

• 论 著 •

检测外周血 T 淋巴细胞亚群、Th17 和 Treg 细胞在初诊多发性骨髓瘤患者中的临床意义研究^{*}

程 虹, 乔文斌, 黄艳春[△]

(新疆医科大学附属肿瘤医院检验科, 乌鲁木齐 830011)

摘 要:目的 探讨初诊多发性骨髓瘤(MM)患者外周血中 T 淋巴细胞亚群表达特点, 以及辅助性 T 细胞 17(Th17)和 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞(Treg 细胞)比率的平衡关系, 分析其在 MM 发病中的临床意义。方法 检测 30 例初诊的 MM 患者(病例组)及 20 例健康志愿者(对照组)外周血中总 T 细胞(CD3⁺)、辅助性 T 细胞/诱导 T 细胞(CD3⁺CD4⁺)、抑制性 T 细胞/细胞毒性 T 细胞(CD3⁺CD8⁺)、(CD3⁺CD4⁺)/(CD3⁺CD8⁺)的比值; 以及 Th17 和 Treg 细胞各占的比率、Th17 细胞/Treg 比值, 比较分析 MM 患者与对照组的差异。结果 与对照组相比, 病例组患者的抑制性 T 细胞/细胞毒性 T 细胞(CD3⁺CD8⁺)比例较对照组升高, 差异有统计学意义($P<0.05$); 病例组患者的(CD3⁺CD4⁺)/(CD3⁺CD8⁺)比值较对照组降低, 差异有统计学意义($P<0.05$); 病例组患者外周血 Th17 细胞的比率为(5.9±1.9)%, 与对照组(4.0±0.9)%相比增高, 差异有统计学意义($P<0.05$); 病例组 Treg 细胞比率为(1.2±0.3)%, 与对照组(2.1±0.4)%相比, 比值降低, 差异有统计学意义($P<0.05$); 病例组 Th17/Treg 细胞比值较对照组明显增高, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 MM 患者体内存在外周血 T 细胞亚群的紊乱, Th17 细胞比率升高和 Treg 细胞比率降低所致的 Th17/Treg 细胞比例失衡, 该免疫失衡可能在 MM 的发生、发展中发挥一定作用, 并对预后的判断有一定的指导价值。

关键词: 多发性骨髓瘤; T 淋巴细胞亚群; Th17 细胞; Treg 细胞; Th17/Treg 细胞比例

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.24.016

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)24-3401-04

The clinical significance of detection of peripheral blood T lymphocyte subsets, Th17 and Treg cells in patients with early diagnosis of multiple myeloma^{*}

CHENG Hong, QIAO Wenbin, HUANG Yanchun[△]

(Clinical Laboratory, Cancer Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi, Xijiang 830011, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression characteristics of T lymphocyte subsets in peripheral blood of patients with newly diagnosed multiple myeloma(MM), as well as the equilibrium relationship between the ratio of helper T cells 17(Th17) and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells(Treg cells), and analyze their clinical significance in the pathogenesis of MM. **Methods** The proportion of CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ cells, Th17 cells, Treg cells in peripheral blood and the ratios of CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺, Th17/Treg were analyzed between the 30 patients with MM in newly diagnosed and 20 healthy volunteers(control group), then analysis the differences between MM patients and control group. In 30 cases of newly diagnosed MM patients(patient group) and 20 healthy volunteers(control group), total T cells in peripheral blood(CD3⁺), auxiliary T cells / induced T cells(CD3⁺CD4⁺), the inhibitory T cell / cytotoxic T cells(CD3⁺CD8⁺), the ratio of(CD3⁺CD4⁺)/(CD3⁺CD8⁺), the percentages of Th17 cells and Treg cell and the ratio of Th17 and Treg were detected, and the differences between MM patients and control group were compared. **Results** The ratio of inhibition/cytotoxic T cells(CD3⁺CD8⁺) in the patient group was higher than that in the control group($P<0.05$). (CD3⁺CD4⁺)/(CD3⁺CD8⁺) ratio in the patient group was lower than that in the control group($P<0.05$); in the patient group, the ratio of Th17 cells in peripheral blood of patients was(5.9±1.9)%, which was increased compared with the control group (4.0±0.9)% ($P<0.05$); the ratio of Treg cells in the patient group was(1.2±0.3)%, which was decreased compared with the control group(2.1±0.4%) ($P<0.05$); and the ratio of Th17/Treg cells was significantly higher in the patient group, and the difference was statistically significant($P<0.05$). **Conclusion** Peripheral blood T cell subsets disorder exists in patients with MM, Th17/Treg cell imbalance caused by the increase of Th17 cell ratio and the decrease of the ratio of Treg cells, and the imbalance of immune system may play a role in the occurrence and development of MM, and has some guiding value for the prognosis.

Key words: multiple myeloma; T lymphocyte subsets; Th17 cells; Treg cells; Th17/Treg cells ratio

多发性骨髓瘤(MM)是骨髓浆细胞恶性克隆性增殖疾病, 临床上以血清、尿液中出现单克隆免疫球蛋白或其成分(M蛋

白), 以及广泛的溶骨病变和(或)肾功能损害为特征。资料显示骨髓微环境中细胞因子的变化、重要膜受体的改变、肿瘤细

^{*} 基金项目: 新疆医科大学创新基金项目(XYDCX201543)。

作者简介: 程虹, 女, 主管技师, 主要从事血液病实验室诊断方向研究。 [△] 通信作者, E-mail: 1105598881@qq.com。

胞前体细胞中癌基因突变,以及多种机制的相互协同作用是该病发生的重要因素^[1]。辅助性 T 细胞 17(Th17)通过其分泌的细胞因子(主要是 IL-17)促进中性粒细胞的动员、募集和活化,促进炎症反应,在感染性疾病、自身免疫性疾病,以及肿瘤的发生、发展中起到重要作用。与此相反,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg)的免疫抑制作用表现为抑制效应 T 细胞,抑制炎症反应,以及维持自身免疫耐受^[2]。有研究表明 Th17、Treg 细胞,以及二者比例失衡在自身免疫性疾病及肿瘤发生机制中有重要作用^[3-6]。本文拟检测初诊 MM 患者外周血中 Th17、Treg 细胞的水平,计算 Th17/Treg 细胞的比值,探讨 Th17、Treg 细胞在 MM 发生、发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取新疆医科大学附属肿瘤医院 2015 年 12 月至 2017 年 3 月收治的初诊 MM 患者(30 例)作为病例组,其中男 17 例,女 13 例,发病中位年龄 58.0 岁,平均(57.9±10.9)岁。另选取 20 名健康体检者为正常对照组,男 10 名,女 10 名,中位年龄 55.5 岁,平均(58.4±14.5)岁。2 组研究对象一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。所有入组患者均签署知情同意书。

1.2 纳入与排除标准 纳入标准:所有入组病例完成骨髓细胞学检查、免疫球蛋白定量、血清蛋白电泳(M 蛋白)、X 线检查等确诊,诊断标准符合文献^[7],分期采用 Durie-salmon 分期^[8]。排除标准:(1)发生第二原发肿瘤的患者不予以入组;(2)孤立性浆细胞瘤不予以入组;(3)复诊 MM 患者不予以入组。

1.3 仪器与试剂 流式细胞仪为美国 Beckman-Coulter 公司的 FC500,抗 IL-17A-PE/Cy7、美国 Biolegend、破膜剂和固定剂购自 Beckman-Coulter 公司;淋巴细胞刺激剂混合液购自 BD 公司;人淋巴细胞分离液购自 Sigma 公司;小牛血清、RPMI-1640 培养基购自杭州四季青生物公司。

1.3 方法

1.3.1 T 细胞亚群检测 取未刺激的肝素钠抗凝全血 50 μ L,加入 10 μ L PerCp-CD3/FITC-CD4/PE-CD8 三联鼠抗人单抗,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,然后加入 2 mL 溶血剂避光放置 5 min,待完全溶血后,加入 2 mL PBS 洗涤 1 次,3 000 r/min 离心 5 min,丢弃上清,上 FC500 流式细胞仪检测,采用 CXP 软件分析数据,以 CD3⁺T 细胞设门,结果以 CD3⁺CD4⁺细胞在 CD3⁺T 细胞中的比率进行统计,见图 1、2。

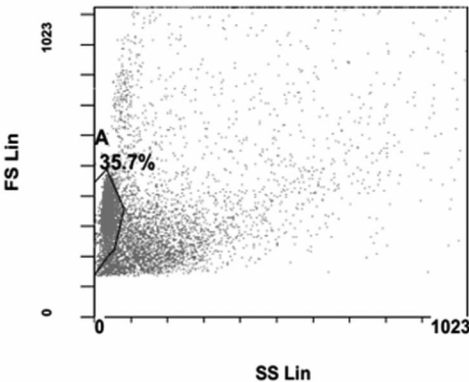


图 1 正常对照组外周血淋巴细胞比率

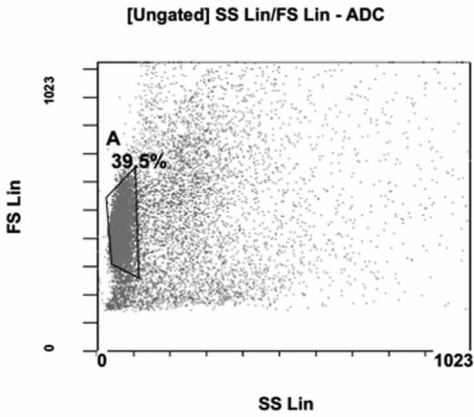


图 2 多发性骨髓瘤患者外周血淋巴细胞比率

1.3.2 Th17 和 Treg 细胞检测 Th17 细胞检测:肝素钠抗凝血 3 mL,经 Ficoll 密度梯度离心法分离提取 PBMCs,PBS 洗涤 2 次,加入等量 RPMI 1640 培养液混匀,加入 2 μ L 白细胞活化混合物,于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5%CO₂ 刺激培养 4~6 h,加入 CD4-PC5 及同型对照进行染色,加入溶血素 2 mL,避光孵育 10 min,PBS 洗涤 2 次,弃上清,加入 IL-17-PC7 抗体及同型对照,避光孵育 30 min,加入 500 μ L PBS 悬浮细胞,上流式细胞仪检测,TH17 水平以 CD4⁺IL-17⁺表示。Treg 细胞检测:标本中加入 CD4-APC/CD25-PE 共 20 μ L,混匀,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min;加入溶血素 2 次,避光孵育 10 min,1 500 r/min 离心 5 min,PBS 洗涤两次,1 500 r/min 离心 5 min,上流式细胞仪检测,结果以 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺细胞进行统计,见图 3~6。

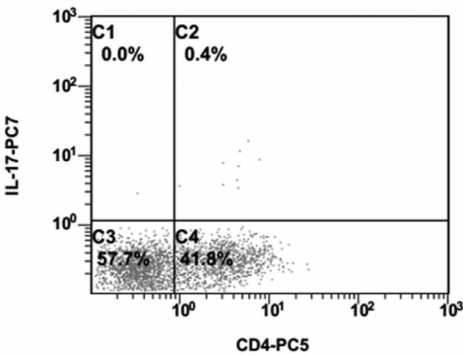


图 3 正常对照组外周血中 Th17 细胞比率

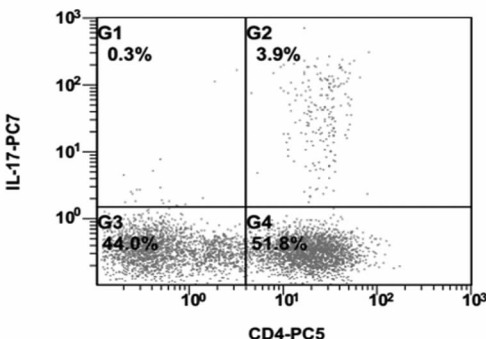


图 4 多发性骨髓瘤患者外周血中 Th17 细胞比率

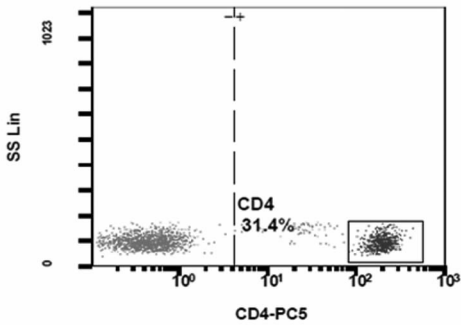


图 5 MM 患者以 CD4⁺ T 细胞射门

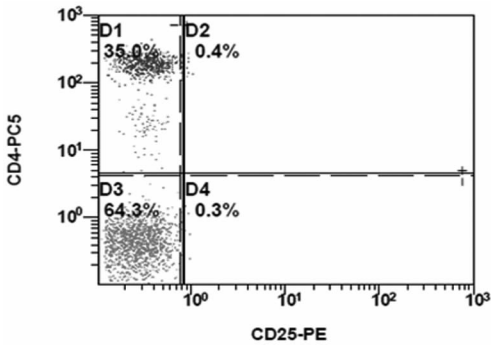


图 6 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 细胞即为 Treg 细胞

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件包进行数据处理,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 病例组与对照组 T 细胞亚群比较 病例组患者的 $(CD3^+ CD4^+) / (CD3^+ CD8^+)$ 比值较对照组降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 病例组与对照组 T 细胞亚群比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD3 ⁺ (%)	CD3 ⁺	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺ / CD3 ⁺ CD8 ⁺
			CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	
病例组	30	66.4 ± 13.1	32.4 ± 6.9	27.8 ± 8.4	1.29 ± 0.31
对照组	20	67.5 ± 11.3	33.1 ± 8.7	24.2 ± 7.8	1.40 ± 0.39
P		0.664	0.472	0.037	0.040

2.2 病例组 Th17 细胞、Treg 细胞比率及二者比值分析 病例组患者外周血 Th17 细胞的比率为 $(5.9 \pm 1.9)\%$,与对照组 $(4.0 \pm 0.9)\%$ 相比增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);病例组 Treg 细胞比率为 $(1.2 \pm 0.3)\%$,与对照组 $(2.1 \pm 0.4)\%$ 相比,比值降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);病例组 Th17/Treg 细胞比值 5.1 ± 1.3 较对照组 2.2 ± 0.4 明显增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

MM 是浆细胞恶性克隆性增殖的血液系统恶性肿瘤,患者体内存在免疫功能异常,尤其是 T 细胞数量和功能的异常。Goodyear 等^[9]、Ogawara^[10]、Sharma 等^[11] 均先后报道过 MM 患者存在 CD4⁺ T 细胞的表达受抑制、Th1 细胞相关细胞因子 IFN- γ 含量下降, Th2 细胞相关因子 IL-4、IL-10 含量均显著升高。上述结果说明 MM 患者中 CD4⁺ T 细胞免疫功能失调是

确实存在的。本研究中同样发现病例组患者的抑制/细胞毒 T 细胞(CD3⁺ CD8⁺)比例较对照组升高, $(CD3^+ CD4^+) / (CD3^+ CD8^+)$ 比值较对照组降低。病例组外周血 Th17 细胞的比率为 $(5.9 \pm 1.9)\%$,与正常对照组 $(4.0 \pm 0.9)\%$ 相比,比值增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

Treg 细胞与恶性肿瘤、其他相关免疫性疾病的关系研究是近年来的热点。许多实体肿瘤患者中发现外周血(或骨髓) Treg 细胞数量的增加与肿瘤的发生、发展呈正相关,若选择性去除 Treg 细胞、或抑制其功能均有助于肿瘤的免疫治疗。Treg 细胞是一类起负调节作用的 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞亚群,按来源分为天然型(nTreg)和诱导型(iTreg)。Foxp3 作为 nTreg 的特征性转录因子,也是参与 nTreg 分化和发育的关键分子^[14]。本研究中病例组外周血 Treg 细胞减少,提示免疫负调控作用减弱。但也有研究表明,在 MM 患者中外周血中 Treg 细胞表达增加,且与疾病严重程度呈正相关^[15-16],与实验结果不相符合,MM 患者 Treg 细胞的表达情况存在争议^[17]。分析原因可能与 MM 患者自身的免疫微环境及患者疾病进程有关,也可能与研究结果的表达方式(绝对细胞计数或是相对细胞比率)、抗体的选择或样本量的大小等因素有关。

目前,国内有关 MM 患者中外周血中 Th17、Treg 细胞共同作用机制的研究并不多见,本研究结果,MM 患者外周血中 Th17 细胞比率增加而 Treg 细胞比率降低,从而导致 Th17/Treg 细胞比例失衡,该实验结果虽与部分文献报道一致,但仍存在争议,说明 MM 患者 Th17/Treg 细胞平衡的调节机制有必要进行更深入地探讨和研究,从而进一步地研究该平衡机制与 MM 发生、发展及预后的相关性。今后,在 MM 患者 Th17 和 Treg 细胞相关免疫治疗中,建议临床不能单纯通过降低或升高一种细胞的比率来达到抑制 MM 疾病发生、发展的作用,而是根据患者个体差异来调节并维持 Treg/Th17 细胞比例的平衡。

参考文献

[1] Kuehl WV, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor[J]. J Clin Invest, 2012, 122(10): 3456-3463.

[2] Muller YD, Seebach JD, Biehler LH, et al. Transplantation tolerance: Clinical potential of regulatory T cells[J]. Self Nonself, 2011, 2(1): 26-34.

[3] Zou W. Restifo NE T(H)17 cells in tumour immunity and immuno-therapy[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(45): 248-256.

[4] Chi LJ, Lu HT, Li GL, et al. Involvement of T helper type 17 and regulatory T cell activity in tumour immunology of bladder carcinoma[J]. Clin Exp Immunol, 2010, 161(23): 480-489.

[5] Chatila TA. Role of regulatory T cells in human diseases[J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 116(33): 949-959.

[6] Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, et al. Th17 cells in human disease[J]. Immunol Rev, 2008, 223(1): 87-113.

[7] 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: 232-233.

[8] Beyer M, Kochanek M, Giese T, et al. In(下转第 3407 页)

高,且两者呈正相关,提示呈形态不规则病灶乳腺癌患者肿瘤侵袭程度高,易侵犯附近组织及发生淋巴结转移,而 HER2 阴性,则提示肿瘤浸润程度低,癌灶形态规则,常呈分叶状或卵圆形。另外,MRI 不均匀强化与 PR 表达呈正相关,与 HER2 呈负相关,PR 阴性提示乳腺癌灶上皮受体激素调控效果差,内分泌治疗效果受限,预后差,而其表达阳性,则提示肿瘤对激素治疗敏感,预后通常较好。而 HER2 阴性表达则提示肿块恶性程度低,预后好,说明 MRI 均匀强化病灶均非均匀强化病灶预后更差,对激素治疗敏感度更低。但同时需注意:影像学检查及免疫组化检查结果判定受主观因素影响较大,因此本研究均选择高资历影像科及病理科医师对所获取结果进行双盲、重复阅片,且在免疫组化操作过程中严格遵循试剂使用说明操作,并选择优质试剂、良好的仪器,对每个环节均进行严格核查,避免操作过程对结果产生影响。

参考文献

[1] Novikov O, Wang ZY, Stanford EA, et al. An Aryl hydrocarbon Receptor-Mediated amplification loop that enforces cell migration in ER-/PR-/her2- human breast cancer cells[J]. *Mol Pharmacol*, 2016, 90(5): 674-688.

[2] 邓丹琼,梁碧玲. 乳腺癌患者临床病理特征与磁共振成像强化率关系[J]. *中国公共卫生*, 2016, 32(9): 1255-1257.

[3] Vandenbussche CJ, Cimino-Mathews A, Park BH, et al. Reflex estrogen receptor/progesterone receptor/human epidermal growth factor receptor 2 (ER/PR/Her2) analysis of breast cancers in needle core biopsy specimens dramatically increases health care costs [J]. *Am J Surg Pathol*, 2015, 39(7): 939-947.

[4] 杨丽,时高峰,刘辉,等. 乳腺癌磁共振特征与 HER-2 表达的相关性[J]. *肿瘤防治研究*, 2013, 40(11): 1070-1073.

[5] 杨海云,刘刚,张林奎,等. 乳腺癌患者癌灶动态增强磁共振成像表现与 ER、PR、Akt、p27 表达的相关性[J]. *山东医药*, 2017, 57(23): 69-71.

[6] 李志,钱明理,汪登斌,等. 乳腺专用磁共振成像、乳腺 X 线摄影及超声检查对乳腺癌诊断价值的对照研究[J]. *临床放射学杂志*, 2012, 31(6): 794-799.

[7] 赵慧娟,高维仁,尹成方,等. 乳腺钙化 BI-RADS 报告分类对乳腺病变的诊断价值[J]. *实用放射学杂志*, 2011, 27(3): 376-378.

[8] 王兰云,王文锋,魏冉,等. 乳腺 MR 灌注时间-信号强度曲线表现及价值研究[J]. *临床放射学杂志*, 2011, 30(2): 197-201.

[9] 秦甫. 乳腺钼靶、超声弹性成像与 MRI 临床用于诊断乳腺癌的随机对照分析[J]. *中国 CT 和 MRI 杂志*, 2016, 14(1): 66-68.

[10] Pan XH, Zhao Bowen, SZ, et al. Estrogen receptor- α 36 is involved in epigallocatechin-3-gallate induced growth inhibition of ER-negative breast cancer stem/progenitor cells[J]. *J Pharmacol Sci*, 2016, 130(2): 85-93.

[11] 郝亮,余日胜,崔凤,等. 雌激素受体、孕激素受体和人类上皮因子受体 2 表达的乳腺癌亚型的 MRI 表现特征分析对照研究[J]. *中华医学杂志*, 2013, 93(11): 819-823.

[12] 李敏红,陈德基,罗永良,等. 乳腺癌的 MRI 影像学特征与细胞分子表型之间的相关性研究[J]. *临床放射学杂志*, 2015, 34(1): 36-40.

[13] 封任冬,汪华,丁莹莹,等. 乳腺癌筛查模式的探讨[J]. *临床放射学杂志*, 2016, 35(1): 36-40.

[14] 孙双燕,杨长良,黄志成,等. 不同分子亚型乳腺癌 MRI 特征分析[J]. *中国临床医学影像杂志*, 2017, 28(5): 327-330.

[15] 陶维静,胡春洪,柏根基,等. 乳腺癌 MRI 强化特征与免疫组织化学相关性分析[J]. *临床放射学杂志*, 2016, 35(5): 706-710.

(收稿日期:2017-07-15 修回日期:2017-09-25)

(上接第 3403 页)

vivo peripheral expansion of native CD4⁺ CD25 FoxP3⁺ regulatory T cells in patients with multiple myeloma[J]. *Blood*, 2006, 107(10): 3940-3949.

[9] Goodyear OC, Pratt G, McLamon A, et al. Differential paRem of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell immunity to MAGE-AI/A2/A3 in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance(MGUS) and multiple myeloma [J]. *Blood*, 2008, 112(56): 3362-3372.

[10] Ogawara H, Hiroshi H, Tohru Y, et al. High Th1/Th2 ratio in patients with multiple myeloma[J]. *Leuk Res*, 2005, 29(11): 135-140.

[11] Sharma A, Khan R, Joshi S, et al. Dysregulation in T helper 1/Thelper 2 cytokine ratios in patients with multiple myeloma[J]. *Leuk Lymphoma*, 2010, 51(21): 920-927.

[12] Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer[J]. *Blood*, 2006, 108(23): 804-811.

[13] Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory Tcell suppression-a diverse arsenal for a moving tar-

get[J]. *Immunology*, 2008, 124(27): 13-22.

[14] Ziegler SF, Buckner JH. FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation[J]. *Microbes Infect*, 2009, 11(14): 594-598.

[15] Feyler S, ScoR GB, Parrish C, et al. Tumour cell generation of inducible regulatory T-cells in multiple myeloma is contactdependent and antigen-presenting cell-independent [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e35981.

[16] Feyler S, von Lilienfeld-Toal M, Jarmin S, et al. CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are increased whilst CD3(+) CD4(-) CDS(-) alphabetaTCR(+) Double Negative T cells are decreased in the peripheral blood of patients with multiple myeloma which correlates with disease burden[J]. *Br J Haematol*, 2009, 144(10): 686-695.

[17] Braga WV, Atanackovic D, Colleoni GW. The role of regulatory T cells and TH1 7 cells in multiple myeloma[J]. *Clin Dev Immtnol*, 2012, 38(2): 293.

(收稿日期:2017-05-29 修回日期:2017-08-18)