

• 论 著 •

外周血 NK 细胞亚群检测在恶性血液病患者中的应用研究

李 莉,任 娟,郭 峰,汤和平,周 丽

(四川省攀枝花市中西医结合医院检验科,四川攀枝花 617000)

摘 要:目的 探讨外周血自然杀伤细胞(NK)亚群检测在恶性血液病患者中的应用价值。**方法** 选择 2014 年 3 月至 2016 年 4 月于该院接受治疗的 100 例恶性血液病患者作为观察组,其中急性期 50 例,平缓期 50 例,并在同一时段内选择 100 例体检健康者作为对照组,比较各组间外周血 NK 细胞数及亚群的变化。**结果** 急性期白血病及淋巴瘤患者 NK 细胞绝对数及相对数均远低于对照组,而平缓期白血病及淋巴瘤 NK 细胞绝对数及相对数高于急性期,差异具有统计学意义($P<0.05$)。治疗后,白血病及淋巴瘤患者 NK 细胞绝对数及相对数均高于治疗前,差异具有统计学意义($P<0.05$)。治疗前,白血病及淋巴瘤患者 CD56^{bright} 及 CD56^{dim} 水平与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$);治疗后,两类患者 CD56^{bright} 及 CD56^{dim} 水平明显改善,治疗前比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 恶性血液病患者外周血 NK 细胞数量降低,细胞功能受损。NK 细胞亚群检测在评价恶性血液病患者预后及疗效方面有一定的指导意义。

关键词: NK 细胞亚群; 白血病; 淋巴瘤; 免疫功能; 恶性血液病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.12.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)12-1622-03

Detection of peripheral blood NK cell subsets in patients with malignant hematological diseases

LI Li, REN Juan, GUO Feng, TANG Heping, ZHOU Li

(Department of Clinical Laboratory, Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Panzhihua, Sichuan 617000, China)

Abstract: **Objective** To study the clinical value of detection of peripheral blood natural killer(NK) cells subsets in patients with malignant hematological diseases. **Methods** A total of 100 patients with malignant blood disease were enrolled from March 2014 to April 2016 as the observation group, including 50 cases in acute stage and 50 cases in mild stage. At the same time, 100 health subjects were enrolled as the control group. The number of NK cells in peripheral blood and the changes of subgroups were compared. **Results** The number of NK cells in the different groups were compared, the absolute numbers and relative numbers of NK cells in the acute phase of leukemia and lymphoma were much lower than those in the control group($P<0.05$). While the absolute number and relative number of NK cells in mild stage of leukemia and lymphoma were higher than that in acute phase($P<0.05$). After treatment, the absolute number and relative number of NK cells in patients with leukemia and lymphoma were higher than before treatment($P<0.05$). Before treatment, levels of CD56^{bright} and CD56^{dim} in patients with leukemia and lymphoma were statistically different with those of control group($P<0.05$). After treatment, CD56^{bright} and CD56^{dim} levels were significantly improved in both groups($P<0.05$). **Conclusion** The number of peripheral blood NK cells in patients with hematological malignancies could be reduced, and the cells function might be compromised. Detection of NK cell subsets could be with guiding significance in the treatment of malignant hematologic disease.

Key words: NK cell subsets; leukemia; lymphoma; immune function; malignant hematological diseases

骨髓造血细胞未遵循正常的分化与增值规律,从而导致造血细胞克隆型增加异常,同时浸润其他体内器官是恶性血液病的重要诱因^[1]。它不断破坏人体的免疫系统,使血液循环发生病变时不能及时做出反应^[2]。自然杀伤细胞(NK)作为人体免疫系统的重要组成部分,在治疗恶性血液病的过程中发挥了至关重要的作用^[3-4]。CD56^{bright} 和 CD56^{dim} 作为 CD56 抗原表达的两类亚群,其中 CD56^{bright} 占 NK 细胞的 20% 左右,其主要作为产生具有免疫调节作用的细胞因子,同时可以分化为 CD56^{dim}; CD56^{dim} 约占 NK 细胞的 80%,其主要作用为溶解抗体依赖的靶细胞^[5]。此次研究,旨在通过回顾性分析,探讨外周血 NK 细胞亚群检测在恶性血液病患中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 3 月至 2016 年 4 月于本院接受

治疗的 100 例恶性血液病患者作为观察组,男 44 例,女 56 例,年龄 16~70 岁,平均年龄(48.47±5.44)岁;急性期 48 例,平缓期 52 例。纳入标准:(1)符合《血液病诊断及疗效标准》拟定的恶性血液病诊断标准^[6]; (2)治疗过程资料完整。排除标准:(1)合并人类免疫缺陷病毒(HIV)、丙型肝炎病毒(HCV)及乙型肝炎病毒(HBV)感染;(2)合并心肺功能损伤;(3)合并精神及神经系统疾病。100 例恶性血液病患者分为白血病组(50 例)及淋巴瘤组(50 例),白血病组包括急性髓细胞白血病(AML)12 例,急淋巴细胞白血病(ALL)11 例,平缓期髓细胞白血病(CML)16 例,平缓期淋巴细胞白血病(CLL)11 例;淋巴瘤组包括急性弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 12 例,急性 T 细胞淋巴瘤 13 例,平缓期弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 11 例,平缓期 T 细胞淋巴瘤 14 例。平缓期患者经过 4 次及其以上化疗,身体健康

水平及生活质量有明显改善。同期于本院体检健康者 100 例纳入对照组,其中男 51 例,女 49 例,年龄 26~60 岁,平均年龄(42.17±4.24)岁。各组别研究对象性别构成及年龄比较差异无统计学意义($P<0.05$)。本研究经医院伦理委员会审查通过。所有研究对象自愿参加本次研究。

1.2 方法 (1)NK 细胞绝对数计数:所有研究对象均在空腹状态下采集静脉血 5 mL,乙二胺四乙酸二钾抗凝;向 100 μ L 抗凝血中分别加入 20 μ L 异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE)标记的抗 CD3/CD16+56 抗体(抗 CD3-FITC/CD16+56-PE 抗体)、多甲藻黄素叶绿素蛋白(PerCP)标记的抗 CD45 抗体(抗 CD45-PerCP 抗体),混匀后室温、避光静置 20 min,加入 1 mL 红细胞裂解液,避光静置 10 min,采用流式细胞仪计数 NK 细胞绝对数。(2)NK 细胞相对数计算:采用 NK 细胞绝对数计数相同的方法采集、处理标本,避光静置 10 min,加入 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS),离心 5 min,弃上清,加入 PBS 2 mL,离心 5 min,弃上清,加入 PBS 0.5 mL,采用流式细胞仪计数并计算 NK 细胞相对数;(3)NK 细胞亚群计数:向 100 μ L 抗凝血中分别加入 10 μ L 抗 CD16+56-PE 抗体、藻红蓝蛋白(PEC)标记的抗 CD314 抗体(抗 CD314-PEC 抗体),避光静置 20 min,采用与 NK 细胞相对数计数相同的方法计数 NK 细胞亚群。

1.3 统计学处理 数据用 SPSS18.0 软件进行处理和分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较并采用 t 检验。 $P<0.05$ 表

示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同组间 NK 细胞数的比较 观察组 NK 细胞绝对数及相对数均低于对照组,其中急性期白血病及淋巴瘤患者 NK 细胞绝对数及相对数低于平缓期患者,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 不同组间 NK 细胞数的比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	NK 细胞绝对数 (个/微升)	NK 细胞 相对数(%)
对照组	100	413.35±165.44	13.51±2.67
观察组			
急性期白血病	21	96.84±25.27 [*]	6.92±0.65 [*]
急性期淋巴瘤	27	103.18±24.36 [*]	7.64±1.17 [*]
平缓期白血病	29	285.92±96.75 ^{*△}	10.11±1.82 ^{*△}
平缓期淋巴瘤	23	291.47±106.19 ^{*▲}	10.99±1.74 ^{*▲}

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与急性期白血病组比较,[△] $P<0.05$;与急性期淋巴瘤组比较,[▲] $P<0.05$ 。

2.2 治疗前后白血病及淋巴瘤患者 NK 细胞数比较 治疗后,白血病组及淋巴瘤组 NK 细胞绝对数和 NK 细胞相对数均明显高于治疗前,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 治疗前后白血病及淋巴瘤患者 NK 细胞数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	治疗前		治疗后	
		NK 细胞绝对数(个/微升)	NK 细胞相对数(%)	NK 细胞绝对数(个/微升)	NK 细胞相对数(%)
白血病组	50	92.46±22.64	6.47±0.82	285.92±96.75 [#]	10.11±1.82 [*]
淋巴瘤组	50	101.58±21.73	7.21±1.03	291.47±106.19 [#]	10.99±1.74 [*]

注:与治疗前 NK 细胞绝对数比较,[#] $P<0.05$;与治疗前 NK 细胞相对数比较,^{*} $P<0.05$ 。

2.3 不同组间治疗前后外周血 NK 细胞亚群计数比较 观察组患者治疗前 CD56^{bright} 水平高于对照组,而 CD56^{dim} 水平低于对照组;与治疗前比较,白血病与淋巴瘤患者治疗后 CD56^{bright} 水平降低,CD56^{dim} 水平明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 3 不同组间治疗前后外周血 NK 细胞亚群计数比较($\bar{x}\pm s$,%)

组别	<i>n</i>	亚群	治疗前	治疗后
对照组	100	CD56 ^{bright}	24.79±5.03 [△]	—
		CD56 ^{dim}	73.64±4.76 [△]	—
白血病组	50	CD56 ^{bright}	67.82±13.06 [*]	22.90±4.58 [#]
		CD56 ^{dim}	28.39±14.18 [*]	65.45±17.91 ^{*#}
淋巴瘤组	50	CD56 ^{bright}	71.37±15.05 [*]	25.13±4.69 [#]
		CD56 ^{dim}	25.75±15.84 [*]	61.53±16.82 ^{*#}

注:与对照组相同亚群计数结果比较,^{*} $P<0.05$;与组内治疗前相同亚群计数结果比较,[#] $P<0.05$;△对照组数据为体检时检测结果;—表示无数据。

3 讨 论

NK 细胞作为人体免疫系统的重要组成部分,一直在恶性

血液病的治疗中扮演着重要角色,它占据了外周血单个核细胞的 10%~20%^[7-8]。NK 细胞主要通过监视细胞表面人类白细胞抗原(HLA)-I 类分子的表达在抗肿瘤的过程中为身体的第一道防线^[9]。有学者指出,NK 细胞监测包括了细胞的异常变化,细胞活化后分泌穿孔素、硫酸软骨素蛋白聚糖和丝氨酸蛋白酶等,同时还可以分解及破坏靶细胞细胞膜^[10-11]。在甄祯等^[12]研究中曾提出,细胞免疫作为人体特异性免疫组成的一部分,恶性血液病体内 NK 细胞的减少和功能的下降,使患者的抗肿瘤能力弱化,进而导致恶性肿瘤细胞不断繁殖发育。

NK 细胞广布于外周血中,这使得它对血液系统疾病的控制有十分明显的优势^[13]。众多研究证明了,NK 细胞比例的降低及功能的下降均标志着恶性血液病患者的病情不断在恶化^[14]。比如子宫癌、胰腺癌等恶性肿瘤患者在治疗前外周血 NK 细胞数及细胞功能明显低于健康人的水平,王志华^[15] 报道 NK 细胞是机体免疫系统中的天然屏障,它通过直接分泌细胞毒因子从而杀死肿瘤细胞,而 NK 细胞的数量下降就是肿瘤不断恶化的重要原因。在本研究中,急性期白血病及淋巴瘤患者的外周血内 NK 细胞绝对数及相对数远远低于对照组,而经过 4 次及以上全面化疗的平缓期白血病及淋巴瘤患者的

NK 细胞绝对数和相对数比较治疗前得到了明显的提升,十分接近对照组所代表的正常水平。这表示 NK 细胞数的下降提醒着恶性血液病患者免疫功能正不断遭受破坏,而肿瘤细胞躲过了 NK 细胞的监测且不断繁殖扩散;而平缓期的患者在经过 4 次及其以上化疗后,NK 细胞数除不断恢复外,其细胞功能也不断地恢复,也促使人体免疫系统的不断地得到重建。也有学者指出,在治疗过程中可能会出现 NK 细胞数下降的情况,这可能是由于在治疗过程中,破坏肿瘤细胞的过程中会消耗 NK 细胞所导致^[9]。

在过往的研究中,同时证明了恶性血液病不断会降低 NK 细胞数,也会导致 NK 细胞亚群分布产生巨大的变化^[3-4]。NK 细胞整体性的表面标记是 CD56,依据其强弱则分为 CD56^{bright}和 CD56^{dim}两个亚群,其中 CD56^{bright}占 NK 细胞的 20%左右,而 CD56^{dim}则占 NK 细胞的 80%左右,并具有很大的细胞毒性作用。临床试验指出,健康人的 NK 细胞表面受体 NKG2D 的表达水平高于 CD56^{bright},同时 NKG2D 与肿瘤细胞表面的特异性分子配对,并刺激 NK 细胞繁殖,所以 CD56^{bright}细胞毒性是弱于 CD56^{dim}的^[16]。当 CD56^{dim}比例下降,同时 CD56^{bright}上升明显,则说明了机体的免疫系统遭到破坏。在本研究中可以得知,治疗前白血病和淋巴肿瘤患者外周血的 CD56^{bright}水平远高于对照组,而 CD56^{dim}水平又远低于对照组;而经过全面化疗后的平缓期患者,CD56^{bright}则明显低于治疗前,CD56^{dim}明显高于治疗前,且两组数据都更趋近与正常水平。这说明了恶性血液病患者体内 NK 细胞不单单只是数量上的减少,另一方面也证明了细胞功能也会同时下降。

综上所述,NK 细胞数量以及 NK 细胞亚群变化可以判断出恶性血液病患者病情的发展状况,通过对 NK 细胞亚群的检测,可以在恶性血液病的临床诊断中提供可靠的信息,方便医生在临床治疗的过程中更加准确的制定治疗方式,值得应用推广。

参考文献

[1] 罗洪强,傅佳萍,蒋景华. 恶性血液病患者医院感染危险因素及预防控制研究[J]. 中华感染学杂志,2014,24(5): 1171-1173.

[2] 敬雪明,李铃,敬雨佳,等. 恶性血液病化学药物治疗后粒细胞缺乏症并发医院感染的相关性研究[J]. 重庆医学, 2016,45(7):957-961.

[3] 郑淑霞,谢若腾,官瑞婷,等. 恶性血液病患者外周血 NK 细胞数量变化及意义[J]. 中国实验血液学杂志,2015,23 (4):1133-1137.

[4] Fruehauf S,Otremba B,Sttzer O,et al. Compatibility of biosimilar filgrastim with cytotoxic chemotherapy during

the treatment of malignant diseases(Venice): a prospec-
tive, multicenter, non-interventional, longitudinal study
[J]. Adv Ther,2016,33(11):1983-2000.

[5] 李倩,李劲高,周茂华,等. 白血病细胞 CD56 抗原表达与急性髓系白血病患者预后的关系[J]. 吉林大学学报(医学版),2016,42(2):283-289.

[6] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科
学出版社,2007.

[7] 周智锋,李洁羽,陈明水,等. 细胞因子组合体外扩增人
NK 细胞的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志,2014,21(3):
193-197.

[8] Geng L,Li X,Zhou X,et al. WP1066 exhibits antitumor
efficacy in nasal type natural killer T-cell lymphoma cells
through downregulation of the STAT3 signaling pathway
[J]. Oncol Rep,2016,36(5):2868-2874.

[9] 赵平森,钟志雄,翁锐强. NK 细胞在肿瘤过继性免疫治疗
中的临床应用与研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志,2016,
23(7):471-478.

[10] 魏海明,田志刚. NK 细胞的发育分化与功能极化[J]. 中
国免疫学杂志,2014,30(1):14-17.

[11] Kim WY,Jung HY,Nam SJ,et al. Expression of pro-
grammed cell death ligand 1(PD-L1) in advanced stage
EBV-associated extranodal NK/T cell lymphoma is asso-
ciated with better prognosis[J]. Virchows Archiv,2016,
469(5):581-590.

[12] 甄祯,叶芳,李国霞,等. 恶性血液病患者 T 淋巴细胞亚群
的检测分析[J]. 中国当代医药,2014,21(9):101-102.

[13] 李玉华,陈颖,孟丽丽,等. 不明原因复发性自然流产患者
外周血 NK 细胞与蜕膜 NK 细胞检测价值分析[J]. 中国
妇产科临床杂志,2015,16(1):51-54.

[14] 田国燕,顾磊,封爱英. 益血生胶囊治疗恶性血液病化疗
后骨髓抑制的疗效观察[J]. 中华中医药学刊,2016,34
(2):505-507.

[15] 王志华. NK 细胞抗肿瘤临床转化研究进展[J]. 中国肿瘤
生物治疗杂志,2016,23(3):419-426.

[16] Pierorazio PM,Patel HD,Johnson MH,et al. Distinguis-
hing malignant and benign renal masses with composite
models and nomograms:A systematic review and meta-a-
nalysis of clinically localized renal masses suspicious for
malignancy[J]. Cancer,2016,122(21):3267-3276.

(收稿日期:2017-02-11 修回日期:2017-04-11)

(上接第 1621 页)

医学与临床,2016,13(12):1665-1666.

[12] 赵鹤进. 呼吸道九联检的临床意义[J]. 临床合理用药杂
志,2014,7(22):148-149.

[13] 夏丽君,巫雯嘉,杨瑾. 9 种呼吸道病原体 IgM 抗体联合
检测的临床意义[J]. 中国实验诊断学,2016,20(9):1477-
1479.

[14] 莫伟平,张泳仪. 13240 例呼吸道感染患者 9 种呼吸道感
染病原体 IgM 抗体检测结果分析[J]. 国际检验医学杂
志,2015,36(17):2577-2579.

[15] 戴娟. 柳州地区患儿 9 种呼吸道非典型病原体感染的检
测结果分析[J]. 医药卫生,2015,1(6):208-209.

(收稿日期:2017-02-12 修回日期:2017-04-17)