

巴细胞数量减少且免疫活性下降[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(2):164-167.

[5] 李东平, 李则攀, 肖世金. 上海地区中期妊娠孕妇 25-羟维生素 D 正常参考区间调查[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(4):542-544.

[6] UNGER M D, CUPPARI L, TITAN S M, et al. Vitamin D status in a sunny country: where has the sun gone? [J]. Clin Nutr, 2010, 29(6):784-788.

[7] KRUL-POEL Y H, SNACKEY C, LOUWERS Y, et al. The role of vitamin D in metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome: a systematic review[J]. Eur J Endocrinol, 2013, 169(6):853-865.

[8] 阎雪, 张会丰, 王卫平. 重新认识机体维生素 D 营养状况[J]. 中华医学杂志, 2012, 93(20):1369-1371.

[9] 邵洁. 儿童维生素 D, 钙营养与骨健康[J]. 中国实用儿科杂志, 2012, 27(3):161-165.

[10] 朱书宇, 陈华干, 杨婷, 等. 柳州地区健康儿童血清 25-羟维生素 D 参考区间水平分析[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33

(17):3911-3913.

[11] VOGESER M, KYRIATSOULIS A, HUBER E, et al. Candidate reference method for the quantification of circulating 25-hydroxyvitamin D3 by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Clin Chem, 2004, 50(8):1415-1417.

[12] 熊燊, 钱士匀, 熊小泉, 等. 海南地区成人血清 25-羟基维生素 D 参考区间的初步调查[J]. 检验医学, 2014, 29(5):464-467.

[13] 汪纯, 刘玉娟, 肖文金, 等. 上海地区健康成年人 25 羟维生素 D 水平及其与骨密度的关系[J]. 上海医学, 2011, 34(03):166-170.

[14] 高正凤, 徐梦华, 袁美芬, 等. 上海地区未成年人 25-羟基维生素 D 参考区间的初步调查[J]. 检验医学, 2017, 32(4):280-283.

(收稿日期:2018-11-26 修回日期:2019-02-04)

• 短篇论著 •

骨髓瘤患者外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} 调节性 T 细胞及淋巴细胞亚群的研究

周 林¹, 王广洲¹, 管 俊², 马 莉^{3△}

(扬州大学临床医学院/江苏省苏北人民医院:1. 医学检验科;2. 血液内科;3. 血液学研究所, 江苏扬州 225001)

摘要:目的 研究多发性骨髓瘤(MM)患者外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} 调节性 T 细胞(Treg)及淋巴细胞亚群的比例, 初步探讨其在 MM 患者发生免疫抑制机制中作用。方法 采用流式细胞术分别检测 65 例 MM 患者和 20 例健康对照组外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Tregs 以及淋巴细胞亚群的比例。结果 MM 患者外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 比例[(10.85±2.19)%]高于健康对照组[(7.48±1.66)%], 差异有统计学意义(P<0.01); MM 患者外周血中 CD3⁺CD4⁺(Th)细胞的比例[(31.39±5.19)%]低于健康对照组[(36.55±3.02)%], 差异有统计学意义(P<0.01); MM 患者外周血中 CD3⁺CD8⁺(Tc)细胞的比例[(34.80±4.29)%], 高于健康对照组[(28.93±3.61)%], 差异有统计学意义(P<0.01); 同时, MM 组外周血中 Th/Tc 的比值(0.95±0.24)低于健康对照组(1.29±0.27), 差异有统计学意义(P<0.01)。结论 MM 患者存在淋巴细胞亚群的比例异常, 导致 MM 患者更易产生免疫功能失调; 同时, 由于 MM 患者 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 细胞比例的增加可能进一步加剧骨髓瘤患者的免疫抑制, 促进了肿瘤细胞的免疫逃逸。

关键词:多发性骨髓瘤; 调节性 T 细胞; 免疫抑制

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.11.028

中图法分类号:R446.6; R733.3

文章编号:1673-4130(2019)11-1393-04

文献标识码:B

多发性骨髓瘤(MM)是血液系统最常见的恶性肿瘤之一, 是一种克隆性浆细胞恶性增殖性疾病。骨髓中异常增生的克隆性浆细胞分泌无免疫功能的单克隆免疫球蛋白(M 蛋白), 其常见的临床表现是骨痛、贫血、肾功能不全、感染等^[1]。目前, 临床已通过调节

MM 患者机体免疫应答水平, 如使用传统化疗药物加免疫调节剂(来那度胺、沙利度胺及各种单克隆抗体药等)的治疗方案, 对骨髓瘤患者的预后有很好的效果^[2-3]。因此, 进一步对 MM 患者的细胞免疫功能及发病机制进行深入研究并从中找到新的免疫治疗靶

△ 通信作者, E-mail: mary_jhy@163.com。

点就显得尤为重要。

调节性 T 细胞(Tregs)是一类具有免疫抑制特性的 T 淋巴细胞亚群。文献报道,Tregs 可抑制机体的抗肿瘤免疫反应,且肿瘤患者肿瘤负荷的增加与 CD4⁺CD25⁺ Tregs 细胞的高表达有关^[4]。有研究显示,MM 患者外周血中 T 细胞亚群异常是 MM 患者原发免疫应答缺陷的原因之一^[5]。由于 MM 患者体内存在严重的免疫功能缺陷,因此有必要对其细胞免疫水平进行进一步的研究。

本研究采用流式细胞术对 65 例 MM 患者外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 细胞进行检测,研究在 MM 患者机体中是否异常存在这一类具有免疫抑制特性的 T 淋巴细胞亚群,探讨其在机体免疫机制中的可能作用。同时通过流式细胞术六色配伍方案进行 T、B、NK 淋巴细胞亚群的检测,分析其在 MM 患者中是否存在比例失衡。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 1 月至 2014 年 12 月在本院就诊的 65 例 MM 患者作为 MM 组,所有患者均为初诊患者,且所有病例诊断均符合国际诊断标准^[6],且筛选病例时严格排除淋巴瘤、巨球蛋白血症等其他引起免疫功能缺陷的血液系统疾病;其中男 39 例,女 26 例,年龄 38~82 岁,中位年龄 56 岁。选择 20 名健康体检人群作为健康对照组,年龄 40~75 岁,中位年龄 54 岁,其中男 12 例,女 8 例。各组患者性别和年龄差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 仪器及试剂 流式细胞仪为美国 BD 公司 FACS Canto II 产品,流式分析软件为 BD FACSDiva。低温冰冻离心机为上海科大创新股份有限公司产品。六色淋巴细胞亚群试剂 CD3-TITC/CD16+56-PE/CD45-PerCP-Cy5.5/CD4-PE-Cy7/CD19-APC/CD8-APC-Cy7 为美国 BD 公司产品,单克隆抗体 CD4-FITC、CD127-PE 和 CD25-PC5 及阴性对照单抗均购于美国 BENCAMAN-COULTER 公司,溶血素为美国 BD 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 实验方法 采用流式细胞术对 65 例 MM 患

者进行 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 细胞的检测,同时使用六色配伍方案检测淋巴细胞亚群分析,对相关数据进行分析,初步研究评估该群细胞的生物学特性及在 MM 患者疾病发生发展过程中的可能作用机制。

1.3.2 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 细胞及淋巴细胞亚群检测 取 2 只试管,第 1 管中加入 CD25-PC5、CD4-FITC 及 CD127-PE 各 20 μL,另加入抗凝全血 100 μL;第 2 管中加入六色淋巴细胞亚群试剂 20 μL,另加入抗凝全血 100 μL。两管经轻揉混匀后置于室温下避光反应 15 min,加入 2 mL 溶血素再经室温下避光孵育 8 min。待完全溶血后以 1 000 r/min 离心弃上清,以 200 μL 灭菌 PBS 缓冲液重悬细胞,立即进行流式细胞仪检测,并采用 BD FACSDiva 软件分析数据。淋巴细胞亚群以 CD45/SSC 设门,计算 CD3⁺百分率以及 CD3⁺CD4⁺(Th)和 CD3⁺CD8⁺(Tc)在 CD3⁺细胞中的比率,并计算 Th/Tc、CD19⁺百分率、CD16⁺CD56⁺百分率。检测 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg 细胞时,根据前向散射光和侧向散射光以 CD4⁺T 细胞设门,每份标本分析 10 000 个细胞。以 CD4⁺T 细胞设门,检测 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} 细胞在 CD4⁺T 细胞中的比率。

1.4 统计学处理 使用 SPSS21.0 软件进行统计学分析,所有数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验比较两组间差异是否有统计学意义; $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MM 组与健康对照组外周血中淋巴细胞亚群检测结果 MM 组外周血中 CD3⁺CD4⁺(Th)细胞比例低于健康对照组比例,差异有统计学意义($P<0.01$);MM 组外周血中 CD3⁺CD8⁺(Tc)细胞比例高于健康对照组比例,差异有统计学意义($P<0.01$);MM 组外周血中 Th/Tc 比值低于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);MM 患者外周血中 CD3⁺(T 细胞)和 CD19⁺(B 细胞)比例高于健康对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$);MM 患者外周血中 CD16⁺CD56⁺(NK 细胞)比例低于健康对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1、图 1。

表 1 MM 组与对照组淋巴细胞亚群检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	Th/ Tc	CD19 ⁺ (%)	CD16 ⁺ CD56 ⁺ (%)
MM 组	65	68.38±4.52	31.39±5.19	34.80±4.29	0.95±0.24	11.44±1.11	17.10±3.02
对照组	20	66.44±2.31	36.55±3.02	28.93±3.61	1.29±0.27	9.77±1.02	18.05±3.63
<i>t</i>		0.681	-3.330	3.100	-6.950	0.655	-1.080
<i>P</i>		>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05	>0.05

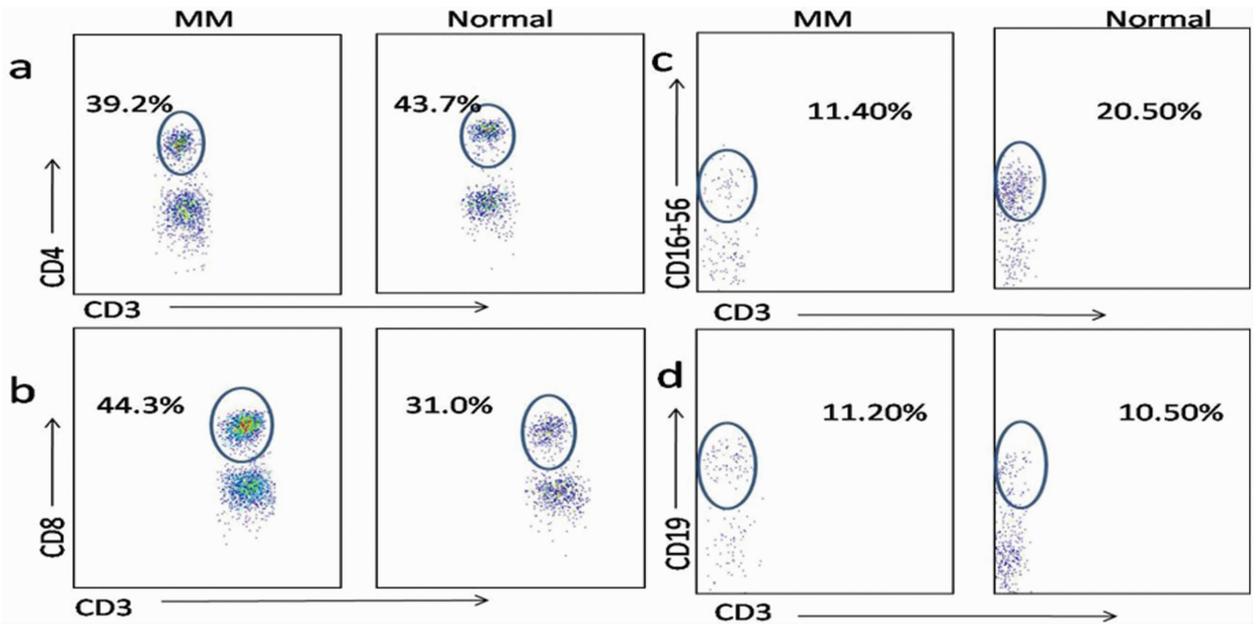


图 1 MM 组和健康对照组中淋巴细胞亚群的流式分析

2.2 MM 组与对照组外周血中 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Treg 的分析 MM 组外周血中 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} (Treg 细胞) 比例为 (10.82 ± 2.19)%, 健康对照组比例为 (7.48 ± 1.62)%, MM 组高于健康对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 2。

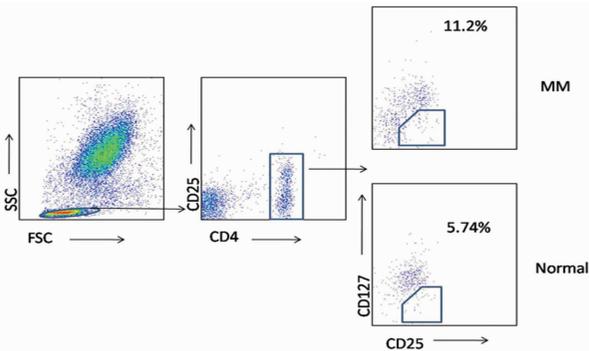


图 2 MM 患者和对照组患者外周血中 Treg 的流式分析

3 讨论

MM 是一种常见的血液系统恶性肿瘤, 研究表明 MM 患者体内存在免疫系统的多种缺陷, 且免疫功能缺陷是该病的一个重要特征并影响疾病进程^[7], 但这些免疫缺陷的具体分子机制尚未完全明确。MM 是来源于 B 细胞的恶性浆细胞疾病, 但对 MM 患者免疫功能的研究发现, 除了体液免疫功能缺陷, MM 患者细胞免疫功能也存在很多异常^[8]。本研究结果发现, 在 MM 患者外周血中 CD4⁺ Th 细胞明显下降及 CD8⁺ Tc 细胞显著升高, 从而导致外周血中具有正常免疫功能的 CD4⁺ Th 细胞和 CD8⁺ T 细胞的比值显著降低, 从而引起正常 T 细胞免疫失调。同时, 笔者还发现, 在 MM 患者外周血中具有天然杀伤作用的

NK 细胞的比例虽然只有轻度下降, 但也能够提示在骨髓瘤患者中 NK 细胞的正向免疫能力也是有所下降的。这些主要免疫细胞的比例变化进一步说明了在 MM 患者外周血中存在免疫功能的匮乏和失调。

Treg 是一群具有促肿瘤免疫耐受和免疫逃逸的负向免疫功能的细胞群体, 且其在多种肿瘤中均表现明显的负向调控作用^[4]。根据其表型, 通常被定义为 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T 细胞或者定义为 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} T 细胞。本实验发现, 在骨髓瘤患者外周血中 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} T 细胞 (Treg) 显著升高, 这一结果与 FENG 等^[5]的研究结果一致, 提示在骨髓瘤患者外周血中存在严重的免疫逃逸和免疫抑制。根据文献报道, Tregs 在肿瘤免疫中的作用机制主要是通过释放大量的转化生长因子-β (TGF-β)、白细胞介素 10 (IL-10) 等因子抑制 T 细胞的增殖和活化^[9]。已有文献报道了 Treg 细胞的免疫抑制机制, 在肺癌患者中 Treg 细胞已成为一个潜在治疗靶点^[10], 因此在抗肿瘤免疫治疗中, Tregs 可能会成为一个很有前途且应用广泛的潜在治疗靶点^[11]。但其在肿瘤免疫治疗中的有效性还没有得到充分确定, 因此, 进一步的深入研究是必不可少的^[4]。

综上所述, 本研究较为系统地分析了 MM 患者外周血中主要免疫细胞的比例变化, 即具有免疫抑制功能的 Treg 细胞显著高于健康人, 而反应机体正常 T 细胞功能的 CD4⁺ T 细胞与 CD8⁺ T 细胞的比例显著低于健康人, 以上这些结果表明在骨髓瘤外周血中存在严重免疫功能抑制和免疫匮乏, 且 Treg 细胞有可能成为一个很有效的评估治疗效果的实验室指标。

(下转第 1405 页)

各项要求,不得向无关人员提供检验结果,不得随意传播受检者的姓名、电话及地址等,不得歧视性病及艾滋病人及其家庭成员,并不可擅自传播此信息造成不好的社会影响,要保护病人的隐私,不以有色眼光看待,要公平公正地对待;(3)希望学生提炼价值理念,使检验工作更加精确化、科学化、合理化,在 ISO15189 质量管理体系的指导下学习和工作,并明白所发出的每一份检验结果都要得到患者和临床的信赖和认可,实验结果的准确性就是我们的生命线,与学科发展相匹配的道德修养就是其职业灵魂,有着重要社会价值与现实意义^[15]。

参考文献

- [1] 张红,金家贵,彭克军,等. 四年制医学检验技术专业人才培养模式探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(12): 1742-1743.
- [2] 朱继文,许扬. 新形势下医德医风建设探索与实践[J]. 中国卫生产业, 2017, (14)14:192-194.
- [3] MILLER W. Developing a theory of clinical instructor identity using the experiences of medical laboratory science practitioners[J]. Clin Lab Sci, 2014, 27(2): 97-104.
- [4] 冯巧玲. 医高专学生全方位职业道德教育体系的构建[J]. 2017, 31(4): 399-401.
- [5] 褚志华,周发为,周维,等. 高校医学检验技术实践教学质量监控机制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(4): 505-508.
- [6] 沈红梅,张凯,杨明照. 医学检验技术专业职业道德教育改革初探[J]. 广东职业技术教育与研究, 2013, 3(4):

130-132.

- [7] 刘成玉,罗春丽. 临床检验基础[M]. 5 版,北京:人民卫生出版社,2012.
- [8] 褚美芬,徐峥,杨珺,等. 医学检验技术专业实践教学考核评价体系的构建与实践[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(21): 3176-3177.
- [9] 曾常茜,朱明雪,张庆镐,等. 医学检验技术专业学生学习需求调查分析[J]. 中国高等医学教育, 2018, 32(6): 57-58.
- [10] AMOLINS M W, EZRAILSON C M, PEARCE D A, et al. Evaluating the effectiveness of a laboratory-based professional development program for science educators[J]. Adv Physiol Educ, 2015, 39(4): 341-351.
- [11] GUEVARA-GUZMÁN R, URRUTIA AGUILAR M E. The formative role of the laboratory in teaching the science of physiology[J]. Gac Med Mex, 2014, 150(3): 365-368.
- [12] 张继瑜,郑磊,王前,等. 医学检验专业临床检验基本技能规范化培训及考核体系的建立与实践[J]. 中华医学教育杂志, 2010, 30(2): 304-307.
- [13] 贾军. 医学检验的职业道德[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(1): 96-97.
- [14] 梁骑,李君安,刘文,等. 医学检验学教学步骤划分教学法对提高学生综合能力的效果评价[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(7): 1022-1023.
- [15] 曾涛. 临床检验基础课程的实验教学改革与体会[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(12): 1621-1622.

(收稿日期:2018-12-04 修回日期:2019-02-12)

(上接第 1395 页)

参考文献

- [1] KYLE R A, RAJKUMAR S V. Multiple myeloma[J]. Blood, 2008, 111(6): 2962-2972.
- [2] JUNG S H, LEE H J, VO M C, et al. Immunotherapy for the treatment of multiple myeloma[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2017, 111(1): 87-93.
- [3] GORGUN G, SAMUR M K, COWENS K B, et al. Lenalidomide enhances immune checkpoint Blockade-Induced immune response in multiple myeloma[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(20): 4607-4618.
- [4] YOSHIKO T H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity[J]. Immunology, 2016, 28(8): 401-409.
- [5] FENG P, YAN R H, DAI X L, et al. The alteration and clinical significance of Th1/Th2/Th17/Treg cells in patients with multiple myeloma[J]. Inflammation, 2015, 38(2): 705-709.
- [6] RAJKUMAR S V, DIMOPOULOS M A, PALUMBO A, et al. International myeloma working group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma[J]. Lancet On-

cology, 2014, 15(12): E538-548.

- [7] GUILLEREY C, NAKAMURA K, VUCKOVIC S, et al. Immune responses in multiple myeloma: role of the natural immune surveillance and potential of immunotherapies [J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(8): 1569-1589.
- [8] PRATT G, GOODYEAR O, MOSS P. Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma[J]. Br J Haematol, 2007, 138(5): 563-579.
- [9] HSU P, SANTNER-NAMNA B, HU M J, et al. IL-10 potentiates differentiation of human induced regulatory T cells via STAT3 and Foxo1[J]. J Immunol, 2015, 195(8): 3665-3674.
- [10] ZHANG D, CHEN Z H, WANG D C, et al. Regulatory T cells and potential immunotherapeutic targets in lung cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 2015, 34(2): 277-290.
- [11] BOARDMAN D, MAHER J, LECHLER R, et al. Antigen-specificity using chimeric antigen receptors: the future of regulatory T-cell therapy? [J]. Biochem Soc Trans, 2016, 44(2): 342-348.

(收稿日期:2018-11-28 修回日期:2019-02-06)