

T 淋巴细胞亚群与白细胞介素-6 在多发性骨髓瘤患者中的表达

杨达天¹ 姚福生¹ 梁虹¹ 徐海涛¹ 潘明¹

[摘要] 目的:探讨不同分期的多发性骨髓瘤(MM)患者外周血淋巴细胞各亚群细胞比例与白细胞介素-6(IL-6)表达变化。方法:用流式细胞仪检测 35 例初治 MM 患者及 10 例对照者的外周血淋巴细胞亚群各细胞表达水平,用 ELISA 法检测 IL-6 水平。结果:与对照者相比,MM 患者的 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 明显降低($P<0.01$),均与 MM 分期严重程度呈负相关($r=-0.780, -0.832, P<0.01$);MM 患者的 CD8⁺ 显著增加($P<0.01$),与 MM 分期严重程度呈正相关($r=0.737, P<0.01$)。MM 患者的 IL-6 水平较对照者显著增加,与 MM 分期严重程度呈正相关($r=0.961, P<0.01$)。结论:IL-6 表达增加及 T 淋巴细胞亚群数目异常变化可能是 MM 患者免疫异常的机制之一,两者能作为观察 MM 患者病情严重程度的指标。

[关键词] 多发性骨髓瘤;T 淋巴细胞亚群;白细胞介素-6

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2015.09.009

[中图分类号] R733.3 **[文献标志码]** A

Expression of T lymphocyte subsets and interleukin-6 in patients with multiple myeloma

YANG Datian YAO Fusheng LIANG Hong XU Haitao PAN Ming

(Department of Hematology, Anqing Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Anqing, 246003, China)

Corresponding author: YAO Fusheng, E-mail: 374860736@qq.com

Abstract Objective: To investigate the changes of T lymphocytes subsets and expression of interleukin-6 (IL-6) in peripheral blood of the patients with multiple myeloma (MM) in different stages. **Method:** The peripheral blood was collected from 35 newly diagnosed patients with MM and 10 normal controls. Flow cytometry was used to detect T lymphocyte subsets in peripheral blood, and enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the level of IL-6. **Result:** Compared with normal controls, the number of CD4⁺ and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ in MM patients decreased significantly ($P<0.01$), and were negatively correlated with the degree of MM ($r=-0.780, -0.832, P<0.01$); The number of CD8⁺ increased significantly, and was positively related with the degree of MM ($r=0.737, P<0.01$); The level of IL-6 increased significantly, and was positively related with the degree of MM ($r=0.961, P<0.01$). **Conclusion:** Increase of IL-6 expression and abnormality of T lymphocyte subsets may be one of the mechanisms for cellular immun dysfunction in patients with MM, both of them can serve as indexes for observing the disease state.

Key words multiple myeloma; T lymphocyte subsets; interleukin-6

多发性骨髓瘤(MM)是浆细胞恶性病,占血液肿瘤的 10%,化疗提高了 MM 患者生存率,但仍有患者复发。肿瘤免疫学现认为细胞免疫在抗肿瘤作用中有重要位置,认为 MM 的发生与肿瘤免疫及细胞因子相关。本研究通过检测不同分期 MM 患者的 T 淋巴细胞亚群与 IL-6 水平,为研究 MM 的发病机制及探索免疫治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料

选择 2013-01—2014-12 在我科住院的 MM 患者 35 例,均符合国内诊断标准^[1]。男 25 例,女 10

例;年龄 36~80 岁,平均(57.2 ± 8.3)岁;参照国际 MM 分期系统(ISS)标准:Ⅰ期 12 例,Ⅱ期 14 例,Ⅲ期 9 例。对照组选择同期健康体检者 10 例,男 6 例,女 4 例;年龄 23~74 岁,平均(59.4 ± 9.3)岁。均排除感染、其他肿瘤及自身免疫性疾病。2 组研究对象的性别、年龄具有均衡性。

1.2 试剂及仪器

荧光素标记抗体、溶血素、流式细胞仪(FACS Calibur)均为美国 BD 公司生产;IL-6 ELISA 体外诊断试剂盒购于天津物化生物工程有限公司。

1.3 方法

2 组研究对象均采集空腹静脉血 10 ml:①在 A、B 试管里各加标记抗体 20 μ l 和抗凝血 100 μ l,

¹安徽医科大学附属安庆医院血液科(安徽安庆,246003)
通信作者:姚福生, E-mail: 374860736@qq.com

混匀避光放置 20 min,各加入溶解素 2 ml,混匀、结合 10 min,离心后弃上清;加入 2 ml PBS,混匀后再离心去上清,后加入 0.5 ml 1%多聚甲醛固定,低温保存,24 h 内流式细胞仪检测。②采用 ELISA 法,将分离血清用 IL-6 单抗包被于酶标板,加入检测抗体,形成“抗体-IL-6-抗体”复合物,再加入亲和素,结合后加入显示剂及终止液混匀后测量光密度值;依绘制的标准曲线计算各待检标本 IL-6 含量。

1.4 统计学处理

使用 SPSS12.0 软件分析数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验、 F 检验及 q 检验,并且采用 Pearson 直线相关分析。

2 结果

2.1 2 组 T 淋巴细胞亚群比例的比较

与对照者比较,MM 患者 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 均明显下降 ($P < 0.01$),且 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 降低与 MM 分期程度呈负相关 ($r = -0.780$, -0.832 , $P < 0.01$),即 MM 分期越晚,程度越重,降低越明显;而 $CD8^+$ 数量增加 ($P < 0.01$),与 MM 分期程度呈正相关 ($r = 0.737$, $P < 0.01$),即 MM 分期越晚,程度越重,增高越明显。见表 1。

表 1 2 组 T 淋巴细胞亚群比例的比较 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	$CD4^+/\%$	$CD8^+/\%$	$CD4^+/CD8^+$
对照组	10	43.56 ± 2.24	29.30 ± 3.17	1.50 ± 0.19
MM 组	35	—	—	—
I 期	12	37.88 ± 3.77	35.0 ± 2.77	1.08 ± 0.13
II 期	14	36.63 ± 3.57	35.41 ± 2.69	1.04 ± 0.15
III 期	9	27.68 ± 5.17	40.61 ± 3.97	0.68 ± 0.15

2.2 2 组 IL-6 水平的比较

与对照者比较,MM 患者 IL-6 表达水平增加 ($P < 0.01$),与 MM 分期程度呈正相关 ($r = 0.961$, $P < 0.01$),即 MM 分期越晚,程度越重,增加越明显。见表 2。

表 2 2 组 IL-6 水平比较 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	IL-6/(pg · ml ⁻¹)
对照组	10	4.91 ± 0.38
MM 组	35	—
I 期	12	7.11 ± 0.37
II 期	14	11.50 ± 0.22
III 期	9	19.42 ± 0.67

3 讨论

目前针对 MM 的化疗方案如 BCD、VTD 等被广泛应用,但包括自体骨髓移植在内的治疗仍无法改变 MM 难治愈的局面,目前的研究有很多涉及细胞免疫缺陷异常及细胞因子的参与过程。本研究结果表明,MM 患者存在免疫功能缺陷, $CD8^+$ T

细胞在 MM 患者比例显著升高,而 $CD4^+$ T 细胞有所降低,与大多数研究报道一致。说明 MM 患者机体存在淋巴细胞亚群数量异常及比例失衡所导致的免疫失常,这可能是笼统意义上的浆细胞疾病者免疫缺陷的发病基础。

自身免疫相关性疾病引起的淋巴细胞亚群数量及比值异常已经被大家所知。MM 系来源于 B 细胞的恶性浆细胞病,但除了体液免疫的功能缺陷,细胞免疫功能在 MM 患者身上也表现出异常,特别是在 T 淋巴细胞的功能及表型上均有体现。 $CD4^+$ 细胞在抗肿瘤(包括实体瘤及血液系统肿瘤)过程中通过分泌各种淋巴因子,增加和放大免疫应答效应,辅助其他免疫细胞如树突样细胞共同发挥抗肿瘤作用, $CD4^+$ 淋巴细胞数量减少会导致机体免疫机能的下降。而 $CD8^+$ 细胞不仅能抑制 $CD4^+$ 淋巴细胞的活化同时能抑制 B 细胞产生抗体,既抑制细胞免疫又抑制体液免疫的正常抗肿瘤作用,在抗肿瘤免疫反应中起负向调控作用,它的增多有利于肿瘤的持续增长,在 MM 这种浆细胞单克隆性疾病的早期阶段,如冒烟性骨髓瘤或者意义未明的免疫蛋白增多症患者体内往往能发现异常^[2]。当机体细胞亚群的数量发生变化, $CD4^+$ T 细胞降低而 $CD8^+$ T 细胞明显偏高,造成两者比值下降时,提示机体的细胞免疫功能失调,肿瘤得以逃避免疫监视。多项研究也提示肿瘤患者具有 T 淋巴细胞亚群状态异常和比例失调;MM 患者体内大量的细胞因子一方面会造成肝细胞产生 C 反应蛋白(CRP),CRP 会抑制 Th 细胞免疫功能,另一方面 CRP 通过抑制 IL-4 的分泌,干扰多克隆 B 细胞的激活。

$CD4^+CD28^+/CD4^+$ T 细胞的比例基本上能表现 $CD4^+$ T 细胞的功能。陈苗等^[3]指出在 ISS 不同分期、不同年龄段的患者均发现 $CD4^+CD28^+/CD4^+$ 明显下降, $CD28^+CD4^+$ 的表达减少,使 $CD4^+$ T 细胞不能被抗原递呈细胞有效激活,针对特异肿瘤抗原的细胞毒作用及细胞因子应答不够,缺乏识别及除去肿瘤细胞的能力,出现机体免疫耐受;而 $CD8^+$ T 细胞在 ISS III 期患者中明显高于 II 期患者,提示 $CD8^+$ T 细胞扩增,特别是抑制性 T 细胞增加,可能是患者预后不良的影响因素之一。

Dankbar 等(2000)研究显示骨髓基质细胞(BMSCs)及骨髓瘤细胞受到外源性 IL-6 的刺激可以分泌血清血管内皮生长因子(VEGF),而 BMSCs 又可以在 VEGF 的作用下产生 IL-6,这两个过程相互影响和促进,结果扩大了各自的生物学效应。郭益群等^[4]也在体内外实验中发现骨髓瘤细胞在与 BMSCs 接触黏附过程中,使上述的各种细胞因子 VEGF 和 IL-6 与 IGF-1 等以自、旁分泌及因子非依赖性方式互相促进,形成不良恶性循环。

(下转第 773 页)

- [9] Thomsen RW, Schoonen WM, Farkas DK, et al. Risk for hospital contact with infection in patients with splenectomy: a population-based cohort study[J]. *Ann Intern Med*, 2009, 151: 546–555.
- [10] Thomsen RW, Schoonen WM, Farkas DK, et al. Risk of venous thromboembolism in splenectomized patients compared with the general population and appendectomized patients: a 10-year nationwide cohort study[J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8: 1413–1416.
- [11] Boyle S, White RH, Brunson A, et al. Splenectomy and the incidence of venous thromboembolism and sepsis in patients with immune thrombocytopenia[J]. *Blood*, 2013, 121: 4782–4790.
- [12] Mohamed SY, Abdel-Nabi I, Inam A, et al. Systemic thromboembolic complications after laparoscopic splenectomy for idiopathic thrombocytopenic purpura in comparison to open surgery in the absence of anticoagulant prophylaxis[J]. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 2010, 3: 71–77.
- [13] Delaitre B, Champault G, Barrat C, et al. Laparoscopic splenectomy for hematologic diseases: study of 275 cases. French Society of Laparoscopic Surgery[J]. *Ann Chir*, 2000, 125: 522–529.
- [14] Yong M, Thomsen RW, Schoonen WM, et al. Mortality risk in splenectomized patients: a Danish population-based cohort study[J]. *Eur J Intern Med*, 2010, 21: 12–16.
- [15] Vianelli N, Palandri F, Polverelli N, et al. Splenectomy as a curative treatment for immune thrombocytopenia: A retrospective analysis of 233 patients with a minimum follow up of 10 years[J]. *Haematologica*, 2013, 98: 875–880.
- [16] Das SS, Bhattacharya S, Sen S. Managing uncontrolled postsplenectomy reactive thrombocytosis in idiopathic thrombocytopenic purpura: role of thrombocytapheresis[J]. *Transfus Apher Sci*, 2013, 49: 171–173.
- [17] Grima KM. Therapeutic apheresis in hematological and oncological diseases[J]. *J Clin Apheresis*, 2000, 15: 28–52.
- [18] Navez J, Hubert C, Gigot JF, et al. Does the site of platelet sequestration predict the response to splenectomy in adult patients with immune thrombocytopenic purpura? [J]. *Platelets*, 2014, 2: 1–4.
- [19] Sarpatwari A, Provan D, Erqou S, et al. Autologous 111 In-labelled platelet sequestration studies in patients with primary immune thrombocytopenia (ITP) prior to splenectomy: a report from the United Kingdom ITP Registry [J]. *Br J Haematol*, 2010, 151: 477–487.
- [20] Wang T, Xu M, Ji L, et al. Splenectomy for adult chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: experience from a single center in China [J]. *Eur J Haematol*, 2005, 75: 424–429.

(收稿日期: 2015-04-15)

(上接第768页)

MM患者的免疫功能经常受损,一项研究指出MM患者的单核细胞能通过CD38信号通路促进IL-6的高水平释放,进而使肿瘤细胞免受凋亡^[5]。而另一项研究揭示骨髓间质细胞可通过分泌IL-6/IL-1 β 使调节性T细胞(Treg)的免疫抑制功能减弱^[6]。把IL-6作为免疫治疗MM的一个靶点,使用来那度胺抑制免疫Treg,调节IL-6的分泌而达到治疗MM的作用^[7],提供了新的治疗MM思路。本研究显示随着临床分期增高MM患者IL-6递增,提示肿瘤负荷高患者IL-6水平高于低肿瘤负荷患者。邢立杰等^[8]研究提示IL-6可像乳酸脱氢酶、 β -微球蛋白等一样成为MM的预后指标。

总之,MM患者存在IL-6及细胞免疫表达异常,通过调节MM患者的细胞免疫功能,可能为MM患者的整体预后好转及治疗方向起指导意义。

参考文献

- [1] 张之南,沈悒. 血液学诊断及疗效标准[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2007: 232–235.
- [2] Goodyear OC, Pratt G, McLarnon A, et al. Differential pattern of CD4+ and CD8+ T-cell immunity to MAGE-A1/A2/A3 in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and multiple myeloma[J]. *Blood*, 2008, 112: 3362–3372.
- [3] 陈苗, 许莹, 李辉, 等. 34例新诊断多发性骨髓瘤患者淋巴细胞亚群及相关预后因素分析[J]. *中华血液学杂志*, 2013, 34(4): 355–358.
- [4] 郭益群, 陈世伦. 多发性骨髓瘤骨髓基质细胞分泌IGF-1、VEGF和IL-6的动态变化[J]. *中华血液学杂志*, 2006, 27(4): 231–234.
- [5] Fedele G, Di Girolamo M, Recine U, et al. CD38 ligation in peripheral blood mononuclear cells of myeloma patients induces release of protumorigenic IL-6 and impaired secretion of IFN γ cytokines and proliferation [J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 564687.
- [6] Guichelaar T, Emmelot ME, Rozemuller H, et al. Human regulatory T cells do not suppress the antitumor immunity in the bone marrow: a role for bone marrow stromal cells in neutralizing regulatory T cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19: 1467–1475.
- [7] Semeraro M, Vacchelli E, Eggermont A, et al. Trial Watch: Lenalidomide-based immunochemotherapy[J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2: e26494.
- [8] 邢立杰, 徐燕, 安刚, 等. 初治多发性骨髓瘤患者血清IL-6的预后价值[J]. *中国实验血液学杂志*, 2013, 21(6): 1492–1495.

(收稿日期: 2015-02-02)