

不同预后骨髓增生异常综合征患者 T 淋巴细胞亚群的分析

赵越超 王 珺 胡慧瑾 叶宝东

摘 要 **目的** 检测和分析不同预后的 MDS 患者 T 淋巴细胞亚群的变化,以评估不同阶段 MDS 患者免疫状态,有助于进一步评估疾病风险预后,从而深入探讨 MDS 的免疫调节机制。**方法** 采用 FC-500 流式细胞仪对笔者医院 2017 年 9 月~2018 年 11 月 55 例 MDS 患者和 30 例正常对照组外周血标本进行 T 淋巴细胞亚群检测。**结果** 根据 IPSS-R 系统以及骨髓原始细胞比例将 55 例 MDS 患者分组分析发现,就 Treg 细胞而言,IPSS-R 分组中,高危组以及极高危组分别与中危组、低危组以及对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。而 NK 细胞比例则相反,随着 MDS 患者 IPSS-R 预后评分的升高,各组间自然杀伤细胞比例逐渐降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$);原始细胞比例 $\geq 5\%$ 组与原始细胞比例 $< 5\%$ 组比较,Treg 细胞比例明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而两组间 NK 细胞比例比较差异无统计学意义,尽管在数值上,NK 细胞表达水平仍呈现出下降趋势。**结论** MDS 患者预后危险评分越高,从数值上看,Treg 细胞比例越高,NK 细胞比例降低。Treg 细胞的升高以及 NK 细胞的减少可能与 MDS 的预后不良相关。

关键词 骨髓增生异常综合征 T 淋巴细胞亚群 Treg 细胞 自然杀伤细胞

中图分类号 R551.3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.10.027

Analysis of T Lymphocyte Subsets in Patients with Myelodysplastic Syndrome under Different Prognostic Stratification. Zhao Yuechao, Wang Jun, Hu Huijin, et al. First Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang 31006, China

Abstract **Objective** To detect and analysis the changes of T lymphocyte subsets in MDS patients with different prognosis risk levels to evaluate the immune status of MDS patients at different stages is more helpful to further evaluate the disease risk prognosis and further explore the immune regulation mechanism of MDS. **Methods** FC-500 flow cytometry was used to detect T lymphocyte subsets in peripheral blood samples of 55 MDS patients and 30 normal controls in our hospital from September 2017 to November 2018. **Results** According to IPSS-R system and the proportion of bone marrow blast cells, 55 MDS patients were grouped and analyzed again. For Treg cells, there were statistical differences for IPSS-R high risk group vs low risk or intermediate risk or control group, and very high risk group vs low risk or intermediate risk or control group ($P < 0.05$). However, the proportion of NK cells was reversed. With the increase of IPSS-R prognosis score in MDS patients, the proportion of natural killer cells among each group was gradually decreased, but the difference was not statistically significant. Compared with the group of the myeloblast counts $\geq 5\%$, the ratio of Treg cells in the group of myeloblast counts $< 5\%$ was significantly increased ($P < 0.05$), which was statistically significant. However, there was no significant difference in NK cell ratio between the two groups, although the expression level of NK cells still showed a downward trend numerically. **Conclusion** Numerically, the higher the prognosis risk score of MDS patients, the higher the proportion of Treg cells and the lower the proportion of NK cells. The increase of Treg cells and the decrease of NK cells may be associated with poor prognosis of MDS.

Key words Myelodysplastic syndrome; T lymphocyte subsets; Treg cells; Natural killer cell

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)是一组起源于造血干细胞的异质性髓系克隆性的恶性肿瘤,其特征是骨髓中一系或多系无效造血,外周血细胞减少,遗传不稳定,并具有发展为急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)的可

能。MDS 进展过程是以异质性的克隆性造血干细胞紊乱为中心,由低危 MDS 到高危 MDS 再到 AML,骨髓原始细胞比例逐渐增加,是恶性克隆逐渐扩增的过程^[1]。

近年来,大量与 MDS 临床表型相关的点突变被发现^[2,3]。这些突变有可能反映临床预后以及疾病进展^[4]。然而,目前 MDS 的免疫学因素尚不明确。但最近的临床和分子研究已经积累了关于不同免疫途径在 MDS 发病和进化中贡献的证据^[5,6]。其

基金项目:浙江中医药大学校级科研项目(2021JKGJYY002)

作者单位:310006 杭州,浙江中医药大学附属第一医院

通讯作者:王珺,电子信箱:xiaotulove@163.com

中细胞免疫失调在 MDS 发病及疾病进展中尤为重要。因此,进一步了解不同阶段的 MDS 患者的细胞免疫状态,可能有助于评估疾病风险预后,并指导选择有效的靶向治疗。目前临床诊疗中通常采用 IPSS(international prognosis scoring system)以及 IPSS-R(revised international prognosis scoring system)对患者进行预后危险程度评分以及分层治疗。因此,本研究旨在通过分析不同 IPSS-R 危险程度以及不同原始细胞比例的 MDS 患者 T 淋巴细胞亚群的变化,以评估不同阶段 MDS 患者免疫状态,为预测疾病进展提供免疫方面的预后因子,现报道如下。

对象与方法

1. 一般资料:选择笔者医院 2017 年 9 月~2018 年 11 月 MDS 患者 55 例(MDS 组),诊断标准参照 WHO 诊断分型^[7],选择同期健康供者 30 例作为对照组,详见表 1。根据 IPSS-R 评分系统将 MDS 患者分为低危组 14 例,中危组 23 例,高危组 14 例,极高危组 4 例;根据骨髓原始细胞百分比,再次将 MDS 患者分为原始细胞比例<5% 组 32 例以及原始细胞比例≥5% 组 23 例。

表 1 MDS 组与对照组一般资料比较($n, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	男性/女性	年龄(岁)
对照组	30	24/6	41.2 ± 7.9
MDS 组	55	36/16	61.0 ± 15.4

2. 方法:流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司的 FC 500,所用试剂单克隆抗体(McAb)为美国 Beckman Coulter 公司产品。将不同的 20μl 荧光单抗,分别加入 100μl 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝的新鲜外周血。避光室温放置 20min,甲酸裂解红细胞,4℃1200r/min 下离心收集细胞,弃上清,用 PBS 洗细胞两次,相同条件下离心,弃上清后,细胞悬浮在 500μl PBS 液中,上机检测,分析 10000 个细胞。采用 CD45-SSC 设门,ELITE4.5 软件分析数据[同时设立免疫球蛋白 G(IgG)及正常人为阴性对照]。其中 Treg 细胞分子标记为 CD4⁺、CD25⁺、CD127^{low/-},NK 细胞分子标记为 CD3⁻、CD16⁺、CD56⁺。

3. 统计学方法:应用 Graphpad Prism(version5.02)软件,对数据结果采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

根据 IPSS-R 评分系统以及骨髓原始细胞比例

这两个层面,将 55 例 MDS 组患者进行分组,比较各组 Treg 细胞及自然杀伤细胞(natural killer cell)的表达水平发现,越高危的 MDS 患者,其 Treg 细胞比例越高,自然杀伤(NK)细胞比例越低,IPSS-R 评分系统中,Treg 细胞的表达水平随着危险程度升高而升高,IPSS-R 高危组以及极高危组与中危组、低危组、对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。而 NK 细胞比例则相反,随着 MDS 患者 IPSS-R 预后评分的升高,各组间自然杀伤细胞比例逐渐降低,但 MDS 患者各组间比较,差异无统计学意义(表 2)。

表 2 IPSS-R 各组与对照组 Treg 细胞及 NK 细胞表达比例($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Treg(%)	NK 细胞(%)
正常对照组	30	5.72 ± 1.63	16.39 ± 6.65
低危组	14	4.76 ± 2.07	14.99 ± 10.44
中危组	23	5.77 ± 3.18	11.87 ± 9.19
高危组	14	7.93 ± 2.66 ^{*##Δ}	11.58 ± 7.66
极高危组	4	9.22 ± 2.49 ^{*##Δ}	6.99 ± 5.20

与正常对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与低危组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与中危组比较,^Δ $P < 0.05$

原始细胞比例高的 MDS 患者,其 Treg 细胞比例较高,NK 细胞比例较低,根据骨髓原始细胞百分比,<5% ($n = 32$)、≥5% ($n = 23$)将患者分为两组,比较两组患者 Treg 细胞以及 NK 细胞比例。结果显示,原始细胞比例≥5% 组与原始细胞比例<5% 组以及对照组比较,Treg 细胞比例明显升高($P < 0.05$),差异有统计学意义。同时,原始细胞比例≥5% 组与对照组比较,NK 细胞比例明显减少($P < 0.05$),差异有统计学意义。但不同原始细胞比例的两组间 NK 细胞比例比较,差异无统计学意义(表 3)。

表 3 不同原始细胞比例组与对照组 Treg 细胞及 NK 细胞表达比例($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Treg(%)	NK 细胞(%)
正常对照组	30	5.72 ± 1.63	16.39 ± 6.65
原始细胞比例<5%	32	5.63 ± 3.30	13.65 ± 10.48
原始细胞比例≥5%	23	7.79 ± 2.91 ^{***}	10.12 ± 6.16 [*]

与正常对照组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与原始细胞比例<5% 组比较,[#] $P < 0.05$

讨 论

不同免疫细胞群对 MDS 的影响一直是被研究的重要因素。其中,Treg 细胞是构成辅助 T 细胞的一个特殊亚群。他们不仅参与诱导免疫耐受,而且有

助于调节免疫反应的强度。多项研究证实 Treg 参与调控抗肿瘤免疫和 MDS 的进展^[8,9]。并且有研究表明 Treg 细胞的绝对数量可以作为低危 MDS 预后因子,帮助预测贫血的严重报告,AML 转化率以及总体生存率^[10]。随着 MDS 发展到高危期和晚期,Treg 细胞的扩增可能有助于突变 MDS 克隆逃避适应性免疫^[11]。同时有多项研究指出,低危 MDS 患者的 Tregs 数量降低,而高危的 MDS 患者 Tregs 活性增强,并且增强了白血病克隆增殖^[10,12,13]。另外,NK 细胞在 MDS 免疫失调中的作用是由于 NK 细胞总数或功能的减少导致免疫监视缺陷,从而导致疾病进展^[14]。有研究指出,MDS 患者外周血 NK 细胞数量减少且功能受损,进而造成免疫监测受损,导致疾病进展及提示预后不良^[15,16]。并且在一项涉及 48 例高危 MDS 患者的研究中发现,NK 细胞针对肿瘤细胞的细胞毒功能下降,其受损程度与代表疾病负荷的因素相关,如更高的 IPSS 评分,异常染色体核型以及原始细胞数^[17]。尽管 MDS 患者通常伴有淋巴细胞减少,但细胞免疫在低危 MDS 中通常为上调状态,这些患者表现为较高的细胞毒性(CD8⁺) T 细胞和较低的调节性 T 细胞(Tregs)^[18,19]。相比之下,高危 MDS 患者表现为细胞反应受损状态,通常 CD8⁺ T 细胞和自然杀伤(NK)细胞水平较低,Treg 细胞数量较高^[20]。因此,Treg 细胞及 NK 细胞有可能成为监测疾病进展以及提示预后不良的重要指标。

本研究中为明确不同预后分层的 MDS 患者间其 Treg 细胞的表达水平,笔者根据 IPSS-R 系统以及骨髓原始细胞比例将 55 例 MDS 患者分组,结果呈现出 MDS 患者预后危险评分越高 Treg 细胞比例越高的趋势,但是 IPSS-R 各组分 NK 细胞比例比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。从平均值上看,各组 NK 细胞的表达水平是有区别的,如果增加样本量,相信两组间比较差异有统计学意义。同时,原始细胞比例 $\geq 5\%$ 组与原始细胞比例 $< 5\%$ 组比较,Treg 细胞比例明显升高,而两组间 NK 细胞比例比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。但在数值上,NK 细胞表达水平仍呈现出下降趋势。这也进一步提示 Treg 细胞的升高以及 NK 细胞的减少可能与 MDS 的预后不良相关。因为两者均能引起免疫监视的缺失,从而导致疾病进展。

目前用于预测 MDS 预后的因素反映了骨髓发育不良克隆固有的渐进变化,包括骨髓形态学、细胞遗传学、突变、输血依赖、细胞减少的数量、年龄和其他并发症。新的模型,如 MDAS,通过增加年龄、ECOG

评分、以及血细胞计数的加权贡献,成功地提高了预测精度^[21-23]。然而,这些因素都不能反映可能影响疾病的免疫参数的渐进变化^[10]。然而 Treg 的增加以及 NK 细胞的减少,可能反映了活跃的免疫抑制,表明免疫抑制微环境的转化,为疾病诊治进展提供免疫学证据。因此,通过监测 Treg 细胞及 NK 细胞的变化,来监测不同阶段的 MDS 患者的免疫状态,更有助于进一步评估疾病风险预后以及疾病进展,并指导选择有效的靶向治疗。

参考文献

- 1 刘菲,张连生,李莉娟.骨髓增生异常综合征患者 T 淋巴细胞亚群的变化[J].中华临床医师杂志:电子版,2014,8(6):1155-1157
- 2 Kim E, Ilagan JO, Liang Y, *et al*. SRSF2 mutations contribute to myelodysplasia by mutant-specific effects on exon recognition[J]. Cancer Cell, 2015, 27(5): 617-630
- 3 Aslan D, Garde C, Nygaard MK, *et al*. Tumor suppressor microRNAs are downregulated in myelodysplastic syndrome with spliceosome mutations[J]. Oncotarget, 2016, 7(9): 9951-9963
- 4 Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, *et al*. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts[J]. N Engl J Med, 2011, 365(15): 1384-1395
- 5 Fozza C, Longinotti M. Are T-cell dysfunctions the other side of the moon in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes? [J]. Eur J Haematol, 2012, 88(5): 380-387
- 6 Fozza C, Longinotti M. The role of T-cells in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: passengers and drivers[J]. Leukemia Res, 2013, 37(2): 201-203
- 7 中华医学会血液学分会.骨髓增生异常综合征中国诊断与治疗指南(2019年版)[J].中华血液学杂志,2019,40(2):89-97
- 8 Claude L, Yuenv W, Carmen A. Bone marrow immunity and myelodysplasia[J]. Front Oncol, 2016, 6: 172
- 9 Hamdi W, Ogawara H, Handa H, *et al*. Clinical significance of regulatory T cells in patients with myelodysplastic syndrome[J]. Eur J Haematol, 2010, 82(3): 201-207
- 10 Mailloux AW, Sugimori C, Komrokji RS, *et al*. Expansion of effector memory regulatory T cells represents a novel prognostic factor in lower risk myelodysplastic syndrome[J]. J Immunol, 2012, 189(9): 4199
- 11 Matos A, Magalhes S, Rauh MJ. Immune dysregulation and recurring mutations in myelodysplastic syndromes pathogenesis[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2020
- 12 Kotsianidis I, Bouchliou I, Nakou E, *et al*. Kinetics, function and bone marrow trafficking of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in myelodysplastic syndromes (MDS) [J]. Leukemia, 2009, 23(3): 510-518
- 13 Cong W, Yan Y, Gao S, *et al*. Immune dysregulation in myelodysplastic syndrome: clinical features, pathogenesis and therapeutic strategies[J]. Crit Rev Oncol/Hematol, 2018, 122: 123

(转第 82 页)

统计学意义 ($P < 0.05$), 说明大鼠的学习记忆能力受到影响, 但这也不能完全排除可能是由于缺碘或高碘导致子代大鼠出现甲状腺功能减退而致心率变慢、代谢减少、行动能力下降, 从而逃避潜伏期延长。空间探索实验显示, SID 组和 SIE 组较 NI 组有效区域运动时间短, 同时各组穿过目标象限的次数均比 NI 组少, 均提示孕期不同程度的碘缺乏和碘过量都会对子代学习记忆能力产生影响。

关于孕期轻度碘缺乏对子代神经发育影响的报道各有差异, 也是学者们的研究热点。本研究提示孕期不同程度碘缺乏对子代学习记忆能力产生一定的影响, 同聂珺妍等^[11]的研究结果一致, 其中严重缺碘组对子代大鼠运动能力产生一定的损伤, 但其余各组未发现明显的损伤作用。已有大量研究证实, 高碘暴露会损害认知功能^[12,13]。本实验中碘过量 1 组和碘过量 2 组均未对子代大鼠运动能力有明显的损伤, 但学习记忆能力产生了明显影响, 这可能是由于各研究中定义高碘的碘酸钾的剂量各不相同, 本次研究只能提示超过碘适宜的 10 倍和 50 倍的碘摄入剂量未对子代的运动能力产生损伤, 但对学习记忆能力产生影响。综合实验结果, 碘缺乏和碘过量均会引起不同程度的神经发育障碍, 表现为运动能力和学习记忆能力的下降, 其中学习记忆能力较为明显, 为孕期碘缺乏和碘过量致子代大鼠神经发育的影响提供了依据。

参考文献

- Vancamp P, Darras VM. Dissecting the role of regulators of thyroid hormone availability in early brain development: merits and potential of the chicken embryo model[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 459: 71-78
- Selma D'Silva. Immune dysregulation in MDS: the role of cytokines and immune cells[M]. London: IntechOpen, 2019
- Hejazi M, Manser AR, Frobel J, et al. Impaired cytotoxicity associated with defective natural killer cell differentiation in myelodysplastic syndromes[J]. *Haematologica*, 2015, 100(5): 643-652
- Aggarwal N, Swerdlow SH, Teneyck SP, et al. Natural killer cell (NK) subsets and NK-like T-cell populations in acute myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes[J]. *Cytometry Part B Clin Cytometry*, 2015, 90(4): 349-357
- Epling-Burnette PK, Bai F, Painter JS, et al. Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors[J]. *Blood*, 2007, 109(11): 4816-4824
- Fozza C, Contini S, Galleu A, et al. Patients with myelodysplastic syndromes display several T-cell expansions, which are mostly polyclonal in the CD4⁺ subset and oligoclonal in the CD8⁺ subset[J]. *Exp Hematol*, 2009, 37(8): 947-955
- Lopes MR, Traina F, Campos PDM, et al. IL10 inversely correlates

- Morreale de Escobar G, Obregon MJ, Escobar del Rey F. Role of thyroid hormone during early brain development[J]. *Eur J Endocrinol*, 2004, 151(Suppl 3): 25-37
- Dong J, Yin H, Liu W, et al. Congenital iodine deficiency and hypothyroidism impair LTP and decrease C-fos and C-jun expression in rat hippocampus[J]. *Neurotoxicology*, 2005, 26(3): 417-426
- Bath SC. The effect of iodine deficiency during pregnancy on child development[J]. *Proc Nutr Soc*, 2019, 78(2): 150-160
- 郭玉熹, 黄文丽. 微量元素碘与人体健康的关系[J]. *国外医学: 医学地理分册*, 2014, 35(1): 64-68
- Sang Z, Wei W, Zhao N, et al. Thyroid dysfunction during late gestation is associated with excessive iodine intake in pregnant women[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(8): 1363-1369
- Yang L, Li M, Liu X, et al. Evaluation of iodine nutritional status among pregnant women in China[J]. *Thyroid*, 2020, 30(3): 443-450
- Wang Y, Han J, Chen X, et al. Maternal iodine supplementation improves motor coordination in offspring by modulating the mGluR1 signaling pathway in mild iodine deficiency-induced hypothyroxinemia rats[J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 58: 80-89
- Zhang L, Teng W, Liu Y, et al. Effect of maternal excessive iodine intake on neurodevelopment and cognitive function in rat offspring[J]. *BMC Neurosci*, 2012, 13(1): 121
- 王凌之, 于林玉, 刘洪亮, 等. 长期碘氟联合染毒对大鼠学习记忆的影响[J]. *环境与健康杂志*, 2016, 33(4): 300-303
- 聂珺妍, 张斌, 赵阳, 等. 饮水高碘对雄性子代大鼠学习记忆能力及海马神经细胞自噬的影响[J]. *环境与健康杂志*, 2018, 35(1): 1-5
- 高童宁, 张祖山, 崔玉山, 等. 高碘致发育期大鼠学习记忆能力及海马神经组织凋亡的影响[J]. *环境与健康杂志*, 2019, 36(11): 962-966
- 金美慧, 周正, 张黎, 等. 不同碘水平对 EAT 大鼠后代脑组织发育及行为学的影响[J]. *中华地方病学杂志*, 2020, 39(7): 469-476

(收稿日期: 2021-03-23)

(修回日期: 2021-05-08)

(接第 127 页)

- with the percentage of CD8⁺ cells in MDS patients[J]. *Leukemia Res*, 2013, 37(5): 541-546
- Kordasti SY, Ingram W, Hayden J, et al. CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS)[J]. *Blood*, 2007, 110(3): 847-850
- Kantarjian H, O'Brien S, Ravandi F, et al. Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System[J]. *Cancer*, 2010, 113(6): 1351-1361
- Kao JM, Mcmillan A, Greenberg PL. International MDS risk analysis workshop (IMRAW)/IPSS reanalyzed: impact of cytopenias on clinical outcomes in myelodysplastic syndromes[J]. *Am J Hematol*, 2010, 83(10): 765-770
- Komrokji RS, Corrales - Yezpe M, Ali NA, et al. Validation of the MD anderson prognostic risk model for patients with myelodysplastic syndrome[J]. *Cancer*, 2012, 118(10): 2659-2664

(收稿日期: 2021-04-04)

(修回日期: 2021-05-08)