

DOI:10.16781/j.0258-879x.2019.12.1285

· 论 著 ·

## 恶性血液病患者异基因造血干细胞移植后骨髓 T 淋巴细胞亚群重建的动态观察

赵潇溟, 黄爱杰, 胡晓霞, 唐古生, 章卫平, 杨建民, 王健民\*  
海军军医大学(第二军医大学)长海医院血液科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 研究恶性血液病患者经异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)后骨髓免疫重建中 T 淋巴细胞的重建规律及其与外周血中 T 淋巴细胞重建的差异。**方法** 本研究采用前瞻性研究设计。收集 2015 年 9 月至 2017 年 1 月在我院血液科行 allo-HSCT 的 41 例恶性血液病患者的骨髓及外周血标本, 收集同期 7 名健康供者的骨髓及外周血标本作为对照样本。用流式细胞术分析移植前和移植后 15、30、60、90、180 d 时的 T 淋巴细胞亚群分布, 包括 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞、辅助性 T 细胞(Th)1、Th2, 并用 Luminex 技术检测 Th1 相关细胞因子白细胞介素 2 受体(IL-2R)、白细胞介素 18(IL-18)水平。**结果** 恶性血液病患者在移植后 15 d 和 30 d 时骨髓中 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞比例均低于对照组( $P$ 均 $<0.05$ ), 至移植后 180 d 仍未见回升; CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞比例在移植后早期(15、30 d)低于对照组( $P$ 均 $<0.01$ ), 60 d 时恢复至正常水平; 骨髓中 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞比例整体水平均低于外周血中水平( $P=0.001、0.002$ )。恶性血液病患者在移植后 15、30、60、90、180 d 时骨髓中 Th1 比例均高于对照组( $P$ 均 $<0.05$ ), 且整体水平高于外周血中水平( $P=0.006$ ); 骨髓中 Th2 比例在移植后 90 d 内均无明显变化, 在 180 d 时高于对照组( $P=0.034$ ), 但整体水平与外周血中水平无明显差异( $P>0.05$ )。骨髓中 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞比值在移植后逐渐下降, 至移植后 180 d 时低于对照组( $P=0.040$ ); 而骨髓中 Th1/Th2 比值在移植后 90 d 内各时间节点(15、30、60、90 d)均高于对照组( $P$ 均 $<0.01$ ), 180 d 时与对照组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。恶性血液病患者骨髓和外周血中 IL-2R 水平在移植后 15、30、60、90 d 均高于对照组( $P$ 均 $<0.05$ ); IL-18 水平在移植后 15、30、60 d 高于对照组( $P$ 均 $<0.05$ ), 但移植后 90 d 时仅外周血中水平与对照组差异有统计学意义( $P=0.021$ ); 骨髓与外周血中 IL-2R 和 IL-18 整体水平均无明显差异( $P$ 均 $>0.05$ )。**结论** 恶性血液病患者 allo-HSCT 后, 骨髓中各 T 淋巴细胞亚群的重建规律不同, 且与外周血中有所差异。

**[关键词]** 异基因造血干细胞移植; 骨髓; T 淋巴细胞亚群; 免疫重建; 外周血

**[中图分类号]** R 457.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)12-1285-07

### Re-constitution of T lymphocyte subsets in bone marrow of patients with hematological malignancies after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

ZHAO Xiao-ming, HUANG Ai-jie, HU Xiao-xia, TANG Gu-sheng, ZHANG Wei-ping, YANG Jian-min, WANG Jian-min\*  
Department of Hematology, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the re-constitution rule of T lymphocyte subsets in bone marrow of patients with hematological malignancies after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), and its differences with those in the peripheral blood. **Methods** This study was a prospective study. We collected the bone marrow and peripheral blood samples from 41 patients with hematological malignancies receiving allo-HSCT treatment in Department of Hematology of our hospital from Sep. 2015 to Jan. 2017. During the same period, bone marrow and peripheral blood samples of 7 healthy donors were collected as control samples. Flow cytometry was used to evaluate the distribution of T lymphocyte subsets, including CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells, T-helper cell (Th)1 and Th2 before transplantation and 15, 30, 60, 90 and 180 d after transplantation. Luminex technique was used to evaluate Th1-related cytokines (interleukin 2 receptor [IL-2R] and interleukin 18 [IL-18]). **Results** The proportions of CD4<sup>+</sup> T cells in bone marrow of the patients with hematological malignancies were

**[收稿日期]** 2019-09-07 **[接受日期]** 2019-11-01

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81530047, 81870143), 上海市卫生系统优秀人才培养计划(2017BR012). Supported by National Natural Science Foundation of China (81530047, 81870143) and Outstanding Talent Training Plan of Health System of Shanghai (2017BR012).

**[作者简介]** 赵潇溟, 硕士生. E-mail: zxm\_1115@163.com

\*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161293, E-mail: jmwangch@139.com

significantly lower versus the healthy controls 15 and 30 d after transplantation (both  $P < 0.05$ ), and no recovery was found 180 d after transplantation. The proportions of  $CD8^+$  T cells in bone marrow of the patients with hematological malignancies were significantly lower versus the healthy controls 15 and 30 d after transplantation (both  $P < 0.01$ ), and it recovered to normal level 60 d after transplantation. The total proportions of  $CD4^+$  and  $CD8^+$  T lymphocytes in bone marrow were both significantly lower than those in the peripheral blood of the patients with hematological malignancies ( $P = 0.001, 0.002$ ). The proportions of Th1 in bone marrow of the patients with hematological malignancies were significantly higher than those of the healthy controls 15, 30, 60, 90 and 180 d after transplantation (all  $P < 0.05$ ), and the total level was significantly higher than that in peripheral blood ( $P = 0.006$ ). The proportions of Th2 in bone marrow did not change significantly within 90 d after transplantation, but it was significantly higher 180 d after transplantation than that of the healthy controls ( $P = 0.034$ ), and the total level was similar to the total level of peripheral blood ( $P > 0.05$ ). The ratio of  $CD4^+/CD8^+$  T lymphocytes in bone marrow was gradually decreased after transplantation, and significantly lower versus the healthy controls 180 d after transplantation ( $P = 0.040$ ). The ratios of Th1/Th2 in bone marrow were significantly higher than those of the healthy controls 15, 30, 60 and 90 d after transplantation (all  $P < 0.01$ ), while it was similar to the healthy control level 180 d after transplantation ( $P > 0.05$ ). The levels of IL-2R in bone marrow and peripheral blood of the patients with hematological malignancies were significantly higher than those of healthy controls 15, 30, 60 and 90 d after allo-HSCT (all  $P < 0.05$ ). The levels of IL-18 were significantly higher than those of healthy controls 15, 30 and 60 d after allo-HSCT (all  $P < 0.05$ ), and that in peripheral blood 90 d after transplantation was also significantly different from that of healthy controls ( $P = 0.021$ ). There were no significant differences in IL-2R or IL-18 between bone marrow and peripheral blood (both  $P > 0.05$ ).

**Conclusion** After allo-HSCT, the re-constitution rules of different T lymphocyte subsets in bone marrow of patients with hematological malignancies are different, and are different from those in peripheral blood.

**[Key words]** allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; bone marrow; T lymphocyte subsets; immune re-constitution; peripheral blood

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(12): 1285-1291]

异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT)是治疗多种血液病的重要方法,allo-HSCT的成功不仅在于造血功能的重建,更包括免疫功能的重建。既往对allo-HSCT后免疫功能重建的研究多以外周血为观察对象<sup>[1-2]</sup>。骨髓作为造血器官和一级、二级免疫器官<sup>[3-4]</sup>,其中T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞等免疫细胞与其分泌的细胞因子及介导的信号通路共同组成免疫微环境(immune niche),免疫微环境的细胞组分等与外周血相差较大。有文献报道了恶性血液病患者接受了allo-HSCT治疗后不同时间点骨髓中部分免疫细胞的变化<sup>[5]</sup>,但鲜见对骨髓中T淋巴细胞的重建规律及其与外周血免疫重建异同的研究。本研究动态观察了allo-HSCT患者自移植前至移植后180 d骨髓 $CD4^+$ T淋巴细胞、 $CD8^+$ T淋巴细胞、辅助性T细胞(T-helper cell, Th)1、Th2及Th1相关的细胞因子——白细胞介素2受体(interleukin 2 receptor, IL-2R)、白细胞介素(interleukin, IL)-18的动态变化情况,并与外周血的数据进行比较,以更深入了解allo-HSCT后骨髓T淋巴细胞的重建情况。

## 1 资料和方法

1.1 研究对象 纳入2015年9月至2017年1月在我院血液内科行allo-HSCT后无移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)、无严重感染、无复发且造血功能恢复良好的恶性血液病患者41例。患者年龄为11~56岁,中位年龄为36岁;男20例(49%)、女21例(51%);急性髓细胞白血病24例(59%)、急性淋巴细胞白血病14例(34%)、骨髓增生异常综合征2例(5%)、慢性粒细胞白血病1例(2%);人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)配型全相合29例(71%)、非全相合12例(29%);亲缘供体移植27例(66%),无关供体移植14例(34%);输注单个核细胞数为 $(5.14 \sim 14.53) \times 10^8/\text{kg}$ ,中位数为 $7.12 \times 10^8/\text{kg}$ 。选择同期7名健康异基因造血干细胞供者为对照组。对照组年龄为23~54岁,中位年龄为37岁;男5例、女2例。本研究通过我院医学伦理委员会审批,所有研究对象或家属均签署知情同意书。

1.2 预处理方案 20例(49%)接受同胞全相合供者allo-HSCT的患者予白消安+环磷酰胺

(bulsufan, cyclophosphamide; BuCy)、氟达拉滨+白消安+阿糖胞苷(fludarabine, bulsufan, cytarabine; FBA)或改良BuCy方案(在BuCy方案中加阿糖胞苷)预处理, 21例(51%)接受其他供者allo-HSCT的患者在预处理中加用抗胸腺细胞蛋白(anti-thymocyte globulin, ATG)<sup>[6]</sup>。

1.3 GVHD预防方案 采用环孢素+甲氨蝶呤+霉酚酸酯方案预防GVHD。环孢素3 mg/kg于预处理开始每天静滴, 胃肠道功能恢复正常后改为每12 h口服1次, 并维持血药浓度200~300 ng/mL; 移植后60~90 d开始减量, 如无GVHD, 至移植后4~6个月停用。甲氨蝶呤于移植后1、3、6 d以10 mg/m<sup>2</sup>静滴。霉酚酸酯0.72 g每天2次口服, 移植后1~30 d用药。

1.4 动员方案 所有供者均予皮下注射重组人粒细胞集落刺激因子(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)5~10 μg/(kg·d)4~5 d动员。

1.5 标本采集 接受allo-HSCT的患者在移植前和移植后15、30、60、90、180 d及根据病情变化分别留取骨髓、外周血标本于抗凝管、促凝管。对照组健康供者均在动员前留取骨髓、外周血标本于抗凝管、促凝管。采用梯度离心法获得单个核细胞。

1.6 流式细胞术检测T淋巴细胞亚群分布 取单个核细胞1×10<sup>6</sup>, 根据细胞内、细胞核内破膜/固定试剂盒说明书分别进行细胞膜表面抗体(CD3、CD4、CD8、CD25)、细胞内抗体[γ干扰素(interferon-γ, IFN-γ)、IL-4]标记; 所用单克隆抗体及试剂盒均购自美国BD Biosciences公司。采用FACSAria II u 8色流式细胞仪(美国BD Biosciences公司)检测CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>)、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞(CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)、Th1(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>)、Th2(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>)的分布。采用FlowJo 7.6软件计算CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞比例(CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞占淋巴细胞的比例)、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞比例(CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞占淋巴细胞的比例)、Th1比例(Th1占CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞的比例)、Th2比例(Th2占CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞的比例)、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞比值、Th1/Th2比值。

1.7 细胞因子芯片检测IL-2R、IL-18水平 采用Luminex技术, 由上海贝晶生物技术公司代为完成。将促凝管中骨髓、外周血离心(室温1 509.12×g离心5 min), 取5 μL上清液进行细胞因子芯片检测。

1.8 统计学处理 采用FlowJo 7.6软件绘图, SPSS 20.0软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s_x$ 表示, 采用F检验对数据进行方差齐性检验, 若方差齐, 2组间比较采用独立样本t检验, 若方差不齐则采用t'检验。组间整体性比较采用重复测量数据的方差分析, 数据进行Mauchly“球对称”检验, 若拒绝“球对称”假设则用“球对称”系数对F值的自由度进行校正。检验水准(α)为0.05。

## 2 结果

### 2.1 allo-HSCT后骨髓、外周血中T淋巴细胞变化

2.1.1 移植后CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞比例持续降低 见表1, 移植后15 d和30 d时, 恶性血液病患者骨髓中CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞比例均低于对照组( $t=2.357$ 、 $2.357$ ,  $P=0.024$ 、 $0.024$ ), 观察至移植后180 d时仍无回升趋势, 但在30~180 d与对照组相比差异均无统计学意义( $P$ 均 $>0.05$ ); 移植后, 恶性血液病患者外周血中CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞比例变化规律与骨髓中一致, 但在移植后30~180 d与对照组相比差异仍有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ )。组间数据重复测量方差分析显示恶性血液病患者骨髓中CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞比例整体水平低于外周血中水平( $F=7.269$ ,  $P=0.001$ )。

2.1.2 移植后CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞比例迅速恢复 见表1, 恶性血液病患者骨髓中CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞比例在移植后早期即15、30 d时均低于对照组( $t=3.938$ 、 $3.433$ ,  $P<0.01$ 、 $P=0.001$ ), 其中移植后15 d时最低, 然后逐渐上升; 恶性血液病患者外周血中CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞比例变化趋势与骨髓中基本一致, 但其回升略早于骨髓。组间数据重复测量方差分析显示移植后骨髓中CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞比例整体水平低于外周血中水平( $F=21.115$ ,  $P=0.002$ )。

2.1.3 移植后CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞比值持续降低 恶性血液病患者骨髓中CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞比值在移植后早期与对照组相比差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 但随着时间推移逐渐下降, 至移植后180 d时低于对照组, 差异有统计学意义( $t'=2.513$ ,  $P=0.040$ ); 恶性血液病患者外周血中CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞比值变化趋势与骨髓一致, 至移植后60、90、180 d时低于对照组( $P$ 均 $<0.05$ )。组间数据重复测量方差分析显示, 恶性血液病患者骨髓与外周血中CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞比值的整体水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

表1 恶性血液病患者 allo-HSCT 后 T 淋巴细胞亚群分布

Tab 1 Distribution of T lymphocyte subsets in patients with hematological malignancies after allo-HSCT

Index	Group	Before allo-HSCT	After allo-HSCT					$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
			15 d	30 d	60 d	90 d	180 d	
CD4 <sup>+</sup> (%)	Control BM (n=7)	15.4±3.6						
	Hematopathy BM (n=41)	10.1±1.6	6.5±1.6	6.7±1.5	8.6±1.0	8.1±1.3	7.0±1.4	
	Control PB (n=7)	27.2±4.8						
	Hematopathy PB (n=41)	19.1±1.7	12.5±2.7	13.5±2.3	13.6±1.5	13.3±1.9	11.8±1.7	
	t/t' value <sup>a</sup>	1.359	2.357	2.357	1.814	1.928	2.186	
	P value <sup>a</sup>	0.209	0.024	0.024	0.112	0.092	0.060	
	t/t' value <sup>b</sup>	1.608	2.399	2.628	2.716	3.178	3.036	
	P value <sup>b</sup>	0.149	0.017	0.013	0.029	0.004	0.017	
CD8 <sup>+</sup> (%)	Control BM (n=7)	19.9±4.1						
	Hematopathy BM (n=41)	19.2±2.8	7.8±1.2	9.3±1.2	28.0±2.6	23.7±2.2	28.2±3.4	
	Control PB (n=7)	23.7±4.1						
	Hematopathy PB (n=41)	28.3±3.9	13.1±2.0	19.1±2.5	42.7±3.1	36.4±3.0	39.7±4.3	
	t/t' value <sup>a</sup>	0.143	3.938	3.433	1.814	1.928	2.186	
	P value <sup>a</sup>	0.888	<0.01	0.001	0.149	0.414	0.161	
	t/t' value <sup>b</sup>	-0.767	2.399	2.628	2.716	3.178	3.036	
	P value <sup>b</sup>	0.454	0.022	0.407	0.006	0.038	0.031	
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	Control BM (n=7)	0.929±0.241						
	Hematopathy BM (n=41)	0.601±0.077	0.796±0.128	0.728±0.107	0.407±0.083	0.392±0.076	0.299±0.070	
	Control PB (n=7)	1.518±0.456						
	Hematopathy PB (n=41)	1.014±0.219	0.910±0.165	0.828±0.124	0.441±0.083	0.397±0.077	0.342±0.067	
	t/t' value <sup>a</sup>	1.294	0.443	0.877	1.340	2.126	2.513	
	P value <sup>a</sup>	0.235	0.660	0.424	0.077	0.070	0.040	
	t/t' value <sup>b</sup>	0.851	1.164	1.828	2.680	2.821	3.005	
	P value <sup>b</sup>	0.405	0.252	0.091	0.032	0.027	0.022	
Th1 (%)	Control BM (n=7)	2.7±0.2						
	Hematopathy BM (n=41)	4.2±0.5	9.0±0.6	7.7±0.5	5.8±0.5	6.3±0.9	4.1±0.4	
	Control PB (n=7)	2.1±0.2						
	Hematopathy PB (n=41)	3.0±0.3	7.2±0.5	6.7±0.4	4.9±0.4	4.2±0.3	3.5±0.3	
	t/t' value <sup>a</sup>	-1.925	-9.244	-10.000	-6.102	-2.388	-2.542	
	P value <sup>a</sup>	0.069	<0.01	<0.01	<0.01	0.024	0.019	
	t/t' value <sup>b</sup>	-2.467	-8.498	-7.966	-6.435	-5.245	-2.592	
	P value <sup>b</sup>	0.048	<0.01	<0.01	0.001	<0.01	0.017	
Th2 (%)	Control BM (n=7)	2.9±0.2						
	Hematopathy BM (n=41)	3.5±0.5	2.6±0.3	2.4±0.2	2.9±0.3	3.1±0.3	4.5±0.6	
	Control PB (n=7)	2.3±0.3						
	Hematopathy PB (n=41)	2.8±0.4	2.0±0.1	2.2±0.2	2.3±0.3	2.4±0.2	3.8±0.9	
	t/t' value <sup>a</sup>	-0.866	0.443	1.154	0.100	-0.378	-2.301	
	P value <sup>a</sup>	0.397	0.661	0.293	0.817	0.797	0.034	
	t/t' value <sup>b</sup>	-0.792	0.984	0.258	0.025	-0.081	-1.124	
	P value <sup>b</sup>	0.438	0.325	0.754	0.980	0.936	0.274	
Th1/Th2	Control BM (n=7)	0.931±0.049						
	Hematopathy BM (n=41)	1.257±0.104	3.928±0.299	3.622±0.267	2.478±0.185	2.215±0.225	1.350±0.241	
	Control PB (n=7)	0.962±0.094						
	Hematopathy PB (n=41)	1.216±0.135	3.816±0.267	3.167±0.239	2.491±0.209	1.960±0.153	1.343±0.173	
	t/t' value <sup>a</sup>	-2.828	-4.563	-10.209	-8.080	-10.575	-1.701	
	P value <sup>a</sup>	0.011	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.109	
	t/t' value <sup>b</sup>	-1.242	-10.090	-8.902	-6.670	-5.545	-1.929	
	P value <sup>b</sup>	0.229	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.068	

<sup>a</sup>: Comparison of the indexes in BM between control group and hematopathy group; <sup>b</sup>: Comparison of the indexes in PB between control group and hematopathy group. allo-HSCT: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; Th: T-helper cell; BM: Bone marrow; PB: Peripheral blood

2.1.4 移植后 Th1 比例升高 见表 1, 恶性血液病患者骨髓中 Th1 比例在移植前与对照组相比差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 移植后升高, 15 d 时达最高水平, 之后稳定下降, 但至观察结束仍高于对照组, 移植后 15、30、60、90、180 d 时与对照组相比差异均有统计学意义 ( $t' = -9.244$ 、 $-10.000$ 、 $-6.102$ ,  $t = -2.388$ 、 $-2.542$ ;  $P$  均  $< 0.05$ ); 恶性血液病患者移植后外周血中 Th1 比例变化规律与骨髓基本一致。但恶性血液病患者外周血中 Th1 比例整体水平低于骨髓水平 ( $F = 11.820$ ,  $P = 0.006$ )。

2.1.5 移植后早期 Th2 比例与对照组相似 见表 1, 恶性血液病患者骨髓和外周血中 Th2 比例在移植后 90 d 内均无明显变化, 与对照组相比差异均无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ ), 仅骨髓中 Th2 比例在移植后 180 d 时高于对照组 ( $t = -2.301$ ,  $P = 0.034$ )。经组间数据重复测量方差分析, 恶性血液病患者骨髓与外周血中 Th2 比例整体水平差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

2.1.6 移植后 Th1/Th2 比值高于正常对照 见表 1,

恶性血液病患者骨髓中 Th1/Th2 比值在移植后 15 d 升至最高水平, 之后稳定下降, 但在移植后 90 d 内各时间节点 (15、30、60、90 d) 均高于对照组 ( $t = -4.563$ ,  $t' = -10.209$ 、 $-8.080$ 、 $-10.575$ ;  $P$  均  $< 0.01$ ), 移植后 180 d 时与对照组差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 外周血中 Th1/Th2 比值变化规律与骨髓中一致。经组间数据重复测量方差分析, 恶性血液病患者骨髓与外周血中 Th1/Th2 比值整体水平差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

2.2 allo-HSCT 后骨髓中 Th1 相关细胞因子变化

2.2.1 移植后 IL-2R 浓度持续升高 见表 2, 恶性血液病患者骨髓中 IL-2R 浓度在移植后 15 d 时达到最高水平, 之后有所下降但仍高于对照组, 各时间节点 (15、30、60、90 d) 与对照组相比差异均有统计学意义 ( $t' = -4.496$ 、 $-4.088$ 、 $-2.674$ 、 $-3.026$ ,  $P = 0.003$ 、 $0.001$ 、 $0.021$ 、 $0.009$ ); 外周血中 IL-2R 浓度变化规律与骨髓一致。但经组间数据重复测量方差分析, 恶性血液病患者骨髓与外周血中 IL-2R 的整体水平差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

表 2 恶性血液病患者 allo-HSCT 后 Th1 相关细胞因子 IL-2R、IL-18 变化

Tab 2 Changes of Th1-related cytokines IL-2R and IL-18 in patients with hematological malignancies after allo-HSCT

Index	Group	Before allo-HSCT	After allo-HSCT			
			15 d	30 d	60 d	90 d
IL-2R	Control BM ( $n = 7$ )	1 543.98 ± 323.66				
	Hematopathy BM ( $n = 41$ )	3 795.92 ± 945.65	16 107.89 ± 3 682.90	5 107.09 ± 809.21	4 644.14 ± 1 113.34	5 933.54 ± 1 397.18
	Control PB ( $n = 7$ )	1 817.39 ± 363.37				
	Hematopathy PB ( $n = 41$ )	3 495.97 ± 571.40	12 040.65 ± 2 106.59	5 880.93 ± 928.85	4 786.19 ± 947.96	5 015.66 ± 1 151.64
	$t/t'$ value <sup>a</sup>	-2.253	-4.496	-4.088	-2.674	-3.026
	$P$ value <sup>a</sup>	0.058	0.003	0.001	0.021	0.009
	$t/t'$ value <sup>b</sup>	-2.396	-4.782	-4.074	-2.924	-2.648
	$P$ value <sup>b</sup>	0.032	<0.01	0.01	0.012	0.019
IL-18	Control BM ( $n = 7$ )	20.75 ± 5.80				
	Hematopathy BM ( $n = 41$ )	54.54 ± 11.57	93.75 ± 11.40	60.62 ± 12.06	65.66 ± 13.99	64.17 ± 20.09
	Control PB ( $n = 7$ )	19.82 ± 4.50				
	Hematopathy PB ( $n = 41$ )	30.53 ± 5.20	62.48 ± 12.45	45.57 ± 10.60	45.57 ± 10.60	56.75 ± 12.99
	$t/t'$ value <sup>a</sup>	-2.473	-5.273	-2.980	-2.965	-2.077
	$P$ value <sup>a</sup>	0.031	<0.01	0.009	0.012	0.057
	$t/t'$ value <sup>b</sup>	-1.531	-2.450	-2.830	-2.236	-2.686
	$P$ value <sup>b</sup>	0.154	0.027	0.013	0.045	0.021

<sup>a</sup>: Comparison of the indexes in BM between control group and hematopathy group; <sup>b</sup>: Comparison of the indexes in PB between control group and hematopathy group. allo-HSCT: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; Th: T-helper cell; IL-2R: Interleukin 2 receptor; IL-18: Interleukin 18; BM: Bone marrow; PB: Peripheral blood

2.2.2 移植后 IL-18 浓度升高 见表 2, 恶性血液病患者移植前骨髓中 IL-18 浓度高于对照组 ( $t = -2.473, P = 0.031$ ), 在移植后 15 d 时达到最高水平, 之后虽有所下降, 但在移植后 15、30、60 d 仍高于对照组 ( $t = -5.273、-2.980、-2.965, P$  均  $< 0.05$ ), 移植后 90 d 与对照组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 移植后外周血中 IL-18 浓度变化规律与骨髓中一致, 但在移植后 90 d 与对照组相比差异仍有统计学意义 ( $t = -2.686, P = 0.021$ )。移植后恶性血液病患者 IL-18 浓度在外周血中与骨髓中的整体变化水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

既往对 allo-HSCT 后免疫重建的数据多来自外周血, 考虑到骨髓免疫微环境在结构、细胞组分等方面与外周血差异较大, 本研究探讨了恶性血液病患者 allo-HSCT 后骨髓免疫微环境中 T 淋巴细胞亚群 ( $CD4^+$  T 淋巴细胞、 $CD8^+$  T 淋巴细胞、Th1、Th2) 重建规律及其与外周血的差异。

目前认为 allo-HSCT 后 T 淋巴细胞重建主要依赖 2 条途径: (1) 非胸腺依赖的外周淋巴细胞扩增, 来自供者移植物中的 T 淋巴细胞,  $CD8^+$  T 淋巴细胞主要依赖此途径重建; (2) 胸腺依赖途径, 来自供者造血细胞增殖、分化并经胸腺培育产生,  $CD4^+$  T 淋巴细胞的重建主要依赖该途径<sup>[7]</sup>。既往研究发现 allo-HSCT 后胸腺输出功能在移植后 1 年内不能达移植前水平<sup>[8-10]</sup>, 因此外周血中  $CD4^+$  T 淋巴细胞恢复缓慢, 而  $CD8^+$  T 淋巴细胞的恢复速度较快<sup>[11]</sup>。本研究中, 除发现外周血和骨髓中  $CD4^+$  T 淋巴细胞比例在 allo-HSCT 后早期下降, 以及  $CD8^+$  T 淋巴细胞比例在 allo-HSCT 后早期即恢复至对照组水平外, 还发现骨髓中  $CD4^+$  T 淋巴细胞、 $CD8^+$  T 淋巴细胞整体水平均低于外周血, 提示移植后早期的 T 淋巴细胞主要来源于供者移植物中 T 淋巴细胞在外周器官的扩增<sup>[12]</sup>。移植后  $CD4^+/CD8^+$  T 淋巴细胞比值也间接反映了移植后  $CD4^+$  T 淋巴细胞和  $CD8^+$  T 淋巴细胞的重建速度。既往研究认为 allo-HSCT 后 1 年内存在  $CD4^+/CD8^+$  T 淋巴细胞比值倒置<sup>[13-14]</sup>, 本研究结果与此一致。

$CD4^+$  T 淋巴细胞分化的 Th 根据分泌的细胞因子主要分为 Th1、Th2、Th17 等亚群。Th1 可分泌 IFN- $\gamma$ 、IL-18、IL-2、肿瘤坏死因子等细胞因子,

引起炎症反应<sup>[15]</sup>; Th2 可分泌 IL-4、IL-5、IL-10 等细胞因子, 有抗细胞内感染的作用<sup>[16]</sup>。既往研究发现移植后骨髓中 Th1 比例升高<sup>[14]</sup>, 但少有研究观察其动态变化。本研究连续性观察结果显示, 恶性血液病患者 allo-HSCT 后骨髓和外周血中 Th1 比例均在移植后升高, 之后虽有下降但至移植后 180 d 仍高于对照组, 且骨髓中 Th1 比例整体高于外周血中水平。而研究认为 allo-HSCT 后外周血中 Th2 比例与健康对照组无显著差异<sup>[17]</sup>, 但也有研究认为骨髓中 Th2 比例在移植后 90 d 高于健康对照组<sup>[5]</sup>。本研究通过连续性观察发现, 骨髓和外周血中 Th2 比例在移植前至移植后 15、30、60、90 d 均与对照组无显著差异, 仅在 180 d 时高于对照组。Th 的分化受多种细胞因子的调节, 各亚群间有交叉影响, 如 IFN- $\gamma$  既能促进 T 淋巴细胞向 Th1 分化, 也能抑制 Th2 的扩增<sup>[18]</sup>。Guo 等<sup>[17]</sup>通过动物实验研究发现, 移植后若 Th 发生 Th1 极化则易发生 GVHD; 若发生 Th2 极化, 则易出现疾病复发。Wang 等<sup>[5]</sup>的临床研究发现, allo-HSCT 后 90 d 时骨髓中 Th1/Th2 比值与对照组无显著差异。本研究通过连续性观察发现, 恶性血液病患者骨髓和外周血中 Th1/Th2 比值在移植后 15 d 达最高水平, 在 180 d 时降至对照组水平。

如前文所述, T 淋巴细胞的分化、迁移受多种细胞因子影响。IL-2R 是一种多聚体蛋白, 可特异性结合 Th1 分泌的 IL-2, 并促进 IL-2 的生物学作用<sup>[19]</sup>。本研究结果显示, 恶性血液病患者移植后骨髓和外周血中 IL-2R 浓度均较对照组升高, 且与 Th1 比例变化规律一致。此外, IL-18 可通过增强 Th1 单克隆和富集多克隆 T 淋巴细胞产生 Th1 类细胞因子, 从而增强 Th1 毒性<sup>[20]</sup>。既往研究认为 allo-HSCT 后外周血中 IL-18 浓度升高, 并与急性 GVHD 的发生和严重程度显著相关<sup>[21]</sup>。本研究首次通过动态观察发现恶性血液病患者在移植后早期骨髓和外周血中 IL-18 浓度均较对照组升高, 并在移植后 90 d 恢复至正常水平, 其变化趋势与移植后 Th1 比例变化趋势相似。

综上所述, 本研究首次通过对恶性血液病患者 allo-HSCT 后骨髓和外周血中  $CD4^+$  T 淋巴细胞、 $CD8^+$  T 淋巴细胞、Th1、Th2 比例及 Th1 相关细胞因子 IL-2R、IL-18 浓度进行了连续性检测, 发现 allo-HSCT 后骨髓和外周血中 T 淋巴细胞重建规律存在差异, 为进一步了解骨髓免疫微环境重建规

律及其在骨髓移植患者转归中的作用提供了基础数据。下一步我们将进一步观察移植后 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞比值、Th1/Th2 比值、Th1 相关细胞因子的变化与严重 GVHD 和疾病复发之间的关系。

## [参 考 文 献]

- [1] DRYLEWICZ J, SCHELLENS I M, GAISER R, NANLOHY N M, QUAKKELAAR E D, OTTEN H, et al. Rapid reconstitution of CD4 T cells and NK cells protects against CMV-reactivation after allogeneic stem cell transplantation[J/OL]. *J Transl Med*, 2016, 14: 230. doi: 10.1186/s12967-016-0988-4.
- [2] 朱明霞, 万文丽, 李海申, 王晶, 王艳芳, 胡凯, 等. 造血干细胞移植后的早期免疫重建[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2016, 48: 515-522.
- [3] 赵潇溟, 胡晓霞, 王健民. 异基因造血干细胞移植后骨髓免疫微环境重建研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32: 1249-1252.
- [4] ZHAO E, XU H, WANG L, KRYCZEK I, WU K, HU Y, et al. Bone marrow and the control of immunity[J]. *Cell Mol Immunol*, 2012, 9: 11-19.
- [5] WANG Y T, KONG Y, SONG Y, HAN W, ZHANG Y Y, ZHANG X H, et al. Increased type 1 immune response in the bone marrow immune microenvironment of patients with poor graft function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2016, 22: 1376-1382.
- [6] ZHANG W P, WANG Z W, HU X X, CHEN J, YANG D, SONG X M, et al. Preconditioning with fludarabine, busulfan and cytarabine versus standard BuCy2 for patients with acute myeloid leukemia: a prospective, randomized phase II study[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2019, 54: 894-902.
- [7] PENG X G, DONG Y, ZHANG T T, WANG K, MA Y J. Immune reconstitution of CD4<sup>+</sup> T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and its correlation with invasive fungal infection in patients with hematological malignancies[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16: 3137-3140.
- [8] DOUEK D C, MCFARLAND R D, KEISER P H, GAGE E A, MASSEY J M, HAYNES B F, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection[J]. *Nature*, 1998, 396: 690-695.
- [9] SAGLIO F, CENA S, BERGER M, QUARELLO P, BOCCASAVIA V, FERRANDO F, et al. Association between thymic function and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcome: results of a pediatric study[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015, 21: 1099-1105.
- [10] TÖRLÉN J, GABALLA A, REMBERGER M, MÖRK L M, SUNDBERG B, MATTSSON J, et al. Effect of graft-versus-host disease prophylaxis regimens on T and B cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2019, 25: 1260-1268.
- [11] 刘晓亮, 高素君, 赵杨祉, 韩薇, 戎月, 谭业辉, 等. 恶性血液病患者异基因造血干细胞移植后免疫细胞的重建[J]. *中华器官移植杂志*, 2017, 38: 70-77.
- [12] TOUBERT A, GLAUZY S, DOUAY C, CLAVE E. Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again[J]. *Tissue Antigens*, 2012, 79: 83-89.
- [13] RETIÈRE C, WILLEM C, GUILLAUME T, VIÉ H, GAUTREAU-ROLLAND L, SCOTET E, et al. Impact on early outcomes and immune reconstitution of high-dose post-transplant cyclophosphamide vs anti-thymocyte globulin after reduced intensity conditioning peripheral blood stem cell allogeneic transplantation[J]. *Oncotarget*, 2018, 9: 11451-11464.
- [14] SONG Y, SHI M M, ZHANG Y Y, MO X D, WANG Y, ZHANG X H, et al. Abnormalities of the bone marrow immune microenvironment in patients with prolonged isolated thrombocytopenia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2017, 23: 906-912.
- [15] JOHNSON M O, WOLF M M, MADDEN M Z, ANDREJEVA G, SUGIURA A, CONTRERAS D C, et al. Distinct regulation of Th17 and Th1 cell differentiation by glutaminase-dependent metabolism[J/OL]. *Cell*, 2018, 175: 1780-1795.e19. doi: 10.1016/j.cell.2018.10.001.
- [16] MELENHORST J J, TIAN X, XU D, SANDLER N G, SCHEINBERG P, BIANCOTTO A, et al. Cytopenia and leukocyte recovery shape cytokine fluctuations after myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Haematologica*, 2012, 97: 867-873.
- [17] GUO H, QIAO Z, ZHU L, WANG H, SU L, LU Y, et al. Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation[J]. *Am J Hematol*, 2004, 75: 78-83.
- [18] SZABO S J, KIM S T, COSTA G L, ZHANG X, FATHMAN C G, GLIMCHER L H. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment[J]. *Cell*, 2000, 100: 655-669.
- [19] BERGER M, SIGNORINO E, MURARO M, QUARELLO P, BIASIN E, NESI F, et al. Monitoring of TNFR1, IL-2R $\alpha$ , HGF, CCL8, IL-8 and IL-12p70 following HSCT and their role as GVHD biomarkers in paediatric patients[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2013, 48: 1230-1236.
- [20] 王谦, 杨晓静, 单宁宁, 侯明, 冀学斌, 王春燕, 等. IL-18 及其受体在特发性血小板减少性紫癜患者 Th1 类细胞优势应答中的作用[J]. *中华血液学杂志*, 2009, 30: 658-661.
- [21] JU X P, XU B, XIAO Z P, LI J Y, CHEN L, LU S Q, et al. Cytokine expression during acute graft-versus-host disease after allogeneic peripheral stem cell transplantation[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2005, 35: 1179-1186.