

髓源性抑制细胞在急性白血病中的表达及临床意义

朱凤凤, 王会平, 许旋旋, 王芝涛, 王极宇, 陶千山, 翟志敏

摘要 目的 研究外周骨髓源性抑制细胞(MDSCs)在急性B淋巴细胞白血病中(B-ALL)的表达及临床相关性。方法

收集85例确诊B-ALL患者(缓解组34例,未缓解组51例)和15例健康对照者,采用流式细胞术(FCM)检测外周血中MDSCs的表达水平。结果 未缓解组M-MDSCs水平高于缓解组及健康对照组($P < 0.05$);未缓解组及缓解组G-MDSCs水平均高于健康对照组($P < 0.05$),且未缓解组G-MDSCs水平高于缓解组($P < 0.05$);高危组M-MDSCs表达水平高于中危组($P < 0.05$);有中枢侵犯的B-ALL患者较无中枢侵犯的G-MDSCs升高($P < 0.05$);与预后良好患者相比,预后不良患者M-MDSCs水平升高($P < 0.05$);在G-MDSCs中,预后不良及中间组均高于预后良好组($P < 0.05$)。结论 B-ALL患者外周血中MDSCs的水平变化可能与该病的发生发展密切相关,且对判断患者预后存在一定价值。

关键词 髓源性抑制细胞;急性B淋巴细胞白血病;流式细胞术

中图分类号 R 552

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)03-0471-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.029

急性B淋巴细胞白血病(acute B lymphocytic leukemia, B-ALL)是来源于前体B细胞的恶性肿瘤,在儿童中发病率最高^[1]。尽管大多数患儿可通过化疗治愈,但复发患者仍有很高的死亡风险,且成人的临床治疗效果更差^[2]。髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)是由骨髓祖细胞和未成熟骨髓细胞组成的异质细胞群。在健康个体中,骨髓中产生的未成熟骨髓细胞快速分化为成熟粒细胞、巨噬细胞或树突细胞。相反,在例如癌症、传染病及一些自身免疫性疾病中,未成熟骨髓细胞向成熟骨髓细胞分化的部分被阻断,导致未成熟骨髓细胞的扩增。这些具有免疫抑制活性的未成熟骨髓细胞群统称为MDSCs^[3]。在人类中,MDSCs最

常被定义为表达共同骨髓标志物CD33和CD11b,但缺乏HLA-DR表达的细胞^[4]。由于它们的异质性,MDSCs可以进一步分为2个亚型:单核细胞来源的MDSCs(M-MDSCs)和粒细胞来源的MDSCs(G-MDSCs)^[5]。M-MDSCs以非特异性方式抑制T细胞反应,主要通过上调精氨酸酶-1和一氧化氮合酶的表达^[6];G-MDSCs通过增强活性氧的产生来抑制T细胞的应答^[7-8]。针对血液系统恶性肿瘤中的MDSCs已经显示出减缓疾病进展的作用^[9]。然而,MDSCs在B-ALL发病机制中的作用仍然不是很清楚。课题组推测MDSCs作为一种免疫抑制细胞,可能在该病的进程中发挥重要作用。故该文旨在研究B-ALL患者外周血中MDSCs的表达及与疾病发展的关系,探讨该细胞在B-ALL患者疾病进展中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 病例资料 收集2017年12月~2018年9月期间于安徽医科大学第二附属医院治疗的B-ALL患者85例(缓解组34例,未缓解组51例),健康对照者15例,性别及年龄差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表1。B-ALL相关诊断参照2008年世界卫生组织(WHO)诊断标准进行细胞形态学、免疫表型、细胞遗传学和分子生物学确诊和分型。经标准化诱导方案化疗后,复查骨髓及外周血,评估临床疗效,疗效评估参照NCCN临床实践指南:急性淋巴细胞白血病(2017.V5)。排除标准:合并其他实体肿瘤、血液系统疾病及自身免疫性疾病;合并各种严重感染;妊娠或哺乳期妇女;合并其他严重的全身性疾病。

表1 各组的一般临床特征($\bar{x} \pm s$)

项目	健康对照 (n=15)	缓解组 (n=34)	未缓解组 (n=51)	χ^2 / F 值	P值
性别(男/女)	6/9	17/17	33/18	3.624	0.163
年龄(岁)	32.54 ± 13.01	41.65 ± 18.99	38.18 ± 13.40	0.475	0.624

1.2 方法

1.2.1 外周血中MDSCs水平的测定 入组患者清

2019-12-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81670179)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院血液科,合肥 230601

作者简介:朱凤凤,女,硕士研究生;

翟志敏,女,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:zzzm889@163.com

晨空腹抽取静脉血,依次向流式管中加入荧光标记抗体 CD10-FITC、CD14-PE、HLA-DR-ECD、CD33-APC、CD45-PC7,再加入静脉血 50 μl,处理完成后用 CytoFLEX 流式细胞仪进行检测,分析 CD14⁺HLA-DR⁻及 CD10-HLA-DR⁻细胞分别占外周血单个核细胞的百分率,并作为 M-MDSCs 和 G-MDSCs 的细胞比例。

1.2.2 B-ALL 患者骨髓及外周血中微小残留病变 (minimal residual disease, MRD) 水平的测定 抽取患者静脉血或骨髓,依次向流式管中加入荧光标记抗体 CD34-FITC、CD10-PE、CD19-APC、CD45-PC7,同时加入抗凝血或骨髓 50 μl,处理完成后用流式细胞仪进行检测,记录 CD10⁺CD19⁺细胞占单个核细胞的百分比。

1.2.3 临床相关指标检测 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、白细胞介素-6 (interleukin6, IL-6) 等检测指标均在安徽医科大学第二附属医院临床检验医学中心进行。

1.3 统计学处理 所有的原始数据经检查核对后均采用 SPSS16.0 和 Prism 6.0 统计软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。若两组数据均符合正态分布且并具有方差齐性,则采用 *t* 检验来检验两组之间的差异;若不符合正态分布,则采用 Mann-Whitney U 非参数检验;定性资料采用 χ^2 检验;相关性分析采用 Spearman 秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 B-ALL 患者外周血 MDSCs 水平与健康对照组比较 对 B-ALL 患者进行临床疗效评估后,分为缓解组及未缓解组,分析显示未缓解组 M-MDSCs 高于健康对照组及缓解组 ($P < 0.05$);缓解组 M-MDSCs 与健康对照组相比呈上升趋势。未缓解组及缓解组 G-MDSCs 均高于健康对照组 ($P < 0.01$);未缓解组 G-MDSCs 高于缓解组 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 B-ALL 患者不同危险度之间 MDSCs 的比较

将 85 例 B-ALL 患者根据危险度分级分为中危、高危及极高危 3 组。分析 3 组患者外周血 MDSCs 可得:高危组 M-MDSCs 高于中危组 ($P < 0.05$),极高危组 M-MDSCs 与高危组相比呈下降趋势,但差异无统计意义。在 G-MDSCs 中,随着危险度的升高,G-MDSCs 水平也呈升高趋势,各组间均无统计学意义。见图 2。

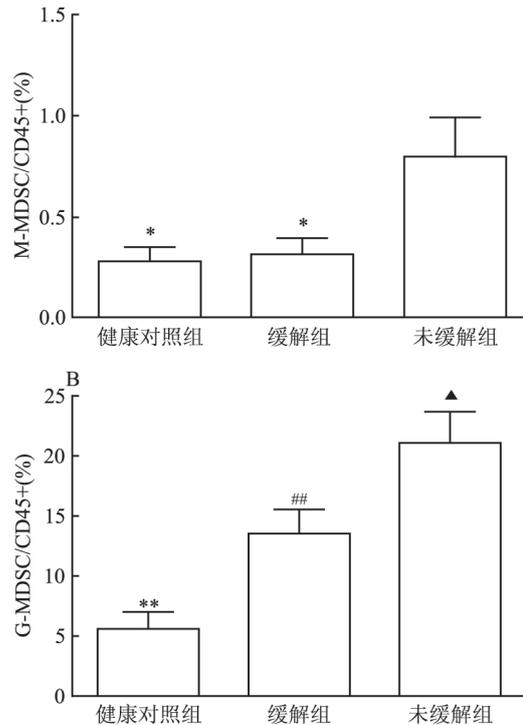


图1 健康对照组及 B-ALL 患者外周血中 MDSCs 占 CD45⁺ 细胞的比例
与未缓解组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与健康对照组比较: ## $P < 0.01$;与缓解组比较: ▲ $P < 0.05$

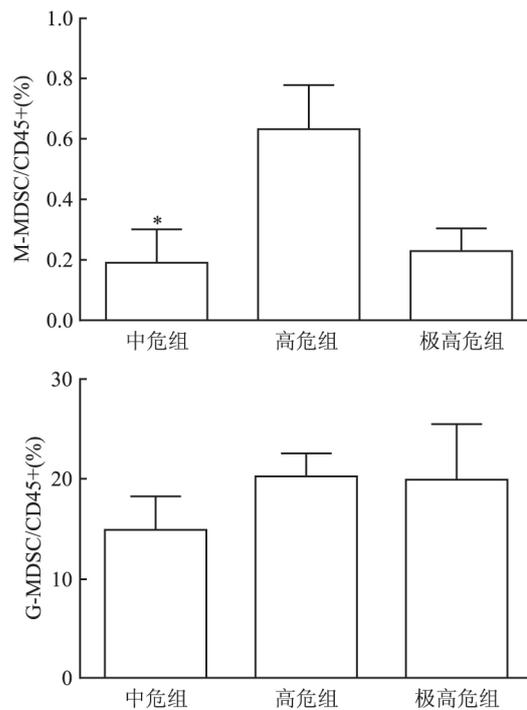


图2 B-ALL 患者不同危险度之间 MDSCs 的比较
与高危组比较: * $P < 0.05$

2.3 B-ALL 患者有无中枢侵犯之间 MDSCs 的比较 比较 B-ALL 有中枢侵犯及无中枢侵犯患者之

间 MDSCs 的表达可得:有中枢侵犯的 B-ALL 患者较无中枢侵犯的 B-ALL 患者 G-MDSCs 升高 ($P < 0.05$), M-MDSCs 水平则呈下降趋势,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。

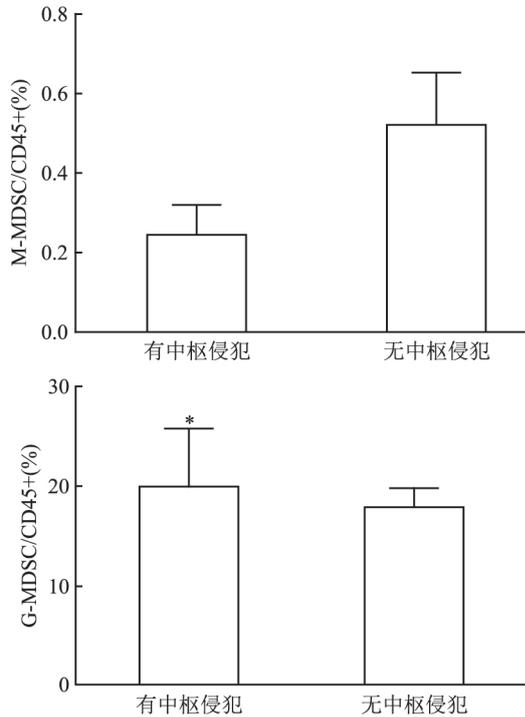


图3 B-ALL 患者有/无中枢侵犯之间 MDSCs 的比较
与无中枢侵犯比较: * $P < 0.05$

2.4 B-ALL 患者不同预后之间 MDSCs 的比较

参照 NCCN 临床实践指南:急性淋巴细胞白血病 (2017. V5) 评估 B-ALL 患者预后情况,比较预后良好、中间组及预后不良 3 者 MDSCs 水平显示,预后不良与预后良好组相比 M-MDSCs 水平升高 ($P < 0.05$) 随着预后变差, M-MDSCs 呈一个上升趋势;在 G-MDSCs 中,预后不良组及中间组高于预后良好组 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 B-ALL 患者外周血中 MDSCs 水平与骨髓及外周血 MRD 之间的相关性分析 对 B-ALL 患者外周血 M-MDSCs 水平与骨髓及外周血 MRD 进行相关性分析,可以得出骨髓 MRD 水平与外周血 M-MDSCs 及 G-MDSCs 均呈正相关 ($P < 0.024$ $P < 0.05$)。而外周血 MRD 与 B-ALL 患者 M-MDSCs 及 G-MDSCs 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.6 B-ALL 患者外周血 MDSCs 与临床指标之间的相关性分析 通过对 B-ALL 患者外周血 MDSCs 水平与患者的 LDH 水平进行相关性分析可以得出, M-MDSCs 与 LDH 无相关性 ($P > 0.05$), G-MDSCs

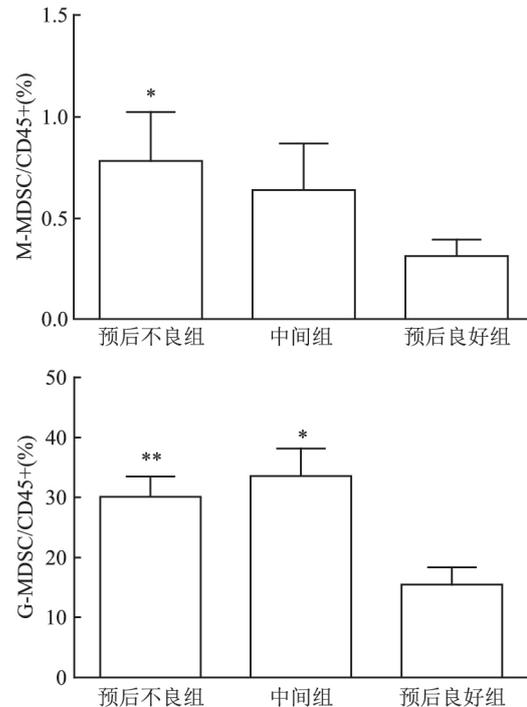


图4 不同预后 B-ALL 患者外周血中 MDSCs 的表达水平
与预后良好组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

水平与 LDH 呈正相关 ($P < 0.05$); M-MDSCs 和 G-MDSCs 与 IL-6 均呈正相关 ($P < 0.05$ $P < 0.05$)。

3 讨论

MDSCs 最早在小鼠的 Lewis 肺癌模型中被发现^[10],因此在肿瘤疾病中的研究成为重点。Ornstein et al^[11] 研究发现肿瘤患者外周血 MDSCs 的表达水平显著高于健康人群,外周血 MDSCs 的表达水平与肿瘤分期成正相关,存在远处转移的 IV 期肿瘤患者外周血 MDSCs 的表达水平显著增加。MDSCs 的扩增和活化由肿瘤微环境分泌的可溶性因子驱动。这些因素包括 IL-6、粒细胞刺激因子和血管内皮生长因子等^[12]。扩增的 MDSCs 通过抑制效应免疫细胞和(或)诱导调节性免疫细胞或免疫抑制细胞因子的产生,对抗肿瘤免疫力发挥强大的抑制作用^[13]。因此,MDSCs 的消耗可以增强当前临床治疗的效果,包括化疗和免疫治疗。在慢性粒细胞白血病患者中,较高水平的 MDSCs 可能会干扰免疫治疗的效果,慢性粒细胞白血病患者 M-MDSCs 水平显著增加,并且 MDSCs 的数量与患者的肿瘤进展和预后相关^[14]。在多发性骨髓瘤患者的骨髓和外周血中,MDSCs 的频率也明显增加,且 MDSCs 的频率与多发性骨髓瘤的疾病进展相关,并诱导患者的全身免疫

抑制^[15]。B-ALL 来源于骨髓内的恶性前体 B 细胞。因此白血病细胞如何直接驱动骨髓中 MDSCs 的扩增或扩增的 MDSCs 是否可直接影响白血病细胞的生长值得进一步研究。

本实验借助 B-ALL 患者,从外周血 MDSCs 的表达水平及其与疾病预后指标的相关性入手,探讨 MDSCs 在 B-ALL 的临床意义。通过比较其外周血中 M-MDSCs 及 G-MDSCs 的表达水平,显示未缓解组 M-MDSCs 高于健康对照组及缓解组;未缓解组及缓解组 G-MDSCs 均高于健康对照组,未缓解组 G-MDSCs 高于缓解组。借此推断 B-ALL 患者外周血 G-MDSCs 的表达水平可预测疾病的进展,缓解组 MDSCs 水平的减少可成为治疗效果的指标,并且 MDSCs 的表达可能与临床治疗反应相关,有效的临床治疗手段可杀伤肿瘤细胞,抑制 MDSCs 的扩增。因此针对明确诊断的 B-ALL 的患者,应及早行化学治疗或免疫治疗。分析 B-ALL 患者外周血 MDSCs 与疾病危险度及有无中枢侵犯之间的相关性表明:高危组 M-MDSCs 高于中危组;极高危组 M-MDSCs 与高危组相比呈下降趋势。而随着危险度的升高,G-MDSCs 也呈上升趋势;中枢侵犯的 B-ALL 患者较无中枢侵犯的患者其 G-MDSCs 升高,M-MDSCs 则呈下降趋势;比较预后良好、中间组及预后不良 3 者 MDSCs 水平显示,预后不良与预后良好组相比 M-MDSCs 水平升高,预后越差,M-MDSCs 水平越高;G-MDSCs 中,预后不良组及中间组均高于预后良好组,说明升高的 MDSCs 水平与 B-ALL 患者的疾病严重程度、有无中枢侵犯及预后可能呈正相关,外周血 MDSCs 水平对评估患者疾病危险程度及预防白血病中枢侵犯具有一定意义。另外课题组分析了 B-ALL 患者外周血中 MDSCs 水平及其预后临床指标 MRD 及 LDH、IL-6 等指标的相关性。发现其骨髓 MRD 和外周血 LDH、IL-6 水平与 B-ALL 患者外周血 M-MDSCs 或 G-MDSCs 均呈正相关,表明就 B-ALL 患者而言,外周血 MDSCs 水平升高可能是导致 B-ALL 患者易复发、预后差的不良因素之一。

参考文献

- [1] Inaba H, Greaves M, Mullighan C G. Acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Lancet*, 2013, 381(9881):1943-55.

- [2] Fielding A K, Richards S M, Chopra R, et al. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study[J]. *Blood*, 2007, 109(3):944-50.
- [3] Gabrilovich D I, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(3):162-74.
- [4] Greten T F, Manns M P, Korangy F. Myeloid derived suppressor cells in human diseases [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(7):802-7.
- [5] Youn J I, Gabrilovich D I. The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity[J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(11):2969-75.
- [6] Gabrilovich D I, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(4):253-68.
- [7] Youn J I, Collazo M, Shalova I N, et al. Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice [J]. *J Leukoc Biol*, 2012, 91(1):167-81.
- [8] Corzo C A, Cotter M J, Cheng P, et al. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells [J]. *J Immunol*, 2009, 182(9):5693-701.
- [9] De Veirman K, Van Valckenborgh E, Lahmar Q, et al. Myeloid-derived suppressor cells as therapeutic target in hematological malignancies [J]. *Front Oncol*, 2014, 4:349.
- [10] 赵振祥, 李兰玉, 朴冬日, 等. PCR 技术鉴定布氏菌 [J]. *中国地方病防治杂志* 2008, 23(4):251-3.
- [11] Ornstein M C, Diaz-Montero C M, Rayman P, et al. Myeloid-derived suppressors cells (MDSC) correlate with clinicopathologic factors and pathologic complete response (pCR) in patients with urothelial carcinoma (UC) undergoing cystectomy [J]. *Urol Oncol*, 2018, 36(9):405-12.
- [12] Elinav E, Nowarski R, Thaiss C A, et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(11):759-71.
- [13] Marigo I, Dolezzi L, Serafini P, et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells [J]. *Immunol Rev*, 2008, 222:162-79.
- [14] Jitschin R, Braun M, Büttner M, et al. CLL-cells induce IDOhi CD14+ HLA-DRlo myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote TRegs [J]. *Blood*, 2014, 124(5):750-60.
- [15] Görgün G T, Whitehill G, Anderson J L, et al. Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans [J]. *Blood*, 2013, 121(15):2975-87.

不同克隆耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的流行病学分析

左 燕¹, 赵冬梅², 李家斌², 王中新¹

摘要 目的 对不同克隆耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)的感染进行流行病学分析。方法 采用多位点序列分型(MLST)方法对CRKP感染株进行同源性分析,通过聚合酶链式反应扩增其耐药基因,并对感染患者的临床特征进行回顾性分析。结果 共有13种序列分型(STs)检出。ST11型CRKP感染菌株($n=44$)与非ST11型($n=16$)相比,产肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPC)比例明显增高($P < 0.001$),且对氨基糖苷类具有更高的耐药率($P = 0.014$)。单因素分析结果显示既往使用过头孢菌素类($P = 0.049$)及存在合并菌($P = 0.020$)与ST11型CRKP感染可能相关,但多因素分析结果显示差异无统计学意义。结论 ST11型CRKP与KPC的产生显著相关,但不同克隆CRKP感染患者

的临床背景及结局相似。

关键词 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌;多位点序列分型;耐药基因;危险因素;结局

中图分类号 R 183.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)03-0475-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.030

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)在全球范围内的广泛传播已成为严重的公共卫生威胁之一^[1]。在中国,CRKP的患病率也从2005年的3.0%逐步上升到2016年的16.1%,且依然呈上升趋势^[2]。肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类的耐药机制中最主要的是碳青霉烯酶的产生^[3]。产肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(*klebsiella pneumoniae* carbapenemase, KPC)型CRKP的流行及传播已被广泛报道,包括中国^[4-5],而多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)方法的出现更促进了其全球范围内种群结构

2019-12-23 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81673242)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹ 检验科、² 感染科,合肥 230022

作者简介:左 燕,女,硕士研究生;

王中新,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: aywzhx87@163.com

Expression and clinical significance of myeloid suppressor cells in acute leukemia

Zhu Fengfeng, Wang Huiping, Xu Xuanxuan, et al

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

Abstract Objective To study the expression and clinical relevance of peripheral blood myeloid-derived suppressor cells(MDSCs) in Acute B lymphoblastic leukemia(B-ALL). **Methods** Eighty-five patients with confirmed B-ALL and fifteen healthy controls were enrolled. Flow cytometry (FCM) was used to detect the expression of MDSCs in peripheral blood. **Results** The level of M-MDSCs in the un-remission group was higher than that in the remission group and the healthy control group ($P < 0.05$). The G-MDSCs levels in the un-remission group and the remission group were higher than those in the healthy control group ($P < 0.05$), and the levels of G-MDSCs in the un-remission group were higher than those in the remission group ($P < 0.05$). The expression level of M-MDSCs in high-risk group was higher than that in middle-risk group ($P < 0.05$). B-ALL patients with central invasion had significantly higher G-MDSCs than those without central invasion ($P < 0.05$). Compared with patients with good prognosis, the level of M-MDSCs increased in patients with poor prognosis ($P < 0.05$). In G-MDSCs, poor prognosis and intermediate groups were higher than good prognosis group ($P < 0.05$). **Conclusion** The level of MDSCs in peripheral blood of patients with B-ALL may be closely related to the occurrence and development of the disease, and it has certain value for judging the prognosis of patients.

Key words myeloid-derived suppressor cells; acute B lymphoblastic leukemia; flow cytometry