

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2020.05.0546

• 研究快报 •

急性髓系白血病患者外周血 T 淋巴细胞亚群的水平变化及临床意义

黄方, 郝思国*

上海交通大学医学院附属新华医院血液科, 上海 200092

[摘要] **目的** 检测急性髓系白血病(AML)患者外周血T淋巴细胞亚群水平的变化,并探讨其临床意义。**方法** 选择68例初诊AML患者及76例健康体检者(健康对照组)作为研究对象。根据《成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2017年版)》对AML患者进行预后危险度分层,将患者分为高危组(20例)和非高危组(48例)。经标准化学治疗方案治疗后对AML患者进行疗效评价。采集AML患者及健康体检者外周血,用流式细胞术检测外周血T淋巴细胞亚群的水平。**结果** AML患者外周血T淋巴细胞CD3⁺细胞比例、CD4⁺细胞比例及CD4⁺/CD8⁺细胞比值均低于健康对照组(P 均 <0.05),调节性T淋巴细胞(Treg细胞)比例高于健康对照组($P<0.05$)。与非高危AML患者比较,高危AML患者外周血T淋巴细胞CD3⁺细胞比例、CD4⁺细胞比例及CD4⁺/CD8⁺细胞比值均降低(P 均 <0.05),Treg细胞比例升高($P<0.05$)。与未获得完全缓解的AML患者(27例)比较,获得完全缓解的AML患者(41例)外周血T淋巴细胞CD3⁺细胞比例、CD4⁺细胞比例及CD4⁺/CD8⁺细胞比值均升高(P 均 <0.05),Treg细胞比例降低($P<0.05$)。**结论** 观察AML患者T淋巴细胞亚群及CD4⁺/CD8⁺细胞比值变化有助于监测AML患者的病情。

[关键词] 急性髓系白血病; T淋巴细胞; 细胞免疫; 预后**[中图分类号]** R 733.712**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2020)05-0546-05

Changes of T lymphocyte subset levels in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients and the clinical significance

HUANG Fang, HAO Si-guo*

Department of Hematology, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

[Abstract] **Objective** To detect the changes of T lymphocyte subset levels in peripheral blood of acute myeloid leukemia (AML) patients and explore the clinical significance. **Methods** Total of 68 newly diagnosed AML patients and 76 healthy candidates (healthy controls) were selected for the study. Prognostic risk stratification of AML patients was stratified according to Chinese guidelines for diagnosis and treatment of adult AML (not acute promyelocytic leukemia) (2017). The enrolled patients were divided into high-risk group (20 cases) and non-high-risk group (48 cases). The curative effect of AML patients was evaluated after standard chemotherapy. The flow cytometry technique was used to detect T lymphocyte subset levels in peripheral blood of the AML patients and the healthy controls. **Results** Proportions of CD3⁺, CD4⁺ T cells as well as CD4⁺/CD8⁺ ratio in AML group were significantly lower than those in healthy controls (all $P<0.05$), but the proportion of regulatory T (Treg) cells was significantly higher than that in healthy controls ($P<0.05$). The proportions of CD3⁺, CD4⁺ T cells and CD4⁺/CD8⁺ ratio in high-risk patients were significantly lower than those in non-high-risk patients (all $P<0.05$). The proportion of Treg cells in high-risk patients was significantly higher than that in non-high-risk patients ($P<0.05$). The proportions of CD3⁺, CD4⁺ T cells and CD4⁺/CD8⁺ ratio in patients who achieved complete remission (CR) ($n=41$) were significantly higher than those in patients without CR ($n=27$) (all $P<0.05$). However, the proportion of Treg cells in AML-CR patients was significantly lower than that in patients without CR ($P<0.05$). **Conclusion** Observation of T lymphocyte subsets and CD4⁺/CD8⁺ ratio can benefit to disease monitoring of patients with AML.

[Key words] acute myeloid leukemia; T-lymphocytes; cellular immunity; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2020, 41(5): 546-550]

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一种起源于髓系造血干(祖)细胞的恶性疾病,以

骨髓及外周血中原始和幼稚髓系细胞异常增殖、抑制骨髓正常造血功能并浸润组织脏器为特征。研究

[收稿日期] 2020-01-18

[接受日期] 2020-03-02

[作者简介] 黄方,博士,住院医师.E-mail: huangfang01@xinhua.com.cn

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-25077600, E-mail: haosiguo@xinhua.com.cn

发现, AML患者存在细胞及体液免疫功能的紊乱^[1], 而细胞免疫系统的功能状态与血液肿瘤的发生、发展及转归密切相关^[2]。本研究对2018年1月至2019年10月在我院接受治疗且资料完整的68例AML患者外周血T淋巴细胞亚群水平的变化进行分析, 并探讨其临床意义。

1 资料和方法

1.1 研究对象 选取2018年1月至2019年10月我院确诊的68例初发AML患者作为AML组。入选标准: (1) 所有患者均采用形态学、免疫学、细胞遗传学和分子遗传学(morphology-immunology-cytogenetic-molecular biology, MICM)分型明确诊断; (2) 年龄>18岁, 在我院全程接受治疗且临床资料完整; (3) 入组前未接受任何医学治疗。排除标准: (1) 有慢性骨髓增殖性疾病史; (2) 有急性早幼粒细胞白血病、髓系肉瘤、治疗相关性AML及合并其他肿瘤病史。入组患者中, 男36例、女32例, 年龄19~82岁(中位年龄54岁)。根据法国美国英国分型系统(French-American-Britain classification systems, FAB分型)标准, M1型8例、M2a型17例、M4型及M4Eo型14例、M5型29例。根据患者初诊时染色体及分子生物学检查结果, 即是否伴有预后差的染色体核型或分子遗传标志物, 遵循《成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2017年版)》^[3]将入组患者分为高危组(20例)和非高危组(48例)。选取同期于我院进行健康体检者作为健康对照组, 共76例, 男40例、女36例, 年龄28~79岁(中位年龄56岁)。所有健康对照者均排除感染、肿瘤、全身免疫性疾病及严重心、肝、肾、甲状腺疾病史, 且均否认长期用药史。AML组与健康对照组的年龄、性别差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究获得上海交通大学医学院附属新华医院伦理委员会审批。

1.2 治疗方案与标本采集 所有AML患者均采用标准诱导方案, 包括去甲氧柔红霉素+阿糖胞苷(IA)方案、柔红霉素+阿糖胞苷(DA)方案、米托蒽醌+阿糖胞苷(MA)方案、高三尖杉酯碱+阿糖胞苷(HA)方案。规律治疗前, AML患者及健康对照者均于清晨空腹状态下行外周血采集。经诱导化学治疗后, AML患者均在骨髓恢复期(化学治

疗后28d)行外周血采集。每次采集外周血2 mL, 经EDTA抗凝处理后行T淋巴细胞亚群检测。

1.3 仪器与试剂 应用美国Becton Dickinson公司生产的FACSCalibur流式细胞仪进行细胞流式术检测, T淋巴细胞亚群检测试剂盒及红细胞裂解液均为美国Becton Dickinson公司的配套产品。

1.4 外周血T淋巴细胞亚群检测 取100 μ L经EDTA处理后的外周血标本至流式检测管中, 加入20 μ L相应荧光单克隆抗体(抗人CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5/Foxp3-APC/CD25-PE-Cy7)充分混匀, 室温避光孵育15 min。随后加入红细胞裂解液2 mL, 充分混匀后室温下避光孵育10 min。离心(4 $^{\circ}$ C, 1 200 \times g) 5 min, 除去上清后加入PBS振荡混匀, 洗涤2次。洗涤后, 加入PBS 500 μ L混匀, 上机检测外周血中CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞及调节性T淋巴细胞(regulatory T lymphocyte, Treg细胞)的比例。

1.5 疗效评价 根据血液病诊断及疗效评价标准^[3]对AML患者进行疗效评估。完全缓解(complete remission, CR): (1) 骨髓细胞学检查示原始粒细胞I型+II型(原始单核细胞+幼稚单核细胞) $\leq 5\%$, 红细胞及巨核细胞正常; (2) 血常规示血红蛋白>100 g/L, 血小板计数>100 $\times 10^9$ /L, 中性粒细胞计数>1.5 $\times 10^9$ /L, 外周血分类中无白血病细胞; (3) 临床表现为无白血病浸润所致的症状和体征, 生活正常或接近正常。

1.6 统计学处理 应用SPSS 19.0软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验; 不符合正态分布的计量资料以中位数(范围)表示。计数资料以例数和百分数表示, 组间比较采用 χ^2 检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 初诊AML患者外周血中T淋巴细胞亚群分析 初诊AML患者(AML组)外周血T淋巴细胞CD3⁺细胞比例、CD4⁺细胞比例及CD4⁺/CD8⁺细胞比值均低于健康对照组(P 均<0.05), CD8⁺细胞比例与健康对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$), Treg细胞比例高于健康对照组($P<0.05$)。见表1。

表1 AML组和健康对照组外周血T淋巴细胞亚群比较

Tab 1 Comparison of peripheral blood T lymphocyte subsets between AML group and HC group

Group	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Treg
HC	76	0.67±0.07	0.46±0.05	0.25±0.04	1.87±0.37	0.03±0.01
AML	68	0.52±0.05*	0.32±0.04*	0.21±0.04	1.58±0.23*	0.05±0.01*

AML: Acute myeloid leukemia; HC: Healthy control; Treg: Regulatory T lymphocyte. *P<0.05 vs HC group

2.2 高危组与非高危组 AML 患者外周血 T 淋巴细胞亚群分析 高危组与非高危组 AML 患者的临床特征见表 2。将高危组 AML 患者初诊时外周血 T 淋巴细胞亚群与非高危组 AML 患者进行比较,结果如表 3 所示,高危组患者 CD3⁺ 细胞比例、CD4⁺

细胞比例及 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比值均低于非高危组患者 (P 均<0.05), Treg 细胞比例高于非高危组患者 (P<0.05), 两组间 CD8⁺ 细胞比例差异无统计学意义 (P>0.05)。

表2 高危组与非高危组 AML 患者的临床特征

Tab 2 Clinical characteristics of AML patients in high-risk and non-high-risk groups

Characteristic	Non-high-risk group N=48	High-risk group N=20
Gender (male/female) n	26/22	12/8
Age at first diagnosis (year), median (range)	47 (19-79)	51 (21-82)
Peripheral blood leukocyte count (L ⁻¹ , ×10 ⁹), median (range)	5.40 (0.67-32.80)	4.90 (0.42-44.60)
Peripheral blood hemoglobin (g·L ⁻¹), median (range)	83 (42-132)	72 (38-122)
Peripheral blood platelet count (L ⁻¹ , ×10 ⁹), median (range)	78 (28-311)	72 (14-298)
Bone marrow blast ratio n (%)		
≥50%	29 (60.42)	14 (70.00)
<50%	19 (39.58)	6 (30.00)
Karyotype n (%)		
Complex karyotype	0	5 (25.00)
Haploid karyotype	0	1 (5.00)
t (9;22)	0	2 (10.00)
t (6;9)	0	1 (5.00)
Gene mutation n (%)		
TP53	0	4 (20.00)
ASXL1	0	0
FLT3-ITD	0	6 (30.00)
RUNX1	0	1 (5.00)

AML: Acute myeloid leukemia; TP53: Tumor protein 53; ASXL1: Additional sex comb-like 1; FLT3-ITD: FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) mutations including internal tandem duplication (ITD) mutation of juxtamembrane region; RUNX1: Runt-related transcription factor 1

表3 高危组与非高危组 AML 患者外周血 T 淋巴细胞亚群比较

Tab 3 Comparison of peripheral blood lymphocyte subsets between AML patients in high-risk group and non-high-risk group

Group	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Treg
Non-high-risk	48	0.55±0.05	0.34±0.04	0.21±0.03	1.69±0.23	0.05±0.01
High-risk	20	0.47±0.04*	0.28±0.03*	0.20±0.05	1.40±0.27*	0.06±0.01*

AML: Acute myeloid leukemia; Treg: Regulatory T lymphocyte. *P<0.05 vs non-high-risk group

2.3 获得CR的AML患者与未获得CR的AML患者的外周血T淋巴细胞亚群分析 经诱导治疗后获得CR的AML患者共41例,未获得CR患者27例。通过对AML患者化学治疗后第28天的外周血T淋巴细胞亚群进行比较分析发现,CR组患者CD3⁺细

胞比例、CD4⁺细胞比例及CD4⁺/CD8⁺细胞比值均高于非CR组患者(P 均 <0.05),CR组患者Treg细胞比例低于非CR组患者($P<0.05$),两组间CD8⁺细胞比例差异无统计学意义($P>0.05$)。见表4。

表4 获得CR的AML患者与未获得CR的AML患者外周血T淋巴细胞亚群比较

Tab 4 Comparison of peripheral blood T lymphocyte subsets between AML patients with and without CR

Group	n	$\bar{x} \pm s$				
		CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Treg
Non-CR	27	0.46±0.04	0.25±0.03	0.20±0.03	1.26±0.29	0.06±0.01
CR	41	0.57±0.06*	0.36±0.04*	0.22±0.04	1.64±0.32*	0.04±0.01*

CR: Complete remission; AML: Acute myeloid leukemia; Treg: Regulatory T lymphocyte. * $P<0.05$ vs non-CR group

3 讨论

AML是目前常见的成人血液系统恶性肿瘤之一,其具体发病机制尚未完全阐明。研究显示,宿主的免疫功能状态与AML的发生、发展及预后关系密切^[4]。研究AML患者淋巴细胞亚群分布有助于了解和分析AML患者的免疫功能状态,为探寻AML发生、发展机制,判断预后和指导治疗提供依据。

T淋巴细胞是机体抗肿瘤免疫最为重要的效应细胞,占外周血淋巴细胞的60%~75%。CD3为T淋巴细胞抗原受体的信号转导组分,代表总T淋巴细胞水平。根据T淋巴细胞表型及功能的差异,T淋巴细胞主要包括CD4⁺T淋巴细胞和CD8⁺T淋巴细胞^[5]。其中CD4⁺T淋巴细胞在调控机体抗肿瘤免疫过程中发挥着重要作用。CD4⁺T淋巴细胞可通过与抗原递呈细胞表面的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex II, MHC II)分子结合从而特异性识别肿瘤细胞;识别肿瘤细胞后,CD4⁺T淋巴细胞不仅能够分泌TNF对肿瘤细胞产生直接杀伤作用,还可辅助CD8⁺T淋巴细胞激活、增殖,启动及维持靶向肿瘤细胞的细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)效应^[6]。CD4⁺T淋巴细胞比例可一定程度反映机体免疫系统状态。需要注意的是,一部分CD4⁺T淋巴细胞可分化成Treg细胞。Treg细胞具有免疫抑制及免疫无能的特征。研究显示,Treg细胞通过抑制效应性T淋巴细胞功能抑制抗肿瘤免疫反应,与肿瘤免疫逃逸密切相关^[7]。CD8⁺T淋巴细胞是具有特异性杀伤活性的效应细

胞,可通过分泌穿孔素、颗粒酶或通过配体诱导的受体介导的凋亡激活途径直接杀伤带有致敏肿瘤抗原的细胞^[8]。此外,CD8⁺T淋巴细胞对CD4⁺T淋巴细胞有免疫抑制作用。正常状态下,T淋巴细胞亚群的比例及数量维持在相对平衡状态,维持正常免疫监视、免疫防御及免疫自稳功能。CD4⁺/CD8⁺T淋巴细胞比值的稳定是机体发挥抗肿瘤免疫的关键因素^[9],CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞比例的失衡则提示机体免疫动态平衡受到破坏,往往与肿瘤等疾病的发生及进展有关。

临床资料显示,血液肿瘤患者常伴有外周血T淋巴细胞亚群功能及分布异常^[2,10]。CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞比例及Treg细胞比例失衡可影响机体免疫调节及免疫监视功能,导致白血病等肿瘤的发生率升高^[11]。而白血病细胞可通过直接抑制T淋巴细胞分化抗原的表达与活化抑制IL-2等细胞因子的产生和混合淋巴细胞反应,并通过分泌TGF- β 1、IL-10等免疫抑制因子进一步影响T淋巴细胞亚群分布,抑制机体抗肿瘤免疫,促进肿瘤发生免疫逃逸,从而影响治疗效果及预后^[12]。本研究结果显示,AML患者外周血中CD3⁺、CD4⁺T淋巴细胞比例及CD4⁺/CD8⁺T淋巴细胞比值低于健康对照组(P 均 <0.05),与既往文献报道^[10]相符,提示AML患者机体存在免疫功能紊乱,T淋巴细胞减少、功能不全和细胞亚群比例失调,进而导致T淋巴细胞介导的机体细胞免疫功能缺陷。此外,本研究中AML患者外周血中Treg细胞比例高于健康对照组($P<0.05$),提示AML患者的机体免疫力呈抑制性优势。

有研究提示,AML对于T淋巴细胞抗原表达

及活化的抑制效应与肿瘤负荷密切相关^[13]。本研究发现,经规律化学治疗后,与未达到CR的AML患者比较,获得CR的AML患者的CD4⁺T淋巴细胞比例、CD4⁺/CD8⁺T淋巴细胞比值明显上升(P 均 <0.05),提示获得CR的AML患者的细胞免疫功能有所恢复。这可能与经化学治疗诱导缓解后,患者体内的白血病细胞负荷较初诊时降低,使T淋巴细胞亚群抗原表达获得部分恢复有关。本研究还发现,具有高危因素的AML患者外周血CD3⁺、CD4⁺T淋巴细胞比例及CD4⁺/CD8⁺T淋巴细胞比值低于非高危AML患者(P 均 <0.05),Treg细胞比例则高于非高危患者($P<0.05$),提示高危AML患者免疫紊乱状态较非高危AML患者更严重,CD4⁺/CD8⁺T淋巴细胞比值及Treg细胞可能是预测AML危险度及预后的相关因素。

综上所述,AML患者存在细胞免疫功能紊乱,检测外周血T淋巴细胞亚群水平的变化有助于监测患者的病情,了解患者的免疫状态。

[参考文献]

- [1] TANG L, WU J, LI C G, JIANG H W, XU M, DU M, et al. Characterization of immune dysfunction and identification of prognostic immune-related risk factors in acute myeloid leukemia[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26: 1763-1772.
- [2] KNAUS H A, BERGLUND S, HACKL H, BLACKFORD A L, ZEIDNER J F, MONTIEL-ESPARZA R, et al. Signatures of CD8⁺T cell dysfunction in AML patients and their reversibility with response to chemotherapy[J/OL]. *JCI Insight*, 2018, 3: e120974. doi: 10.1172/jci.insight.120974.
- [3] 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2017年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38: 177-182.
- [4] DERMIME S, MAVROUDIS D, JIANG Y Z, HENSEL N, MOLLDREM J, BARRETT A J. Immune escape from a graft-versus-leukemia effect may play a role in the relapse of myeloid leukemias following allogeneic bone marrow transplantation[J]. *Bone Marrow Transplant*, 1997, 19: 989-999.
- [5] JIANG S, YAN W. T-cell immunometabolism against cancer[J]. *Cancer Lett*, 2016, 382: 255-258.
- [6] BORST J, AHRENDTS T, BAŁAŁA N, MELIEF C J M, KASTENMÜLLER W. CD4⁺T cell help in cancer immunology and immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18: 635-647.
- [7] PALUSKIEVICZ C M, CAO X, ABDI R, ZHENG P, LIU Y, BROMBERG J S. T regulatory cells and priming the suppressive tumor microenvironment[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2453. doi: 10.3389/fimmu.2019.02453.
- [8] BOLLARD C M, BARRETT A J. Cytotoxic T lymphocytes for leukemia and lymphoma[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2014, 2014: 565-569.
- [9] OSTROUMOV D, FEKETE-DRIMUSZ N, SABOROWSKI M, KÜHNEL F, WOLLER N. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75: 689-713.
- [10] OZKAZANC D, YOYEN-ERMIS D, TAVUKCUOGLU E, BUYUKASIKY, ESENDAGLI G. Functional exhaustion of CD4⁺T cells induced by co-stimulatory signals from myeloid leukaemia cells[J]. *Immunology*, 2016, 149: 460-471.
- [11] WHITESIDE T L. Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2014, 63: 67-72.
- [12] CHEN X, DU Y, LIN X, QIAN Y, ZHOU T, HUANG Z. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in tumor immunity[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 34: 244-249.
- [13] NISHIYAMA Y, SAIKAWA Y, NISHIYAMA N. Interaction between the immune system and acute myeloid leukemia: a model incorporating promotion of regulatory T cell expansion by leukemic cells[J]. *Biosystems*, 2018, 165: 99-105.

[本文编辑] 商素芳