

• 共识解读 •

《淋巴细胞亚群检测在血液肿瘤中应用的专家共识》解读^{*}

冉隆荣, 吴雪莲, 杨再林[△]

重庆大学附属肿瘤医院血液肿瘤中心, 重庆 400030

摘要: 血液肿瘤是一类起源于造血系统的恶性肿瘤, 其发生、发展及预后与患者的免疫功能密切相关, 其中细胞免疫发挥尤为重要的作用。目前, 基于流式细胞术的淋巴细胞亚群检测已被广泛应用于血液肿瘤患者的免疫状态评估、疾病复发或转移风险预测及治疗指导等方面。为了更加深刻地认识淋巴细胞亚群检测在血液肿瘤中的临床价值, 加强其检测过程中的质量管理, 促进其规范地应用于临床, 中国医药质量管理协会医学检验质量管理专业委员会牵头组织国内血液肿瘤诊疗领域多位检验及临床专家, 发表了《淋巴细胞亚群检测在血液肿瘤中应用的专家共识》。该解读对该共识进行简要说明, 供我国血液肿瘤诊疗相关领域的工作者参考。

关键词: 淋巴细胞亚群; 调节性 T 淋巴细胞; 流式细胞术; 血液肿瘤; 共识; 解读

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.17.002 **中图法分类号:** R733

文章编号: 1673-4130(2023)17-2053-04 **文献标志码:** A

Interpretation of experts consensus on the application of lymphocyte subsets in hematologic malignancies^{*}

RAN Longrong, WU Xuelian, YANG Zailin[△]

Center of Blood Tumor, Chongqing University Cancer Hospital, Chongqing 400030, China

Abstract: Hematological malignancies are malignant tumors those originate from the hematopoietic system. Their occurrence, development and prognosis are closely related to patients' immune function, in which cellular immunity plays a particularly prominent role. At present, the detection of lymphocyte subsets based on flow cytometry (FCM) is widely used in immune status assessment, disease recurrence or metastasis risk prediction and treatment guidance of patients with hematological malignancies. In order to more deeply understand the clinical value of lymphocyte subsets detection in hematologic malignancies, strengthen the quality management in the detection process, and promote its standardized application in clinic, Professional Committee of Medical Laboratory Quality Management of China Quality Association for Pharmaceuticals organized a number of domestic laboratory and clinical experts in the field of hematological malignancies diagnosis and treatment published "Consensus of experts on the application of lymphocyte subsets in hematologic malignancies." This interpretation briefly explains the consensus, which can be used as a reference for practitioners in the field of diagnosis and treatment of hematologic malignancies in China.

Key words: lymphocyte subsets; regulatory T lymphocyte; flow cytometry; hematologic malignancies; consensus; interpretation

血液肿瘤是一类起源于造血系统的恶性肿瘤, 白血病、多发性骨髓瘤(MM)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)和霍奇金淋巴瘤(HL)等是临床常见的血液肿瘤类型^[1]。据资料显示, 在 2019 年全球新增血液肿瘤患者约 134.385 万例, 73.022 万人因其死亡, 是全球主要死亡原因之一^[2]。肿瘤发生、发展和转移与机体的免疫功能密切相关, 虽然基于流式细胞术(FCM)的淋巴细胞亚群检测已被广泛用于评估血液肿瘤患者的

免疫状态、预测疾病复发或转移风险及指导治疗等方面, 但依然存在认识不统一、应用不规范等问题。由中国医药质量管理协会医学检验质量管理专业委员会发表的《淋巴细胞亚群检测在血液肿瘤中应用的专家共识》(以下简称《共识》)^[3], 是国内首个关于淋巴细胞亚群检测在血液肿瘤中应用的专家共识, 其详细介绍了淋巴细胞亚群检测推荐的抗体组合、报告内容、检测过程中质量管理的要点, 总结了淋巴细胞亚

^{*} 基金项目: 中央高校基本科研业务费(2022CDJYGRH-001); 重庆市科卫联合医学科科研项目(2021MSXM272)。

[△] 通信作者, E-mail: 804728092@qq.com。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230824.1724.008.html\(2023-08-25\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230824.1724.008.html(2023-08-25))

群对血液肿瘤筛查、复发及合并感染预警、预后评估、造血干细胞移植(HSCT)后免疫重建与移植抗宿主病(GVHD)监测、嵌合抗原受体 T 淋巴细胞(CAR-T)免疫治疗后监测、用药指导与疗效监测等方面的应用价值,并对血液肿瘤患者的监测方案与随访时机选择做出了推荐。现对该《共识》作一解读,以期望更好地应用于临床。

1 淋巴细胞亚群检测的报告内容与质量管理

淋巴细胞亚群检测是临床开展最广泛的 FCM 检测项目之一,是利用各种荧光染料标记的单克隆抗体测定各类淋巴细胞胞膜或胞内的分化抗原(CD),从而对淋巴细胞的各个亚群进行分析。原国家卫生部在 2011 年发布的(WS/T 360-2011)《流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南》对于规范 FCM 在外周血淋巴细胞亚群分析中的应用具有重要指导意义^[4]。常规检测的淋巴细胞亚群包括 T 淋巴细胞(CD3⁺)、B 淋巴细胞(CD3⁻CD19⁺)和 NK 淋巴细胞 CD3⁻(CD16+CD56)⁺,T 淋巴细胞又分为辅助性 T 淋巴细胞(CD3⁺CD4⁺)及杀伤性 T 淋巴细胞(CD3⁺CD8⁺),以上细胞统称为 TBNK;CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}的调节性 T 淋巴细胞(Treg 细胞)是另一个重要的 T 细胞功能亚群,在该《共识》中,把 TBNK 和 Treg 细胞统称为淋巴细胞亚群。

《共识》推荐外周血淋巴细胞亚群检测的标本采用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝,并在 24 h 内进行检测。根据医疗机构条件的不同,既可以采用双平台法,也可以采用单平台法。双平台法应采用与 FCM 检测的同一标本进行白细胞计数和分类;单平台法既可以采用微球法,也可以采用体积法。推荐的 TBNK 检测抗体组合为 CD45、CD3、CD4、CD8、CD19、CD16、CD56;推荐的 Treg 细胞检测的抗体组合为 CD3、CD4、CD25、CD127;推荐每管获取淋巴细胞数应不小于 10 000 个;TBNK 检测推荐报告 CD3⁺T 淋巴细胞、CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞、CD3⁻CD19⁺B 淋巴细胞和 CD3⁻(CD16+CD56)⁺NK 细胞的相对计数(百分比)和绝对计数(绝对值),CD4⁺/CD8⁺比值,Treg 细胞检测推荐报告 Treg 细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞的百分比。在报告审核时应满足 CD3⁺%+CD19⁺%+(CD16+CD56)⁺%≈(100%±5%);CD4⁺%+CD8⁺%≈CD3⁺%(变化范围为 5%~10%),若不满足,必要时重复实验及标本推片镜检。

近年来,越来越多的文献报道了不同地区、不同种族、不同人群的淋巴细胞亚群参考范围^[5-9],《共识》推荐有条件的实验室应建立自己的参考区间及评价体系。实验室自建参考区间时,每组应不少于 120 例健康样本,参考区间验证应不少于 20 例健康样本,分

布在参考区间外的测定值应不超过 10%。开展淋巴细胞亚群检测的实验室均需参加国家卫生健康委员会或省市级临床检验中心组织的室间质评,从而保证实验室检测结果的准确性。Treg 细胞检测项目因为目前国内没有相应的室间质评,应进行实验室室间比对。

2 淋巴细胞亚群检测在血液肿瘤中的应用

血液肿瘤的发生、发展与免疫功能失衡有关,免疫功能在疾病和诊疗评价中发挥着重要的作用^[10-16]。淋巴细胞亚群检测可为临床对机体细胞免疫功能评价提供依据。该《共识》总结了淋巴细胞亚群检测对血液肿瘤 7 个方面的应用,为临床提供参考,其具体应用如下。

2.1 初筛血液肿瘤 对于部分由淋巴细胞来源的血液肿瘤,包括急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞增殖性疾病(CLPD)等可表现为特定外周血淋巴细胞亚群比例及表型异常^[16]。出现以下 3 种情况,在排除标本、实验操作及反应性改变等原因后,可考虑对血液肿瘤进行筛查:(1)当 B 淋巴细胞或 NK 淋巴细胞显著增高,在排除细菌感染及其他非肿瘤原因引起的淋巴细胞增高后,需考虑成熟 B 淋巴细胞增殖性疾病或 NK 细胞淋巴瘤可能;(2)若 CD3⁺CD4⁺CD8⁺T 淋巴细胞或 CD3⁺CD4⁻CD8⁻T 明显增高,在排除感染导致的反应性升高后需考虑 T 淋巴细胞肿瘤可能;(3)当 CD4⁺/CD8⁺比值大于 10:1 或小于 1:10,可辅助 CD4⁺T 淋巴细胞来源或 CD8⁺T 淋巴细胞来源的肿瘤诊断。

2.2 评估血液肿瘤患者复发、转移及预后 淋巴细胞亚群改变与血液肿瘤患者复发、转移及预后密切相关。有研究结果显示,Treg 细胞能抑制肿瘤微环境中有效的抗肿瘤反应,从而有利于肿瘤细胞的生长^[17]。Treg 细胞的数量和比例与患者的不良预后呈正相关^[18-22]。CD3⁺T、CD4⁺T、CD8⁺T 淋巴细胞的数量和比例增高与患者较好的预后相关。在急性髓系白血病(AML)患者中,NK 细胞数量和比例减低与患者较差的预后相关^[23]。NK 细胞数量减少的慢性淋巴细胞白血病(CLL)和 MM 患者可能预后较差,且发生感染的风险增加^[24-25]。

2.3 血液肿瘤合并感染风险预警 淋巴细胞亚群检测可以用于肿瘤患者感染风险预警。当 CD4⁺T 淋巴细胞绝对计数<500 个/微升时,患者机会性感染风险增加;淋巴瘤患者 CD4⁺T、CD8⁺T 淋巴细胞数量低下时,患者化疗后感染风险增加;初诊时 Treg 细胞比例增加的患者,住院期间感染率增加。

2.4 HSCT 后患者免疫重建的监测及 GVHD 的预防 HSCT 后造血能力的恢复与免疫功能密切相关。GVHD 是异基因 HSCT 后死亡的主要原因^[26],及时准确地判断患者免疫重建状态及是否发生排异反应

是移植成败的关键。HSCT 患者免疫重建过程中, NK 淋巴细胞数量恢复最快, $CD3^+CD8^+$ T 淋巴细胞数量恢复次之, $CD3^+CD4^+$ T 淋巴细胞数量恢复较慢, $CD3^-CD19^+$ B 淋巴细胞数量恢复时间不等, 短则 3 个月, 长则 1 年半以上。在 HSCT 早期 Treg 细胞比例很低, 晚期逐渐增多。研究表明, Treg 细胞随着 GVHD 等级的增加而呈下降趋势^[27], Treg 细胞有望作为预测急性和慢性 GVHD 的特异性指标^[28-29]。移植后 NK 细胞数量增加能促进大量炎症因子的分泌, 也可作为急性 GVHD 发生的预测标志物。

2.5 CAR-T 治疗患者的规范化管理和评估 针对 CAR-T 治疗患者, 推荐对患者外周血中 CAR-T 细胞和淋巴细胞亚群同时检测。有研究发现, CAR-T 细胞回输后第 15 天的外周血低水平的淋巴细胞数 ($<0.67 \times 10^9/L$) 与 CAR-T 治疗患者的预后呈负相关^[30]。另有研究显示, 体内 CAR-T 细胞增殖水平与疗效呈正相关^[31-33]。外周血 CAR-T 细胞检测时建议报告总 CAR-T 细胞占淋巴细胞、 $CD4^+$ CAR-T 细胞 (占 T 淋巴细胞) 和 $CD8^+$ CAR-T 细胞 (占 T 淋巴细胞) 的比例及数量。

2.6 指导 CD20 单抗和免疫调节药物的用药 在 CD20 单抗治疗的血液肿瘤患者中, 外周血 B 淋巴细胞数量与药物使用呈剂量依赖性, 若外周血 B 淋巴细胞数量未出现明显减少或无剂量依赖, 则提示患者对 CD20 单抗治疗反应差, 需考虑更换治疗方案。对免疫功能缺陷或严重受损的患者, 当 $CD4^+$ T 淋巴细胞数量 <100 个/微升时, 患者严重感染的概率增加, 建议停用免疫抑制药; 当 $CD4^+$ T 淋巴细胞数量 <200 个/微升时, 需注意免疫抑制药的剂量。对移植和免疫治疗患者, 当 $CD4^+/CD8^+$ 比值 <0.2 时, 建议停用免疫抑制药; $CD4^+/CD8^+$ 比值 <0.5 时, 需谨慎使用免疫抑制药, 并注意患者免疫功能状态及感染情况。在治疗期间合并感染的患者, 如果出现 NK 淋巴细胞或 $CD8^+$ T 淋巴细胞数量及比例较治疗前明显升高, 提示伴有病毒感染的可能。

2.7 动态监测及随访 《共识》强调了建立患者淋巴细胞亚群检测结果基线的重要性, 并建议规律、动态监测其变化趋势。建议有条件的单位, 可在报告中呈现结果动态变化的趋势图。对放化疗、免疫治疗、靶向治疗的患者, 推荐在初诊时、治疗周期动态监测淋巴细胞亚群变化, 评估患者治疗期间免疫功能恢复情况及肿瘤复发和转移及感染的风险情况。有条件的情况下, 建议可在治疗结束后半年内每 3 个月跟踪随访, 半年后每 6 个月进行随访。对造血干细胞移植治疗的患者在移植后第 14 天、21 天、1 个月、3 个月、6 个月、1 年、2 年进行监测与随访。对 CAR-T 治疗的患者, 应在患者回输 CAR-T 后, 连续监测第 4、7、14、

28 天的外周血淋巴细胞亚群的变化情况, 评估患者在治疗期间的免疫状态, 在治疗后 2、3、6 月随访患者的免疫功能状态。

3 淋巴细胞亚群检测在血液肿瘤患者中应用的挑战和展望

《共识》指出, 由于机体免疫功能受年龄、药物、感染、营养、生理等众多因素的影响, 存在较大的个体差异, 且机体免疫功能是动态变化的, 同一患者的不同疾病状态下淋巴细胞亚群检测结果也可能出现较大的波动。因此, 淋巴细胞亚群检测在参考范围的建立、报告结果解读等方面依然存在挑战。用于免疫功能评价的淋巴细胞亚群检测在临床已广泛开展, 《流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南》^[4] 是各级医疗机构及实验室开展淋巴细胞亚群项目检测最基本的参照依据。该《共识》一方面强调了淋巴细胞亚群检测实验操作、结果报告、结果分析的质量控制要点, 有助于提高实验室检测结果的准确性; 另一方面总结了淋巴细胞亚群检测在血液肿瘤中的临床价值, 并对血液肿瘤患者的监测方案与随访时机选择做出了推荐。《共识》推荐了淋巴细胞亚群检测在血液肿瘤应用中的规范模式, 有利于系统科学的监测及评估血液肿瘤患者的免疫功能状态, 可以帮助临床医生做出更加精准的诊疗决策, 使患者获益。

参考文献

- [1] DAMLAJ M, EL F R, HASHMI S K. Evolution of survivorship in lymphoma, myeloma and leukemia: metamorphosis of the field into long term follow-up care[J]. Blood Rev, 2019, 33: 63-73.
- [2] ZHANG N, WU J, WANG Q, et al. Global burden of hematologic malignancies and evolution patterns over the past 30 years[J]. Blood Cancer J, 2023, 13(1): 82.
- [3] 中国医药质量管理协会医学检验质量管理专业委员会. 淋巴细胞亚群检测在血液肿瘤中应用的专家共识[J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44(15): 1793-1802.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南: WS/T 360-2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [5] RUDOLF-OLIVEIRA R C, GONCALVES K T, MARTIGNAGO M L, et al. Determination of lymphocyte subset reference ranges in peripheral blood of healthy adults by a dual-platform flow cytometry method[J]. Immunol Lett, 2015, 163(1): 96-101.
- [6] WONG W S, LO A W, SIU L P, et al. Reference ranges for lymphocyte subsets among healthy Hong Kong Chinese adults by single-platform flow cytometry[J]. Clin Vaccine Immunol, 2013, 20(4): 602-606.
- [7] WEI B, GUO Y, ZHANG L, et al. Reference ranges of T lymphocyte subsets by single-platform among healthy

- population in southwest China[J]. BMC Immunol, 2021, 22(1):80.
- [8] XU K, MIAO L, CHEN W, et al. Establishment of the reference intervals of lymphocyte subsets for healthy Chinese Han adults and its influencing factors [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(19):1495.
- [9] LIU W, XU J, PU Q, et al. The reference ranges and characteristics of lymphocyte parameters and the correlation between lymphocyte parameters and routine health indicators in adults from China[J]. Immun Ageing, 2022, 19(1):42.
- [10] CHEN G, WU D, GUO W, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019[J]. J Clin Invest, 2020, 130(5):2620-2629.
- [11] SUN Y, DONG Y, WANG L, et al. Characteristics and prognostic factors of disease severity in patients with COVID-19: the Beijing experience[J]. J Autoimmun, 2020, 112:102473.
- [12] DIAO B, WANG C, TAN Y, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)[J]. Front Immunol, 2020, 11:827.
- [13] QIN C, ZHOU L, HU Z, et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China[J]. Clin Infect Dis, 2020, 71(15):762-768.
- [14] WAN S, YI Q, FAN S, et al. Relationships among lymphocyte subsets, cytokines, and the pulmonary inflammation index in coronavirus (COVID-19) infected patients [J]. Br J Haematol, 2020, 189(3):428-437.
- [15] WANG F, NIE J, WANG H, et al. Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia[J]. J Infect Dis, 2020, 221(11):1762-1769.
- [16] JOHNSON N A, BOYLE M, BASHASHATI A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma; reduced CD20 expression is associated with an inferior survival[J]. Blood, 2009, 113(16):3773-3780.
- [17] BEYER M, SCHULTZE J L. Regulatory T cells: major players in the tumor microenvironment[J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(16):1879-1892.
- [18] 张司琪, 葛健, 夏瑞祥. 急性白血病患者外周血 T 细胞亚群、NK 细胞和调节性 T 细胞的检测及临床意义[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(2):218-221.
- [19] 张丹阳, 田登梅, 冯超, 等. 慢性髓系白血病患者外周血 T 淋巴细胞亚群和 NK 细胞检测的临床意义[J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(1):22-25.
- [20] 陆春伟, 佟海侠, 陆美言. 急性白血病患者外周血淋巴细胞亚群和调节性 T 细胞的检测及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(11):2230-2233.
- [21] 王韧, 刘佩佳, 闫永毅. 外周血 T 淋巴细胞亚群在白血病病情监测及疗效判定中的检测价值[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(3):370-372.
- [22] 乔文斌. 弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者外周血 T 淋巴细胞亚群与 NK 细胞检测的临床意义[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学, 2011.
- [23] 张玉玲, 梁艳, 俞钟, 等. 成人急性白血病患者外周血 T 细胞亚群、NK 细胞动态监测[J]. 赣南医学院学报, 2020, 40(1):40-44.
- [24] WILLIAMS P, BASU S, GARCIA-MANERO G, et al. The distribution of T-cell subsets and the expression of immune checkpoint receptors and ligands in patients with newly diagnosed and relapsed acute myeloid leukemia [J]. Cancer, 2019, 125(9):1470-1481.
- [25] 宋斌, 万楚成, 张王刚, 等. 多发性骨髓瘤患者外周 T 淋巴细胞亚群和 NK 细胞比值与预后关系[J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 26(1):119-121.
- [26] SCHURCH C M, CARACCIO C, NOLTE M A. Diversity, localization, and (patho)physiology of mature lymphocyte populations in the bone marrow[J]. Blood, 2021, 137(22):3015-3026.
- [27] DIVITO S J, AASEBO A T, MATOS T R, et al. Peripheral host T cells survive hematopoietic stem cell transplantation and promote graft-versus-host disease [J]. J Clin Invest, 2020, 130(9):4624-4636.
- [28] MAGENAU J M, QIN X, TAWARA I, et al. Frequency of CD4(+)CD25(hi)FOXP3(+) regulatory T cells has diagnostic and prognostic value as a biomarker for acute graft-versus-host-disease[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2010, 16(7):907-914.
- [29] WANG W, HONG T, WANG X, et al. Newly Found Peacekeeper: Potential of CD8⁺ Tregs for Graft-Versus-Host Disease[J]. Front Immunol, 2021, 12:764786.
- [30] BANSAL R, NOVO M, AL S A, et al. Peak absolute lymphocyte count after CAR-T infusion predicts clinical response in aggressive lymphoma [J]. Am J Hematol, 2022, 97(7):E241-E244.
- [31] ZHANG J, HU Y, YANG J, et al. Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL[J]. Nature, 2022, 609(7926):369-374.
- [32] ZHANG X, LU X A, YANG J, et al. Efficacy and safety of anti-CD19 CAR T-cell therapy in 110 patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia with high-risk features [J]. Blood Adv, 2020, 4(10):2325-2338.
- [33] WESTIN J R, KERSTEN M J, SALLES G, et al. Efficacy and safety of CD19-directed CAR-T cell therapies in patients with relapsed/refractory aggressive B-cell lymphomas: observations from the JULIET, ZUMA-1, and TRANSCEND trials[J]. Am J Hematol, 2021, 96(10):1295-1312.