

## 脐血移植患者 T 淋巴细胞内细胞因子的特性研究

杨会志, 朱小玉, 汪 健, 孙自敏

**摘要** 目的 探讨异基因脐血移植后外周血 T 淋巴细胞免疫功能的特点及规律。方法 11 例异基因脐血移植患者分别在移植前、移植后 30、60 和 90 d 取外周血, 将其中 T 淋巴细胞在莫能霉素存在的情况下, 体外经十四烷酰拂波醇乙脂和离子霉素刺激后, 分别进行 CD4-FITC、CD8-FITC 荧光单抗染色和  $\gamma$ -IFN-PE、IL-4-PE 荧光单抗胞内染色, 最后进行流式细胞仪分析。结果 脐血移植后 60 d 的 T 淋巴细胞分泌  $\gamma$ -IFN 和 IL-4 的比率开始增加, 90 d 后 T 淋巴细胞分泌  $\gamma$ -IFN 和 IL-4 的比率增加明显 ( $P < 0.001$ )。结论 脐血移植 60 d 后患者的免疫功能开始恢复, 90 d 后免疫功能达到顶峰, 脐血移植是治疗急性白血病的一种有效方法。

**关键词** 异基因脐血移植; T 淋巴细胞; 细胞因子

中图分类号 R 55

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)11-1680-04

自从法国 Gluckman 教授于 1988 年完成了世界首例异基因脐血移植后, 世界各地相继运用该技术成功治疗血液系统恶性病、恶性实体瘤及遗传性疾病等多种疾病。脐血移植的安全性和有效性在临床实践中不断得到验证, 与其他类型造血干细胞移植相比, 人体脐血移植的移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) 发生率较低且严重程度相对较弱<sup>[1]</sup>。但脐血移植患者造血重建和免疫恢复相对

延迟, 存在一定程度的免疫缺陷状态, 这都使受者对各种微生物的易感性增加, 易患致命性细菌、霉菌及病毒感染<sup>[2]</sup>, 导致移植失败。因此研究脐血移植前后外周血 T 淋巴细胞免疫活性恢复情况非常重要。该研究利用流式细胞仪技术检测脐血移植患者移植前后 T 淋巴细胞胞内细胞因子的变化及其分布格局, 探讨脐血移植后的免疫重建特性, 了解可能的发生机制。

### 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 选取安徽医科大学附属省立医院 2013 年 1 月~2014 年 7 月 11 例异基因脐血移植患者, 分别取患者移植前以及移植后 30、60 和 90 d 的外周血 T 淋巴细胞。采用环孢素 + 骁悉预防 GVHD; 如发生 GVHD, 加用甲强龙干预, 干预后可抑制过强的免疫功能。

**1.2 实验方法** 采用微量全血法采集标本, 细胞因子检测所需试剂和仪器主要为流式细胞仪检测外周血 T 淋巴细胞分泌的干扰素 (interferon, IFN) 和白介素 (interleukin, IL) 两种细胞因子。取 0.5 ml 经肝素抗凝的外周血加入 0.5 ml IMDM 完全培养基, 5% CO<sub>2</sub> 孵育 5 h 加红细胞裂解液 5 000 r/min 离心 1 min, 弃上清液备用。分别加抗 CD4-FITC、CD8-FITC 荧光单抗, 4℃ 避光静置 30 min, 用染色缓冲液清洗, 加质量浓度为 1% PFA-PBG 每管 50  $\mu$ l, 4℃ 过夜。再用穿孔缓冲液洗 1 次, 每管加 200  $\mu$ l 穿孔液, 室温静置 20 min, 5 000 r/min 离心 1 min 弃去上

2015-06-29 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (编号: 31101006)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院血液科, 合肥 230001

作者简介: 杨会志, 男, 副主任医师, 责任作者, E-mail: yanghz69@sina.com

Clinical data of 17 cases of patients with prostate cancer and 25 cases of histologic chronic prostatitis and prostate cancer patients were retrospectively analyzed and compared with PSA, Gleason score and metastasis in two groups, the expressions of E-cadherin, N-cadherin,  $\beta$ -catenin and Vimentin in the two groups were analyzed by the immunohistochemistry. **Results** PSA, Gleason score and metastasis in patients with prostate cancer were significantly lower than patients with histologic chronic prostatitis with prostate cancer ( $P < 0.01$ ); immunohistochemistry showed that the expressions of E-cadherin and N-cadherin in patients with prostate cancer were significantly higher than histologic chronic prostatitis with prostate cancer patients ( $P < 0.01$ ); the expression of  $\beta$ -catenin and Vimentin in prostate cancer group was significantly lower than the histologic chronic prostatitis with prostate cancer patients ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Histologic chronic prostatitis has a significant impact on the PSA, Gleason score and metastasis rates of prostate cancer and promotes the development of prostate cancer EMT.

**Key words** prostate cancer; EMT; chronic prostatitis

清液。加荧光素标记的抗淋巴因子抗体: 每管各加 200 ng(5 ~ 10 μl) 标记物和等量穿孔缓冲液, 室温孵育 30 min, 分别用穿孔缓冲液洗 1 次, 染色缓冲液洗 1 次。用质量浓度为 0.5% PFA-PBS 制备悬浮细胞, 置与流式细胞仪上进行检测。根据检测获取的数据, 用 CBA 软件自动绘制标准曲线, 根据标准曲线自动计算出样本中各细胞因子含量。

**1.3 统计学处理** 使用 SPSS 13.0 进行统计学处理, 计量资料描述用  $\bar{x} \pm s$  表示; 对重复测量资料比较采用单因素重复测量方差分析,  $\gamma$ -IFN 和 IL-4 的变化关系采用相关性分析。

**2 结果**

**2.1 异基因脐血移植后 T 淋巴细胞免疫系统重建特性** T 淋巴细胞分泌的  $\gamma$ -IFN 和 IL-4 经流式细胞

仪检测(图 1), 患者脐血移植前外周血中 CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞胞内分泌的  $\gamma$ -IFN 和 IL-4 比率分别为 (3.97 ± 0.98)、(3.62 ± 0.79) 和 (2.81 ± 0.42)、(4.48 ± 1.45)。相对于移植后 30 d, 移植后 60、90 d 的 CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞胞内分泌的  $\gamma$ -IFN 和 IL-4 均逐渐增高, Linear 趋势检验结果显示差异均有统计学意义( $P < 0.001$ )。

**2.2  $\gamma$ -IFN 和 IL-4 变化的相关性分析** 经相关分析, 异基因脐血移植患者  $\gamma$ -IFN 和 IL-4 变化呈正相关性( $r = 0.789, P < 0.001$ )。见图 2。

**3 讨论**

异基因造血干细胞移植是现今治愈血液病最安全有效的方法。由于人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA) 严格相合的血缘及非血缘骨髓

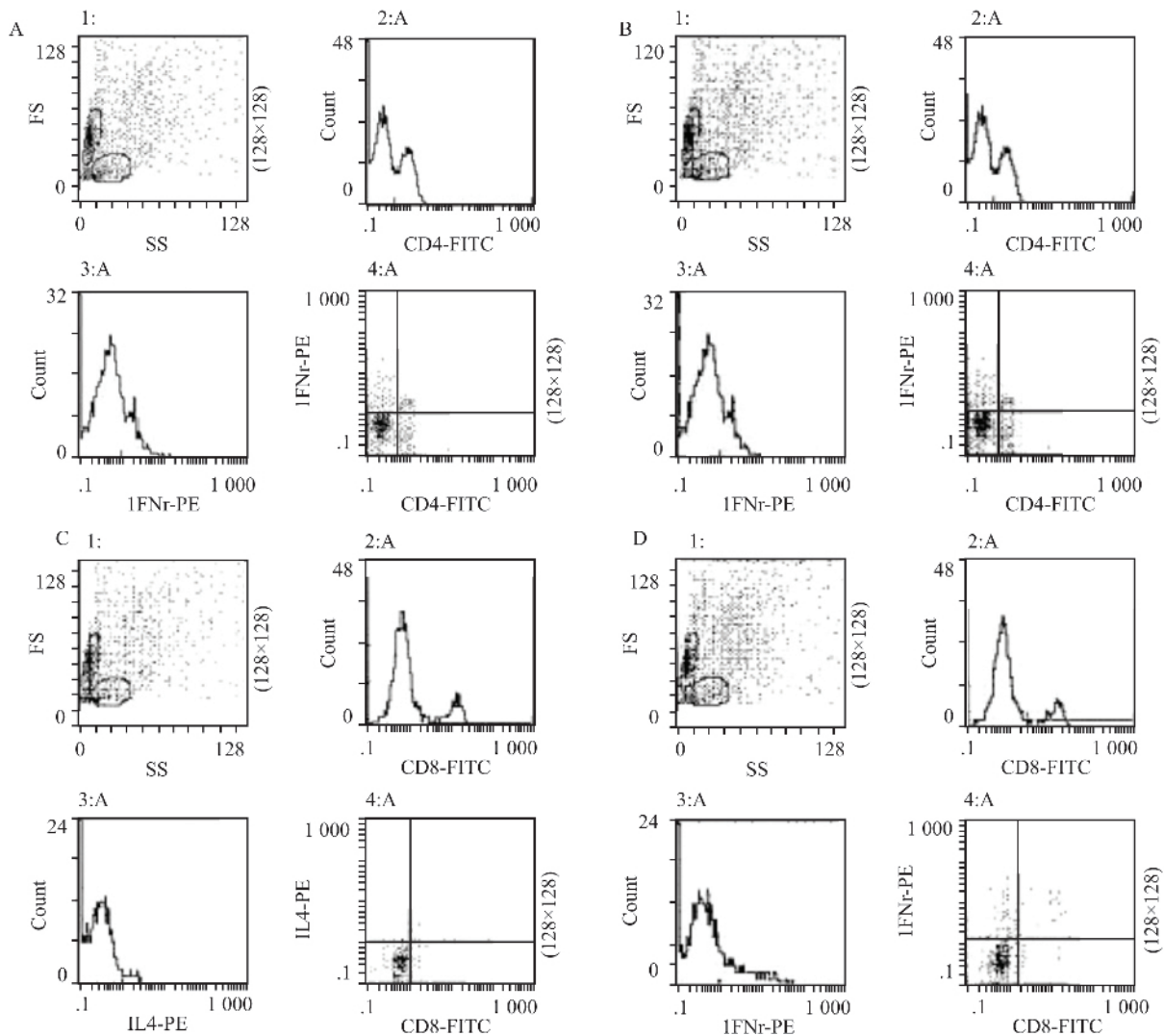


图 1 T 淋巴细胞分泌的  $\gamma$ -IFN 和 IL-4 流式细胞图  
A: Th1 细胞; B: Th2 细胞; C: Tc1 细胞; D: Tc2 细胞

表1 脐血移植患者移植前后胞内  $\gamma$ -IFN 和 IL-4 的变化情况(  $n = 11$  )

项目	移植前	移植后 30 d	移植后 60 d	移植后 90 d	F 值	P 值
CD4 <sup>+</sup> T 细胞( % )						
$\gamma$ -IFN( Th1)	3.97 ± 0.98	2.05 ± 0.56	4.92 ± 0.74	11.40 ± 3.79	30.619	0.00
IL-4( Th2)	2.81 ± 0.42	2.29 ± 0.46	4.40 ± 0.77	6.86 ± 1.87	42.092	0.00
CD8 <sup>+</sup> T 细胞( % )						
$\gamma$ -IFN( Th1)	3.62 ± 0.79	1.93 ± 0.38	5.19 ± 0.73	11.35 ± 4.07	30.887	0.00
IL-4( Th2)	4.48 ± 1.45	2.46 ± 0.52	5.95 ± 0.83	7.92 ± 2.14	33.444	0.00

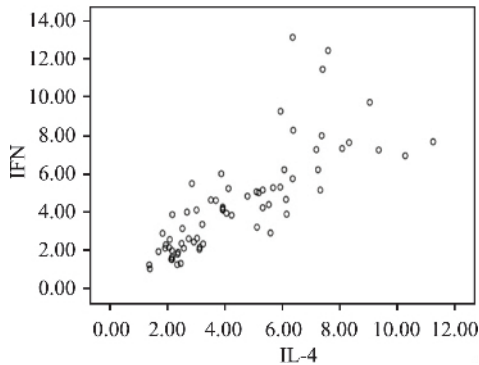


图2 脐血移植患者  $\gamma$ -IFN 和 IL-4 变化的散点图

供者严重不足而极大地限制了移植的广泛开展。而感染和免疫重建是影响移植疗效的另一个主要因素，感染相关的死亡大多发生于移植后 3~4 个月。故应密切监测免疫重建进程，并根据检测结果及时调整治疗方案，从而提高人体脐血移植的成功率。免疫重建过程中的细胞因子的检测方法较多，而流式细胞仪双标记法检测是目前国内外最经典方法，不仅可以准确地反映单一细胞分泌细胞因子的能力，而且又能反映具有分泌细胞因子能力的特定细胞群及细胞数量，是目前国际上常用的测定 T 淋巴细胞功能亚群、活化状态、分化情况的一种先进的方法<sup>[3]</sup>。

T 淋巴细胞亚群繁多，功能各异，按其胞内分泌的细胞因子谱的不同至少可分为两种功能截然不同的亚群，即 Th1 和 Th2。Th1 亚群主要分泌 IL-2、IL-12、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ ；Th2 亚群主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 等。在 Th1 亚群中以 IFN- $\gamma$  分泌为主要特征，参与细胞免疫反应，是引发 GVHD 的主要细胞亚群，在造成 GVHD 的“细胞因子风暴”中，Th1 分泌的细胞因子起着关键作用。而 Th2 亚群中以 IL-4 的分泌最富代表性，主要参与体液免疫应答。Th1 和 Th2 亚群之间还存在拮抗作用，分泌的细胞因子均可刺激自身的分化与发展而抑制对方的分化与发展<sup>[4-6]</sup>。

白血病患者因为本身免疫受损，功能低下，导致 T 淋巴细胞功能降低，本实验也表明，脐血移植前 T 淋巴细胞分泌的  $\gamma$ -IFN 和 IL-4 较正常人弱<sup>[7]</sup>，显示白血病患者自身的 T 淋巴细胞免疫功能下降。移

植后 30 d T 淋巴细胞分泌  $\gamma$ -IFN 和 IL-4 的比率较移植前继续下降，显示患者此时处于免疫功能缺乏状态。脐血移植后 60 d 后 T 淋巴细胞分泌  $\gamma$ -IFN 和 IL-4 的比率开始增加，显示 T 淋巴细胞免疫功能开始恢复，特别是 Th2 亚群细胞恢复较快。90 d 后 T 淋巴细胞分泌  $\gamma$ -IFN 和 IL-4 的比率增加明显，本次研究显示，IFN- $\gamma$  和 IL-4 的增加变化呈正相关性，提示 Th1 和 Th2 免疫功能同步恢复。但是  $\gamma$ -IFN 的分泌量较 IL-4 的分泌量增加显著，显示一种优势明显的细胞因子分泌状态。由于 90 d 后 T 淋巴细胞的这种功能增加可能是 GVHD 发生的原因之一，这与本实验 11 例病例中有 2 例发生 GVHD 相吻合。本实验观察的病例数较少，结果可能有偏移，应加强相关病例数研究。

参考文献

- [1] Grewal S S ,Barker J N ,Davies S M ,et al. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood [J]. *Blood* 2003 ,101( 11) : 4233 - 44.
- [2] Bowers E , Tamaki S ,Coward A , et al. Differing functional recovery of donor-derived immune cells after purified haploidentical and fully mismatched hematopoietic stem cell transplantation in mice [J]. *Exp Hematol* ,2000 ,28( 12) : 1481 - 9.
- [3] Boesch M ,Zeimet A G ,Reimer D ,et al. The side population of ovarian cancer cells defines a heterogeneous compartment exhibiting stem cell characteristics [J]. *Oncotarget* ,2014 ,5( 16) : 7027 - 39.
- [4] Nishioka C ,Jkezoe T ,Yang J ,et al. The combination of I $\kappa$ B kinase  $\beta$  inhibitor and everolimus modulates expression of interleukin-10 in human T-cell lymphotropic virus type-1-infected T cells [J]. *Immunology* 2013 ,138( 3) : 216 - 27.
- [5] Liu J ,He C ,Zhou H ,et al. Effects of TLR4 on  $\beta$ 2-glycoprotein I-induced bone marrow-derived dendritic cells maturation [J]. *Cell Immunol* 2014 ,290( 2) : 226 - 32.
- [6] Hardtke-Wolenski M ,Kraus L ,Schmetz C ,et al. Exchange of cytosolic content between T cells and tumor cells activates CD4 T cells and impedes cancer growth [J]. *PLoS One* ,2013 ,8( 10) : e78558.
- [7] 杨会志 ,汪 健 ,孙自敏. 急性髓系白血病患者 T 淋巴细胞内细胞因子表达特性 [J]. *中国实验血液学杂志* ,2007 ,15( 6) : 1161 - 4.

◇技术与方法◇

## 残端牵张并增强缝合修复兔急性前交叉韧带完全损伤的实验研究

邓小文, 赵其纯, 尚希福, 李久源, 吴星, 李丹, 王毅

**摘要** 取27只健康成年雌性新西兰大白兔于近前交叉韧带股骨止点处完全离断建立双侧急性前交叉韧带完全损伤模型。随机选择一侧膝关节采用自体半腱肌腱增强缝合残端并牵张技术修复前交叉韧带(L组), 对侧行常规前交叉韧带重建(R组)。结果显示: 术后第3、6、10周L组移植物在组织学表现如腱骨界面愈合、细胞增殖、血管再生等方面均优于R组; R组骨-移植物-骨复合体(骨-移植物-残端复合体)的最大载负荷要稍强于L组( $P < 0.05$ )。

**关键词** 前交叉韧带; 完全损伤; 残端牵张并增强缝合; 移植物-残端愈合

中图分类号 R 686.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)11-1683-04

前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)损伤是膝关节常见损伤之一, 近年来, 关节镜下ACL重建恢复其稳定性已成为治疗其损伤的常规治疗手

段且取得了良好的治疗效果<sup>[1-3]</sup>, 但有文献<sup>[4]</sup>报道该手术失败率达到8%~25%。所以如何改进手术提高其成功率仍是目前的研究热点。通过对多例陈旧性ACL股骨止点断裂患者关节镜下观察发现, 断裂后的ACL残端可粘连于股骨髁窝顶点、后交叉韧带、股骨外髁等处后形成愈合, 并产生一定张力<sup>[5]</sup>, 这在临床实践工作过程中得到证实, 因此该研究通过建立兔急性ACL完全损伤模型, 应用自体半腱肌腱增强缝合残端并牵张技术修复, 并与常规ACL重建的治疗效果作对比, 探讨膝关节急性ACL完全损伤的治疗方法。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 30只健康成年雌性新西兰大白兔, 体重1.9~2.5 kg, 平均2.3 kg, 由安徽医科大学附属省立医院实验动物中心提供。饲养期间实验动物关节功能良好, 无关节红肿、跛行等异常。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型的建立及术后处理** 3.0%戊巴比妥钠耳缘静脉置管麻醉(1 ml/kg), 仰卧位固定, 双侧膝关节术区备皮、消毒、铺巾。取膝前内侧切口,

2015-07-25 接收

基金项目: 安徽省科技厅重点科研项目(编号: 11070403044)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院骨科, 合肥 230001

作者简介: 邓小文, 男, 硕士研究生;

赵其纯, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: qichzhao@163.com

## The characteristics of T lymphocyte cytokine in the cord blood transplantation patients

Yang Huizhi, Zhu Xiaoyu, Wang Jian, et al

(Dept of Hematology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University Hefei 230001)

**Abstract Objective** To evaluate characteristics of T-lymphocyte immunologic function and reconstitution after allo-gene cord blood transplantation. **Methods** To peripheral blood from 11 human cord blood at 30, 60 and 90 days after cord blood transplantation, the T-lymphocytes with phorbol 12-myristate 13-acetate and ionomycin in the presence of monensin. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were analyzed for  $\gamma$ -IFN and IL-4 intracellular production by flow cytometry. **Results** The rate of  $\gamma$ -IFN and IL-4 from T lymphocytes began to increase at 60 days after the transplantation, and the rate of  $\gamma$ -IFN and IL-4 increased significantly at 90 days after the transplantation ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** The immune function begins to recover at 60 days after the Cord blood transplantation, the immune function peaks after 90 days. Cord blood transplantation is effective for the acute leukemia therapy.

**Key words** allo-gene cord blood transplantation; T-lymphocytes; cytokines