

· 论 著 ·

多发性骨髓瘤患者外周血 T 细胞亚群及细胞免疫功能研究*

颜 斌¹, 魏 锦¹, 陈 健², 钟国成², 匡 红², 岳伦莉², 王 奎², 廖 皓², 孙 蕊^{2△}

(1. 川北医学院附属医院血液科, 四川南充 637000; 2. 中国人民解放军

第 452 医院肿瘤血液科, 成都 610021)

摘 要:目的 探讨多发性骨髓瘤(MM)患者外周血 T 细胞亚群和 CD4⁺CD25⁺调节性 T(Treg) 细胞的表达特点, 分析 MM 与健康者之间的细胞免疫功能差异。方法 检测 28 例初诊的 MM 患者及 22 例健康志愿者外周血淋巴细胞中总 T 细胞(CD3⁺)、辅助/诱导 T 细胞(CD3⁺CD4⁺)、抑制/细胞毒 T 细胞(CD3⁺CD8⁺)的比例、(CD3⁺CD4⁺)/(CD3⁺CD8⁺)、CD4⁺CD25⁺/CD4⁺、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺/CD4⁺CD25⁺比值, 并比较 MM 患者与健康者之间细胞免疫指标(Th1/Th2 比值、AgNOR 比值、TGF-β)的差异。结果 初诊 MM 患者与对照组相比, 外周血淋巴细胞中总 T 细胞(CD3⁺)比例、辅助/诱导 T 细胞(CD3⁺CD4⁺)比例差异无统计学意义($P>0.05$); 抑制/细胞毒 T 细胞(CD3⁺CD8⁺)比例增加($P<0.05$); CD4⁺CD25⁺/CD4⁺、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺/CD4⁺CD25⁺比值明显高于健康组($P<0.05$); 血清中 Th1/Th2 比值、AgNOR 比值均明显低于健康组($P<0.05$); 血清 TGF-β 含量较健康组上升($P<0.01$)。结论 MM 患者外周血 T 细胞亚群的异常、Treg 表达增加及细胞免疫功能低下可能与疾病的发生、发展相关, 对判断 MM 疗效及预后有一定的指导价值。

关键词:多发性骨髓瘤; T 淋巴细胞, 调节性; T 淋巴细胞亚群; 免疫, 细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.11.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)11-1210-03

Study on T lymphocyte subsets and the cellular immune functions in peripheral blood from the patients with multiple myeloma*

Yan Bin¹, Wei Jin¹, Chen Jian², Zhong Guocheng², Kuang Hong², Yue Lunli², Wang Kui², Liao Hao², Sun Yi^{2△}

(1. Department of Hematology, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China;

2. Department of Hematology, 452nd Hospital of People's Liberation Army, Chengdu, Sichuan 610021, China)

Abstract: **Objective** To study the characteristics of T lymphocyte subsets, CD4⁺CD25⁺ Treg cells in peripheral blood from the patients with multiple myeloma(MM) and analyse the differences of cellular immune functions between the MM and the healthy persons. **Methods** The proportions of CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ cells in peripheral blood and the ratios of CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD25⁺/CD4⁺, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺/CD4⁺CD25⁺ were analyzed between the 28 patients with MM in newly diagnosed and 22 healthy volunteers(control group) and the differences of cellular immune indicators(Th1/Th2, the ratio of AgNOR, and TGF-β) between the two groups were compared. **Results** Compared with the healthy people, the proportions of CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ cells in lymphocyte from the patients with multiple myeloma in newly diagnosed were no significance respectively($P>0.05$), and the proportion of CD3⁺CD8⁺ cells in lymphocyte from the patients with multiple myeloma in newly diagnosed was higher than those of the control group($P<0.05$). The ratios of CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ and CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺/CD4⁺CD25⁺ from the cases in newly diagnosed were clearly higher than those of control group($P<0.05$). The Th1/Th2 and the ratio of AgNOR in serum from the patients were significantly lower than the healthy group($P<0.05$). The level of TGF-β in serum from the patients was higher than the healthy group($P<0.01$). **Conclusion** The abnormality of T cell subsets in peripheral blood and the excessive expression of Tregs and the cellular immune function were related with the occurrence and development of disease. So it had certain clinical instructional value in judging the therapy and prognosis of the patients with multiple myeloma.

Key words: multiple myeloma; T-lymphocyte, regulatory; T-lymphocyte subsets; immunity, cellular

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种骨髓浆细胞恶性克隆性增生疾病, 以血清或尿液中出现单克隆免疫球蛋白或其成分(M 蛋白), 以及广泛溶骨病变和(或)肾功能损害为特征。研究发现^[1], MM 患者常伴有明显的免疫功能异常, 调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)很可能参与了 MM 的发病。Treg 的表面标志是 CD4⁺CD25⁺, 主要负调节机体免疫反应, 维持自身耐受和防止过度的免疫应答损伤机体, 同时能阻止机体对自体同源肿瘤细胞的识别, 导致肿瘤免疫逃逸。FOXP3⁺是 Treg 特异性表达的转录因子, 与 Treg 的分化、发育和免疫调节功能的发挥密切相关^[2], 因此很多学者将 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T 细胞作为 Treg 进行研究。为了解 MM 患者的免疫微环境状态, 作者采用流式细胞术检测 28 例初诊的

MM 患者及 22 例健康志愿者外周血 T 细胞亚群、Treg 的比例, 并研究 MM 患者的细胞免疫功能, 旨在为 MM 相关的免疫学机制研究、临床治疗靶点及预后的评估提供更多的依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 以解放军第 452 医院 2008 年 5 月至 2010 年 9 月肿瘤血液科初诊的 MM 患者作为研究组。MM 患者的诊断标准参考张之南主编的第 3 版《血液病诊断及疗效标准》, 将其按照 2005 年国际骨髓瘤工作组提出的最新 MM 国际分期标准(ISS)进行分期。28 例初诊的患者中, I 期 2 例、II 期 6 例、III 期 20 例; 其中男 15 例, 女 13 例; 发病中位年龄 62 岁。对照组来自本院体检中心 22 例体检健康者, 未发生相关疾病史、家族史, 近期无感冒, 其中男 11 例、女 11 例; 中位年龄 60 岁。

表 1 MM 患者与健康对照者外周血 T 细胞亚群比较(±s)

组别	n	CD3 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺
健康对照者	22	69.81±10.72	35.07±5.42	25.60±6.09	1.46±0.32
MM 患者	28	68.44±12.63	34.22±10.23	29.60±8.93	1.31±0.28
统计学指标		t=0.406 4,P=0.339 2	t=0.352 3,P=0.363 1	t=1.796 4,P=0.039 4	t=1.765 8,P=0.041 9

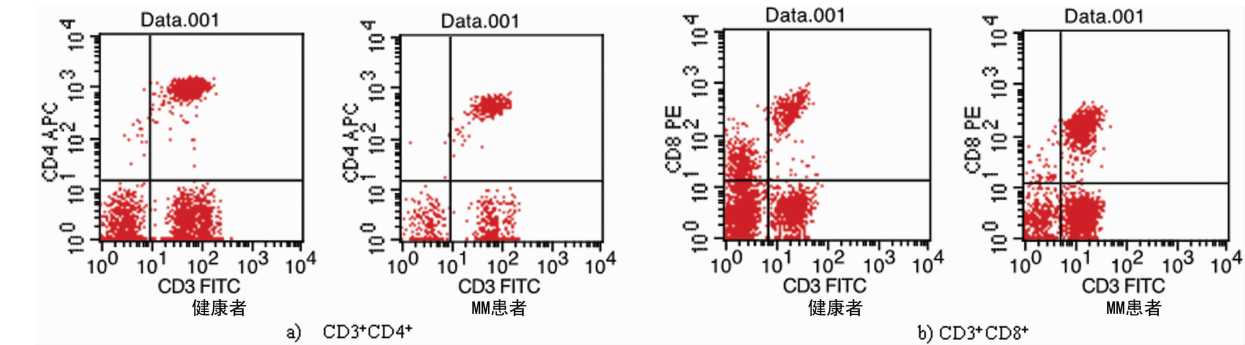


图 1 MM 患者与健康人 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 表达情况

1.2 试剂与材料 淋巴细胞分离液购自美国 Modiatech 公司;CD3-FITC、CD83-FITC、CD4-FITC、CD25-PE-Cy5、Foxp3-PE 等抗体购自美国 BD 公司;洗涤液含 1%FBS 与 0.1%叠氮钠的磷酸盐缓冲液(PBS)(实验室自行配制),4℃储存;含 1%多聚甲醛的 PBS(实验室自行配制),4℃储存。流式细胞仪(BD FACSAria)为美国 BD 公司产品,Cell Quest 软件分析数据。细胞银染液、固定液及 KL 型分析系统购自北京健尔康公司。定量 ELISA 试剂盒购自 eBioscience 公司。

1.3 T 细胞亚群的检测 取 50 μL 抗凝全血加入 20 μL 抗体(CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺等抗体)混匀后在室温(25℃)下避光孵育 15min,然后加入红细胞裂解液 1.5 mL,混匀后在室温(25℃)下避光孵育 15 min,离心(1 000 r/min,5 min),弃上清液,再加入 1.5 mL PBS,混匀后再次离心(1 000 r/min,5 min),弃上清液,上机分析。

1.4 Treg 的检测 抽取外周血 2 mL,加入 EDTA 抗凝试管中。用淋巴细胞分离液分离出单个核细胞(白膜层),PBS 洗涤 2 次,离心弃上清液,制成单细胞悬液,调整细胞浓度。取 100 μL 加入 FCM 检测管 1 号和 2 号中,然后分别加入 20 μL CD4-FITC、5 μL CD25-APC,混匀,室温避光孵育 15 min。然后固定细胞,破膜进行胞内染色,含 1%FBS 与 0.1%叠氮钠的 PBS 洗涤 2 次,离心弃上清液。加入 300 mL 含 1%多聚甲醛的 PBS 重悬细胞,4℃避光保存,上机检测。

1.5 细胞免疫功能检测 分离 MM 患者和健康对照者的外周血单个核细胞,将其银染,经 KL 分析系统计算淋巴细胞银染核仁区(argyrophilic nucleolar organizer regions, AgNORs)面积与核面积的比值(IS%);应用定量 ELISA 试剂盒测定

MM 患者和健康对照者血清中 Th1/Th2 比值(IFN-γ 代表 Th1,IL-10 代表 Th2)及转化生长因子(TGF)-β 含量(根据试剂盒样品的标准曲线计算)。

1.6 统计学处理 采用 SAS 9.1.3 版医用统计软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MM 患者与健康者外周血 T 细胞亚群比较 初诊 MM 患者外周血总 T 细胞(CD3⁺)比例、辅助/诱导 T 细胞(CD3⁺CD4⁺)比例与健康对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);初诊患者的抑制/细胞毒 T 细胞(CD3⁺CD8⁺)比例较健康组增高($P < 0.05$),(CD3⁺CD4⁺)/(CD3⁺CD8⁺)比值较健康组减少($P < 0.05$),见表 1、图 1。

2.2 MM 患者与健康者外周血 Treg 比较 初诊 MM 患者外周血 CD4⁺CD25⁺细胞/CD4⁺细胞、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺细胞/CD4⁺CD25⁺细胞明显高于实验组,见表 2、图 2。

2.3 免疫学指标 经检测,初诊 MM 患者血清中 Th1/Th2 比值、AgNORs 均明显低于健康组($P < 0.05$);血清 TGF-β 含量较健康组上升($P < 0.01$),见表 3。

表 2 MM 患者与健康对照者外周血 Treg 比较(±s,%)

组别	n	CD4 ⁺ CD25 ⁺ / CD4 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ / CD4 ⁺ CD25 ⁺
健康对照者	22	3.37±1.49	5.63±3.75
MM 患者	28	5.46±2.68	43.61±23.15
统计学指标		t=3.277 0,P=0.001 0	t=7.600 8,P=0.000 0

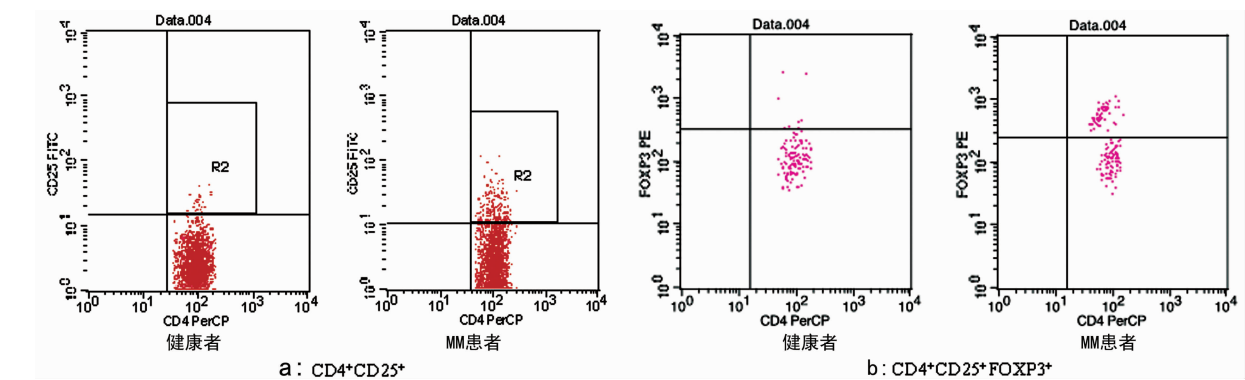


图 2 MM 患者与健康对照者 CD4⁺CD25⁺及 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ 表达情况

表 3 MM 患者与健康对照者免疫学指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Th1/Th2	AgNORs(IS%)	TGF-β(ng/mL)
健康对照者	22	1.41±0.33	4.41±0.87	1.05±0.34
MM 患者	28	1.25±0.31	4.02±0.65	1.27±0.41
统计学指标		<i>t</i> =1.761 0, <i>P</i> =0.042 3	<i>t</i> =1.815 1, <i>P</i> =0.037 9	<i>t</i> =2.027 0, <i>P</i> =0.024 1

3 讨 论

MM 是一种免疫系统的恶性肿瘤,近年来,随着分子生物学和免疫学的不断进展,其免疫功能异常的相关机制正逐渐被揭示。机体内抗肿瘤应答主要由 T 细胞执行,其中 CD4⁺ 细胞主要为辅助性 T 细胞(Th),可分化为 Th1、Th2、Th17 三类效应细胞(Th1、Th2 分别在细胞免疫和体液免疫中发挥作用, Th17 参与固有免疫和某些炎症);而 CD8⁺ 细胞主要由细胞毒性 T 细胞和抑制性 T 细胞(后者尚未分离出独立表面标志)组成。本研究发现,MM 初诊患者外周血 CD3⁺ CD8⁺ 较健康者明显增高,并导致 CD4/CD8 细胞比例失衡,这与既往报道相符^[3],提示 T 细胞亚群比例的紊乱与 MM 的发生及进展紧密相关。MM 患者 CD8⁺ T 细胞比例异常上升,这些增多的 CD8⁺ T 细胞很可能不具备正常的抗癌功能,对瘤细胞处于失活或耐受状态,甚至在机体中发挥着免疫抑制作用。

CD4⁺ CD25⁺ Treg 是一群具有免疫抑制性作用的 T 细胞,在维持对自身机体成分免疫耐受的同时也抑制了机体对自体肿瘤细胞的免疫应答,故 Treg 在肿瘤的发生、发展过程中发挥着重要作用。FoxP3⁺ 作为 Treg 特异性表达分子,在本研究的初诊骨髓瘤患者中明显高表达,这与杨燕飞^[4]的检测结果一致。Tregs 能形成将效应细胞转变成抑制细胞的微环境,使一些 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞能被 Treg 诱导并分泌 TGF-β 或 IL-10^[5]。Treg 在 MM 患者体内高表达,致使其免疫功能受到抑制,可以尝试通过外界干涉减少 Treg 的活化,在避免自身免疫性疾病诱发的前提下改善 MM 患者的免疫状态。

为进一步分析 MM 患者与健康对照组之间细胞免疫功能的差异,作者选择以下指标进行检测:(1)Th1/Th2 比值,反映体内抗肿瘤免疫状态;(2)AgNORs,是 RNA 聚合酶的亚单位,代表 rDNA 的转录效率,能体现淋巴细胞活性和机体细胞免疫状态^[6];(3)TGF-β,由瘤细胞和 Treg 共同分泌的免疫抑制因子,可显示肿瘤对免疫应答的抑制程度。经过检测,初诊 MM 患者血清中 Th1/Th2 比值、AgNORs 明显低于健康组,而血清 TGF-β 含量高于健康组,这提示 MM 患者体内的瘤细胞和 Treg 通过分泌 TGF-β 等免疫抑制因子,极大地削弱了针对瘤细胞的免疫杀伤(表现在 Th1 应答向 Th2 方向漂移),降低了机体免疫细胞的活性和功能,导致患者细胞免疫功能不全,为 MM 的进一步进展提供了有利的微环境^[7]。

细胞免疫功能紊乱是导致 MM 发生、发展的重要原因和严重后果。异常的浆细胞不仅能快速增殖,而且能模拟一些免疫系统信号通路有利于肿瘤免疫耐受网络的形成,削弱了免疫治疗和临床常规治疗肿瘤的有效性。骨髓瘤患者即使经常规

治疗达完全缓解,仍不能改变其难以治愈的结局。MM 患者体内会存在微小残留病灶(minimal residual disease,MRD)^[8]而成为复发的根源,而肿瘤微环境中的 Treg 构成了肿瘤免疫耐受网络的关键成分,促进了肿瘤的发生、发展。因此,以 Tregs 为靶点的免疫治疗将为血液肿瘤疾病的治疗提供新的参考。

综上所述,本研究发现 MM 患者的 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞亚群和 Treg 比例增高,且 FOXP3⁺ 在 MM 患者的 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞表达比例明显增加,同时 MM 患者整体的细胞免疫功能低于健康人,这提示以 Treg 细胞为基础的免疫功能异常在 MM 的发病过程中发挥着重要作用,但其具体的相关机制尚不清楚,有待进一步研究。

参考文献:

[1] Pratt G,Goodyear O,Moss P. Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma[J]. Br J Haematol, 2007,138(5):563-579.

[2] Hori S,Nomura T,Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FoxP3[J]. Science,2003,299(5609):1057-1061

[3] Oken MM,Kay NE. T-cell subpopulations in multiple myeloma:correlation with clinical disease status[J]. Br J Haematol,1981,49(4):629-634.

[4] 杨燕飞. 多发性骨髓瘤患者外周血调节性 T 细胞的表达特点及意义[D]. 杭州:浙江大学医学院,2007.

[5] Jonuleit H,Schmitt E,Kakirman H,et al. Infectious tolerance; human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells[J]. J Exp Med,2002,196(2):255-260.

[6] 钟国成,张小玉,孙慧,等. 抗原致敏 DC 联合 CIK 在原发性肝癌的临床应用[J]. 中国肿瘤临床,2009,36(24):1404-1408.

[7] 孙慧,匡红,张小玉,等. DC-CIK 过继免疫联合沙利度胺治疗复发难治性多发性骨髓瘤的回顾性研究[J]. 免疫学杂志,2012,28(4):324-328.

[8] 钟国成,孙慧. 多发性骨髓瘤过继细胞免疫治疗的研究进展[J]. 华西医学,2011,26(12):1805-1809.

(收稿日期:2012-11-28 修回日期:2013-01-22)

(上接第 1209 页)

[12] Skirnisdóttir IA,Sorbe B,Lindborg K,et al. Prognostic impact of p53, p27, and C-MYC on clinicopathological features and outcome in early-stage(FIGO I-II) epithelial ovarian cancer[J]. Int J Gynecol Cancer,2011,21(2):236-244.

[13] Avraam K,Pavlakakis K,Papadimitriou C,et al. The prognostic and predictive value of ERCC-1, p53, bcl-2 and bax in epithelial ovarian cancer[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2011,32(5):516-520.

(收稿日期:2012-12-02 修回日期:2013-01-29)