

CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞对慢性淋巴细胞白血病预后的影响

陈荣伴¹ 邹琪²

【摘要】 目的:探讨慢性淋巴细胞白血病(CLL)患者外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg 细胞)表达及其与预后的相关性。**方法:**采用流式细胞仪检测 50 例健康者(对照组)及 30 例 CLL 患者(CLL 组)治疗前后 CD4⁺CD25⁺Treg、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 水平。**结果:**初诊 CLL 组患者外周血 T 淋巴细胞数量、CD4⁺CD25⁺Treg、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 水平均显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗后,CLL 组患者外周血 T 淋巴细胞数量、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 水平显著降低,与初诊时比较差异有统计学意义($P<0.05$),但仍高于对照组($P<0.05$)。CLL 患者中,Binet 临床分期 A 期患者 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 水平显著低于 B/C 期患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。Spearman 相关分析结果显示,Binet 临床分期与 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 水平呈正相关($r=0.511, P<0.05$)。**结论:**CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 水平可能是评估 CLL 患者预后的有效指标。

【关键词】 白血病,淋巴细胞,慢性;调节性 T 细胞;细胞免疫

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2015.03.011

【中图分类号】 R733.72 **【文献标志码】** A

The significance of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells for the prognosis of chronic lymphocytic leukemia

CHEN Rongban¹ ZOU Qi²

(¹Department of Hematology, Jiangmen Central Hospital, Jiangmen, 529030, China; ²Outpatient Department, Marines School)

Corresponding author: CHEN Rongban, E-mail: zhchenrongban@163.com

Abstract Objective: To evaluate the significance of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells for the prognosis of chronic lymphocytic leukemia. **Method:** CD4⁺CD25⁺Treg and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg level before and after treatment of 50 cases healthy subjects and 30 cases CLL patients were detected by flow cytometry. **Result:** The peripheral blood T lymphocytes, CD4⁺CD25⁺Treg and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg levels of initial diagnostic patients were significantly higher than that of healthy group ($P<0.05$). After treatment, the number of peripheral blood T lymphocytes and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg levels of CLL patients were significantly reduced, compared with initial diagnosis ($P<0.05$), but still higher than that of healthy group ($P<0.05$). In CLL group, the CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg of patients with Binet stage A significantly lower than patients with Binet stage B/C ($P<0.05$). Spearman correlation analysis showed that Binet stage was positively correlated with CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg levels ($r=0.511, P<0.05$). **Conclusion:** CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg may be an effective index to evaluate the prognosis of CLL patients.

Key words chronic lymphocytic leukemia; regulatory T cells; cellular immune

慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)属于造血组织恶性肿瘤,以单克隆、成熟小淋巴细胞在骨髓、外周血及淋巴组织大量蓄积为临床特征^[1]。CLL 的发病机制目前尚未明确,多认为与机体免疫功能异常有关,尤其是细胞免疫异常^[2]。T 淋巴细胞执行细胞免疫功能,具有抗肿瘤免疫效应,监测 T 淋巴细胞水平对探讨 CLL 免疫异常实质及临床治疗具有重要意义^[3]。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg 细

胞)是一类具有免疫抑制性及免疫无能性的 T 细胞亚群,大量临床研究证实 Treg 细胞免疫抑制作用与多种实体瘤的发生与发展密切相关^[4]。但 Treg 细胞与 CLL 相关性的研究鲜见报道。本研究采用流式细胞仪检测 CLL 初诊患者、治疗后缓解患者及健康人群外周血中 Treg 细胞水平,探讨 Treg 细胞与 CLL 预后的相关性,旨在为 CLL 免疫干预治疗提供可靠依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2013-01—2014-05 我院收治的 30 例 CLL

¹江门市中心医院血液内科(广东江门,529030)

²海军陆战学院门诊部

通信作者:陈荣伴, E-mail: zhchenrongban@163.com

患者为研究对象,其中男 23 例,女 7 例;年龄 37~80 岁,中位年龄 60 岁;Binet 分期:A 期 14 例,B/C 期 17 例;FISH 染色体检测:正常核型 9 例,RB1 基因缺失 4 例,12 号染色体三体 5 例,ATM 基因缺失 5 例,P53 基因缺失 7 例。所有患者均符合 2011 年版《中国慢性淋巴细胞白血病诊断与治疗指南》中制定的诊断标准^[5]。选取同期于我院行健康体检的健康者 50 例为对照组,其中男 35 例,女 15 例;年龄 35~79 岁,中位年龄 61 岁。2 组患者性别、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 方法

采集所有受检者清晨空腹肘静脉血 5 ml,置于无菌乙二胺四乙酸二钾(EDTA)抗凝管中,混匀,采集血样后 2 h 内用无菌 PBS 缓冲溶液 1:1 稀释抗凝血,淋巴细胞分离液分离单个核细胞,DMEM 细胞培养液调整细胞浓度为 2×10^6 个/ml。抽取 100 μ l 上述细胞悬液,分别加入 5 μ l FITC 标记的鼠抗人 CD25 抗体、PerCP 标记的鼠抗人 CD4 单克隆抗体,置于 4℃ 避光静置 30 min,800 r/min 离心 10 min,PBS 缓冲液洗涤 2 次,去除上清,DMEM 细胞培养液重悬细胞,加入 1 ml 1×固定/穿透缓冲液,混匀,置于 4℃ 避光静置 30 min,800 r/min 离心 10 min,2 ml 1×固定/穿透缓冲液洗涤 2 次,去除上清,分别加入 80 μ l 穿透缓冲液、5 μ l PE 标记的鼠抗人 Foxp3 抗体或大鼠 IgG2a,4℃ 避光静置 30 min,800 r/min 离心 10 min,2 ml 1×固定/穿透缓冲液洗涤 2 次,去除上清,加适量染色缓冲液,上流式细胞仪分析。

1.3 观察指标

①比较对照组及 CLL 组(初诊时及治疗后)外周血 T 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 水平;②观察不同 Binet 临床分期的 CLL 患者 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 水平,并分析 CLL 患者 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 水平与 Binet 临床分期相关性。

1.4 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。Binet 临床分期与 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 相关性采用 Spearman

相关分析。

2 结果

2.1 各组患者外周血 T 细胞数、CD4⁺CD25⁺Treg 及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 水平比较

初诊 CLL 患者外周血 T 淋巴细胞数量、CD4⁺CD25⁺Treg 及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 水平均显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗后,外周血 T 淋巴细胞数量及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 显著降低,与初诊时比较差异具有统计学意义($P<0.05$),但仍高于对照组($P<0.05$),见表 1。

2.2 CLL 患者 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 水平与 Binet 临床分期相关性

CLL 患者中,Binet 临床分期 A 期患者 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 显著低于 B/C 期患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。Spearman 相关分析结果显示,Binet 临床分期与 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 水平呈正相关($r=0.511$, $P<0.05$)。

3 讨论

T 淋巴细胞在肿瘤免疫过程中起中心调控作用。既往临床研究证实,CD4⁺CD25⁺Treg 具有免疫抑制性和免疫无能性的双重作用,其免疫抑制性主要表现为细胞抗原受体介导的信号刺激活化后可抑制 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞的增殖与活化,其免疫无能性则表现为白细胞介素-2(IL-2)特异性抗原及抗原递呈细胞的刺激呈低反应状态^[6]。CD4⁺CD25⁺Treg 抑制识别肿瘤细胞的肿瘤效应细胞的增殖与活化是重要的肿瘤免疫逃逸机制之一^[7]。目前研究表明,乳腺癌^[8]、卵巢癌^[9]、胰腺癌^[10]及非小细胞肺癌^[11]患者肿瘤部位及外周血中均可见 CD4⁺CD25⁺Treg 显著增加。陆春伟等^[12]通过对急性白血病(ALL)外周血患者 CD4⁺CD25⁺Treg 进行研究,发现 ALL 患者 CD4⁺CD25⁺Treg 显著高于健康人群,提示 CD4⁺CD25⁺Treg 的高表达可能抑制了机体免疫系统对肿瘤细胞的抵抗作用,产生肿瘤免疫逃逸,从而参与 ALL 的发生与发展。与本研究结果一致。

Foxp3 是 CD4⁺CD25⁺Treg 特异性标记,可促使 CD4⁺CD25⁺Treg 活化并转变为 CD4⁺CD25⁺Treg,是保证 CD4⁺CD25⁺Treg 发挥特异性免疫调节作用的必要前提^[13]。本研究结果显示,CLL 患

表 1 各组患者外周血 T 细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比较

%, $\bar{x} \pm s$

组别	例数	T cell	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg
对照组	50	25.75±7.81	3.21±0.67	2.83±0.77
CLL 组	30			
初诊时		67.43±14.35 ¹⁾²⁾	5.31±1.47 ¹⁾	4.80±1.53 ¹⁾²⁾
治疗后		33.37±9.37 ¹⁾	3.69±1.34	3.74±1.56 ¹⁾

与对照组比较,¹⁾ $P<0.05$;与治疗前后比较,²⁾ $P<0.05$ 。

表 2 不同 Binet 临床分期患者 CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg 水平比较			% , $\bar{x} \pm s$
Binet 临床分期	例数	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg	
A 期	14	3.47±1.01	
B/C 期	17	6.22±1.98 ¹⁾	

与 A 期比较,¹⁾ $P<0.05$ 。

者初诊时 CD4⁺CD25⁺Treg 及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 均显著高于健康人群,治疗后缓解患者 CD4⁺CD25⁺Treg 及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 明显降低,但仍高于健康人群,与 Dasgupta 等^[14-15] 研究结果一致。提示 CLL 患者 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 显著增多,可抑制体内抗肿瘤免疫作用,打破机体免疫平衡,从而诱导肿瘤细胞增殖、活化;治疗可减少 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 数量,恢复机体部分抗肿瘤免疫功能,从而促进机体内肿瘤细胞清除。临床分期是恶性肿瘤重要的预后因素。本研究结果显示,CLL 患者中,Binet 临床分期 A 期患者 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 显著低于 B/C 期患者,且 Binet 临床分期与 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 水平呈正相关,提示 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 越多则预后越差。

综上所述,CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 对 CLL 患者病情评估、疗效判定及预后评估具有一定临床价值。下调 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 数量或抑制其功能为免疫治疗方案,可能为 CLL 的临床治疗提供新思路。

参考文献

[1] Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia[J]. Blood, 2011, 117: 563—574.

[2] Fabbri M, Bottoni A, Shimizu M, et al. Association of a microRNA/TP53 feedback circuitry with pathogenesis and outcome of B-cell chronic lymphocytic leukemia[J]. JAMA, 2011, 305: 59—67.

[3] Pourgheysari B, Bruton R, Parry H, et al. The number of cytomegalovirus-specific CD4⁺ T cells is markedly expanded in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and determines the total CD4⁺ T-cell repertoire[J]. Blood, 2010, 116: 2968—2974.

[4] D’Arena G, Laurenti L, Minervini MM, et al. Regulator

ry T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease[J]. Leuk Res, 2011, 35: 363—368.

[5] 中华医学会血液学分会. 中国慢性淋巴细胞白血病的诊断与治疗指南(2011 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(7): 498—501.

[6] Han D, Wang C, Lou W, et al. Allergen-specific IL-10-secreting type I T regulatory cells, but not CD4 (+) CD25 (+) Foxp3 (+) T cells, are decreased in peripheral blood of patients with persistent allergic rhinitis[J]. Clin Immunol, 2010, 136: 292—301.

[7] 刘立, 吴文川, 刘保池. CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在肿瘤免疫中的作用研究[J]. 国际外科学杂志, 2011, 38(4): 259—262.

[8] 魏明, 涂玲, 梁颖红, 等. 乳腺癌 CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺调节性 T 细胞数量和分布及 Foxp3mRNA 表达与肿瘤分期的相关性研究[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(12): 2227—2231.

[9] Preston C, Maurer M, Oberg A, et al. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells and association with survival in epithelial ovarian cancer[J]. J Immunol, 2012, 188: 1—9.

[10] Yamamoto T, Yanagimoto H, Sato S, et al. Circulating CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with pancreatic cancer[J]. Pancreas, 2012, 41: 409—415.

[11] Karagöz B, Bilgi O, Gümüş M, et al. CD8⁺CD28[?] cells and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of advanced stage lung cancer patients[J]. Med Oncol, 2010, 27: 29—33.

[12] 陆春伟, 佟海侠, 陆美言. 急性白血病患者外周血淋巴细胞亚群和调节性 T 细胞的检测及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(11): 2230—2233.

[13] 曹国番, 李贵平, 杨洁, 等. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞体外诱导扩增与临床应用研究进展[J]. 临床输血与检验, 2012, 14(3): 278—281.

[14] Dasgupta A, Mahapatra M, Saxena R. Flow cytometric immunophenotyping of regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: comparative assessment of various markers and use of novel antibody panel with CD127 as alternative to transcription factor FoxP3 [J]. Leuk lymphoma, 2013, 54: 778—789.

[15] 谢平, 庞楠楠, 郭新红, 等. 慢性淋巴细胞白血病患者外周血调节性 T 细胞的百分率及与预后的关系[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(12): 1307—1311.

(收稿日期: 2014-07-31)