

Treg 和淋巴细胞亚群在急性髓系白血病中的意义

孔令君 葛 健 夏瑞祥

摘要 目的 研究 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} 调节性 T 细胞 (Treg) 和淋巴细胞亚群在急性髓系白血病 (AML) 患者外周血中的变化、相互关系及临床意义。方法 采用流式细胞仪对初治组和完全缓解 (CR) 组外周血 Treg 及淋巴细胞亚群水平进行检测,并与正常对照组进行对比。结果 初治组和 CR 组 AML 患者外周血中 Treg 水平均高于正常对照组 ($P < 0.05$),初治组高于 CR 组 ($P < 0.05$)。初治组和 CR 组 AML 患者外周血的 NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) 细胞占淋巴细胞的比例均低于正常对照组 ($P < 0.05$),初治组低于 CR 组 ($P < 0.05$)。初治组 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞含量和 CD4⁺/CD8⁺ 比值均低于正常对照组 ($P < 0.05$),但初治组 CD8⁺T 细胞含量却明显高于正常对照组 ($P < 0.05$);CR 组 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞含量及 CD4⁺/CD8⁺ 比值接近正常对照组,与初治组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 AML 患者外周血中 Treg 及 CD8⁺T 细胞比例明显升高,NK 细胞、CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞含量和 CD4⁺/CD8⁺ 比值降低,表明 AML 患者免疫功能处于抑制状态。Treg 控制 CD8⁺T 细胞免疫应答,同时抑制 NK 细胞的天然免疫反应,在 CD4⁺T 细胞与 CD8⁺T 细胞平衡的失调中起主要作用,与 AML 疾病发生发展密切相关。通过下调 Treg 的数量或去除其抑制功能,优化 AML 患者的免疫治疗。
关键词 急性髓系白血病;Treg;淋巴细胞亚群;NK 细胞;肿瘤免疫

中图分类号 R 733.71

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)04-0512-04

急性髓系白血病 (acute myelocytic leukemia, AML) 是造血系统的恶性克隆性疾病,其发生、发展与机体免疫水平降低密切相关,尤其是细胞免疫异常。近年来,白血病的免疫治疗逐渐成为白血病治疗中的研究热点。调节性 T 细胞 (regulatory T cell,

Treg) 作为一群独特的专职抑制细胞,主要分泌转化生长因子- β 和白细胞介素-10 等细胞抑制因子,具有免疫抑制性和免疫无能性,在机体免疫稳态维持等方面起很重要作用。淋巴细胞亚群作为机体抗肿瘤免疫的重要活性细胞,执行细胞免疫功能,在抗肿瘤免疫效应中发挥了重要的作用。因此,检测 AML 患者 Treg、淋巴细胞亚群,对于探讨 AML 免疫异常的实质及指导免疫相关的治疗有着重要的意义。该研究采用流式细胞术检测化疗前后 AML 患者以及正常对照者外周血 Treg 及淋巴细胞亚群水平,探讨其在 AML 患者化疗前后外周血中的变化、相互关系以及在 AML 疾病发生发展中的作用,为临床免疫治疗 AML 提供依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2013 年 4 月~2014 年 9 月在安徽医科大学第一附属医院血液内科住院的 AML 患者 30 例作为实验组,男 14 例,女 16 例;年龄 20~74 岁,中位年龄 47.5 岁;诊断符合《血液病诊断及疗效标准》^[1]。AML 初治组与完全缓解 (CR) 组来源于同一患者不同标本,其中初治组未治疗,CR 组为已化疗两个疗程,间隔 1 个月未接受化疗。健康体检者 30 例作为正常对照组,排除肿瘤与自身免疫性疾病史,男 15 例,女 15 例;年龄 18~70 岁,中位年龄 46 岁。组与组之间年龄、性别比较差异无统计学意义,具有可比性。

1.2 实验器材和试剂 鼠抗人 CD25-FITC、CD127-PE、CD4-PC5 及同型对照抗体、CD3-FITC/CD (16⁺56⁺)-PE、CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5、红细胞裂解剂、磷酸盐缓冲液 (PBS) 及 NAVIOS 流式细胞仪均购自美国 COULTER 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 分别采集白血病患者及健康体检者的晨起空腹外周新鲜静脉血 3 ml,置于 EDTA 抗凝的真空采血管 (去热源与内毒素),轻轻混匀,于 2 h 内送至实验室。

1.3.2 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 检测 取一支 FACS 专用试管,加入 10 μ l CD25-PC5、20 μ l CD4-FITC、20 μ l CD127-PE;再加入 EDTA-K2 抗凝的全血

2014-12-30 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:孔令君,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

100 μl 涡旋混匀,避光 15~20 min。加入 1 ml 溶血素,充分混匀,避光放置 10 min;取出涡旋混匀,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液。加 1 ml PBS 混匀,4℃避光 1 h 内上机检测。流式细胞仪检测分析应用 Navios tetra 软件,在 FSC-SSC 散点图上选定淋巴细胞群,再以 CD4 和 SSC 设门选择 CD4⁺ T 细胞,分析 CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} 占 CD4⁺ T 细胞的百分率。收集细胞数 30 000 个/管。

1.3.3 淋巴细胞亚群检测 采用直接免疫荧光法,取两支 FACS 专用试管,各加入 100 μl 充分混匀的抗凝全血和 10 μl CD45-PC5 抗体,再分别加入 5 μl CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5 抗体和 10 μl CD3-FITC/CD(16⁺56⁺)-PE。涡旋混匀,室温避光放置 15~20 min。加入 1 ml 溶血素,充分混匀,避光放置 10 min,观察待测样本裂解后呈均一透明红色,管底无红细胞沉淀。取出涡旋混匀,1 500 r/min,离心 5 min,弃上清液。加 1 ml PBS 混匀,30 min 内上机,用 NAVIOS 流式细胞仪分析系统软件获取 30 000 个细胞进行检测。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Treg 占 CD4⁺ T 细胞检测率 初治组、CR 组和正常对照组 Treg 检测结果统计学分析显示检测率满足方差齐性,3 组均数差异有统计学意义 ($F = 43.67, P < 0.05$)。3 组间均数两两比较结果示:初治组 (10.16 ± 3.61) 明显高于 CR 组 (8.53 ± 2.97) 和正常对照组 (6.45 ± 1.84),差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);CR 组明显高于正常对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 淋巴细胞亚群检测率 初治组、CR 组和正常对照组淋巴细胞亚群检测结果统计学分析显示:① NK 细胞 (CD16⁺56⁺):检测率满足方差齐性,3 组均数差异有统计学意义 ($F = 71.39, P < 0.05$)。3 组间均数两两比较结果示,初治组和 CR 组均低于正常对照组 ($P < 0.05$),初治组低于 CR 组 ($P < 0.05$)。② CD8⁺ T 细胞:检测率满足方差齐性,3 组均数差异有统计学意义 ($F = 13.69, P < 0.05$)。3 组间均数两两比较结果示,初治组均高于 CR 组和正常对照组 ($P < 0.05$),CR 组和正常对照组差异无统计学意义。③ CD3⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞、CD4⁺ /

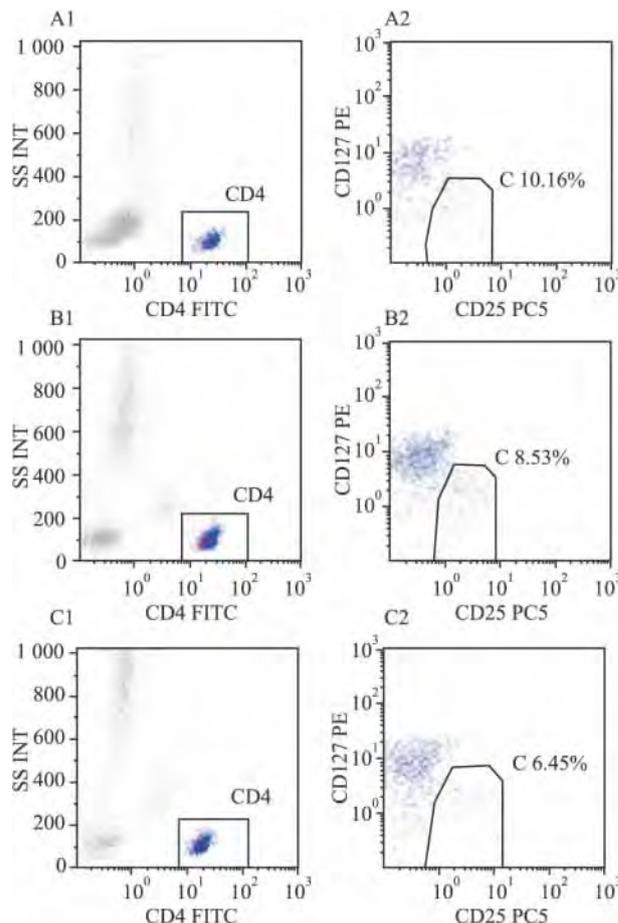


图 1 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} T 细胞占 CD4⁺ T 细胞比例流式图
A: 初治组; B: CR 组; C: 正常对照组; 1: CD4、SSC 设门选择 CD4⁺ T 细胞; 2: CD4、CD25、CD127 设门选择 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} T 细胞

CD8⁺:检测率均满足方差齐性,3 组均数差异均有统计学意义 ($F = 22.57, 19.26, 33.86, P < 0.05$)。3 组间均数两两比较结果示,初治组均显著低于 CR 组和正常对照组 ($P < 0.05$),但 CR 组和正常对照组差异均无统计学意义。见表 1。

表 1 各组外周血淋巴细胞亚群检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

项目	初治组	CR 组	正常对照组
CD3 ⁺	66.06 ± 8.47*	73.08 ± 8.34#	72.91 ± 7.88
CD4 ⁺	32.08 ± 8.80*	38.88 ± 8.70#	39.02 ± 8.21
CD8 ⁺	33.75 ± 6.51*	30.76 ± 5.74#	30.66 ± 6.12
CD4 ⁺ / CD8 ⁺	0.95 ± 0.19*	1.29 ± 0.34#	1.31 ± 0.24
CD16 ⁺ 56 ⁺	4.77 ± 1.95*	7.29 ± 1.97*#	14.26 ± 4.76

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与初治组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

Treg 作为一类具有免疫负调控作用的 T 细胞,在肿瘤免疫和移植免疫中起重要作用。Treg 在霍奇

金病患者肿瘤浸润淋巴细胞中及胃癌、非小细胞肺癌等实体肿瘤患者的外周血中明显增加^[2-3]。该研究通过检测 30 例初治 AML 患者及其化疗达 CR 外周血 Treg 数量,并与正常对照者进行对比,表明初治组 AML 患者外周血 Treg 水平明显高于 CR 组和正常对照组,且 CR 组高于正常对照组。这提示升高 Treg 能抑制细胞的正常免疫功能,导致肿瘤免疫逃逸,促进 AML 的疾病发生发展。研究^[4]显示,化疗达 CR 的 AML 患者体内恢复的多数为 Treg,这表明达 CR 的 AML 患者体内 Treg 含量仍维持着较高水平,与该研究结果一致。高水平的 Treg 的免疫抑制作用,使达 CR 的 AML 患者体内白血病细胞不能被完全清除,促使 AML 的复发。

Ustun et al^[5]发现,AML 患者体内表达吲哚胺 2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase,IDO)能使 CD4⁺CD25⁻T 细胞转化为 CD4⁺CD25⁺T 细胞,Treg 含量明显增多。在建立动物模型的体内实验^[6]中发现,这一过程可被 IDO 的特异性抑制剂 1-甲基色氨酸所逆转,1-甲基色氨酸还具有增强肿瘤化疗药物疗效的作用。考虑可以通过 IDO 的特异性抑制剂靶向治疗等方法降低体内的 Treg 含量,为临床设计有效的抗肿瘤治疗方案提供新的思路。

淋巴细胞亚群在肿瘤免疫中起中心调控作用,执行免疫调节功能和细胞免疫功能。本研究结果显示初治 AML 患者外周血 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺比值较正常对照组均明显降低,初治组 CD8⁺T 细胞明显高于正常对照组;初治组及 CR 组 NK 细胞水平均明显低于正常对照组,而初治组低于 CR 组,差异有统计学意义。说明 AML 患者免疫调节功能紊乱,且 Treg 优势状态与 NK 细胞抑制状态具有一致性。研究^[7]显示,Treg 在机体免疫的初始阶段促进 CD8⁺T 细胞的免疫应答,之后限制 CD8⁺T 细胞活性,而 CD4⁺/CD8⁺只有在稳定比例的前提下才能维持细胞免疫反应的平衡。这说明 Treg 在 CD4⁺T 细胞与 CD8⁺T 细胞平衡的失调中起控制作用。吴泽霖等^[8]发现在肿瘤患者体内 Treg

细胞膜表达的转化生长因子-β 直接抑制 NK 细胞的功能,并下调 NK 细胞表面受体 NKG2D,从而抑制 NK 细胞的天然免疫反应。这说明 Treg 可能也对 NK 细胞起到同样的调节作用,影响其对肿瘤细胞的广谱杀伤作用,从而最终导致了白血病细胞的持续增长。

综上所述,Treg 和淋巴细胞亚群相互影响,促进机体细胞免疫功能的紊乱,最终导致 AML 的产生和发展。由于目前治疗 AML 主要依靠化疗和骨髓移植,治疗过程中常出现严重的机体损伤,治疗费用昂贵。考虑可以降低 Treg 的数量去除 Treg 的功能,为临床治疗 AML 设计有效的免疫治疗方案。

参考文献

- [1] 张之南,沈 悌.血液病诊断及疗效标准[M].3 版.北京:科学出版社,2007:106-13.
- [2] Gabaglia C R, DeLaney A, Gee J, et al. Treatment combining RU486 and Ad5IL-12 vector attenuates the growth of experimentally formed prostate tumors and induces changes in the sentinel lymph nodes of mice[J]. *J Transl Med* 2010;8:98.
- [3] Gu T, Rowsell-Turner R B, Kilinc M O, et al. Central role of IFN gamma-indoleamine 2,3-dioxygenase axis in regulation of interleukin-12-mediated antitumor immunity [J]. *Cancer Res*, 2010;70(1):129-38.
- [4] Kanakry C G, Hess A D, Gocke C D, et al. Early lymphocyte recovery after intensive timed sequential chemotherapy for acute myelogenous leukemia: peripheral oligoclonal expansion of regulatory T cells [J]. *Blood*, 2011;117(2):608-17.
- [5] Ustun C, Miller J S, Munn D H, et al. Regulatory T cells in acute myelogenous leukemia: is it time for immunomodulation [J]. *Blood* 2011;118(19):5084-95.
- [6] Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism *in vivo* [J]. *Nat Immunol*, 2002;3(11):1097-101.
- [7] 史红鱼,郝国平,王晓欢,等.急性白血病患者 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞和 NK 细胞免疫作用探讨[J]. *中国小儿血液与肿瘤杂志* 2012;17(4):177-9.
- [8] 吴泽霖,胡光玉,陈福雄,等.急性白血病儿童外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞和 NK 细胞的变化及其在白血病免疫中的意义[J]. *中国实验血液学杂志* 2010;18(3):709-13.

The significance of Treg and T lymphocyte subsets in acute myelocytic leukemia

Kong Lingjun, Ge Jian, Xia Ruixiang

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

Abstract Objective To explore the alterations, relationship and clinical significance of CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}

初诊 2 型糖尿病患者胰岛素强化治疗前后 海马区 NAA/Cr、Cho/Cr 的变化

章容¹ 戴武¹ 张继² 王松² 廖芳芳³ 叶军¹ 曹永红¹ 刘燕¹ 汪运生¹ 张苏皖¹ 匡蕾¹ 邹玲玲¹

摘要 目的 研究初诊 2 型糖尿病患者胰岛素强化治疗前后海马区 N-乙酰天门冬氨酸复合物(NAA)/肌酸(Cr)、胆碱复合物(Cho)/Cr 的变化。方法 氢质子磁共振波谱(¹H-MRS)检测 30 例初诊 2 型糖尿病患者双侧海马区 NAA/Cr、Cho/Cr,同时检测空腹血糖(FPG)、餐后 2 h 血糖(2 hPG)、糖化血红蛋白(HbA_{1c})、三酰甘油(TG)、胆固醇(CHO)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)、HOMA-β 细胞功能指数(HOMA-β)和 HOMA-胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)。胰岛素强化降糖 10~14 d,血糖达标后复查上述指标予以对比。结果 胰岛素强化治疗后,患者 FPG、2 hPG、TG、CHO、LDL、HOMA-IR 水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),HOMA-β 水平升高($P < 0.05$);左右侧海马区 NAA/Cr 升高($P < 0.05$),右侧海马区 Cho/Cr 降低($P < 0.05$),左侧海马区

Cho/Cr 呈下降趋势,但差异无统计学意义;NAA/Cr、Cho/Cr 与血糖、HOMA-β、HOMA-IR 有一定相关性。结论 胰岛素强化治疗初诊 2 型糖尿病,可改善患者血糖、血脂,同时可升高双侧海马区 NAA/Cr、降低右侧海马区 Cho/Cr,其机制可能与血糖降低、胰岛素分泌增加、胰岛素抵抗改善有关。

关键词 磁共振波谱;2 型糖尿病;胰岛素强化;海马

中图分类号 R 445.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)04-0515-04

2 型糖尿病患者存在学习、记忆减退等认知损害^[1],而海马与人类学习、记忆活动密切相关,主管人类的近期记忆^[2]。因此研究海马的功能对于阐明糖尿病患者认知功能障碍的原因十分重要,但是对活体海马的研究一直缺乏有效方法。目前可利用氢质子磁共振波谱(proton magnetic resonance spectroscopy,¹H-MRS)测定海马部位的代谢化合物^[3],如 N-乙酰天门冬氨酸复合物(N-acetylaspartate,NAA)、胆碱复合物(choline compound,Cho)与肌酸(creatine,Cr)等,无创性和无辐射性。研究^[4]表明

2015-01-19 接收

基金项目:安徽省科技厅重点科研项目(编号:12070403043)

作者单位:安徽医科大学附属合肥医院(合肥市第二人民医院)¹ 内分泌科,² 磁共振室,³ 院感科,合肥 230011

作者简介:章容,男,硕士,主治医师;

戴武,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:dai-wuhf@126.com

regulatory T cells (Treg) and lymphocyte subsets in peripheral blood of patients with acute myelocytic leukemia (AML). **Methods** The level of peripheral blood lymphocyte subsets and Treg of untreated AML patients and complete remission (CR) patients were tested by flow cytometry, and were compared with that of 30 normal controls. **Results** The proportions of Treg were much higher in untreated AML patients and CR patients than in normal controls, while the mean proportion of Treg in untreated AML patients was higher than that in CR patients ($P < 0.05$). The proportions of NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) cells in untreated AML patients and CR patients were both decreased compared with normal controls, and the mean proportion of NK cells in untreated AML patients was lower than that in CR patients ($P < 0.05$). Compared with the normal controls, the proportions of CD3⁺T cell, CD4⁺T cell, and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ decreased in untreated AML patients ($P < 0.05$), but the proportions of CD8⁺T cell was higher than in normal controls; the proportions of CD3⁺T cell, CD4⁺T cell, CD8⁺T cell and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ in CR patients were close to the proportions in normal controls, but there was significant difference between CR patients and untreated AML patients ($P < 0.05$). **Conclusion** The increase of Treg, CD8⁺T cell and decrease of NK cells, CD3⁺T cell, CD4⁺T cell, and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ in peripheral blood of patients with AML indicate that the immune function of patients with AML is depressed. Treg control the immune response of CD8⁺T cells, at the same time inhibit the natural immune response of NK cells, playing a major role in the disorders of CD4⁺T cells and CD8⁺T cell balance, and closely relate with the development of AML. The immune treatment of patients with AML will be optimised by reducing the amount of Treg or removing the suppression function.

Key words acute myelocytic leukemia; Treg; lymphocyte subsets; NK cells; tumor immunity