatment with cytostatic agents[J]. *Lancet*, 1970, 2(7674): 671-2.

[4] Masala E, Valencia-Martinez A, Pillozzi S, et al. Severe hypoxia selects hematopoietic progenitors with stem cell potential from primary Myelodysplastic syndrome bone marrow cell cultures[J]. *Onco-target*, 2018, 9(12): 10561-71.

[5] Widick P, Winer E S. Leukocytosis and leukemia[J]. *Prim Care*, 2016, 43(4): 575-87.

[6] Meier B, Burton J H. Myeloproliferative disorders[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2017, 31(6): 1029-44.

[7] Ohue Y, Nishikawa H. Regulatory T(Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(7): 2080-9.

[8] Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity[J]. *Int Immunol*, 2016, 28(8): 401-9.

[9] Idris S Z, Hassan N, Lee L J, et al. Increased regulatory T cells in acute lymphoblastic leukaemia patients[J]. *Hematology*, 2016, 21(4): 206-12.

[10] 解丰, 梁瑞, 李丹, 等. 调节性 T 细胞及其在抗肿瘤免疫疗法中的临床应用[J]. *Engineering*, 2019, 5(1): 284-301.

[11] Aggarwal N, Swerdlow S H, TenEyck S P, et al. Natural killer cell(NK) subsets and NK-like T-cell populations in acute myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016, 90(4): 349-57.

[12] Niedzwiecki M, Budzilo O, Adamkiewicz-Drozynska E, et al. CD4(+) CD25(high) CD127(low / -) FoxP3(+) regulatory T-cell population in acute leukemias: A review of the literature[J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019: 2816498.

Detection of T cell subsets with secondary leukemia

Ye Qianling, Song Mingzhu, Wang huiping, et al

(Dept of Hematology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Direct fluorescence labeling and multiparameter flow cytometry were used to detect different T lymphocyte subsets such as total T lymphocytes, helper T lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes, regulatory T cells(Treg cells) and activated effector T cells(Teff cells) in patients with secondary myeloid leukemia retrospectively. By comparing secondary acute myeloid leukemia(S-AML), primary acute myeloid leukemia(P-AML) and healthy control group, the differences in Treg and Treg/Teff among the three groups were found to be statistically significant ($P < 0.05$). There was an imbalance in the immune status of patients with acute myeloid leukemia. Moreover, the immune imbalance was even more pronounced in s-aml patients, which might provide new ideas for the prevention and treatment of S-AML in the future.

Key words acute myeloid leukemia; T cells; flow cytometry; treatment