

• 论 著 •

多发性骨髓瘤患者外周血淋巴细胞亚群的变化及临床意义

丁 海, 王 森, 高 硕, 徐学静, 陈军浩[△]

(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 南京 210008)

摘 要:目的 探讨初发多发性骨髓瘤(MM)患者淋巴细胞亚群表达水平的变化, 分析其免疫功能状态及临床意义。方法 收集南京大学医学院附属鼓楼医院初诊为 MM 的患者 20 例(患者组), 健康体检者 25 例(健康对照组)。利用流式细胞仪分别检测 2 组研究对象的外周血淋巴细胞的 CD3⁺ T 细胞、CD3⁺ CD4⁺ T 细胞、CD3⁺ CD8⁺ T 细胞、B 细胞、NK 细胞、辅助性 T 淋巴细胞(Th)1、Th2, 以及调节性 T 细胞(Treg)的表达水平, 并进行比较。结果 患者组与健康对照组比较, CD3⁺ T 细胞、CD3⁺ CD4⁺ T 细胞比例的差异无统计学意义($P>0.05$); CD4⁺/CD8⁺ 的比值、B 细胞、Th1、Th2 比例降低; CD3⁺ CD8⁺ T 细胞、Th1/Th2、Treg 所占比例比健康对照组明显升高, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 MM 患者免疫功能发生紊乱, T 细胞亚群的表达异常可能与疾病的发生、发展及预后相关。

关键词:多发性骨髓瘤; 淋巴细胞亚群; 辅助性 T 淋巴细胞 1; 辅助性 T 淋巴细胞 2; 调节性 T 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.13.012 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)13-1880-03

The clinical significance of lymphocyte subsets in peripheral blood from patients with multiple myeloma

DING Hai, WANG Sen, GAO Shuo, XU Xuejing, CHEN Junhao[△]

(Department of Laboratory, Nanjing Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the lymphocyte subsets from patients with multiple myeloma (MM), analysis the state of immune function and clinical significance. **Methods** 21 patients with MM in newly diagnosed and 25 healthy volunteers were recruited from the Drum Tower hospital affiliated to Medical School of Nanjing University. The differences of CD3⁺ T cells, CD3⁺ CD4⁺ T cells, CD3⁺ CD8⁺ T cells, B cells, NK cells, Th1, Th2 and Treg cells in peripheral blood between the patients of MM and healthy people were measured by the flow cytometry. **Results** Compared with the healthy volunteers and the patients with MM in newly diagnosed, the expression of CD3⁺ T cell, CD3⁺ CD4⁺ T cell in lymphocyte were no statistically significant ($P>0.05$); the expression of B cells, Th1, Th2 cells and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ in lymphocyte from the patients with MM were lower than healthy control ($P<0.05$); the expression of CD3⁺ CD8⁺ cells, Treg cells and the ratio of Th1/Th2 were higher than the control group ($P<0.05$), the differences were statistically significant. **Conclusion** The immune function of patients with multiple myeloma was disorder, the imbalance of T cell subgroup may be associated with the occurrence, development and prognosis of disease.

Key words: multiple myeloma; lymphocyte subsets; Th1; Th2; Treg

多发性骨髓瘤(MM)是一种以骨髓浆细胞恶性增生为主要特征的血液恶性肿瘤。约 70% 的 MM 患者会出现骨痛, 60%~80% 出现贫血, 还有一些患者表现为出血、感染、器官病变等症状, 复杂且无典型症状, 易错、漏诊^[1]。若不及时治疗, MM 患者只有半年的生存期, 而只接受传统化疗, 生存期也很少超过 3 年, 目前尚无治愈 MM 的方法^[2]。近年来, 有研究证实 MM 存在免疫功能紊乱, 淋巴细胞是机体免疫系统的重要组成部分, 特别是 T 淋巴细胞尤为重要, 主导细胞免疫, 辅助体液免疫。但具体的 T 细胞亚群如辅助性 T 淋巴细胞(Th)1、Th2、调节性 T 细胞(Treg)在 MM 的表达及临床意义还有待进一步研究。现分析淋巴细胞亚群、Th 中的 Th1、Th2 细胞, 以及 Treg 等各项免疫系统指标, 探讨 MM 的细胞免疫功能状态, 为临床的诊断、治疗及疗效判断提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 8 月至 2016 年 8 月南京大学医学院附属鼓楼医院血液科初诊为 MM 的患者 20 例(患者组), 中位年龄 63 岁, 男 12 例, 女 8 例, 诊断均符合国内有关诊断标准^[3]。同时选取该院健康体检者 25 例作为健康对照组, 平均年龄 52 岁, 男 13 例, 女 12 例, 都为非血液系统恶性疾病及免疫系统疾病患者。2 组研究对象的性别、年龄等一般资料比

较, 差异无统计学意义($P>0.05$), 具有可比性。

1.2 仪器与试剂 仪器采用 FACS Calibur 流式细胞仪(BD 公司生产), CO₂ 培养箱, 离心机, 振荡器等。试剂由美国 Becton Dickinson 公司(BD 公司)提供的鼠抗人单克隆抗体 Anti-Human CD3-PerCP、Anti-Human CD8-APC、Anti-Human IL-4-PE、Anti-Human IFN- γ FITC、BD Multitest™ IMK Kit 试剂盒、Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug™ (刺激剂主要成分为 PMA、Ionomycin 和 Brefeldin), 及 Human Regulatory T Cell staining kit 试剂盒(eBioscience 公司购置)。

1.3 方法

1.3.1 淋巴细胞亚群检测 加入 50 μ L 混匀后 EDTA 抗凝全血及 20 μ L BD MultitestCD3/CD8/CD45/CD4 试剂于流式管 A 中, 50 μ L 混匀后 EDTA 抗凝全血及 20 μ L BD MultitestCD16+56/CD45/CD19 试剂于流式管 B 中(避免粘到管壁), 混匀后室温(25 $^{\circ}$ C)避光孵育 15 min, 加入 1 $\times$ BD Multitest 溶血素 450 μ L 振荡混匀后离心(1 200 r/min, 5 min), 弃上清液, 加入 2 mL 生理盐水振荡混匀后再次离心(1 200 r/min, 5 min), 弃上清液后加入 360 μ L 鞘液上机检测。

1.3.2 Th1/Th2 的检测 取新鲜的 50 μ L 混匀的肝素抗凝全血于流式管中, 加入 1 μ L 刺激剂振荡混匀, 放入 37 $^{\circ}$ C CO₂

孵箱孵育 4~6 h(每小时振荡混匀 1 次),在流式管中分别加入 20 μ L CD3、CD8 抗体,混匀后室温(25 $^{\circ}$ C)避光孵育 15 min,加入 50 μ L 固定剂继续孵育 15 min 后加入 2 mL 生理盐水洗涤离心(1 200 r/min,5 min),弃上清液,同时加入 50 μ L 破膜剂、20 μ L 白细胞介素-4(IL-4)和 20 μ L γ -干扰素(INF- γ),室温避光孵育 30 min,再次加入 1 mL 生理盐水洗涤离心(1 200 r/min,5 min)后,弃上清液后加入 360 μ L 鞘液上机检测。

1.3.3 Treg 的检测 取新鲜的 50 μ L 混匀的 EDTA 抗凝全血于流式管中,分别加入 20 μ L CD4 和 CD25 振荡混匀,室温(25 $^{\circ}$ C)避光孵育 30 min,加入 1 mL 悬浮液洗涤离心(1 200 r/min,5 min),弃上清液后加入新配制的固定剂 50 mL 振荡混匀,室温孵育 30 min 后加入 800 mL 破膜剂离心(1 200 r/min,5 min),弃上清液后分别加入 50 μ L 破膜剂和 20 μ L FoxP3,室

温避光继续孵育 30 min 后加入 1 mL 生理盐水洗涤离心(200 r/min,5 min),弃上清液,加入 360 μ L 鞘液上机检测。

1.4 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 和 GraphPad Prism5 软件作图表示,采用 Student's *t* 检验对患者组和健康对照组的差异进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组研究对象淋巴细胞亚群结果比较 与健康对照组比较,患者组 CD3⁺ T 细胞、CD3⁺ CD4⁺ T 细胞、自然杀伤细胞(NK)比例差异无统计学意义($P > 0.05$);患者组 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞比例升高,CD4⁺/CD8⁺ 比值降低,B 细胞比例降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 2 组研究对象淋巴细胞亚群结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(<i>n</i>)	CD3 ⁺ T 细胞	CD3 ⁺ CD4 ⁺ T 细胞	CD3 ⁺ CD8 ⁺ T 细胞	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	B 细胞	NK 细胞
健康对照组	25	70.46 $\pm$ 5.80	42.15 $\pm$ 7.54	24.98 $\pm$ 5.33	1.80 $\pm$ 0.65	12.51 $\pm$ 3.96	13.50 $\pm$ 5.54
患者组	20	72.32 $\pm$ 12.10	36.88 $\pm$ 10.14	32.49 $\pm$ 14.07	1.38 $\pm$ 0.65	6.37 $\pm$ 4.31	20.07 $\pm$ 12.00
<i>t</i>		0.882	1.959	2.317	2.364	4.708	1.757
<i>P</i>		0.389	0.065	0.032	0.029	<0.001	0.095

2.2 2 组研究对象 Th1、Th2 表达水平结果比较 设门方法如图 1A 所示,先以侧向散射角(SSC)与 CD3 确定有核细胞中 CD3⁺ 细胞群及 T 细胞群,用 CD8 剔除 T 细胞中 CD8⁺ 细胞群,最后在 CD3⁺ CD8⁻ 细胞群中通过检测 IL-4 和 INF- γ 的比例来确定 Th1、Th2 在淋巴细胞中所占比率。患者组 Th1 与健康对照组比较,Th1 与 Th2 所占的比例降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1B。患者组 Th1/Th2 比健康对照组明显升高($P < 0.05$),Th1、Th2 平衡出现紊乱,呈 Th1 偏移状态,见图 1C、图 1D。

2.3 2 组研究对象 Treg 检测结果比较 Treg 在调控免疫反应、维持免疫系统的稳定性发挥着重要作用,是 CD4⁺ T 细胞的一种,是一种 CD4⁺ CD25⁺ 的 T 细胞,FoxP3⁺ 是其激活的特异性指标,通过标记 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ 的细胞数量的变化判断 Treg 细胞的变化,见图 2A。2 组之间 Treg 结果比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2B。

3 讨 论

MM 是一种浆细胞恶性增殖的血液恶性肿瘤疾病,免疫功能的异常也是其特点之一。淋巴细胞是机体免疫系统的重要组成部分,它包含不同功能的亚群,可大致分为 T 细胞、B 细胞、NK 细胞等。本研究发现 MM 患者 B 细胞明显降低,这可能是由于异常浆细胞的增生抑制了 B 细胞的分化所致。T 细胞可以介导细胞免疫,辅助机体的体液免疫,它可分为 CD4⁺ T 细胞(主要为辅助性淋巴细胞,Th 细胞)和 CD8⁺ T 细胞(主要为细胞毒性淋巴细胞)。有研究表明在某些恶性肿瘤性疾病中,机体的免疫平衡发生紊乱,CD4⁺ T 细胞与 CD8⁺ T 细胞比例发生变化^[4-5]。本研究患者组 CD8⁺ T 细胞较健康对照组明显增高,CD4⁺/CD8⁺ 的比例降低,与有关研究相符。CD8⁺ T 与 CD4⁺ T 细胞构成一种免疫平衡,MM 患者 CD4⁺/CD8⁺ 平衡被打乱,异常增高的 CD8⁺ 细胞很有可能失去其原有的抗肿瘤功能,并抑制机体对控制 MM 免疫调节的功能,使病情加重。对 MM 患者进行 CD8⁺ 细胞的治疗可能会帮助机体重新建立免疫平衡。

有研究表明,CD4⁺ T 细胞是临床评价 T 细胞功能的主要指标^[6]。Th 细胞是 CD4⁺ 的 T 细胞重要组成部分,在免疫反应中发挥重要作用,能够分泌多种细胞因子介导机体的免疫应答。Th 主要分为 Th1 和 Th2 2 类,Th1 主要分泌 IL-2、INF- γ 、肿瘤坏死因子- β 。它可以辅助细胞毒性 T 细胞的分化,加强巨噬细胞在体内的杀伤和吞噬能力,在机体中产生细胞毒性和炎性作用。Th2 主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 等细胞因子,刺激 B 细胞的增殖、分化并产生免疫球蛋白,与肥大细胞、嗜酸性粒细胞等一起发挥机体体液免疫作用。有研究表明,多种血液系统疾病都存在 Th1、Th2 细胞亚型的缺陷^[7]。本研究结果显示,MM 患者 Th1 和 Th2 所占比例均比健康对照组下降,说明 MM 患者的细胞免疫和体液免疫都受到不同程度的损

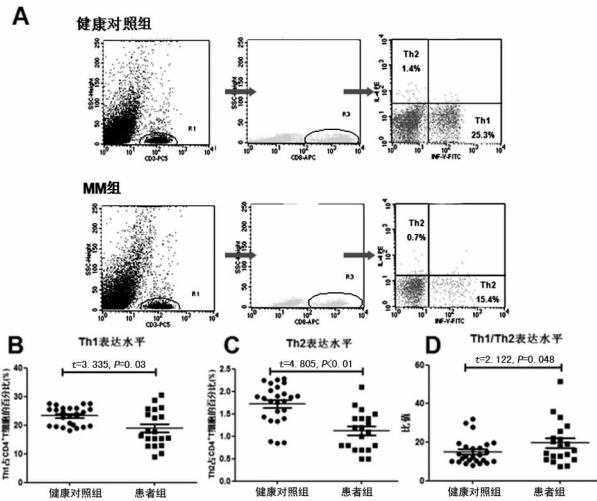


图 1 Th1、Th2 表达水平圈门策略及结果

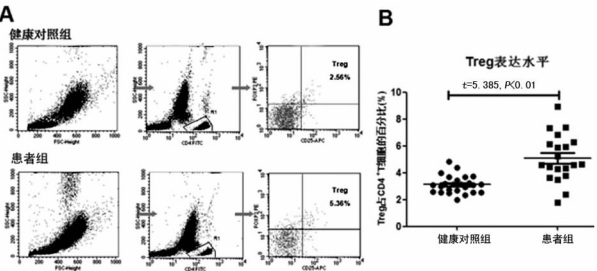


图 2 Treg 表达水平圈门策略及结果

伤,免疫系统无法正常清除病变细胞,使病情无法有效控制。在正常情况下, Th1/Th2 处于一种动态平衡,是机体维持正常免疫功能的重要因素。当平衡发生紊乱且向 Th1 或 Th2 转化时,就称之为 Th1 或 Th2 漂移。本研究 MM 患者 Th1/Th2 的比值比健康对照组升高,处于一种 Th1 漂移的免疫失衡状态,与吴弘英等^[8]研究相符。Th1 可以主要生产 IL-2,刺激 NK 细胞增殖,与本研究 MM 患者 NK 细胞相对增高($P<0.05$)相同。颜斌等^[9]却认为因为 Th1 受到骨髓瘤分泌的肿瘤生长因子- β 抑制,使 MM 患者处于 Th2 漂移状态。结合本研究可以发现,可能由于 Th1、Th2 都有所降低,在 MM 的不同阶段, Th1 与 Th2 降低的程度不同,导致结果不同,但都可说明 Th1/Th2 平衡紊乱与 MM 的预后密切相关,通过调节 MM 患者 Th1、Th2 平衡的治疗方法可能是不同于传统治疗方法的一种新思路。

Treg 是一种控制自身免疫的 T 细胞亚群,具有免疫负向调控功能,与 Th1、Th2 一起维持机体的免疫系统稳定。其与机体的免疫耐受,肿瘤逃避机制有一定的关系,一方面可以控制人体对自身成分的免疫,另一方面又可能使自体同源的肿瘤细胞逃避免疫机制。有研究报道,在一些肿瘤疾病中 Treg 明显增高,抑制机体的肿瘤免疫^[10]。本研究结果表明,MM 患者 Treg 比健康对照组明显增高,高比例的 Treg 一方面抑制了机体对病变细胞的清除,另一方面还阻碍免疫系统对肿瘤细胞的识别,可能是 MM 的病情不断加重的原因之一。对 MM 患者体内 Treg 进行清除而重新建立肿瘤免疫在未来可能是治疗 MM 的重要手段。

综上所述,患者组与健康对照组比较,B 细胞、Th1、Th2 比例及 $CD4^+/CD8^+$ T 细胞的比值降低, $CD8^+$ T 细胞、Th1/Th2、Treg 细胞所占比例比健康对照组明显升高,提示 MM 患者体内免疫功能受损, $CD4^+/CD8^+$ 、Th1/Th2 等免疫平衡发生紊乱,高数量的 Treg 带来的肿瘤免疫逃逸对患者的诊断、预后及治疗产生了一定的影响。本研究结果说明, T 细胞亚群的表达异常在 MM 发病过程中发挥了重要作用,但具体的机制仍有待进一步研究。

(上接第 1879 页)

- [8] Aziz MH, Chen XD, Zhang Q, et al. Suppressing NRIP1 inhibits growth of breast cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(37):39714-39724.
- [9] Fu F, Xiao X, Zhang T, et al. Expression of receptor protein tyrosine phosphatase is a risk factor for triple negative breast cancer relapse[J]. *Biomed Rep*, 2016, 4(2): 167-172.
- [10] Fan L, Strasser-Weippl K, Li JJ, et al. Breast cancer in China[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7):e279-e289.
- [11] Piroth MD, Petz D, Pinkawa M, et al. Usefulness of a thermoplastic breast bra for breast cancer radiotherapy: a prospective analysis [J]. *Strahlenther Onkol*, 2016, 10(9):245-249.
- [12] Moloney N, Sung JM, Kilbreath S, et al. Prevalence and risk factors associated with pain 21 months following surgery for breast cancer[J]. *Supportive Care in Cancer*, 2016, 24(11):4533-4539.
- [13] Mangolini A, Ferracin M, Zanzi MV, et al. Diagnostic and prognostic microRNAs in the serum of breast cancer pa-

参考文献

- [1] 芦晗, 王志银, 李强. 3 种实验技术在多发性骨髓瘤检测中的应用[J]. *检验医学与临床*, 2015, 12(9):1278-1280.
- [2] 周波. 多发性骨髓瘤 2 例诊治体会[J]. *当代医学*, 2011, 17(2):96-97.
- [3] 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, 2007:232-235.
- [4] Meyer ZU, Haerste G, Cordes S, et al. FoxP3+ regulatory T cells determine disease severity in rodent models of inflammatory neuropathies[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e108756.
- [5] 陈佳琦, 金晶, 姚小敏, 等. 恶性肿瘤患者外周血淋巴细胞亚群分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 10(6): 1491-1492.
- [6] 张建军, 谢辉, 李菊红. 艾滋病抗病毒疗法患者 $CD4^+$ T 淋巴细胞变化的相关因素研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 11(2):109-112.
- [7] 尹冬梅, 许洪志, 张婧瑶, 等. AA、MDS 和 AML 患者 $CD4^+$ T 细胞亚群的变化及其临床意义[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2012, 18(3):66-70.
- [8] 吴弘英, 郝鲁梅, 刘波. 多发性骨髓瘤患者 Th1、Th2 水平的检测及其临床意义[J]. *中国误诊学杂志*. 2011, 22(6): 5351-5352.
- [9] 颜斌, 魏锦, 陈健, 等. 外周血 T 细胞亚群及细胞免疫功能研究[J]. *重庆医学*, 2013, 32(11):1210-1212.
- [10] Tu JF, Ding YH, Ying XH, et al. Regulatory T cells, especially ICOS+ FOXP3+ regulatory T cells, are increased in the hepatocellular carcinoma microenvironment and predict reduced survival[J]. *Sci Rep*, 2016, 11(6):35-36.

(收稿日期:2017-01-16 修回日期:2017-03-11)

tients measured by droplet digital PCR[J]. *Biomark Res*, 2015, 3(1):12-14.

- [14] Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(15):4429-4434.
- [15] De P, Carlson JH, Wu H, et al. Wnt-beta-catenin pathway signals metastasis-associated tumor cell phenotypes in triple negative breast cancers[J]. *Oncotarget*, 2016, 18(3): 529-533.
- [16] Zhang DX, Wang YE, Dai YE, et al. Downregulation of RIP140 in hepatocellular carcinoma promoted the growth and migration of the cancer cells [J]. *Tumor Biology*, 2015, 36(3):2077-2085.
- [17] Lapierre M, Bonnet S, Bascoul-Mollevis CA, et al. RIP140 increases APC expression and controls intestinal homeostasis and tumorigenesis[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(5): 1899-1913.

(收稿日期:2017-01-16 修回日期:2017-02-26)