

论著·临床研究

DLBCL 患者经 GM-CSF 治疗后外周血单个核细胞
及树突状细胞变化研究*邱 樊, 立 彦[△]

(南京医科大学附属南京医院核医学科, 南京 210006)

摘要:目的 研究弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)患者经 GM-CSF 治疗后, 外周血单核细胞、树突状细胞(DC)、髓系树突状细胞(mDC)以及浆系树突状细胞(pDC)的变化情况。方法 2014 年 10 月至 2016 年 2 月入住该院的 33 例 DLBCL 患者静脉注射 GM-CSF 进行治疗, 每周注射 1 次 GM-CSF, 每周为 1 个疗程, 共治疗 3 个疗程。每次注射前, 静脉采血 3 mL, 采血后 24 h 内用流式细胞仪对外周血单核细胞和 DC 进行检测。检测结果用 SPSS17.0 软件进行统计分析。结果 33 例患者 GM-CSF 治疗前单核细胞水平为 $(9.85 \pm 2.31)\%$, 3 个疗程治疗后为 $(3.67 \pm 0.78)\%$, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。DC 水平治疗前为 $(0.24 \pm 0.04)\%$, 治疗后为 $(0.58 \pm 0.13)\%$, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。其中, mDC 治疗水平为 $(0.11 \pm 0.02)\%$, 低于治疗后的 $(0.36 \pm 0.08)\%$ ($P < 0.01$); pDC 治疗前、后比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 DLBCL 患者经 GM-CSF 治疗 3 个疗程后, 单核细胞明显减少, DC 显著增加, 其中 mDC 显著增加, pDC 无明显变化, 即 GM-CSF 治疗激活了 DLBCL 患者的抗肿瘤免疫。

关键词: 弥漫性大 B 淋巴瘤; GM-CSF; 单核细胞; 树突状细胞; 髓系树突状细胞; 浆系树突状细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.03.006

中图法分类号: R446.11

文章编号: 1673-4130(2018)03-0274-04

文献标识码: A

Evaluation of monocytes and dendritic cells changes in peripheral blood of diffuse
large B-cell lymphoma patients before and after GM-CSF treatment*QIU Fan, LI Yan[△]

(Department of Nuclear Medicine, Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China)

Abstract: Objective To evaluate the changes of monocytes, dendritic cells (DC), myeloid dendritic cells (mDC) and plasma dendritic cells (pDC) of peripheral blood in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients after 3 courses of GM-CSF treatment. **Methods** 33 patients diagnosed with DLBCL in the hospital from October 2015 to February 2016 were enrolled in the study. All the patients were treated with GM-CSF for 3 courses. Before each course, 3 mL venous blood samples were extracted and the monocytes, dendritic cells, myeloid dendritic cells and plasma dendritic cells were analyzed by using flow cytometer within 24 h. All the data was analyzed with SPSS17.0 software. **Results** After 3 courses' treatment, the monocytes decreased significantly, from $(9.85 \pm 2.31)\%$ to $(3.67 \pm 0.78)\%$. Dendritic cells increased significantly, from $(0.24 \pm 0.04)\%$ to $(0.58 \pm 0.13)\%$. mDCs increased significantly from $(0.11 \pm 0.02)\%$ to $(0.36 \pm 0.08)\%$, however, pDCs only increased from $(0.13 \pm 0.03)\%$ to $(0.21 \pm 0.04)\%$ with no statistically significance. **Conclusion** After 3 treatment courses with GM-CSF, the monocytes decreased obviously while DCs especially mDCs increased obviously in DLBCL patients. GM-CSF might activate the anti-tumor immunity of DLBCL patients.

Key words: diffuse large B-cell lymphoma; GM-CSF; monocyte; dendritic cell; myeloid dendritic cell; plasma dendritic cell

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)是成人淋巴瘤中最常见的一种类型, 是非霍奇金淋巴瘤(NHL)的主

* 基金项目: 江苏省科技厅临床医学科技专项(BL2014014); 南京医科大学科技发展基金重点项目(2015NJMUZD048)。

作者简介: 邱樊, 女, 助理研究员, 主要从事肿瘤免疫与治疗方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: shirilyqiu@163.com。

本文引用格式: 邱樊, 立彦. DLBCL 患者经 GM-CSF 治疗后外周血单个核细胞及树突状细胞变化研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39

要类型,其发病率占 NHL 的 31%~34%,在我国 DLBCL 占有 NHL 的 45.8%,占有淋巴瘤的 40.1%^[1]。DLBCL 是一类异质性的侵袭性 NHL,病情进展快,病死率较高,其发病多与免疫应答过程中淋巴细胞增殖分化产生的某种免疫细胞恶变相关^[2]。近年来,GM-CSF 基因修饰的肿瘤细胞疫苗作为一种新的肿瘤治疗手段,开展了广泛的临床试验,在非小细胞肺癌、卵巢癌、结直肠癌、前列腺癌、黑色素瘤、淋巴瘤等多种肿瘤的临床Ⅱ期、Ⅲ期实验中显示出了较好的抗肿瘤效果^[3-9]。GM-CSF 是一种具有多种生物学活性的细胞因子,可促进抗原递呈细胞(APC),如 DC 的分化、成熟。DC 根据其表面标志及功能分为两个主要亚群,即髓系 DC(mDC)和浆系 DC(pDC),其中 mDC 与单核细胞有共同祖细胞,主要参与抗肿瘤免疫;而 pDC 主要参与免疫耐受^[10]。本研究主要探讨了 DLBCL 患者经 GM-CSF 治疗后,单核细胞、DC、mDC 以及 pDC 的变化情况,GM-CSF 治疗后 DLBCL 患者的机体免疫状态。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2014 年 10 月至 2016 年 2 月入住本院的 33 例 DLBCL 患者纳入研究,男 20 例(占 61%),女 13 例(占 39%),年龄 45~80 岁,平均(66.23±8.94)岁。所有患者接受 GM-CSF 治疗,每周注射 1 次 GM-CSF 每周为 1 个疗程,共治疗 3 个疗程。

1.2 方法 流式细胞术检测患者外周血单核细胞以及树突状细胞(DC)的比例。DLBCL 患者每次注射 GM-CSF 进行治疗前抽取 3 mL 静脉血(EDTA 或肝素抗凝),24 h 内用流式细胞仪检测单核细胞以及树

突状细胞比例。检测方法如下,单核细胞:用 anti-CD14-PE (Beckman Coulter)公司荧光抗体对单核细胞进行标记。流式管中加入 20 μL 荧光抗体后,加入 50 μL 待测标本,于涡旋仪上震荡混匀后,避光孵育 20 min。加入 625 μL 自制溶血剂 A (0.12%甲酸),涡旋仪上震荡充分溶血后加入 275 μL 自制终止液 B (56.60 mmol/L Na₂CO₃, 247.86 mmol/L NaCl, 220.36mmol/L Na₂SO₄)终止反应后立即上机检测。树突状细胞:mDC 和 pDC 分别用抗体 anti-Lin-1-FITC(BD 公司)、anti-HLA-DR-PerCP (Biolegend 公司)、anti-CD11c-PE (Biolegend 公司)和 anti-Lin-1-FITC (BD 公司)、anti-HLA-DR-PerCP (Biolegend 公司)、anti-CD123-PE(Biolegend 公司)进行标记。标记好后步骤同单核细胞的检测。单核细胞、树突状细胞、mDC 以及 pDC 均按其占有单个核细胞的比例分析。

1.3 统计学处理 应用 SPSS18.0 进行统计学分析。所有定量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,治疗前及不同治疗疗程单核细胞比例变化、mDC 比例变化以及 pDC 比例变化均采用配对样本 *t* 检验,治疗前后单核细胞比例变化与树突状细胞比例变化的相关性采用独立样本 *t* 检验及相关性分析。*P*<0.05 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 DLBCL 患者接受 GM-CSF 治疗前单核细胞及树突状细胞情况 33 例 DLBCL 患者按性别、年龄进行分组。在接受 GM-CSF 治疗前,男性患者与女性患者比较,单核细胞、DC、mDC 以及 pDC 差异均无统计学意义(*P*>0.05)。年龄≥66 岁的患者与年龄<66 岁患者比较,单核细胞、DC、mDC 以及 pDC 差异均无统计学意义(*P*>0.05),见表 1。

表 1 DLBCL 患者接受治疗前单核细胞及树突状细胞情况

患者分类	病例[n(％)]	单核细胞比较		树突细胞比较		髓系树突细胞比较		浆系树突细胞比较	
		％	<i>P</i>	％	<i>P</i>	％	<i>P</i>	％	<i>P</i>
性别									
男	20(61)	11.02±2.16	0.155	0.25±0.07	0.813	0.12±0.03	0.794	0.15±0.03	0.873
女	13(39)	8.01±1.15		0.22±0.04		0.10±0.02		0.13±0.03	
年龄									
≥66岁	15(45)	8.69±2.08	0.143	0.26±0.04	0.314	0.13±0.03	0.743	0.19±0.12	0.797
<66岁	18(55)	11.62±2.23		0.21±0.04		0.11±0.02		0.18±0.08	

2.2 DLBCL 患者接受 GM-CSF 治疗后单核细胞减少 患者接受 GM-CSF 治疗 1 个疗程后,单核细胞由(9.85±2.31)%减少到了(8.03±1.85)%,但差异无统计学意义(*P*>0.05)。第 2 个疗程结束后,单核细胞继续减少,同治疗前相比,减少显著(*P*=0.03<0.05),由(9.85±2.31)%减少到(5.90±0.98)%。第 3 个疗程结束后,单核细胞减少极显著(*P*<0.01),由(9.85±2.31)%减少到(3.67±0.78)%,见表 2。

表 2 DLBCL 患者接受 GM-CSF 治疗后单核细胞变化情况

时间	单核细胞 (%)	<i>P</i>
治疗前	9.85±2.31	—
1 个疗程后	8.03±1.85	0.177
2 个疗程后	5.90±0.98*	0.030
3 个疗程后	3.67±0.78**	<0.01

注:与治疗前比较,**P*<0.05;***P*<0.01;—表示该项无数据

2.3 DLBCL 患者接受 GM-CSF 治疗后 DC, mDC 以及 pDC 变化情况 患者接受 GM-CSF 治疗后, 树突状细胞 DC 数量增加, 治疗 1 个疗程后 DC 数量没有明显增加($P=0.266>0.05$), 治疗 2 个疗程后 DC 明显增加($P=0.016<0.05$), 治疗 3 个疗程后 DC 增加极显著($P<0.01$)。mDC 在第 1 个疗程结束后无明

显变化($P=0.145>0.05$), 第 2 疗程结束后明显增加($P=0.03<0.05$), 在第 3 疗程结束后增加极显著($P<0.01$)。pDC 在治疗过程中, 虽有所增加, 但增加不显著, 第 3 个疗程结束后数量仅从(0.13 ± 0.03)% 增加到(0.21 ± 0.04)% ($P=0.084>0.05$), 见表 3。

表 3 DLBCL 患者经 GM-CSF 治疗后树突状细胞的变化情况

时间	树突细胞比较		髓系树突细胞		浆系树突细胞	
	%	P	%	P	%	P
治疗前	0.24±0.04		0.11±0.02		0.13±0.03	
1 个疗程后	0.34±0.06	0.266	0.18±0.04	0.145	0.16±0.03	0.558
2 个疗程后	0.42±0.08*	0.016	0.23±0.05*	0.030	0.18±0.04	0.168
3 个疗程后	0.58±0.13**	<0.01	0.36±0.08**	<0.01	0.21±0.04	0.084

注:与治疗前比较, * $P<0.05$; ** $P<0.01$

3 讨 论

目前, 治疗肿瘤的方法主要包括手术治疗、放疗和化疗, 而免疫治疗使机体产生针对肿瘤细胞的特异性免疫反应, 有助于清除肿瘤残余病灶而成为肿瘤治疗的第四种方法。GM-CSF 是肿瘤免疫最重要的细胞因子之一, 其在抗肿瘤免疫中的作用越来越受到重视^[11]。以 GM-CSF 为基础的疫苗在治疗非小细胞肺癌(NSCLC)、黑色素瘤、前列腺癌、肾细胞癌、结直肠癌、淋巴瘤等的临床试验中, 均显示了良好的治疗效果, 其可有效激活机体的抗肿瘤免疫^[3-7]。在对 DLBCL 进行 CHOP 或 R-CHOP 方案治疗时, 患者 PFS 和 OS 有所提高, 即 GM-CSF 联合 CHOP 方案治疗有助于改善淋巴瘤患者的生存状态^[8-9]。但目前对 GM-CSF 治疗 DLBCL 患者的研究主要集中在患者的临床反应, 而关于 GM-CSF 如何提高患者的 PFS 和 OS 的研究还较少。本文对接受 GM-CSF 治疗的 DLBCL 患者单核细胞、树突状细胞、髓系树突状细胞以及浆系树突状细胞变化进行研究, 有助于了解 GM-CSF 对 DLBCL 患者的免疫调控, 有助于选择合适的药物与 GM-CSF 进行联用, 制定更有效的治疗方案。

GM-CSF 是一种具有多种生物活性的细胞因子, 可促进 APC 如 DC 等的分化、成熟、活化及诱导 CD86 表达以激发对肿瘤的免疫应答; 可促进单核细胞向巨噬细胞分化; 诱导单核细胞 MHC II 类分子的表达; 增强巨噬细胞及粒细胞毒性及 ADCC 反应; 促进 Th、Tc、NK 在肿瘤部位浸润从而杀伤肿瘤^[12-13]。DC 数量较少仅占人单核细胞的 1%, 是机体免疫系统的一种专职 APC, 可诱导肿瘤患者体内特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)产生, 有利于上述肿瘤细胞^[14]。本研究发现, DLBCL 患者在接受 GM-CSF 治疗 2 个疗程后 DC 明显增加, 3 个疗程后 DC 极显著增加, 其中 pDC 在整个治疗过程中虽有所增加, 但增加不显著,

而 mDC 在治疗 2 个疗程后显著增加, 治疗 3 个疗程后极显著增加, 即患者从接受 GM-CSF 治疗 2 个疗程开始抗肿瘤免疫被显著激活。

在本研究中还发现, DLBCL 患者在接受 GM-CSF 治疗后单核细胞减少, 在治疗 2 个疗程后单核细胞显著减少, 在治疗 3 个疗程后极显著减少。GM-CSF 与其他细胞因子联用或单独使用均可诱导单核细胞向 DC 分化。在体外将 GM-CSF 与单核细胞共培养 4 d 可诱导未成熟的 DC 产生^[15]。进一步研究发现, 在体外培养单核细胞时加入 GM-CSF 共培养 12 d 或更长时间, 可诱导产生高表达 HLA-DR, CD86 和 CD11c 的树突细胞^[16]。本研究的结果与其一致, 因此, 作者推测 GM-CSF 在对 DLBCL 患者进行治疗时诱导了单核细胞向 DC 的分化。但 GM-CSF 诱导单核细胞向 DC 分化的机制还需进一步研究。

综上所述, GM-CSF 可强烈激活机体的抗肿瘤免疫。DLBCL 患者经 GM-CSF 治疗后, 单核细胞显著减少而 DC 和 mDC 则显著增加, 单核细胞的减少与 DC 的增加存在一定的相关性。本研究为选择合适的药物与 GM-CSF 联用以达到对 DLBCL 患者更好的治疗效果奠定了一定基础。

参考文献

[1] 中华医学会血液学分会, 中国抗癌协会淋巴瘤专业委员会. 中国弥漫大 B 细胞淋巴瘤诊断与治疗指南(2013 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(9): 816-819.
[2] 纪小龙, 申明识. 我国淋巴结外淋巴瘤的临床特点[J]. 癌症, 1999, 18(5): 570-572.
[3] OOSTERLING S J, MELS A K, GERIJTENBEEK T B, et al. Preoperative granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) increases hepatic dendritic cell numbers and clustering with lymphocytes in colorectal cancer patients[J]. Immunobiology, 2006, 211(6/8): 641-

- 649.
 - [4] CORREALE P, TINDARA M S, REMONDO C, et al. Second-line treatment of non small cell lung cancer by bi-weekly gemcitabine and docetaxel +/- granulocyte-macrophage colony stimulating factor and low dose al-desleukine[J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(6): 497-502.
 - [5] CHENG Y C, VALERO V, DAVIS M L, et al. Addition of GM-CSF to trastuzumab stabilises disease in trastuzumab-resistant HER2 + metastatic breast cancer patients[J]. Br J Cancer, 2010, 103(9): 1331-1334.
 - [6] DREICER R, KLEIN E A, ELSON P, et al. Phase II trial of GM-CSF thalidomide in patients with androgen-independent metastatic prostate cancer[J]. Urol Oncol, 2005, 23(2): 82-86.
 - [7] EROGLU Z, KONG K M, JAKOWATZ J G, et al. Phase II clinical trial evaluating docetaxel, vinorelbine and GM-CSF in stage IV melanoma[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2011, 68(4): 1081-1087.
 - [8] KARMAI R, LARSON M L, WOOLDRIDGE J E, et al. Granulocyte macrophage colony stimulationg factor-induced immunepriming of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone with rituximab chemoinmunotherapy in previously untreated patients with diffuse large B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma [J]. Leuk Lymphoma, 2011, 52(10): 2097-2104.
 - [9] CHANG J E, SEO S, KIM K M, et al. Rituximab and CHOP chemotherapy plus GM-CSF for previously untreated diffuse large B-cell lymphoma in the elderly: a Wisconsin oncology network study[J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2010, 10(3): 379-384.
 - [10] STEINMAN R M, COHN Z A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice[J]. J Immunol, 2007, 178(1): 5-25.
 - [11] LEONG S P, ENDERS-ZOHR P, ZHOU Y M, et al. Recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor(rhGM-CSF) and autologous melanoma vaccine mediate tumor regression in patients with metastatic melanoma[J]. J Immunother, 1999, 22(2): 166-174.
 - [12] KASS E, PARKER J, SCHLOM J, et al. Comparative studies of the effects of recombinant GM-CSF and GM-CSF administered via a poxvirus to enhance the concentration of antigen- presenting cells in regional lymph nodes[J]. Cytokine, 2000, 12(7): 960-971.
 - [13] RAGNHAMMAR P. Anti-tumoral effect of GM-CSF with or without cytokines and monoclonal antibodies in solid tumors[J]. Medical Oncology, 1996, 13(3): 167-176.
 - [14] 刘风华. 自体外周血树突状细胞体外诱导培养的研究及应用进展[J]. 临床血液学杂志(输血与检验版), 2009, 22(6): 675-678.
 - [15] GANGULY D, PAUL K, BAGCHI J, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor drives monocytes to CD14low CD83+ DCSIGN- interleukin-10-producing myeloid cells with differential effects on T-cell subsets[J]. Immunology, 2007, 121(4): 499-507.
 - [16] CHITTA S, SANTAMBROGIO L, STERN L J. GMCSF in the absence of other cytokines sustains human dendritic cell precursors with T cell regulatory activity and capacity to differentiate into functional dendritic cells[J]. Immunol Lett, 2008, 116(1): 41-54.
-
- (收稿日期: 2017-08-20 修回日期: 2017-10-26)
-
- (上接第 273 页)
- 生成素治疗恶性血液病化疗后血小板减少[J]. 血栓与止血学, 2014, 20(2): 53-56.
- [9] 张佃富, 方瑞艳, 马德亮. 门冬酰胺酶联合 CHOP 方案治疗结外 NK/T 细胞淋巴瘤的临床效果研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(4): 1034-1038.
- [10] SHIGEOKA T, YAMAGATA H, ISHIDO A, et al. Latent malignant lymphoma diagnosed at autopsy in a patient with cold agglutinin disease coexisting thrombotic thrombocytopenic purpura[J]. Rinsho Ketsueki, 2013, 54(12): 2182-2186.
- [11] LAI C H, TSAI J W, LIN J N, et al. Plasma-cell type Castleman's disease of the neck and lymphocyte-depletion Hodgkin lymphoma associated with intestinal intussusception in an AIDS patient[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2013, 46(3): 234-236.
- [12] 余喜然, 卓德祥, 汤俊峰, 等. 恶性淋巴瘤合并静脉血栓栓塞的血液学指标检测分析[J]. 实验与检验医学, 2015, 23(5): 634-636.
- [13] 苏畅, 张明智, 李兆明, 等. ANC, ALC, LNR, AMC 及 LMR 对结外鼻型 NK/T 细胞淋巴瘤预后的预测价值探讨[J]. 河南医学研究, 2016, 25(5): 800-804.
- [14] SHIGEOKA T, YAMAGATA H, ISHIDO A, et al. Latent malignant lymphoma diagnosed at autopsy in a patient with cold agglutinin disease coexisting thrombotic thrombocytopenic purpura[J]. Rinsho Ketsueki, 2013, 54(12): 2182-2186.
- [15] 张亚平, 常青. 化疗间歇期随访路径表对淋巴瘤患儿院外生活质量的影响[J]. 护士进修杂志, 2015, 30(12): 1063-1065.
- [16] 俞杨, 樊星, 王苓, 等. 复发/难治性淋巴瘤患儿自体干细胞移植后巩固化疗的疗效分析[J]. 中国癌症杂志, 2014, 25(10): 761-764.
-
- (收稿日期: 2017-07-21 修回日期: 2017-11-27)