

# 异基因造血干细胞移植后 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞 ATP 水平的临床意义

罗晓丹<sup>1</sup> 郑润辉<sup>1</sup> 覃鹏飞<sup>2</sup> 林竞初<sup>2</sup> 郜靛<sup>2</sup> 王春燕<sup>2</sup> 谭获<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探讨荧光素酶法检测 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞三磷酸腺苷(ATP)水平在异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)后感染、急性移植物抗宿主病(aGVHD)及疾病复发的变化和临床意义。方法:纳入 2019 年 1 月—2020 年 5 月接受 allo-HSCT 的血液系统肿瘤患者为研究对象,荧光素酶法检测 allo-HSCT 后不同时间点患者的 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞 ATP 水平,分析其与 aGVHD、感染和肿瘤复发的关系。结果:纳入本研究患者 26 例,中位年龄 31(17~64)岁。allo-HSCT 后 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 分别为(217.50 ± 117.59)ng/mL 和(196.23 ± 117.32)ng/mL,均比健康人群低( $P < 0.05$ )。发生 aGVHD 的中位时间为+48(+25~+184) d,发生 III~IV 度 aGVHD 患者基础 ATP<sup>CD4</sup> 比轻度和未发生 GVHD 的患者明显下降( $P = 0.018$ ),而且,aGVHD 时的 ATP<sup>CD4</sup> 比粒细胞重建时更低,aGVHD 缓解后 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 均比起病时明显回升( $P < 0.01$ )。allo-HSCT 后感染的中位时间为+67(+36~+218) d。感染后平均 ATP<sup>CD4</sup> 比感染前明显下降( $P = 0.047$ ),基础 ATP 水平在+67 d 内感染和非感染患者间差异无统计学意义。总体中位随访时间为 31(3~39)个月,2 年内复发患者 8 例(30.77%),死亡患者 8 例(30.77%)。复发患者基础 ATP<sup>CD4</sup> 比无复发患者明显下降( $P = 0.009$ ),基础 ATP<sup>CD4</sup> ≤ 99.90 ng/mL 是死亡的独立危险因素( $P = 0.009$ )。结论:ATP<sup>CD4</sup> 对预测 III~IV 度严重 GVHD 和疾病复发及不良预后有一定价值。

**[关键词]** 造血干细胞移植;T 细胞功能;三磷酸腺苷;移植物抗宿主病

**DOI:**10.13201/j.issn.1004-2806.2022.11.008

**[中图分类号]** R457.7 **[文献标志码]** A

## Clinical utility of CD4 and CD8 T-lymphocytes ATP levels in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

LUO Xiaodan<sup>1</sup> ZHENG Runhui<sup>1</sup> QIN Pengfei<sup>2</sup> LIN Jingren<sup>2</sup>  
GAO Jing<sup>2</sup> WANG Chunyan<sup>2</sup> TAN Huo<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Hematology, Fifth Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou, 510735, China; <sup>2</sup>Department of Hematology, First Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University)

Corresponding author: TAN Huo; E-mail: tanhuo.2008@163.com

**Abstract Objective:** To evaluate the clinical utility of CD4 and CD8 T-lymphocytes adenosine triphosphate (ATP) levels in predicting infection, acute GVHD(aGVHD) and disease relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation(allo-HSCT). **Methods:** Patients with hematology malignancy who underwent allo-HSCT between January 2019 to May 2020 were retrospectively studied. Luminescent ATP detection assay was used to assess CD4 and CD8 ATP levels which were compared at different time points when patients had neutrophil reconstitution, aGVHD onset, infection and disease relapse. **Results:** A total of 26 patients were included with the median age of 31 years(range 17-64 years). CD4 and CD8 ATP levels at the time of neutrophil reconstitution were (217.50 ± 117.59)ng/mL and (196.23 ± 117.32)ng/mL, respectively, which were much lower than those of healthy people( $P < 0.05$ ). Patients developed aGVHD at a median time of +48 d(range +25 to +184 days). Initial CD4 ATP levels of patients with grade III-IV aGVHD were significantly lower than those with grade I-II or without aGVHD( $P = 0.018$ ). CD4 ATP levels during aGVHD were lower than initial levels but increased as aGVHD improved( $P < 0.01$ ). Patients had infection at a median time of +67 d(range +36 to +218 days). CD4 ATP levels during infection were lower than initial levels which showed no difference between patients with or without infection within +67 d post allo-HSCT. Patients were followed up for 3 to 39 months with a median follow-up of 31 months and 8 patients (30.77%) relapsed and 8 patients (30.77%) died within 2 years. CD4 ATP

<sup>1</sup> 广州医科大学附属第五医院血液内科(广州,510735)

<sup>2</sup> 广州医科大学附属第一医院血液内科

通信作者:谭获,E-mail:tanhuo.2008@163.com

levels at relapse was dramatically decreased and initial CD4 ATP levels of  $\leq 99.90$  ng/mL was confirmed to be a risk factor for poor clinical outcome ( $P=0.009$ ). **Conclusion:** Assessment of CD4 and CD8 ATP levels by Luminescent ATP Detection Assay Kit play an important role in predicting grade III-IV aGVHD and disease relapse after allo-HSCT.

**Key words** hematopoietic stem cell transplantation; T cell function; adenosine triphosphate; graft-versus-host-disease

异基因造血干细胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT) 是治疗血液系统肿瘤和骨髓衰竭性疾病的重要手段<sup>[1-2]</sup>。感染和急性移植物抗宿主病 (acute graft-versus-host disease, aGVHD) 作为 allo-HSCT 后的主要并发症, 明显增加移植相关死亡率 (transplant-related mortality, TRM)<sup>[3-5]</sup>。随着单倍体相合造血干细胞移植的广泛应用, T 细胞功能重建延迟成为病原体感染、aGVHD 和肿瘤复发的主要原因<sup>[6-8]</sup>。因此, 监测 allo-HSCT 后 T 细胞功能, 对感染或 aGVHD 的发生有预测和鉴别意义, 为抢先治疗、病因治疗和预防复发提供重要依据。荧光素酶法检测三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 已广泛用于实体器官移植后 T 细胞功能的检测, 但在 allo-HSCT 的适用性和敏感性不明确。本研究通过采用荧光素酶法, 检测我院 26 例接受 allo-HSCT 的患者在中性粒细胞重建后、aGVHD、感染和肿瘤复发等不同状态下外周血的 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞 ATP 水平, 比较 allo-HSCT 并发症前后 ATP 水平的变化, 并分析基础 ATP 水平对并发症的预测作用。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料

回顾性分析 2019 年 1 月—2020 年 5 月接受 allo-HSCT 的血液系统肿瘤患者, 接受 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞 ATP 水平 (ATP<sup>CD4</sup>, ATP<sup>CD8</sup>) 检测的患者为 26 例, 其中男 16 例, 女 10 例; 中位年龄 31 (17~64) 岁。主要疾病类型包括: 急性髓系白血病 11 例、急性淋巴细胞白血病 7 例、骨髓增生异常综合征 2 例、非霍奇金淋巴瘤 6 例。供者类型包括: 人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 全相合亲缘供者 8 例、HLA 半相合亲缘供者 18 例。GVHD 预防方案: HLA 全相合移植患者采用环孢霉素 (cyclosporin A, CsA) 和短疗程甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX); 单倍体移植患者应用抗胸腺细胞球蛋白 (anti-thymocyte globulin, ATG)、CsA、吗替麦考酚酯 (mycophenolate mofetil, MMF)、巴利昔单抗和短疗程 MTX。所有患者移植后均获得中性粒细胞重建, 重建的中位时间为 14 (10~31) d。所有患者在预处理期间予以抗真菌和病毒预防。另招募健康志愿者 10 例检测 T 细胞 ATP 水平, 其中男 6 例, 女 4 例; 中位年龄 43.5 (26~70) 岁。

### 1.2 诊断标准与定义

**1.2.1 中性粒细胞重建标准** 未应用粒细胞集落刺激因子的情况下中性粒细胞连续 3 d  $\geq 0.5 \times 10^9/L$ <sup>[9]</sup>。

#### 1.2.2 中性粒细胞重建后血流感染诊断标准

①体温  $>38.0^\circ\text{C}$  或  $<36.0^\circ\text{C}$ , 可伴寒战; ②血培养分离出病原微生物, 即在使用抗菌药物前, 通过中心和外周静脉同时采血完善需氧菌、厌氧菌和真菌培养<sup>[10]</sup>。

**1.2.3 肺部感染诊断标准** ①临床症状可表现为咳嗽、气促; ②影像学有新近出现的炎症病灶; ③痰培养或肺泡灌洗液等有病原学依据。

**1.2.4 aGVHD 的诊断和分度** aGVHD 指发生在移植后 100 d 内, 且主要表现为皮肤、胃肠道和肝脏 3 个器官的炎症反应; 或具备经典 aGVHD 的临床表现、但发生于 +100 d 后的 GVHD。根据 Blucksborg 法将 aGVHD 分为 I~IV 度<sup>[11-12]</sup>。

**1.2.5 肿瘤复发** 为造血干细胞移植后的疾病复发, 均以中国诊疗指南和专家共识为依据: 急性白血病完全缓解 (CR) 后外周血再次出现白血病细胞或骨髓中原始细胞  $\geq 5\%$  (除外巩固化疗后骨髓再生等其他原因) 或髓外出现白血病细胞浸润<sup>[13-14]</sup>。淋巴瘤疗效评价标准采用 2014 年 Lugano 会议修订标准<sup>[15]</sup>。

### 1.3 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 检测时间

为避免粒细胞缺乏的影响, 对所有患者在中性粒细胞重建后检测 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 作为基础水平; 在发生 aGVHD 时、aGVHD 缓解后、出现明确感染时、肿瘤复发或死亡的不同时间点, 根据患者的实际情况, 收集外周血标本进行 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 检测, 并在相应时间点, 收集患者血常规的淋巴细胞绝对值、T 细胞亚群中 Th/Ts 和 CsA 血药谷浓度。

### 1.4 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 释放试验 (荧光素酶法)

采用 CD4<sup>+</sup> T 细胞 ATP 释放试验试剂盒进行: 采集肝素钠抗凝血, 30 h 内到达实验室。每个样本设置 1 个未刺激孔和 1 个刺激孔。全血用样本稀释液 (RPMI Medium 1640 basic) 1:3 稀释, 分别加 100  $\mu\text{L}$ /孔到无菌 96 孔细胞培养板 (BIOFIL, TCP002096)。未刺激孔每孔加入样本稀释液 25  $\mu\text{L}$ , 刺激孔每孔加入刺激剂植物血凝素 (PHA-L) 25  $\mu\text{L}$ , 终浓度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。细胞培养板放置微孔板振荡器 600 r/min 振荡 2 min 后, 放入 37 $^\circ\text{C}$  恒温恒

湿培养箱(MCO-15AC)孵育 15~18 h。孵育结束取出细胞培养板,每孔加入 CD4 抗体耦合磁珠 30  $\mu$ L,移液器充分混匀后,放在微孔板振荡器 600 r/min 振荡 20 min,令 CD4 抗体磁珠与 CD4<sup>+</sup> T 细胞充分结合,从振荡器上取下细胞培养板,放在磁力架上 2 min,利用磁场将磁珠结合 CD4<sup>+</sup> T 细胞吸附在微孔一侧,移去红细胞与其他未被吸附细胞,加洗涤液洗涤 3 次,用 80  $\mu$ L 样本稀释液重悬每孔细胞。标准品梯度稀释,共 7 个浓度,每个浓度吸取 80  $\mu$ L,细胞重悬孔与标准品孔加入由反应液 I、II 和荧光素酶、底物 4 种试剂按一定比例配合成的工作液 80  $\mu$ L/孔,混匀后吸取 140  $\mu$ L 到反应微孔板(Greiner,白色),20 min 内上多功能酶标仪(Spectramax M3, Molecular Devices)读值。读值根据标准曲线换算得到每孔的浓度。CD8<sup>+</sup> T 细胞 ATP 释放试验方法同 CD4<sup>+</sup> T 细胞。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析,Graph-Pad Prism Version 8.0.2 作图。符合正态分布的计量资料以  $\bar{X} \pm S$  表示,采用 *t* 检验;计数资料以例(%)表示,采用  $\chi^2$  检验;连续变量和有序变量间的相关性分析采用 Kendall's tau-b 法。总生存(OS)采用 Kaplan-Meier 法分析和绘制,单因素生存分析采用 log-rank 检验,多因素生存分析采用 Cox 回归模型,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 中性粒细胞重建后淋系和髓系肿瘤 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup>

健康志愿者 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 的平均水平分别为 (377.50  $\pm$  74.78) ng/mL 和 (373.00  $\pm$  65.94) ng/mL,结果与 Gesundheit 等<sup>[16]</sup> 报道的健康人群 T 细胞 ATP 水平相似。患者中性粒细胞重建后基础 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 的平均水平分别为 (217.50  $\pm$  117.59) ng/mL 和 (196.23  $\pm$  117.32) ng/mL,与健康人群比较结果提示,allo-HSCT 后 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 比健康人群低 ( $P < 0.05$ )。淋系肿瘤和髓系肿瘤 ATP<sup>CD4</sup> 分别为 (205.00  $\pm$  138.95) ng/mL 和 (230.00  $\pm$  95.72) ng/mL ( $P = 0.598$ ),ATP<sup>CD8</sup> 分别为 (212.54  $\pm$  138.51) ng/mL 和 (179.92  $\pm$  94.41) ng/mL ( $P = 0.490$ )。淋系和髓系肿瘤

ATP 水平表达比较,差异无统计学意义,分布见图 1。

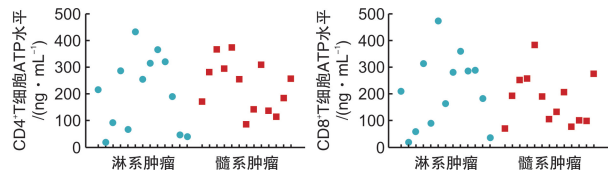


图 1 淋系和髓系肿瘤 ATP 水平分布情况

2.2 移植后 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 与 aGVHD 的关系

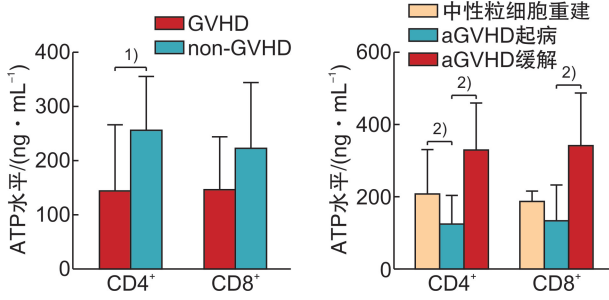
根据 aGVHD 程度把 26 例患者分为 3 组,未发生 aGVHD 有 6 例 (23.08%),发生 I~II 度 aGVHD 有 11 例 (42.31%),发生 III~IV 度严重 aGVHD 有 9 例 (34.62%)。发生 aGVHD 的中位时间为 +48 (+25~+184) d。比较 3 组患者在中性粒细胞重建时淋巴细胞绝对值、Th/Ts 和 CsA 谷浓度,结果均差异无统计学意义 ( $P = 0.820$ 、 $0.118$ 、 $0.730$ )。然而,发生 III~IV 度 aGVHD 患者的基础 ATP<sup>CD4</sup> 比轻度和未发生 GVHD 的患者明显下降 ( $P = 0.018$ ),相关性分析也提示 CD4<sup>+</sup> T 细胞 ATP 水平与 III~IV 度 GVHD 的发生存在负相关关系 ( $P = 0.029$ )。而且,aGVHD 时的 ATP<sup>CD4</sup> 比粒细胞重建时更低,差异有统计学意义,见表 1。ATP<sup>CD8</sup> 在 aGVHD 发病前后差异无统计学意义,但 aGVHD 缓解后 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 均比起病时明显回升(图 2)。淋巴细胞绝对值、Th/Ts 和 CsA 谷浓度在 aGVHD 发生前后和缓解前后均差异无统计学意义(表 1)。

2.3 移植后 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 与感染的关系

中性粒细胞重建后,14 例 (53.85%) 患者出现单一或复合感染,其中血流感染 6 例 (23.08%)、肺部感染 10 例 (38.46%),出现感染的中位时间为 +67 (+36~+218) d。感染后平均 ATP<sup>CD4</sup> 为 (105.79  $\pm$  56.39) ng/mL,比感染前明显下降 ( $P = 0.047$ );平均 ATP<sup>CD8</sup> 为 (132.00  $\pm$  82.82) ng/mL,与感染前比较,差异无统计学意义;基础 ATP 水平在 +67 d 内感染和非感染患者间差异无统计学意义(图 3)。淋巴细胞绝对值、Th/Ts 和 CsA 谷浓度在感染前后差异均无统计学意义。

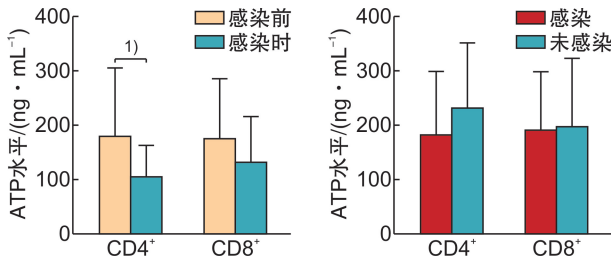
表 1 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 在中性粒细胞重建时、aGVHD 发生时和 aGVHD 缓解后的比较  $\bar{X} \pm S$

时间	ATP <sup>CD4</sup> /(ng·mL <sup>-1</sup> )	ATP <sup>CD8</sup> /(ng·mL <sup>-1</sup> )	淋巴细胞/( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	Th/Ts	CsA/(ng·mL <sup>-1</sup> )
粒细胞重建	208.85 $\pm$ 120.49	188.25 $\pm$ 26.98	1.26 $\pm$ 0.55	0.47 $\pm$ 0.20	213.84 $\pm$ 98.65
aGVHD 起病	126.05 $\pm$ 77.08	135.95 $\pm$ 95.86	1.01 $\pm$ 0.56	0.56 $\pm$ 0.24	215.22 $\pm$ 81.61
aGVHD 缓解	330.67 $\pm$ 126.30	343.33 $\pm$ 141.15	1.43 $\pm$ 0.43	0.48 $\pm$ 0.10	246.01 $\pm$ 94.11
<i>P</i>	<0.01	<0.01	0.066	0.286	0.528



与 GVHD 组比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与 aGVHD 起病时比较,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

图 2 aGVHD 发病和缓解前后 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 变化



与感染前比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

图 3 感染前后 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 变化

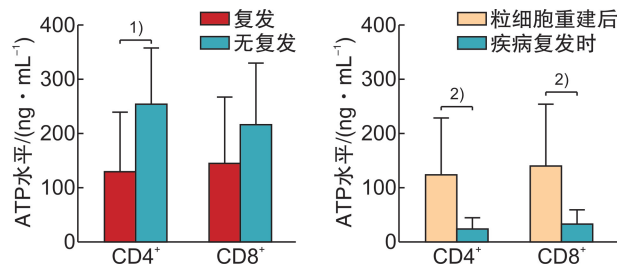
### 2.4 移植后 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 与肿瘤复发和 OS 的关系

总体中位随访时间为 31 (3~39) 个月, 8 例 (30.77%) 患者在 2 年内复发, 其中 6 例 (23.08%) 患者在 1 年内复发。复发患者基础 ATP<sup>CD4</sup> 比无复发患者明显下降 ( $P = 0.009$ )。8 例患者复发时 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 分别为  $(27.38 \pm 20.35)$  ng/mL 和  $(36.63 \pm 27.05)$  ng/mL, 均较粒细胞重建后明显下降 ( $P = 0.020, 0.025$ ) (图 4)。淋巴细胞绝对值和 Th/Ts 在复发前后差异无统计学意义。2 年内死亡患者共 8 例 (30.77%)。为进一步明确 ATP 水平与疾病复发、OS 的关系, 以基础 ATP 平均水平加减 1 个标准差为界值, 分别将 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 分成 3 个等级, 1 级: ATP<sup>CD4</sup>  $\leq 99.90$  ng/mL, ATP<sup>CD8</sup>  $\leq 78.90$  ng/mL; 2 级: ATP<sup>CD4</sup> = 99.91 ~ 335.08 ng/mL, ATP<sup>CD8</sup> = 78.91 ~ 313.54 ng/mL; 3 级: ATP<sup>CD4</sup>  $\geq 335.09$  ng/mL, ATP<sup>CD8</sup>  $\geq 313.55$  ng/mL。单因素分析显示, ATP<sup>CD4</sup> 是复发的独立影响因素 ( $P = 0.039$ )。多因素 Cox 回归分析提示, ATP<sup>CD4</sup>  $\leq 99.90$  ng/mL 是死亡的独立危险因素, ATP 水平越低, 死亡风险越高 ( $P = 0.009$ ) (图 5)。患者 ATP<sup>CD8</sup>、年龄、性别、淋巴细胞绝对值、Th/Ts 和 CsA 谷浓度与疾病结局均无显著相关性。

### 3 讨论

Allo-HSCT 后患者因高强度预处理化疗引起粒细胞缺乏、黏膜屏障损伤和骨髓造血重建延迟等原因, 即使患者已获得造血重建, 在化疗损伤和免

疫抑制剂共同作用下, 体液免疫和细胞免疫功能仍极度低下, 血流感染发生率为 11.6% ~ 61.98%<sup>[17-18]</sup>。感染又是诱发 aGVHD 的主要因素, aGVHD 可通过限制 T 细胞的发育和细胞因子风暴等抑制 T 细胞的功能, 不仅再次加重感染, GVHD 过度治疗还明显削弱移植物抗白血病 (graft-versus-leukemia, GVL) 效应, 增加肿瘤复发率<sup>[12, 19]</sup>。供者 T 细胞为主导的免疫重建和平衡是打破该恶性循环的关键, 准确判断 T 细胞功能是并发症预防和治疗的关键。然而, 目前缺乏对 T 细胞功能检测的可靠方法。因此, 本研究通过荧光素酶法检测刺激前后 T 细胞内 ATP 水平, 分析其对 aGVHD、感染以及肿瘤复发的预测意义。



复发组比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与粒细胞重建后比较,<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

图 4 疾病复发与 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 的关系

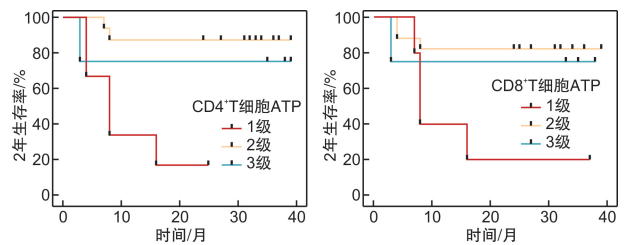


图 5 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 对 2 年 OS 的影响

临床上常通过淋巴细胞计数、T 细胞亚群分析、环孢素的血药浓度以及细胞因子水平, 间接判断 T 细胞功能, 但细胞数目与功能、钙调磷酸酶抑制剂的浓度和细胞功能受抑程度均无明显相关性<sup>[20]</sup>。在本研究中, 患者淋巴细胞计数、T 细胞亚群分布和环孢素浓度均与 aGVHD、感染或肿瘤复发无关。细胞因子的释放是 aGVHD 发病机制中供者 T 细胞的效应阶段, 在 aGVHD 发病前或早期阶段, 细胞因子的水平并未明显升高。其次, 部分细胞因子的作用具有两面性, 如  $\lambda$  干扰素既能反映 aGVHD, 又反映 GVL 和抗感染效应<sup>[21-22]</sup>, 不能作为鉴别感染、GVHD 和 GVL 的预测指标。荧光素酶法通过检测 T 细胞活化过程经糖代谢产生的 ATP 水平, 判断 T 细胞的活化状态, 已广泛应用于预测实体器官移植后的 T 细胞功能, 以指导免疫

抑制剂的使用<sup>[23-27]</sup>。Moon 等<sup>[24]</sup> 和 Ravaioli 等<sup>[28]</sup> 分别报道肾移植和肝移植后感染患者的 ATP<sup>CD4</sup> 比无感染者明显下降。Berglund 等<sup>[29]</sup> 指出,肝移植后排斥反应与高 ATP<sup>CD4</sup> 有关,而低 ATP<sup>CD4</sup> 则与过度免疫抑制和早期死亡相关。然而,有大样本研究认为 ATP<sup>CD4</sup> 对感染和排斥无预测意义,也无 ATP<sup>CD8</sup> 的检测的相关报道<sup>[30]</sup>。荧光素酶法在 allo-HSCT 的应用和报道更少,而且实体器官移植和 allo-HSCT 所引起的免疫排斥本质不同,前者无宿主免疫细胞清除和供者免疫细胞重建的过程。Allo-HSCT 后免疫重建需 1 年以上,其中 CD8<sup>+</sup> T 细胞重建在 +100 d 左右,CD4<sup>+</sup> T 细胞则在 +3~+6 个月后<sup>[7]</sup>。本研究 allo-HSCT 后患者的 ATP 基础水平比健康人群明显下降,与 allo-HSCT 后早期 T 细胞功能未重建相符合。在发生感染时,ATP<sup>CD4</sup> 明显下降,与部分实体器官移植后的结果一致,但基础 ATP 水平与中位感染时间内的感染发生率无相关性,不管 ATP<sup>CD4</sup> 还是 ATP<sup>CD8</sup> 都不能预测近期感染的发生。关于 ATP 水平与 GVHD 的关系,目前有限的报道结果不一致。Israeli 等<sup>[31]</sup> 指出,aGVHD 患者 ATP<sup>CD4</sup> 比免疫状态稳定的患者明显升高。Gesundheit 等<sup>[16]</sup> 监测 40 例 allo-HSCT 患者移植后 ATP<sup>CD4</sup> 的变化,发现移植后的前 2 个月大部分患者的 ATP<sup>CD4</sup> 均为低水平,2 个月后低 ATP<sup>CD4</sup> 与反复感染和疾病复发明显相关,但与急慢性 GVHD 无关。本研究中,发生 GVHD 时的 ATP 水平并无升高,而是明显下降;在 GVHD 缓解后 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 均有明显恢复。而且,低基础 ATP<sup>CD4</sup> 是 III~IV 度严重 GVHD 的危险因素。众所周知,辅助性 T 细胞尤其调节性 T 细胞的重建在减轻 aGVHD 和保留 GVL 中起了重要作用<sup>[7,32]</sup>,本研究结果也从 T 细胞功能方面证实缓慢 T 细胞重建与严重 GVHD 密切相关。

Gesundheit 等<sup>[16]</sup> 对 allo-HSCT 患者移植后 ATP<sup>CD4</sup> 的研究还指出,+7 个月后 ATP<sup>CD4</sup> 恢复正常水平的患者 1 年 OS 率为 83%;而 ATP<sup>CD4</sup> 明显下降的患者 1 年 OS 率只有 12%。不管实体器官移植还是 allo-HSCT,低水平 ATP 都与疾病不良预后相关。本研究不仅提示复发时 ATP<sup>CD4</sup> 和 ATP<sup>CD8</sup> 均处于极度下降状态,还提示基础 ATP<sup>CD4</sup> ≤ 99.90 ng/mL 是死亡的独立危险因素,可用于疾病预后的预测指标。目前极少关于 ATP<sup>CD8</sup> 的报道,CD8<sup>+</sup> T 细胞作为杀伤性 T 细胞,本研究结果却未发现 ATP<sup>CD8</sup> 对 GVHD、感染及复发的预测意义,这可能与 CD8<sup>+</sup> T 细胞的瞬时效应机制相关。CD8<sup>+</sup> T 细胞识别 MHC-I 类分子后,在活化 CD4<sup>+</sup> T 细胞的协同作用下增殖分化为杀伤性 T 细胞,通过穿孔素、颗粒酶 B 以及 Fas/FasL 等方式直接杀伤靶细胞<sup>[8-9,33]</sup>,因此,ATP<sup>CD8</sup> 可能仅在

CD8<sup>+</sup> T 细胞活化行使效应时才会出现明显变化。

综上所述,荧光素酶法-ATP<sup>CD4</sup> 可作为 III~IV 度严重 GVHD 和疾病复发及不良预后的预测指标,但还需要更有针对性的 T 细胞体外刺激方法、更大样本量的研究,以及更长时间的动态观察才能验证。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Iftikhar R, Chaudhry Q, Anwer F, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in aplastic anemia: current indications and transplant strategies [J]. *Blood Rev*, 2021, 47: 100772.
- [2] Barriga F, Ramírez P, Wietstruck A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation: clinical use and perspectives [J]. *Biol Res*, 2012, 45(3): 307-316.
- [3] Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, et al. Graft-versus-host disease [J]. *Lancet*, 2009, 373(9674): 1550-1561.
- [4] Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(6): 443-458.
- [5] 李娜, 周阳, 赵晨, 等. 单倍型造血干细胞移植与同胞相合造血干细胞移植治疗慢性粒-单核细胞白血病的疗效比较 [J]. *临床血液学杂志*, 2022, 35(5): 323-327.
- [6] Di Bartolomeo P, Santarone S, De Angelis G, et al. Haploidentical, unmanipulated, G-CSF-primed bone marrow transplantation for patients with high-risk hematologic malignancies [J]. *Blood*, 2013, 121(5): 849-857.
- [7] Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, et al. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 507.
- [8] Velardi E, Tsai JJ, van den Brink M. T cell regeneration after immunological injury [J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(5): 277-291.
- [9] Gordon MY, Blackett NM. Reconstruction of the hematopoietic system after stem cell transplantation [J]. *Cell Transplant*, 1998, 7(4): 339-344.
- [10] 中华医学会血液学分会, 中国医师协会血液科医师分会. 中国中性粒细胞缺乏伴发热患者抗菌药物临床应用指南(2020 年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2020, 41(12): 969-978.
- [11] Rowlings PA, Przepiorcka D, Klein JP, et al. IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade [J]. *Br J Haematol*, 1997, 97(4): 855-864.
- [12] Schoemans HM, Lee SJ, Ferrara JL, et al. EBMT-NIH-CIBMTR Task Force position statement on standardized terminology & guidance for graft-versus-host disease assessment [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2018, 53(11): 1401-1415.
- [13] 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 中国成人

- 急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)诊疗指南(2021年版)[J]. 中华血液学杂志, 2021, 42(8): 617-623.
- [14] 中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会, 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 中国成人急性淋巴细胞白血病诊断与治疗指南(2021年版)[J]. 中华血液学杂志, 2021, 42(9): 705-716.
- [15] Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(27): 3059-3068.
- [16] Gesundheit B, Budowski E, Israeli M, et al. Assessment of CD4 T-lymphocyte reactivity by the Cylex ImmuKnow assay in patients following allogeneic hematopoietic SCT [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2010, 45(3): 527-533.
- [17] Lee LE, Barsoumian AE, Brown AW, et al. Rates of Microbiologically Diagnosed Infection and Pathogen Detection in Hematopoietic Stem Cell Transplant Patients[J]. *Mil Med*, 2016, 181(11): e1685-e1691.
- [18] Omrani AS, Almaghrabi RS. Complications of hematopoietic stem cell transplantation: Bacterial infections [J]. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 2017, 10(4): 228-232.
- [19] 杨飞燕, 谢春红, 陈磊, 等. 芦可替尼治疗激素难治性移植抗宿主病有效性和安全性的 meta 分析[J]. 临床血液学杂志, 2022, 35(5): 369-374.
- [20] Barten MJ, Tarnok A, Garbade J, et al. Pharmacodynamics of T-cell function for monitoring immunosuppression[J]. *Cell Prolif*, 2007, 40(1): 50-63.
- [21] Robb RJ, Kreijveld E, Kuns RD, et al. Type I-IFNs control GVHD and GVL responses after transplantation[J]. *Blood*, 2011, 118(12): 3399-409.
- [22] Pirogova OV, Moiseev IS, Surkova EA, et al. Profiles of pro-inflammatory cytokines in allogeneic stem cell transplantation with post-transplant cyclophosphamide[J]. *Cytokine*, 2017, 99: 148-153.
- [23] Bhorade SM, Janata K, Vigneswaran WT, et al. Cylex ImmuKnow assay levels are lower in lung transplant recipients with infection [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2008, 27(9): 990-994.
- [24] Moon HH, Kim TS, Roh YN, et al. Can immune function assay predict infection or recovery? [J]. *Transplant Proc*, 2012, 44(4): 1048-1051.
- [25] Moon HH, Kim TS, Lee S, et al. Serial ImmuKnow assay in stable kidney transplant recipients [J]. *Cent Eur J Immunol*, 2014, 39(1): 96-99.
- [26] Piloni D, Magni S, Oggionni T, et al. Clinical utility of CD4<sup>+</sup> function assessment (ViraCor-IBT ImmuKnow test) in lung recipients [J]. *Transpl Immunol*, 2016, 37: 35-39.
- [27] Weston MW, Rinde-Hoffman D, Lopez-Cepero M. Monitoring cell-mediated immunity during immunosuppression reduction in heart transplant recipients with severe systemic infections [J]. *Clin Transplant*, 2020, 34(3): e13809.
- [28] Ravaioli M, Neri F, Lazzarotto T, et al. Immunosuppression Modifications Based on an Immune Response Assay: Results of a Randomized, Controlled Trial [J]. *Transplantation*, 2015, 99(8): 1625-1632.
- [29] Berglund D, Bengtsson M, Biglarnia A, et al. Screening of mortality in transplant patients using an assay for immune function [J]. *Transpl Immunol*, 2011, 24(4): 246-250.
- [30] Huskey J, Gralla J, Wiseman AC. Single time point immune function assay (ImmuKnow) testing does not aid in the prediction of future opportunistic infections or acute rejection [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2011, 6(2): 423-429.
- [31] Israeli M, Klein T, Herscovici C, et al. Cellular immune function monitoring after allogeneic haematopoietic cell transplantation: evaluation of a new assay [J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 172(3): 475-482.
- [32] Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, et al. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation [J]. *Nat Med*, 2003, 9(9): 1144-1150.
- [33] Mehrotra A, Leventhal J, Purroy C, et al. Monitoring T cell alloreactivity [J]. *Transplant Rev (Orlando)*, 2015, 29(2): 53-59.

(收稿日期: 2022-07-20)

(本文编辑: 阮方)