

急性白血病患者外周血 T 细胞亚群、NK 细胞和调节性 T 细胞的检测及临床意义

张司琪, 葛健, 夏瑞祥

摘要 目的 了解急性白血病(AL)患者外周血 T 淋巴细胞亚群、自然杀伤(NK)细胞和调节性 T 细胞(Treg)的水平及不同时期的变化,并探讨其临床意义。方法 采用流式细胞术对 AL 初诊患者(93 例)、异基因造血干细胞移植(Allo-HSCT)者(9 例)及正常健康对照者(30 例)外周血 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值、NK 细胞和 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 进行检测。结果 初诊 AL 患者 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值和 NK 细胞低于正常对照者($P < 0.05$), Treg 细胞高于正常对照者($P < 0.05$); AL 患者治疗后达完全缓解(CR)者 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值、NK 细胞及 Treg 细胞可逐渐恢复,但 NK 细胞恢复缓慢, Treg 细胞在缓解早期较治疗前增高,但差异无统计学意义; Allo-HSCT 患者 CD4⁺T 细胞水平和 CD4⁺/CD8⁺ 比值明显低于正常对照者($P < 0.05$), CD8⁺T 细胞水平明显高于正常对照者($P < 0.05$)。结论 AL 患者存在细胞免疫功能紊乱,动态检测 T 淋巴细胞亚群、NK 细胞及 Treg 对了解 AL 患者细胞免疫功能及免疫调节治疗有一定的临床价值。

关键词 急性白血病; T 淋巴细胞亚群; NK 细胞; 调节性 T 细胞

中图分类号 R 733.71

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)02-0218-04

急性白血病(acute leukemia, AL)是起源于造血干细胞的克隆性恶性血液病,其发生发展与机体免疫紊乱密切相关,尤其是细胞免疫异常。T 淋巴细胞和自然杀伤(natural killer, NK)细胞是细胞免疫的重要组成部分,在抗肿瘤效应中发挥重要作用。

2015-11-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81200371); 高等学校博士学科点专项科研基金联合资助课题(新教师类联合资助课题)(编号: 20123420120011); 安徽省自然科学基金(编号: 1208085QH154)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院血液内科,合肥 230022

作者简介: 张司琪,女,硕士研究生;

葛健,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: gejian77@medmail.com.cn;

夏瑞祥,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: xrx2041@163.com

调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)有免疫调节功能,在肿瘤环境中能够抑制抗肿瘤免疫。该研究对 93 例初诊 AL 患者、9 例异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, Allo-HSCT)患者和 30 例健康对照者进行外周血 T 淋巴细胞亚群、NK 细胞及 Treg 细胞水平进行检测,并动态观察其在 AL 患者治疗前后的变化。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2014 年 7 月 ~ 2015 年 6 月于安徽医科大学第一附属医院血液内科确诊的 93 例初诊 AL 患者(AML 73 例, ALL 17 例, MPAL 3 例),其中男 56 例,女 37 例,年龄 14 ~ 84(50.7 ± 17.57)岁; 9 例 AL Allo-HSCT 者,其中男 7 例,女 2 例,年龄 25 ~ 43(30.67 ± 6.38)岁。正常对照者 30 例,其中男 17 例,女 13 例,年龄 21 ~ 54(32.13 ± 10.00)岁,均为医院体检中心健康体检者。

1.2 主要试剂和仪器 鼠抗人单克隆抗体: CD4-PB、CD8-APC、CD3-FITC/CD(16 + 56) PE、CD45-KO、CD4-FITC、CD25-PC5、CD127-PE,溶血素,磷酸盐缓冲液(PBS),水平离心机,旋窝振荡器,Navios 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

1.3 标本的制备 清晨收集研究对象空腹外周静脉血 3 ml,置于肝素抗凝管中,混匀后取 2 ml 于离心管,置离心机中,1 500 r/min 离心 5 min,吸除最上层血浆后充分混匀。取两支 BECKMAN 离心管,各加入混匀的去血浆抗凝血 100 μl,分别编号为试管 1 和试管 2,试管 1 中加入 10 μl CD4-PB、CD8-APC、CD3-FITC/CD(16 + 56) PE、CD45-KO,试管 2 中加入 10 μl CD4-FITC、CD25-PC5、CD127-PE,涡旋混匀,室温避光放置 15 min。取出后向两支试管中各加入 1 ml 溶血素,旋窝混匀,避光放置 15 min。取出置离心机中,1 500 r/min 离心 5 min 后,弃去上清液,各加入 0.5 ml PBS 溶液旋窝混匀后直接上机,每管收集 2 000 个淋巴细胞。

1.4 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞的检测方法(试管 1) 首先在 FSC-SSC 散点图上圈定淋巴细胞群,以

CD45⁺/SSC 射门,选择 CD45 阳性且 SSC 较小的细胞区,其中 CD3 阳性且 CD4 阳性者为 CD4⁺T 细胞群,CD3 阳性且 CD8 阳性者为 CD8⁺T 细胞群,CD3 不表达且 CD(16+56) 高表达者为 NK 细胞,检测结果以各类细胞占总淋巴细胞的百分率表示。

1.5 Treg 的检测方法(试管 2) 首先在 FSC-SSC 散点图上圈定淋巴细胞群,再以 CD4⁺/SSC 射门,选择 CD4 阳性且 SSC 较小的细胞区,其中 CD25 阳性而 CD127 低表达者为 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组均数的比较采用方差分析,方差齐时采用 LSD 检验,方差不齐采用 Dunnett's T3 检验两两比较各组间差异。

2 结果

2.1 AL 患者基本情况 93 例初诊 AL 患者诱导治疗后完全缓解(CR)者 55 例,部分缓解(PR)者 9 例,未缓解者 19 例,死亡者 3 例,放弃治疗者 7 例。55 例 CR 者为 AL CR(1 个月)组。3 个月后仍 CR 者 49 例,复发两例,失访 4 例,该 49 例为 AL CR(3 个月)组。19 例未缓解者为 AL 未缓解组。

2.2 Allo-HSCT 者基本情况 9 例 AL Allo-HSCT 者为 AL 移植组,均为移植 3~18 个月后来我院复查患者,其造血干细胞来源分别为亲缘全相合 6 例,亲缘非全相合移植 2 例,非亲缘脐血干细胞移植 1 例。检测时患者均处于 CR 状态,其中 3 例患有慢性移植物抗宿主病(chronic graft-versus-host disease, cGVHD),两例表现以皮疹为主,1 例表现以腹泻及肝功能异常为主。

2.3 T 淋巴细胞亚群检测结果 初诊 AL 组、AL CR(1 个月)组、AL CR(3 个月)组、AL 未缓解组、AL 移植组和正常对照组 T 细胞亚群的具体检测结果见表 1,其中 CD3⁺T 细胞水平、CD4⁺T 细胞水平和 CD4⁺/CD8⁺ 比值满足方差齐性 β 组间均数差异均有统计学意义($F = 6.538, 28.513, 17.348, P < 0.05$),CD8⁺T 细胞水平不满足方差齐性 β 组间均数差异有统计学意义($F = 22.498, P < 0.05$)。组间两两比较结果显示:初诊 AL 组和 AL 未缓解组 CD3⁺T 细胞百分比、CD4⁺T 细胞百分比、CD4⁺/CD8⁺ 比值均明显低于正常对照组($P < 0.05$),CD8⁺T 细胞百分比均高于正常对照组,但差异无统计学意义;AL CR(1 个月)组及 AL CR(3 个月)组患者 T 淋巴细胞亚群与正常对照组无明显差异,CD3⁺T 细胞百分比、CD4⁺T 细胞百分比、CD4⁺/

CD8⁺ 比值均高于初诊 AL 组($P < 0.05$),CD8⁺T 细胞百分比低于初诊 AL 组,但差异无统计学意义;AL 移植组 CD3⁺T 细胞百分比与正常对照组无明显差异,CD4⁺T 细胞百分比、CD4⁺/CD8⁺ 比值均明显低于正常对照组($P < 0.05$),CD8⁺T 细胞百分比明显高于正常对照组($P < 0.05$)。见表 1。

2.4 NK 细胞检测结果 各组 NK 细胞占总淋巴细胞的百分率分别为:初诊 AL 组(11.84% ± 6.65%),AL CR(1 个月)组(12.34% ± 7.18%),AL CR(3 个月)组(14.96% ± 7.40%),AL 未缓解组(11.87% ± 7.22%),AL 移植组(16.33% ± 6.67%),正常对照组(16.30% ± 6.10%),满足方差齐性 β 组间均数差异有统计学意义($F = 3.319, P < 0.05$)。组间两两比较结果显示:初诊 AL 组和 AL 未缓解组 NK 细胞百分比均明显低于正常对照组($P < 0.05$);AL CR(1 个月)组 NK 细胞百分比仍低于正常对照组($P < 0.05$);初诊 AL 组和 AL CR(1 个月)组 NK 细胞水平无明显差异;AL CR(3 个月)组 NK 细胞百分比接近正常对照组,高于初诊 AL 组($P < 0.05$);AL 移植组 NK 细胞百分比与正常对照组无明显差异。见表 1。

2.5 Treg 检测结果 各组 Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的百分率分别为:初诊 AL 组(8.31% ± 3.74%),AL CR(1 个月)组(9.67% ± 3.81%),AL CR(3 个月)组(6.69% ± 2.99%),AL 未缓解组(10.33% ± 3.52%),AL 移植组(6.83% ± 3.85%),正常对照组(6.33% ± 2.62%),不满足方差齐性 β 组间均数差异有统计学意义($F = 6.536, P < 0.05$)。组间两两比较结果显示:初诊 AL 组、AL CR(1 个月)组及 AL 未缓解组 Treg 百分比明显高于正常对照组($P < 0.05$);AL CR(1 个月)组及未缓解组 Treg 百分比均高于初诊 AL 组,但差异无统计学意义;AL CR(3 个月)组 Treg 百分比与正常对照组无明显差异,明显低于 AL CR(1 个月)组($P < 0.05$)及 AL 未缓解组($P < 0.05$);AL 移植组 Treg 水平与正常对照组无明显差异。见表 1。

3 讨论

T 淋巴细胞有辅助功能、杀伤功能和抑制功能,其各亚群之间的平衡状态与机体的免疫功能密切相关。CD3 是 T 细胞表面的重要标志,CD3⁺细胞可用于计数 T 淋巴细胞总数。T 细胞亚群包括 CD4⁺T 细胞群和 CD8⁺T 细胞群。CD4⁺T 细胞亚群有免疫协调功能,CD8⁺T 细胞亚群有免疫抑制作用和杀伤

表1 AL患者T淋巴细胞亚群、NK细胞及Treg水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NK (%)	Treg (%)
AL初诊	93	66.12 ± 9.62*	31.44 ± 9.10*	31.27 ± 7.36	1.06 ± 0.46*	11.84 ± 6.65*	8.31 ± 3.74*
AL CR(1个月)	55	71.55 ± 8.22#	38.72 ± 8.29#	30.69 ± 5.58	1.36 ± 0.46#	12.34 ± 7.18*	9.67 ± 3.81*
AL CR(3个月)	49	73.19 ± 9.35#	42.17 ± 8.94#	29.48 ± 5.73	1.50 ± 0.48#	14.96 ± 7.40#	6.69 ± 2.99
AL治疗后未缓解	19	67.29 ± 9.21*	32.09 ± 8.75*	31.76 ± 7.76	1.12 ± 0.51*	11.87 ± 7.22*	10.33 ± 3.52*
AL移植	9	72.08 ± 12.75	17.99 ± 4.48* #	49.24 ± 12.54* #	0.41 ± 0.21* #	16.33 ± 6.67	6.83 ± 3.85
正常对照	30	73.50 ± 6.76#	41.79 ± 7.23#	28.82 ± 6.16	1.54 ± 0.45#	16.30 ± 6.10#	6.33 ± 2.62#

与正常对照比较: * P < 0.05; 与初诊AL组比较: # P < 0.05

靶细胞的功能,CD4⁺/CD8⁺比例稳定对维持细胞免疫反应平衡至关重要。本实验结果显示AL患者CD3⁺T细胞、CD4⁺T细胞、CD4⁺/CD8⁺比值均明显低于正常对照组,提示AL患者存在T淋巴细胞平衡紊乱,细胞免疫功能受到抑制。AL CR患者T细胞亚群各抗原比例接近正常,提示机体细胞免疫功能得到一定程度的恢复。化疗是治疗AL的常规手段,Allo-HSCT是AL患者长期存活的有效治疗方法。研究^[1]显示,化疗对细胞免疫有抑制作用,免疫调节剂(如IL-2)能够改善化疗后白血病患者T细胞亚群水平。Allo-HSCT患者通过大剂量化疗预处理,再回输供者造血干细胞,重建免疫系统,并且需长期使用激素和免疫抑制剂,以防治GVHD。国内外研究^[2-3]显示,Allo-HSCT患者移植后CD8⁺T细胞恢复较快,CD4⁺T细胞恢复较慢,导致CD4⁺/CD8⁺比值长期倒置。本实验结果显示AL Allo-HSCT患者CD4⁺T细胞比值明显降低,CD8⁺T细胞比值明显增高,CD4⁺/CD8⁺比值严重倒置,与研究^[2-3]结果一致,提示AL患者移植后机体细胞免疫功能长期处于抑制状态。

NK细胞有细胞毒功能和免疫调节功能,是感染和抗肿瘤免疫的第一道天然防线^[4]。一项对42例AL患儿的研究^[5]显示,AL患儿在疾病发生和治疗过程中存在细胞免疫功能异常,治疗并获得CR后,患儿细胞免疫功能可逐渐恢复,但NK细胞水平恢复缓慢,获得CR一年后NK细胞水平仍未达到正常。本研究结果显示AL初诊患者NK细胞水平低于正常对照者,提示初诊AL患者NK细胞免疫功能受损,AL CR患者诱导治疗1个月后NK细胞水平未见明显升高,诱导治疗3个月后接近正常,提示NK细胞恢复速度相对缓慢,与上述研究^[5]结果一致。

Treg有免疫抑制性和免疫无能性,其增高或降低与多种机体病理状态相关。Treg细胞高表达可能与多种恶性肿瘤性的不良预后相关^[6],而低表达则与免疫性血小板减少症、溃疡性结肠炎等多种免疫

相关性疾病相关^[7-8]。研究^[9]表明Treg可以抑制抗肿瘤免疫。本研究显示AL初诊患者Treg较正常对照者明显增高,提示AL患者抗肿瘤免疫受到抑制。而本研究中AL CR(1个月)组及AL未缓解组Treg细胞均高于治疗前水平,但差异无统计学意义,提示AL患者诱导治疗后机体免疫可能进一步受抑。可能是因为化疗本身对机体免疫功能有负作用。Treg细胞水平还与aGVHD相关。Magenau et al^[10]的临床实验提示Treg细胞水平可作为aGVHD的生物预测标志。傅华睿等^[11]发现,Allo-HSCT患者在血象恢复后3~5d,Treg/CD4⁺T细胞比例小于7%时,发生aGVHD的风险增大。本实验Allo-HSCT者均为移植3个月后AL患者,其Treg水平与正常对照者无明显差异,可能是因为病例数较少,以及未对移植患者进行无GVHD和cGVHD分组比较相关。早期和动态监测移植患者Treg细胞水平可进一步了解Allo-HSCT患者免疫重建过程及细胞免疫水平。

Treg细胞可能参与T细胞亚群和NK细胞的调节。研究^[12]显示,Treg可以通过促进CD8⁺T细胞免疫应答,抑制NK细胞免疫应答,参与急性髓系白血病的发生发展。本实验结果显示AL初诊组Treg细胞水平高于正常对照组,NK细胞水平低于正常对照组,AL CR(3个月)组Treg细胞及CD8⁺T细胞水平降低,NK细胞水平升高。但AL CR(1个月)组Treg细胞百分比较治疗前稍升高,而NK细胞水平未见下降,CD8⁺T细胞水平未见升高,提示Treg细胞与CD8⁺T细胞、NK细胞并非绝对相关,其之间的关系及机制有待进一步的研究。

综上所述,AL患者在疾病发生及治疗过程中存在细胞免疫功能紊乱,经治疗并获得CR后细胞免疫功能可逐渐恢复。动态检测T淋巴细胞亚群、NK细胞及Treg可反应机体细胞免疫水平,临床上对了解患者细胞免疫功能及免疫调节治疗有一定价值。治疗过程中根据患者T淋巴细胞亚群、NK细胞及Treg水平,适当应用免疫调节剂可能有助于患者恢

复。

参考文献

- [1] 闫铁鹏,张青宜,贺立山. 白血病患者化疗后应用 IL-2 对 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(9): 898-9.
- [2] 洪 鸣,李建勇,钱思轩,等. 异基因造血干细胞移植后免疫重建临床研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2008, 15(6): 1130-4.
- [3] Bae K W, Kim B E, Koh K N, et al. Factors influencing lymphocyte reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children[J]. *Korean J Hematol*, 2012, 47(1): 44-52.
- [4] 王平忠,于海涛,蒋 伟,等. 自然杀伤细胞受体介导抗病毒免疫的分子机制[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(4): 441-3.
- [5] 李学梅,王红心,熊辉霞. 白血病患者外周血 T 细胞亚群检测的临床意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(6): 1521-4.
- [6] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance[J]. *Cell*, 2008, 133(5): 775-87.
- [7] 曹 江,李秀芹,陈 翀,等. 免疫性血小板减少症患者外周血 Th17/Treg 细胞比率失衡的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19(3): 730-3.
- [8] 王 坤,宣秀敏,王 莲,等. 溃疡性结肠炎大鼠外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 的变化及相关性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(3): 354-6.
- [9] 徐 华,王丹波. 诱导调节性 T 细胞与肿瘤免疫研究进展[J]. 免疫学杂志, 2015, 31(4): 353-7.
- [10] Magenau J M, Qin X, Tawara I, et al. Frequency of CD4(+) CD25(hi) FOXP3(+) regulatory T cells has diagnostic and prognostic value as a biomarker for acute graft-versus-host-disease[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010, 16(7): 907-14.
- [11] 傅华睿. 异基因造血干细胞移植后早期 T 细胞免疫重建与移植宿主病[D]. 浙江: 浙江大学, 2013.
- [12] 孔令君,葛 健,夏瑞祥. Treg 和淋巴细胞亚群在急性髓系白血病中的意义[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(4): 512-5.

Detection of T lymphocyte subsets , NK cells , regulatory T cells in peripheral blood of patients with acute leukemia and its clinical significance

Zhang Siqi , Ge Jian , Xia Ruixiang

(Dept of Hematology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

Abstract Objective To study the levels of T lymphocyte subsets , NK cells , regulatory T cells in peripheral blood of patients with acute leukemia , and the changes in different periods , and to explore its clinical significance.

Methods To detect the level of peripheral blood of CD3⁺T cells , CD4⁺T cells , CD8⁺T cells , CD4⁺/CD8⁺ ratio , NK cells and CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg in 93 newly diagnosed AL patients , 9 AL patients after Allo-HSCT and 30 normal controls by using flow cytometry. **Results** The percentages of CD3⁺T cells , CD4⁺T cells , NK cells and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ in newly diagnosed AL patients were much lower than the normal controls($P < 0.05$) , and Treg in newly diagnosed AL patients was much higher than the normal controls($P < 0.05$) . The levels of CD3⁺T cells , CD4⁺T cells , CD4⁺/CD8⁺ ratio , NK cells and Treg in the patients achieved CR were gradually close to the normal controls. But the recovery rate of NK cells was slow , and the level of Treg in early CR period was increased than that of before induction therapy , but it had no statistically significant difference. The level of CD4⁺T cells and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ in the group of Allo-HSCT were significantly lower than the normal controls($P < 0.05$) , and the level of CD8⁺T cells in the group of Allo-HSCT was significantly higher than the normal controls($P < 0.05$) . **Conclusion** Cellular immune function is disordered in patients with AL. Dynamic detection of T lymphocyte subsets , NK cells , regulatory T cells are clinically value on investigating cellular immune function and immune regulation therapy in patients with AL.

Key words acute leukemia; T lymphocyte subsets; NK cells; regulatory T cells