

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.05.014

类风湿关节炎患者外周血 Treg 细胞及其分泌 IL-35 水平检测与临床意义*

熊怡淞¹, 宋燕¹, 俞娟², 陈莉^{1△}

(1. 成都军区总医院检验科, 成都 610083; 2 南通大学附属医院检验科, 江苏南通 226001)

[摘要] 目的 探讨类风湿关节炎(RA)患者外周血中调节性 T 细胞(Treg)的数量, 以及其所分泌的白细胞介素(IL)-35 表达水平与 RA 发病的相关性。方法 采集 45 例 RA 患者(RA 组), 22 例骨关节炎(OA)患者(OA 组), 26 例健康体检者(对照组)的外周血, 流式细胞术检测 CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ Treg 数量, ELISA 检测血浆 IL-35 水平。分析 Treg 细胞及其表达的 IL-35 与临床指标间的相关性。结果 RA 组外周血中 Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的百分率[(5.65±2.33)%]较对照组[(4.12±1.75)%]明显升高($P<0.05$); OA 组与 RA 组比较, 差异无统计学意义($P=0.086$)。3 组对象 foxp3 平均荧光强度比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); DAS28 评分越高的患者, 其外周血 Treg 细胞数量和 foxp3 荧光强度越低。RA 组血浆 IL-35[(34.22±14.35)ng/L]水平明显低于 OA 组[(78.63±24.58)ng/L]和对照组[(67.56±25.43)ng/L], 差异均有统计学意义($P<0.05$)。RA 患者 Treg 细胞数量与红细胞沉降率(ERS)、DAS28 评分呈负相关($r=-0.223, -0.343, P=0.023, 0.011$), 而与类风湿因子、C 反应蛋白、抗 CCP 抗体无相关性。结论 RA 患者外周血中 Treg 细胞数量增高, IL-35 水平降低; Treg 细胞功能缺陷致负调控能力减弱。

[关键词] 类风湿关节炎; 骨关节炎; Treg 细胞; 白细胞介素 35; 流式细胞术**[中图分类号]** R593.22**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)05-0622-04

Detection of peripheral blood Treg cells and secreted IL-35 level in patients with rheumatoid arthritis and its clinical significance*

XIONG Yisong¹, SONG Yan¹, YU Juan², CHEN Li^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, General Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu, Sichuan 610083, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

[Abstract] **Objective** To detect the number of peripheral blood Treg cells and secreted IL-35 expression level in the patients with rheumatoid arthritis(RA) and to explore their correlation with RA occurrence. **Methods** Peripheral blood was collected from 45 cases of RA, 22 cases of osteoarthritis(OA) and 26 persons undergoing healthy physical examination(control group). The number of CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ regulatory T cells was determined by flow cytometry, while plasma IL-35 level was determined by ELISA. Then the relationship between Treg and expressed IL-35 with clinical indicators was analyzed. **Results** The percentage of peripheral blood Treg cells to total CD4⁺T cells in the RA group was (5.65±2.33)%, which was significantly increased compared with (4.12±1.75)% in the control group($P<0.05$); the difference between the OA group and RA group was not statistically significant($P=0.086$). The average fluorescence intensity of foxp3 had no statistical difference among 3 groups($P>0.05$). The higher the DAS28 score, the lower the peripheral blood Treg cells number and foxp3 fluorescence intensity. The plasma IL-35 level in the RA group [(34.22±14.35)ng/L] was significantly lower than that in the OA group[(78.63±24.58)ng/L] and control group [(67.56±25.43)ng/L], the difference was statistically significant($P<0.05$). The Treg number in RA patients was negatively correlated with ESR and DAS28 score($r=-0.223, -0.343, P=0.023, 0.011$), but had no correlation with rheumatoid factor, C-reactive protein and anti-CCP antibody. **Conclusion** The peripheral blood Treg cells number in RA patients is elevated, while the IL-35 level is decreased, the negative regulation ability in the patients with Treg cell function deficit is attenuated.

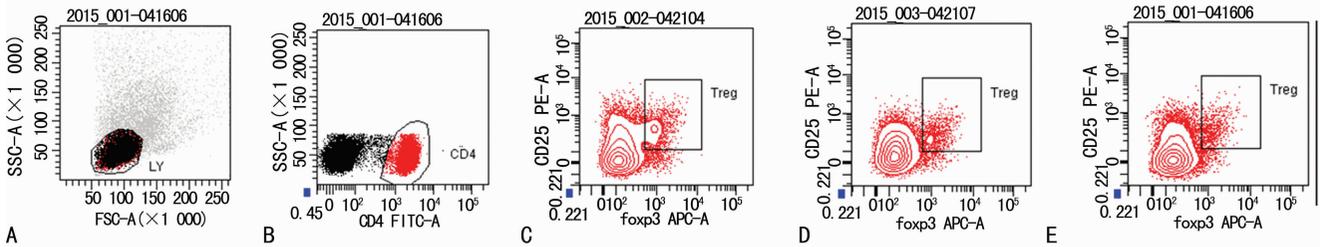
[Key words] rheumatoid arthritis; osteoarthritis; Treg cells; interleukin-35; flow cytometry

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性破坏性关节病变为特征的全身性自身免疫性疾病, 以双手、腕、膝、踝和足关节的对称性多关节炎为主要表现, 其病因及发病机制目前尚不明确^[1]。研究发现 CD4⁺T 细胞亚群失衡及各种细胞因子和炎症介质的异常表达在 RA 发病中起重要作用; CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg)具有免疫应答负调节和免疫无反应性两大功能, 在 RA 发病和进展中起负调控作用^[2], 而白细胞介素(IL)-35 是 Treg 细胞发挥最大抑制效应所必需的一种抑制性细胞因子。IL-35 属于 IL-12 细胞因子家族, 主要由 Treg 细胞分泌。小鼠体内实验表明, 体内 IL-35 的表达

缺失降低了 Treg 细胞的抑制功能, 与野生型 Treg 相比, IL-35 缺陷的 Treg 细胞不能控制效应 T 细胞的增殖^[3]。目前国内对 RA 患者 Treg 细胞及其所分泌的 IL-35 的相关研究和报道较少, 因此本研究拟观察 RA 患者外周血中 Treg 细胞和 IL-35 表达及其与临床指标的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014 年 10 月至 2016 年 10 月在成都军区总医院就诊并确诊为 RA 的患者 45 例(RA 组), 均符合 1987 年美国风湿病学会诊断标准^[4]。其中男 9 例, 女 36 例, 年龄 22~78 岁, 部分患者经过抗风湿药物或激素治疗, 根据 28



A:根据前向角散射光(FSC)和侧向角散射光(SSC)圈出淋巴细胞门 LY;B:根据 CD4 表达圈出 CD4⁺T 细胞;C:RA 患者 CD4⁺T 细胞中 foxp3 及 CD25 表达;D:OA 患者 CD4⁺T 细胞中 foxp3 及 CD25 表达;E:健康者 CD4⁺T 细胞中 foxp3 及 CD25 表达

图 1 FCM 检测外周血 Treg 表达

关节疾病活动度评分(DAS28)评估目前疾病活动程度: $DAS28 = 0.56 \times (\text{压痛关节数})^{1/2} + 0.28 \times (\text{肿胀关节数})^{1/2} + 0.70 \times \text{Ln}[\text{红细胞沉降率(ERS)}] + 0.014 \times (\text{患者健康状况评分})$ 。选择同时期骨关节炎(osteoarthritis,OA)患者 22 例(OA 组),其中男 8 例,女 14 例,年龄 38~69 岁。选择同期健康体检者 26 例(对照组),其中男 8 例,女 18 例,年龄 17~65 岁。本研究通过该院伦理委员会批准并已获得入选对象的知情同意。排除标准:合并其他自身免疫性疾病及高血压、糖尿病、冠心病、肿瘤性疾病、急慢性感染、传染性疾病,合并严重并发症,孕妇及哺乳期妇女。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 BD FACSCanto II 流式细胞检测仪购自美国 BD 公司;低速离心机(KDC-40 型)购自河北白洋离心机厂;酶标仪购自美国 Bio-rad 公司;洗板机 405LS 购自美国 Biotek 公司;CD4-FITC 荧光单克隆抗体、CD25-PE 荧光单克隆抗体、Foxp3-Alexa Fluor® 647 荧光单克隆抗体、破膜剂(BD Cytotfix/Cytoperm)购自美国 Becton Dickinson 公司;牛血清清蛋白(BSA)购自瑞士 Roche 公司;人 IL-35 细胞因子检测试剂盒购自美国 MyBioSource 公司;人淋巴细胞分离液(Ficoll-Hypaque)购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2.2 标本采集 采集各组对象空腹静脉外周血标本,用 EDTA-K₂ 抗凝处理,于 8 h 内分析检测,用人淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(PBMC),PBS 清洗重悬,制成浓度为 $1.0 \times 10^7/\text{mL}$ 细胞悬液用于流式细胞术(FCM)检测。全血标本 3 000 r/min 离心 5 min 分离血浆用于细胞因子检测。

1.2.3 Treg 细胞的检测 (1)取流式上样管,加入各 6 μL 的 CD4 和 CD25 单抗及 100 μL PBMC 悬液,混匀,室温避光放置 20 min;(2)混匀细胞,加入 250 μL BD Cytotfix/Cytoperm,混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 20 min;(3)加入 1 mL BD Perm/Wash™ buffer,1 500 r/min 水平离心 5 min,弃上清液,沾干;(4)重复第 3 步再洗 1 遍;(5)将细胞重悬于 50 μL BD Perm/Wash™ buffer,加入 foxp3 抗体 10 μL ,混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30~60 min;(6)重复步骤 3 洗 2 遍,弃上清液,细胞重悬于 500 μL PBS 中,用 BD FACSCanto II FCM 检测,Div software 分析结果。

1.2.4 IL-35 的检测 用 ELISA 方法检测血浆 IL-35 水平,操作按试剂盒说明书进行。

1.3 统计学处理 应用 Sigma Stat3.5 软件包进行统计分析,对于正态分布及接近正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间均数首先进行方差齐性检验,如满足方差齐性,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 *t* 检验,两组间相关性分析采用 Pearson 直线相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组对象外周血中 Treg 细胞水平比较 FCM 分析 Treg 表达,见图 1。结果发现,RA 组患者外周血中 Treg(CD4⁺

CD25⁺ foxp3⁺T)细胞占 CD4⁺T 细胞百分率较对照组明显升高($P < 0.05$);OA 组患者 Treg 表达比 RA 患者高,但差异无统计学意义($P = 0.086$)。3 组对象 foxp3 的荧光强度比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 3 组对象 Treg 表达率及 foxp3 荧光强度的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Treg 表达(%)	Foxp3 荧光强度
RA 组	45	5.65 ± 2.33 ^a	1 386.21 ± 287.56
OA 组	22	6.65 ± 2.51 ^a	1 433.25 ± 356.45
对照组	26	4.12 ± 1.75	1 313.44 ± 156.75

^a: $P < 0.05$,与对照组比较

2.2 RA 患者不同组别外周血 Treg 细胞水平比较 根据 DAS28 评分将 RA 患者分成 4 组,DAS28 评分越高的患者,其外周血 Treg 细胞数量和 foxp3 荧光强度越低,Treg 百分数在各组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$),而 foxp3 的荧光强度在各组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 2 RA 患者不同 DAS28 评分 Treg 表达及 foxp3 荧光强度的比较($\bar{x} \pm s$)

DAS28(分)	n	Treg 表达(%)	Foxp3 荧光强度
<2.6	11	7.985 ± 3.831	1 453.534 ± 373.742
2.6~<3.2	21	6.009 ± 2.434 ^a	1 418.802 ± 324.526
3.2~5.1	9	3.635 ± 1.316 ^{ab}	1 285.562 ± 278.341
>5.1	4	1.821 ± 0.884 ^{abc}	1 256.432 ± 256.325

^a: $P < 0.01$,与小于 2.6 分比较;^b: $P < 0.01$,与 2.6~<3.2 分比较;^c: $P < 0.01$,与 3.2~5.1 分比较

2.3 转录因子 foxp3 表达与 CD25 表达的相关性 将 CD4⁺T 细胞根据 CD25 表达荧光强度不同分为 P3、P4、P5 3 群,分别显示每群细胞 foxp3 表达情况(图 2)。foxp3 主要表达于高表达 CD25 的 CD4⁺T 细胞,中等程度表达 CD25 的细胞中也含有少量 foxp3 阳性细胞。可见 foxp3 表达与 CD25 表达呈正相关性。

2.4 3 组对象 IL-35 水平比较 RA、OA、对照组血浆 IL-35 分别为(34.22 ± 14.35)、(78.63 ± 24.58)、(67.56 ± 25.43) ng/L,RA 组外周血中 IL-35 水平明显低于 OA 组及对照组($P < 0.05$);IL-35 在 RA 患者 DAS28 < 2.6 分、2.6~<3.2 分、3.2~5.1 分、>5.1 分分别为(50.53 ± 16.44)、(42.93 ± 13.53)、(7.97 ± 4.52)、(2.70 ± 1.74) ng/L,DAS28 评分越高 IL-35 水平越低,各组间比较差异有统计学意义($F = 30.725$, $P < 0.01$),见图 3。

2.5 RA 患者 Treg 数量与 RA 实验室指标相关性分析 相

相关性分析发现,RA 患者 Treg 数量与类风湿因子(RF)、C 反应蛋白、抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体无相关性,而与 ESR、DAS28 评分呈负相关($r = -0.223, -0.343, P = 0.023, 0.011$)。IL-35 水平与 DAS28 评分呈负相关($r = -0.368, P = 0.008$)。

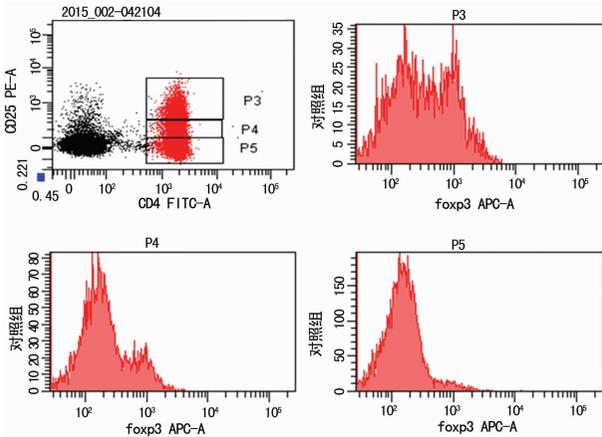


图2 foxp3 表达与 CD25 表达的相关性

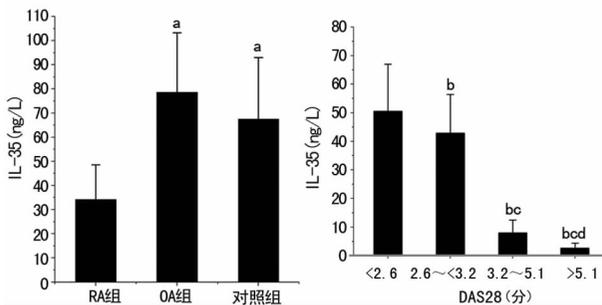


图3 各组间 IL-35 水平比较

a: $P < 0.05$, 与 RA 组比较; b: $P < 0.01$, 与小于 2.6 分比较; c: $P < 0.01$, 与 2.6 ~ < 3.2 分比较; d: $P < 0.01$, 与 3.2 ~ 5.1 分比较

3 讨 论

目前 RA 病因和发病机制尚不完全清楚,但一般认为与机体的自身免疫耐受被打破有关^[5]。Treg 细胞是一群具有免疫负调控作用的 T 淋巴细胞亚群,健康人外周血 Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞的 5%~10%,其在维持机体自身免疫耐受方面发挥着极为重要的作用^[6]。Treg 细胞主要通过以下 3 个方面发挥免疫抑制作用:(1)细胞直接接触介导抑制;(2)分泌抑制性细胞因子,如 IL-10、TGF- β 、IL-2 等;(3)表达抑制性转录因子 foxp3^[7-9]。

IL-35 是 IL-12 家族成员之一,主要由 Treg 细胞产生。IL-35 由 P35 亚基和 EB13 亚基构成,其中 P35 亚基与 IL-12 P35 亚基相同,EB13 亚基与 IL-27 EB13 亚基相同。小鼠体内实验表明,IL-35 的表达缺失降低了 Treg 细胞的抑制功能^[3],与野生型 Treg 细胞相比,IL-35 缺陷的 Treg 细胞不能控制效应 T 细胞的增殖。NIEDBALA 等^[10]证明,构建的 EB13-P35-Fc 融合蛋白体外能促进 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞增殖,抑制 CD4⁺ CD25⁻ T 细胞增殖,体外和体内均能抑制 Th17 细胞的分化,抑制 IL-17 分泌,增强干扰素 γ (IFN- γ)的产生,改善胶原性关节炎(CIA)症状。IL-35 对 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞有抑制功能,但仅局限于外周血成熟 T 细胞。IL-35 能诱导 CD4⁺ CD39⁺ CD25⁺ T 细胞产生 IL-10,从而阻止 CIA 的发生和恶化^[11-12]。

本研究发现,RA 患者外周血 Treg 细胞数量增加,但 IL-35 却明显低于对照组,说明具有负向调控功能的 IL-35 在 RA

表达降低,免疫耐受遭到破坏。但 Treg 细胞数量却增加,有可能其处于免疫“无能”状态,功能与正常 Treg 细胞不一致,不能发挥有效的免疫负调控功能。由于本研究中部分 RA 患者经过治疗,不能反映原始的发病状态,因此通过 DAS28 评分对 RA 患者进一步分组研究,发现不同组别 Treg 和 IL-35 表达存在较大差异,DAS28 评分越高,代表疾病活动度越大,其 Treg 细胞比例和 IL-35 表达均降低,说明在疾病活动期,外周血中的 Treg 细胞数量及功能均受一定程度的抑制,负调控能力减弱,机体处于免疫激活状态。而疾病恢复期 Treg 细胞数量和分泌 IL-35 功能均增强,甚至超过对照组,使机体处于免疫抑制状态。本研究还发现,Treg 细胞与 RA 病程具有一定相关性,并与 ERS 和 DAS28 评分呈负相关,而与 RF 和 C 反应蛋白均无相关性。Treg 细胞分泌 IL-35 的水平也与疾病活动度指标 DAS28 评分呈现负相关关系。

有文献报道 RA 患者外周血 Treg 细胞及 IL-35 减少,关节液中 Treg 细胞增加^[13-16]。也有研究发现 RA 患者外周血 Treg 细胞数量与对照组相比无变化或增高^[17-18]。造成这些研究结果差异的可能因素有:(1)RA 患者的活动度及不同病程的影响,患者处于风湿病的活动期,其 Treg 细胞的表达可能降低,而处于非活动期的患者其 Treg 细胞的表达可能跟健康者相同或者高于健康者。(2)用药情况,某些患者用药物治疗后,能部分改善机体免疫功能,重建机体对自身抗原的免疫耐受,其中 Treg 细胞就是重要的负调控细胞,其表达可能会增加^[19]。(3)本研究中 RA 患者 Treg 表达虽高于对照组,但其 IL-35 水平降低,说明其发挥正常的免疫抑制能力减弱,可能属于功能缺陷的 Treg 细胞。(4)实验样本群及抽样误差造成的影响。

综上所述,Treg 细胞及其分泌的 IL-35 有可能是影响 RA 发生、发展的重要因素,目前,对于此方面的研究尚待进一步完善,若研究清楚这些将对 RA 的发病及治疗提供有力的理论依据。

参考文献

- [1] SCHETT G, EMERY P, TANAKA Y, et al. Tapering biologic and conventional DMARD therapy in rheumatoid arthritis: current evidence and future directions [J]. Ann Rheum Dis, 2016, 75(8): 1428-1437.
- [2] 冯家烜, 戴生明. 调节性 T 细胞与类风湿关节炎 [J]. 中华风湿病学杂志, 2008, 12(1): 48-51.
- [3] COLLISON L W, WORKMAN C J, KUO T T, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function [J]. Nature, 2007, 450(7169): 566-569.
- [4] ARNETT F C, EDWORTHY S M, BLOCH D A, et al. The American rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 1988, 31(3): 315-324.
- [5] 缪怡, 胡朝英, 钱柳, 等. 类风湿性关节炎免疫学研究进展 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2011, 31(7): 1035-1040.
- [6] GONZALEZ-AMARO R, MARAZUELA M. T regulatory (Treg) and T helper 17 (Th17) lymphocytes in thyroid autoimmunity [J]. Endocrine, 2016, 52(1): 30-38.
- [7] WOLF D, SOPPER S, PIRCHER A, et al. Treg(s) in cancer: friends or foe? [J]. J Cell Physiol, 2015, 230(11): 2598-

2605.

- [8] VON BOEHMER H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(4): 338-344.
- [9] ROTHSTEIN D M, CAMIRAND G. New insights into the mechanisms of Treg function[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2015, 20(4): 376-384.
- [10] NIEBALA W, WEI X Q, CAI B E, et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells[J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37(11): 3021-3029.
- [11] KOCHETKOVA I, GOLDEN S, HOLDERNESS K, et al. IL-35 stimulation of CD39⁺ regulatory T cells confers protection against collagen II-induced arthritis via the production of IL-10[J]. *J Immunol*, 2010, 184(12): 7144-7153.
- [12] MCINNES I B, LIEW F Y. Cytokine networks—towards new therapies for rheumatoid arthritis[J]. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2005, 1(1): 31-39.
- [13] 姚寿林, 徐建华, 连莉, 等. 类风湿关节炎患者外周血 Th17 细胞/调节性 T 细胞变化及其临床意义[J]. *中华风湿病学杂志*, 2011, 15(5): 309-313.
- [14] 王伟, 杨肃文, 张宏娟 等. 类风湿关节炎患者 Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ T 细胞的流式细胞术检测及意义[J]. *中华微生物*

学和免疫学杂志, 2008, 28(6): 564-564.

- [15] SHALINI U P, DEBNATH T, VIDYASAGAR J, et al. A study on FoxP3 and Tregs in paired samples of peripheral blood and synovium in rheumatoid arthritis[J]. *Central Eur J Immunol*, 2015, 40(4): 431-436.
- [16] NAKANO S, MORIMOTO S, SUZUKI S, et al. Immunoregulatory role of IL-35 in T cells of patients with rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology*, 2015, 54(8): 1498-1506.
- [17] 杨茜, 叶勤, 袁向亮, 等. 流式细胞术检测 RA 患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg 细胞及其 GITR 表达[J]. *临床检验杂志*, 2008, 26(4): 291-293.
- [18] NAKAMURA T, KUMON Y, HIRATA S, et al. Abatacept May be effective and safe in patients with amyloid A amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2014, 32(4): 501-508.
- [19] KIKUCHI J, HASHIZUME M, KANEKO Y, et al. Peripheral blood CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} regulatory T cells are significantly increased by tocilizumab treatment in patients with rheumatoid arthritis; increase in regulatory T cells correlates with clinical response[J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17(1): 1-10.

(收稿日期: 2017-06-23 修回日期: 2017-08-31)

(上接第 621 页)

- [6] TILLY H, VITOLO U, WALEWSKI J, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(7): 78-82.
- [7] 陈碧玲, 赵哲, 覃仕海, 等. 吉西他滨联合奥沙利铂治疗淋巴瘤患者的疗效及安全性评价[J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23(2): 445-449.
- [8] BARRINGTON S F, MIKHAEEL N G, KOSTAKOGLU L, et al. Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(27): 3048-3058.
- [9] DUECK A C, MENDOZA T R, MITCHELL S A, et al. Validity and reliability of the US National cancer institute's Patient-Reported outcomes version of the common terminology criteria for adverse events (PRO-CTCAE) [J]. *JAMA Oncol*, 2015, 1(8): 1051-1059.
- [10] CRUMP M, KURUVILLA J, COUBAN S, et al. Randomized comparison of gemcitabine, dexamethasone, and cisplatin versus dexamethasone, cytarabine, and cisplatin chemotherapy before autologous Stem-Cell transplantation for relapsed and refractory aggressive lymphomas: NCIC-CTG LY. 12 [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(31): 3490-3496.

- [11] QI F, DONG M, HE X H, et al. Gemcitabine, dexamethasone, and cisplatin(GDP) as salvage chemotherapy for patients with relapsed or refractory peripheral T cell lymphoma-not otherwise specified[J]. *Ann Hematol*, 2017, 96(2): 245-251.
- [12] EI GNAOUI T, DUPUIS J, BELHADJ K, et al. Rituximab, gemcitabine and oxaliplatin; an effective salvage regimen for patients with relapsed or refractory B-cell lymphoma not candidates for high-dose therapy[J]. *Ann Oncol*, 2007, 18(8): 1363-1368.
- [13] 杨建良, 石远凯, 何小慧, 等. 吉西他滨联合奥沙利铂对多种化疗方案治疗失败后淋巴瘤患者的疗效及安全性评价[J]. *中华肿瘤杂志*, 2014, 36(2): 137-140.
- [14] 平凌燕, 宋玉琴, 郑文, 等. DICE 方案治疗 97 例复发/难治非霍奇金淋巴瘤患者的疗效及生存分析[J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37(9): 790-794.
- [15] 陆颖, 黄海欣, 李桂生. GEMOX 方案与 GDP 方案治疗复发或难治性非霍奇金淋巴瘤的临床对比研究[J]. *中国癌症杂志*, 2011, 21(8): 621-625.
- [16] 彭翠翠, 刘林, 文静. 利妥昔单抗联合 APBSCT 治疗 B 细胞性非霍奇金淋巴瘤的临床研究[J]. *重庆医学*, 2014, 43(28): 3718-3721.

(收稿日期: 2017-07-11 修回日期: 2017-09-26)