

# CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞检测在急性髓细胞白血病中的临床意义\*

陶贞霞<sup>1</sup> 郭晓玲<sup>2</sup> 孟宇<sup>1</sup> 于彦居<sup>1</sup> 丁继生<sup>1</sup> 王娟<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的:探讨 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞检测在急性髓细胞白血病(AML)中的临床意义。方法:选取 AML 患者 41 例和体检健康者 16 例,用流式细胞仪检测 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞占 CD4<sup>+</sup>T 细胞的比例。结果:AML 患者外周血的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞表达明显高于对照者[(3.88±1.99)%:(1.96±1.66)%,*P*<0.01]。AML 组内,化疗耐药者(15 例)的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞表达显著高于化疗敏感者(14 例)[(3.90±1.89)%:(2.00±1.65)%,*P*<0.01]。14 例化疗敏感者中,缓解后复发者(4 例)的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞表达显著高于持续缓解者(10 例)[(3.95±1.86)%:(2.02±1.55)%,*P*<0.05]。结论:CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞可能诱导免疫耐受,从而导致 AML 细胞的恶性增殖,影响白血病化疗的疗效,也可能是引起缓解患者复发的原因之一。

**【关键词】** 急性髓细胞白血病;CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞;预后;免疫表型;流式细胞术

**【中图分类号】** R733.71 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1004-2806(2013)07-0452-03

## Clinical significance of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells detection in acute myelocytic leukemia

TAO Zhenxia<sup>1</sup> GUO Xiaoling<sup>2</sup> MENG Yu<sup>1</sup> YU Yanju<sup>1</sup> DING Jisheng<sup>1</sup> WANG Juan<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Central Laboratory, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou, 061001, China; <sup>2</sup>the Second Hospital of Hebei Medical University, Blood Institute in Hebei Province)

Corresponding author: GUO Xiaoling, E-mail: 13932113351@163.com

**Abstract Objective:** To explore the clinical significance of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells detection in acute myelocytic leukemia (AML). **Method:** The percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in CD4<sup>+</sup> T cells was detected in 41 AML and 16 normal controls by flow cytometry. **Result:** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells expression in AML patients was significantly higher than that in normal controls (*P*<0.01). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells expression in 15 patients with chemotherapy tolerance was significantly higher than that in 14 patients with chemotherapy sensitivity (*P*<0.01). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells expression in 4 patients with recurrence was significantly higher than that in 10 patients with sustained remission (*P*<0.05). **Conclusion:** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells may induce immune tolerance and lead to acute leukemia cell proliferation and influence the curative effect of leukemia chemotherapy. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells may be one of the reasons which resulted in the recurrence of patients after remission.

**Key words** acute myelocytic leukemia; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells; prognosis; immunophenotype; flow cytometry

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞由 Sakaguchi 等(1995)首次报道。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞是一群独特的专职抑制细胞,主要分泌白细胞介素(IL)-10 和转化生长因子(TGF)-β 等抑制性细胞因子,通过细胞-细胞接触的方式发挥抑制免疫反应作用<sup>[1]</sup>。近年来,白血病的免疫治疗逐渐成为白血病治疗中的研究热点。本文通过检测白血病体内微环境中免疫细胞的情况,探讨白血病的发病和转移机制及新的治疗方法。

### 1 资料与方法

#### 1.1 资料

选取 2009-03-2009-12 在沧州市中心医院血液科住院的急性髓细胞白血病(AML)患者 41 例(AML 组),男 29 例,女 12 例;年龄 20~75 岁,中位年龄 48 岁;依据 FAB 分型 M<sub>1</sub> 2 例, M<sub>2</sub> 17 例, M<sub>4</sub> 5 例, M<sub>5</sub> 17 例。另选择同期在沧州市中心医院体检中心的健康体检者 16 例作为对照组,男 10 例,女 6 例;年龄 20~53 岁,中位年龄 33.5 岁。

#### 1.2 方法

**1.2.1 仪器和试剂** Becton Dickinson 公司生产的 FACS Calibur 流式细胞仪。藻红蛋白(PE)标记的鼠抗人 CD4 抗体,鼠抗人 IgG1-异硫氰酸荧光素

\* 基金项目:河北省自然科学基金(No:C2008001097);国家高等学校博士学科点专项科研基金(No:200800890011)  
<sup>1</sup>沧州市中心医院中心实验室(河北沧州,061001)  
<sup>2</sup>河北医科大学第二医院 河北省血液病研究所  
通信作者:郭晓玲, E-mail: 13932113351@163.com

(FITC)/IgG2-PE 免疫球蛋白, FITC 标记的鼠抗人 CD25 抗体,均来自美国 BD 公司。

**1.2.2 标本采集** 采集患者和健康体检者外周血 2 ml 加入 EDTA 抗凝管,充分混匀,检测 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞占 CD4<sup>+</sup>T 细胞的比例。

**1.2.3 实验方法** ①采集 AML 组患者外周血 2 ml 加入 EDTA 抗凝管,充分混匀,取 100  $\mu$ l 加入流式细胞检测管 1 和 2。管 1 中加入各 20  $\mu$ l 鼠抗 IgG1-FITC/IgG2-PE,管 2 中加入各 20  $\mu$ l CD4<sup>-</sup>FITC/CD25<sup>-</sup>PE,涡旋器充分混匀,闭光孵育 20~40 min。②避光孵育后加入红细胞裂解液 2 ml,闭光孵育 10 min 至液体透亮。③离心 1 000 转 5 min 去上清,加入 2 ml PBS 缓冲液洗涤,离心 1 000 转 5 min 去上清。④加入 PBS 缓冲液 400  $\mu$ l 上流式细胞仪检测。⑤数据获取采用 Cell Quest 3.2,应用鼠抗人 IgG1-FITC/IgG2-PE/为对照设置样本非特异荧光,即阴性对照。使用对照管调整,使阴性群体位于点图左下角,调整和补偿,顺序放置实验管,收集至少 10 000 个细胞,分析荧光强度,光散射数据存盘,测试后在计算机上用软件分析数据,记录 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞的百分率。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件分析。所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较用独立样本 *t* 检验,相关性检验用线性相关性分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 2 组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的表达及其与临床特征的关系

AML 组外周血的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞表达明显高于对照组[(3.88 $\pm$ 1.99)%:(1.96 $\pm$ 1.66)%, $P < 0.01$ ]。AML 组内,M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>、M<sub>4</sub>、M<sub>5</sub> 各型的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞表达均差异无统计学意义。相关性分析结果显示,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的表达与患者外周血白细胞的数量、年龄、性别及 CD34 表达均无显著相关。

### 2.2 AML 组内化疗敏感者与化疗耐药者间 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的表达

41 例 AML 中,14 例经 1 个或 2 个疗程的化疗达到完全缓解,为化疗敏感者;15 例经 2 个疗程化疗未缓解,为化疗耐药者(参照文献[2])。化疗耐药者的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞表达显著高于化疗敏感者[(3.90 $\pm$ 1.89)%:(2.00 $\pm$ 1.65)%, $P < 0.01$ ]。

### 2.3 AML 组内持续缓解者与缓解后复发者间 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的表达

14 例化疗敏感者中,持续缓解者 10 例,缓解后复发 4 例。缓解后复发者的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T

细胞表达显著高于持续缓解者[(3.95 $\pm$ 1.86)%:(2.02 $\pm$ 1.55)%, $P < 0.05$ ]。

## 3 讨论

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞在实体瘤中抑制肿瘤免疫的研究较早,而其在恶性血液病中的研究最近几年才开始。在 AML 及慢性淋巴细胞白血病患者外周血中,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的数量较正常者明显增加<sup>[3-4]</sup>,同时出现 IL-2、干扰素分泌减少,IL-10、TGF- $\beta$  水平升高。AML 患者的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>调节性 T 细胞与 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>细胞共培养,能有效抑制 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>细胞的增殖和活化,同时表达胞内 CD152(细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4),但是无近期活化的标志 CD69 的表达<sup>[4]</sup>。提示 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞在白血病的免疫抑制中发挥重要作用。从数量上看,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞数量的增多,更强地抑制了 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞的增殖与活化,抑制了 NK 细胞、NKT 细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞的抗肿瘤作用,从而介导了白血病患者的免疫损害,削弱了针对肿瘤的免疫作用。

人体的血液系统和免疫系统相互联系,密不可分。在白血病初治患者中,白血病细胞侵占造血系统的同时也影响正常的免疫细胞,正常的淋巴细胞数目较正常人明显减少。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞是否还能发挥免疫抑制的作用,目前国内外鲜有报道。

本文研究表明,AML 患者的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞增高,可能会抑制机体的抗肿瘤免疫反应,引起机体对白血病细胞的免疫耐受,使机体免疫细胞不能清除白血病细胞,从而导致白血病细胞的恶性增殖,使机体罹患白血病。提示初发 AML 患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞升高可能导致患者抗肿瘤免疫功能低下,与白血病发生关系密切<sup>[5]</sup>。此外还有研究证实,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞在体内外能有效抑制 NK 细胞,影响其对肿瘤细胞的光谱杀伤作用<sup>[6]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞通过抑制自身反应性 T 细胞来控制自体免疫反应,但过度抑制肿瘤反应性淋巴细胞会导致患者失去自身的抗肿瘤免疫反应,提示下调 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞数量或功能将有助于提高机体抗肿瘤免疫,减轻肿瘤负荷<sup>[7]</sup>。急性白血病患者细胞升高是急性白血病免疫逃逸的重要机制,去除 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞可能增强抗肿瘤免疫,为急性白血病的治疗开辟新的途径<sup>[8]</sup>。

我们的研究表明,AML 患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞表达可能会影响患者的预后。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞数量表达持续高的患者对化疗药物不敏感,不容易达到临床缓解,这可能与 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞抑制正常的免疫细胞,

使机体清除抗白血病细胞的能力减弱有关。AML 患者达到缓解后,免疫系统对肿瘤的监视和清除是维持缓解状态的重要因素之一。但 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞数量的增高,使免疫系统对机体的白血病细胞清除功能下降,引起其不断增殖,患者复发白血病。Szczepanski 等<sup>[9]</sup>的研究表明,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞调节的数量在急性白血病患者中增加,而且数量较高的患者对常规化疗不敏感,数量较低的患者通常可以达到缓解。有研究表明,AML 患儿的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞数量高于健康儿童,并且与疾病的危险度和治疗的效应有一定的关系<sup>[10]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的表达是否可以作为 AML 患者缓解后复发预测的一个指标,有待于更进一步的研究和跟踪。

迄今为止,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞与白血病细胞的相互关系尚未明了。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞促进机体对肿瘤细胞的低反应性,提供了肿瘤细胞免疫逃逸的内环境。相反,白血病细胞是否对 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的数量增多和功能活化起作用以及如何起作用,有待于进一步研究。

**参考文献**

[1] 徐文鑫,翁开枝. 免疫细胞在白血病免疫治疗应用中的研究进展[J]. 医学综述,2006,12(12):739-742.  
 [2] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2007:131-133.  
 [3] WANG X, ZHENG J, LIU J, et al. Increased population of CD4(+)CD25(high), regulatory T cells with

their higher apoptotic and proliferating status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients[J]. Eur J Haematol,2005,75:468-476.

[4] BEYER M, KOCHANEK M, DARABI K, et al. Reduced frequencies and suppressive function of CD4<sup>+</sup>CD25 high regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine [J]. Blood,2005,106:2018-2025.  
 [5] 张帆,徐菁,朱镭. 血液系统恶性肿瘤患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的变化及意义[J]. 山西医科大学学报,2007,38(12):1106-1108.  
 [6] RALAINIRINA N, POLI A, MICHEL T, et al. Control of NK cell functions by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells[J]. J Leukoc Biol,2007,81:144-153.  
 [7] 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.  
 [8] 杨云,何爱丽,张王刚,等. 急性白血病患者调节性 T 细胞的检测及临床意义[J]. 临床血液学杂志,2010,23(3):71-73.  
 [9] SZCZEPANSKI M J, SZAINIK M, CZYSTOWSKA M, et al. Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia[J]. Clin Cancer Res,2009,15:3325-3332.  
 [10] 张爱梅,翟志敏,王宁玲,等. CD4<sup>+</sup>CD25 高表达调节性 T 细胞与儿童急性淋巴细胞白血病的关系[J]. 白血病. 淋巴瘤,2008,17(4):267-270.

(收稿日期:2012-12-26)

与临床康复,2009,13(40):7908-7912.

[3] 李佩恩,吴秉毅,李真慧,等. 间充质干细胞可能通过调控免疫细胞促进再生障碍性贫血小鼠骨髓的造血功能[J]. 中国病理生理杂志,2010,26(5):987-990.  
 [4] 夏云金,高清平,万楚成,等. 肝细胞生长因子对 ALL 小鼠骨髓移植后 GVHD 和血清 Th1/Th2 相关细胞因子的影响[J]. 中国实验血液学杂志,2005,13(1):35-38.  
 [5] 刘增慧,肖扬,蒋祖军,等. 骨髓间充质干细胞上调再生障碍性贫血患者 CD4+CD25+Foxp3+调节性 T 细胞的临床研究[J]. 实用医学杂志,2011,27(9):1582-1585.  
 [6] 柴晔,刘瑛,孙媛媛,等. 人脐带间充质干细胞对再生障碍性贫血患者 Treg 细胞的影响[J]. 中国免疫学杂志,2011,27(9):837-839.  
 [7] 高颯,肖扬,蒋祖军,等. 骨髓间充质干细胞治疗再生障碍性贫血的疗效及安全性[J]. 广东医学,2010,31(21):2797-2800.

(收稿日期:2013-01-08)

(上接第 451 页)

升高 Treg 细胞水平有关。治疗过程中,患者未出现肝肾功能、体温、消化道等异常反应,说明 UC-MSCs 输注是安全的。

脐带中具有相当数量的造血干细胞和丰富的 MSCs,其具有易获得性、扩增性、自我复制和多向分化潜能,ATG 联合 UC-MSCs 输注可加强 ATG 的免疫抑制作用,有利于促进造血功能恢复,展示了良好的研究和应用前景。UC-MSCs 有可能成为治疗 SAA 的一种有效可行的细胞治疗方法,但其远期疗效和安全性有待观察更多的病例进一步证实。

**参考文献**

[1] KAITO K, OTSUBO H, USUI N, et al. Th1/Th2 lymphocyte balance in patients with aplastic anemia [J]. Rinsho Byori,2004,52:569-573.  
 [2] 陈新,华建媛,石庆之. 人脐带间充质干细胞对再生障碍性贫血 T 细胞的调节作用[J]. 中国组织工程研究