

AML 不同疾病阶段患者 T 细胞耗竭及相关细胞因子表达水平实验研究

萧杏贤, 刘 德, 姜朝晖 (江门市中心医院血液内科, 广东江门 529000)

摘要: **目的** 探讨急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 不同疾病阶段患者 T 细胞耗竭 (T cell exhaustion, Tex) 及相关细胞因子的表达水平。**方法** 选择 2017 年 2 月~2020 年 6 月接受治疗的 AML 患者 120 例, 同期选择 60 例体检健康者为对照组 (HC 组)。根据 AML 不同疾病阶段患者可分为初诊 (initial diagnosis, ND) 45 例、完全缓解 (complete remission, CR) 35 例、未缓解 (non-remission, NR) 24 例和复发 (recurrence, HR) 16 例, 采用流式细胞仪检测各组外周血和骨髓不同免疫检查点 Tex (PD1⁺TIM-3⁺T, PD1⁺T 和 TIM-3⁺T), IL-2 和 IFN- γ 细胞因子的表达水平。**结果** AML 不同疾病阶段患者外周血和骨髓中 CD4⁺PD1⁺TIM-3⁺T 和 CD8⁺PD1⁺TIM-3⁺T 细胞水平均高于 HC 组 ($F=9.149, 6.068, 3.438, 4.807$, 均 $P < 0.001$), CR 患者外周血和骨髓中 CD4⁺PD1⁺TIM-3⁺T 细胞 ($t=6.320, 8.841, 37.420$, 均 $P < 0.001$) 和 CD8⁺PD1⁺TIM-3⁺T 细胞 ($t=5.417, 6.096, 12.610$, 均 $P < 0.001$) 水平均明显低于 ND, NR 和 HR 患者, 差异均有统计学意义。AML 患者外周血和骨髓中 CD8⁺PD1⁺TIM-3⁺T 细胞数明显高于 CD4⁺PD1⁺TIM-3⁺T 细胞数 ($t=8.227, 7.289$, 均 $P < 0.001$), 且 ND 患者骨髓 CD4⁺PD1⁺TIM-3⁺T 和 CD8⁺PD1⁺TIM-3⁺T 细胞水平明显高于外周血 ($t=6.297, 7.527$, 均 $P < 0.001$), 差异均有统计学意义。ND 患者外周血和骨髓中 CD4⁺PD1⁺T 和 CD8⁺PD1⁺T 细胞水平明显高于 HC 患者 ($F=13.810, 8.029, 7.541, 10.540$, 均 $P < 0.001$), CR 患者外周血和骨髓中 CD4⁺PD1⁺T 细胞 ($t=4.576, 3.164, 5.625$, 均 $P < 0.001$) 和 CD8⁺PD1⁺T 细胞 ($t=5.293, 3.091, 5.091$, 均 $P < 0.001$) 明显低于 ND 和 HR 患者, 差异均有统计学意义。AML 患者外周血和骨髓中 CD4⁺TIM-3⁺T 和 CD8⁺TIM-3⁺T 细胞水平明显高于 HC 组 ($F=24.230, 9.101, 16.010, 12.540$, 均 $P < 0.001$), 且 CR 患者中 CD4⁺TIM-3⁺T 和 CD8⁺TIM-3⁺T 细胞水平明显低于 HR 组 ($t=3.986, 4.621$, 均 $P < 0.001$), 差异均有统计学意义; HR 患者外周血和骨髓中 PD1⁺T 细胞和 TIM-3⁺T 细胞所产生的 IL-2 和 IFN- γ 细胞因子明显低于 HC 组和 ND 患者 ($F=6.218, 5.925, 5.841, 5.017$, 均 $P < 0.001$)。 **结论** AML 不同疾病阶段患者的外周血和骨髓中 Tex 动态变化与其临床特点、缓解复发及预后密切相关。

关键词: 急性髓系白血病; T 细胞耗竭; 细胞因子

中图分类号: R557; R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 03-138-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.03.029

Experimental Study on T Cell Exhaustion and Related Cytokine Expression Levels in Patients with AML at Different Disease Stages

XIAO Xing-xian, LIU De, JIANG Zhao-hui

(Department of Hematology, Jiangmen Central Hospital, Guangdong Jiangmen 529000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression levels of T cell exhaustion (Tex) and related cytokines in patients with acute myeloid leukemia (AML) at different disease states. **Methods** 120 patients with AML who received treatment from February 2017 to June 2020 were selected, and 60 healthy subjects were selected as control group (HC group) during the same period. AML patients at different disease states were divided into initial diagnosis (ND) 45 cases, complete remission (CR) 35 cases, non-remission (NR) 24 cases, and recurrence (HR) 16 cases, respectively, the expression levels of Tex expression levels (PD1⁺TIM-3⁺T, PD1⁺T and TIM-3⁺T), IL-2 and IFN- γ cytokines were detected by flow cytometry at different immune checkpoints in each group. **Results** CD4⁺PD1⁺TIM-3⁺T and CD8⁺PD1⁺TIM-3⁺T cells levels in peripheral blood and bone marrow of patients with different disease stages of AML were higher than those in HC group ($F=9.149, 6.068, 3.438, 4.807$, all $P < 0.001$). CD4⁺PD1⁺TIM-3⁺T ($t=6.320, 8.841, 37.420$, all $P < 0.001$) and CD8⁺PD1⁺TIM-3⁺T ($t=5.417, 6.096, 12.610$, all $P < 0.001$) cells levels in peripheral blood and bone marrow of patients with CR were significantly lower than those of patients with ND, NR and HR, the differences were statistically significant, respectively. CD4⁺PD1⁺TIM-3⁺T cells in peripheral blood and bone marrow were significantly higher than CD4⁺PD1⁺TIM-3⁺T cells ($t=8.227, 7.289$, all $P < 0.001$), and CD4⁺PD1⁺TIM-3⁺T and CD8⁺PD1⁺TIM-3⁺T cells levels in bone marrow of newly diagnosed AML patients were significantly

基金项目: 2018 年度江门市科技计划项目 (编号: 2018A025)。

作者简介: 萧杏贤 (1981-), 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事血液病免疫治疗相关研究, E-mail: baiyun133121@163.com。

higher than those in peripheral blood ($t=6.297, 7.527$, all $P < 0.001$), the differences were statistically significant, respectively. $CD4^+PD1^+T$ and $CD8^+PD1^+T$ cells in peripheral blood and bone marrow of ND patients were significantly higher than those in HC patients ($F=13.810, 8.029, 7.541, 10.540$, all $P < 0.001$), $CD4^+PD1^+T$ cells in peripheral blood and bone marrow of patients with CR ($t=4.576, 3.164, 5.625$, all $P < 0.001$) and $CD8^+PD1^+T$ cells ($t=5.293, 3.091, 5.091$, all $P < 0.001$) were significantly lower than those in ND and HR group, the differences were statistically significant, respectively. The levels of $CD4^+TIM-3^+T$ and $CD8^+TIM-3^+T$ cells in peripheral blood and bone marrow of AML patients were significantly higher than those of HC patients ($F=24.230, 9.101, 16.010, 12.540$, all $P < 0.001$), and $CD4^+TIM-3^+T$ and $CD8^+TIM-3^+T$ cells in CR patients were significantly lower than those in HR group ($t=3.986, 4.621$, all $P < 0.001$), the differences were statistically significant, respectively. The IL-2 and IFN- γ cytokines secretion of $PD1^+T$ and $TIM-3^+T$ cells levels in peripheral blood and bone marrow of HR patients were significantly lower than those of HC group and ND patients ($F=6.218, 5.925, 5.841, 5.017$, all $P < 0.001$). **Conclusion** Tex dynamic changes in peripheral blood and bone marrow at different disease states were closely related to clinical characteristics, remission of recurrence and prognosis of AML patients.

Keywords: acute myeloid leukemia; T cell depletion; cytokines

骨髓微环境中存在着促进肿瘤生长而抑制肿瘤免疫应答的T细胞亚群,包括调节性T细胞(T cell regulatory, Tre)和耗竭性T细胞(T cell exhaustion, Tex)。T细胞耗竭主要是T细胞逐渐丧失功能,表现为高表达免疫位点[程序性细胞死亡1(PD1)、黏液蛋白域3(TIM-3)、淋巴细胞激活基因3(LAG-3)等]对抗原的免疫应答能力下降,可导致T细胞迁移、增殖、趋化和细胞杀伤能力下降^[1-6]。研究表明,在肿瘤免疫应答过程中,抗原特异性T细胞逐渐出现耗竭状态,分化为Tex,削弱对肿瘤的免疫监视、应答及杀伤作用,促进肿瘤的发生发展^[1,6]。目前关于急性髓系白血病患者(acute myeloid leukemia, AML)中Tex水平及预后研究较少,尤其是AML患者不同疾病阶段下Tex的水平变化,而探讨AML免疫位点的Tex表达水平有助于了解肿瘤的免疫逃逸机制和寻找精准的免疫治疗靶点。本研究拟探讨AML不同疾病阶段患者的Tex水平及预后分析,有助于预测白血病患者治疗疗效及预后,为寻求免疫治疗靶点提供重要的临床证据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集2017年2月~2020年6月接受治疗的AML患者120例,其中男性68例,女性52例,平均年龄 32.6 ± 9.4 岁;包括急性粒细胞白血病微分化型患者3例,急性粒细胞白血病未分化型患者18例,急性粒细胞白血病部分分化型患者54例,急性早幼粒细胞白血病患者2例,急性粒单核细胞白血病患者20例,急性单核细胞白血病患者23例。AML诊断符合2016年WHO髓系肿瘤和急性白血病诊断标准。根据疾病不同阶段及治疗效果分为初诊组45例(ND组)、完全缓解组35例(CR组)、未缓解组24例(NR组)和复发组16例(HR组)。选择同期60例体检健康者为健康对照组(HC组),男性39例,女性21例,平

均年龄 31.5 ± 8.5 岁。AML组与对照组在年龄、性别等一般临床资料上差异无统计学意义($P>0.05$)。

纳入标准: 年龄 ≥ 18 岁,经血细胞计数及骨髓涂片确诊为AML患者,1月前未接受相关治疗的患者。

排除标准: 并发严重感染、脏器功能不全或并发其他血液性疾病者;近6个月内接受放化疗和免疫抑制剂治疗者。本研究通过我院伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 BD Accuri C6 Plus型流式细胞仪(美国BD公司),PD-1⁺,TIM-3⁺,IL-2⁺,IFN- γ ⁺,CD4⁺T,CD8⁺T抗体(美国BD公司)。

1.3 方法

1.3.1 耗竭性T细胞流式细胞检测: 收集研究对象的外周血,骨髓穿刺抽取骨髓5~10 ml。分离外周血单个核细胞,加入含有10 ml/dl胎牛血清的RPMI-1640培养液中培养。取 10^6 个细胞,加入1 ml/dl多聚甲醛固定细胞后,离心去上清加入流式缓冲液,置于5 ml流式管中,分别加入PD-1⁺,TIM-3⁺,IL-2⁺,IFN- γ ⁺,CD4⁺T,CD8⁺T抗体(购自美国BD公司)孵育30 min,漂洗后于室温避光下孵育30 min,流式缓冲液漂洗3次,400 g离心5 min,弃上清加入流式缓冲液200 μ l,在BD Accuri C6 Plus型流式细胞仪进行检测,记录各Tex细胞的绝对计数和百分比。

1.3.2 分组标准: 根据AML患者疗效评判标准^[5]:初诊患者(ND):初次接受治疗的AML患者;完全缓解(CR):骨髓液显示原粒细胞 $\leq 5\%$,巨核细胞及红细胞数量正常。外周血分类无白血病细胞,血细胞计数血红蛋白(Hb) >100 g/L,中性粒细胞 $>1.5 \times 10^9/L$,血小板计数 $>100 \times 10^9/L$;无白血病细胞浸润的临床症状及体征;未缓解(NR):AML患者接受治疗后骨髓象和外周血象指标及临床症状未见改善;血液学复发(HR):在患者完全获得

缓解后外周血中又出现白血病细胞或髓系原始细胞>5%。

1.3.3 观察指标 比较AML患者不同疾病阶段(ND, CR, NR, HR)和HC者的外周血和骨髓中不同免疫检查点Tex表达水平(PD1⁺TIM-3⁺T, PD1⁺T和TIM-3⁺T)及IL-2和IFN- γ 细胞因子分泌情况。

1.4 统计学分析 采用SPSS21.0软件进行统计学分析,计量资料采用均数 \pm 标准差表示($\bar{x}\pm s$),多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用Bonferroni法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组间PD1⁺TIM-3⁺T细胞水平 见表1。流式细胞术结果显示,AML不同疾病阶段患者外周血和

骨髓中CD4⁺PD1⁺TIM-3⁺T和CD8⁺PD1⁺TIM-3⁺T水平高于HC组($F=9.149, 6.068, 3.438, 4.807$, 均 $P<0.001$)。CR患者外周血和骨髓中CD4⁺PD1⁺TIM-3⁺T细胞($t=6.320, 8.841, 37.420; 18.221, 8.216, 30.176$, 均 $P<0.001$)和CD8⁺PD1⁺TIM-3⁺T细胞($t=5.417, 6.096, 12.610; 5.201, 6.034, 10.874$, 均 $P<0.001$)水平明显低于ND, NR和HR患者,差异均有统计学意义。AML患者外周血和骨髓中CD8⁺PD1⁺TIM-3⁺T细胞数明显高于CD4⁺PD1⁺TIM-3⁺T细胞数($t=8.227, 7.289$, 均 $P<0.001$),且ND患者骨髓中CD4⁺PD1⁺TIM-3⁺T和CD8⁺PD1⁺TIM-3⁺T细胞水平明显高于外周血($t=6.297, 7.527$, 均 $P<0.001$),差异均有统计学意义。

表1 各组间PD1⁺TIM-3⁺T细胞水平比较 [$(\bar{x}\pm s)\%$]

| 项目 | n | 外周血 | | 骨髓 | |
|----|----|--|--|--|--|
| | | CD4 ⁺ PD1 ⁺ TIM-3 ⁺ T | CD8 ⁺ PD1 ⁺ TIM-3 ⁺ T | CD4 ⁺ PD1 ⁺ TIM-3 ⁺ T | CD8 ⁺ PD1 ⁺ TIM-3 ⁺ T |
| ND | 45 | 2.24 \pm 0.43 | 4.35 \pm 1.24 | 5.38 \pm 1.62 | 8.89 \pm 1.86 |
| CR | 35 | 1.45 \pm 0.52 | 3.22 \pm 0.70 | 2.25 \pm 1.12 | 6.64 \pm 2.28 |
| NR | 24 | 2.75 \pm 0.85 | 5.21 \pm 1.08 | 5.94 \pm 2.19 | 9.03 \pm 2.91 |
| HR | 16 | 7.74 \pm 1.06 | 8.95 \pm 1.41 | 10.39 \pm 2.03 | 12.62 \pm 3.74 |
| HC | 60 | 0.48 \pm 0.21 | 0.87 \pm 0.35 | 0.71 \pm 0.27 | 1.15 \pm 0.54 |

2.2 各组间PD1⁺T细胞水平 见表2。ND患者外周血和骨髓CD4⁺PD1⁺T和CD8⁺PD1⁺T细胞水平明显高于HC组($F=13.810, 8.02, 7.541, 10.540$, 均 $P<0.001$)。CR患者外周血和骨髓中CD4⁺PD1⁺T细胞($t=4.576, 3.164, 5.625; 5.012, 4.012, 4.783$, 均 $P<0.001$)和CD8⁺PD1⁺T细胞($t=5.293, 3.091, 5.091; 6.012, 2.897, 4.907$, 均 $P<0.001$)明显低于ND, NR和HR患者,差异均有统计学意义。

表2 各组间PD1⁺T细胞水平比较 [$(\bar{x}\pm s)\%$]

| 项目 | n | 外周血 | | 骨髓 | |
|----|----|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | | CD4 ⁺ PD1 ⁺ T | CD8 ⁺ PD1 ⁺ T | CD4 ⁺ PD1 ⁺ T | CD8 ⁺ PD1 ⁺ T |
| ND | 45 | 33.79 \pm 9.52 | 40.19 \pm 8.75 | 42.49 \pm 7.54 | 46.26 \pm 12.25 |
| CR | 35 | 27.99 \pm 6.83 | 31.51 \pm 8.24 | 32.64 \pm 7.89 | 35.24 \pm 7.91 |
| NR | 24 | 34.07 \pm 6.76 | 35.24 \pm 10.37 | 39.08 \pm 7.84 | 41.48 \pm 12.22 |
| HR | 16 | 38.51 \pm 3.85 | 39.67 \pm 5.89 | 44.54 \pm 7.60 | 47.47 \pm 10.55 |
| HC | 60 | 0.48 \pm 0.25 | 6.23 \pm 2.38 | 6.18 \pm 2.44 | 8.11 \pm 2.57 |

表3 各组间PD1⁺T细胞IL-2和IFN- γ 的表达 [$(\bar{x}\pm s)\%$]

| 组别 | n | 外周血IL-2 | | 外周血IFN- γ | | 骨髓IL-2 | | 骨髓IFN- γ | |
|----|----|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | | CD4 ⁺ PD1 ⁺ T | CD8 ⁺ PD1 ⁺ T | CD4 ⁺ PD1 ⁺ T | CD8 ⁺ PD1 ⁺ T | CD4 ⁺ PD1 ⁺ T | CD8 ⁺ PD1 ⁺ T | CD4 ⁺ PD1 ⁺ T | CD8 ⁺ PD1 ⁺ T |
| ND | 45 | 27.54 \pm 8.54 | 13.78 \pm 4.78 | 19.58 \pm 6.71 | 28.45 \pm 8.95 | 27.94 \pm 10.15 | 12.56 \pm 4.05 | 22.45 \pm 9.45 | 50.15 \pm 14.84 |
| CR | 35 | 27.01 \pm 12.12 | 11.56 \pm 6.12 | 14.45 \pm 6.78 | 27.02 \pm 11.65 | 26.12 \pm 11.48 | 11.26 \pm 4.95 | 20.56 \pm 8.54 | 42.45 \pm 12.51 |
| NR | 24 | 25.46 \pm 11.45 | 9.74 \pm 4.56 | 12.54 \pm 8.45 | 26.45 \pm 11.41 | 25.45 \pm 11.40 | 10.26 \pm 5.12 | 20.12 \pm 11.36 | 40.46 \pm 17.56 |
| HR | 16 | 19.12 \pm 10.21 | 10.05 \pm 5.15 | 14.10 \pm 7.45 | 24.97 \pm 10.45 | 24.87 \pm 12.56 | 8.72 \pm 4.89 | 19.58 \pm 10.47 | 40.12 \pm 16.54 |
| HC | 60 | 28.12 \pm 9.87 | 14.58 \pm 6.12 | 20.45 \pm 8.12 | 29.12 \pm 9.02 | 28.01 \pm 9.18 | 13.01 \pm 6.12 | 23.12 \pm 8.49 | 55.45 \pm 16.87 |

注: ND vs HR, $F_{ND}=6.157, 5.868, 4.563, 4.182, 3.979, 5.167, 3.179, 7.192$, 均 $P<0.01$; HC vs HR, $F_{HC}=7.271, 6.162, 5.178, 4.781, 5.267, 4.892, 8.278$, 均 $P<0.01$ 。

2.4 各组间 TIM-3⁺T 细胞水平 见表4。AML 患者外周血和骨髓中 CD4⁺TIM-3⁺T 和 CD8⁺TIM-3⁺T 细胞水平明显高于 HC 组 ($F=24.230, 9.101, 16.010, 12.540$, 均 $P<0.001$), 且 CR 患者中 CD4⁺TIM-3⁺T 和 CD8⁺TIM-3⁺T 细胞水平明显低于 HR 组 ($t=3.986, 4.621$, 均 $P<0.001$), 差异均有统计学意义。

2.5 各组间 TIM-3⁺T 细胞产生 IL-2 和 IFN- γ 的

表4 各组间 TIM-3⁺T 细胞水平比较 [$(\bar{x} \pm s)\%$]

| 项目 | n | 外周血 | | 骨髓 | |
|----|----|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | | CD4 ⁺ TIM-3 ⁺ T | CD8 ⁺ TIM-3 ⁺ T | CD4 ⁺ TIM-3 ⁺ T | CD8 ⁺ TIM-3 ⁺ T |
| ND | 45 | 28.34 \pm 9.14 | 28.83 \pm 8.48 | 35.75 \pm 7.30 | 38.76 \pm 16.55 |
| CR | 35 | 23.08 \pm 9.20 | 24.27 \pm 5.78 | 32.63 \pm 11.85 | 36.16 \pm 13.19 |
| NR | 24 | 25.14 \pm 5.80 | 25.46 \pm 9.79 | 34.37 \pm 8.07 | 35.92 \pm 10.05 |
| HR | 16 | 33.30 \pm 5.81 | 35.49 \pm 6.65 | 46.18 \pm 7.94 | 48.35 \pm 6.77 |
| CH | 60 | 2.64 \pm 1.13 | 6.27 \pm 2.38 | 3.17 \pm 1.01 | 4.56 \pm 1.21 |

表5 各组间 TIM-3⁺T 细胞 IL-2 和 IFN- γ 的表达 [$(\bar{x} \pm s)\%$]

| 组别 | n | 外周血 IL-2 | | 外周血 IFN- γ | | 骨髓 IL-2 | | 骨髓 IFN- γ | |
|----|----|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | | CD4 ⁺ PD1 ⁺ | CD8 ⁺ PD1 ⁺ | CD4 ⁺ PD1 ⁺ | CD8 ⁺ PD1 ⁺ | CD4 ⁺ PD1 ⁺ | CD8 ⁺ PD1 ⁺ | CD4 ⁺ PD1 ⁺ | CD8 ⁺ PD1 ⁺ |
| ND | 45 | 22.15 \pm 10.24 | 14.29 \pm 7.15 | 19.15 \pm 7.85 | 49.87 \pm 16.78 | 24.46 \pm 11.21 | 13.15 \pm 4.54 | 18.58 \pm 9.57 | 54.58 \pm 19.25 |
| CR | 35 | 15.12 \pm 7.01 | 10.20 \pm 5.68 | 15.45 \pm 6.78 | 47.05 \pm 18.75 | 20.44 \pm 10.75 | 11.21 \pm 6.48 | 16.28 \pm 9.13 | 52.18 \pm 18.47 |
| NR | 24 | 14.46 \pm 7.12 | 7.05 \pm 3.18 | 14.54 \pm 8.45 | 46.45 \pm 15.26 | 20.21 \pm 10.32 | 10.02 \pm 5.48 | 15.22 \pm 10.14 | 50.66 \pm 18.44 |
| HR | 16 | 12.86 \pm 6.45 | 7.81 \pm 3.26 | 15.26 \pm 7.45 | 45.23 \pm 18.21 | 19.87 \pm 10.24 | 8.58 \pm 4.13 | 14.59 \pm 9.32 | 50.26 \pm 18.38 |
| HC | 60 | 23.26 \pm 10.48 | 15.06 \pm 7.64 | 19.57 \pm 8.61 | 49.12 \pm 19.15 | 25.45 \pm 12.14 | 14.22 \pm 7.32 | 19.40 \pm 10.52 | 55.87 \pm 19.22 |

注: ND vs HR, $F_{ND}=8.172, 6.892, 5.268, 4.972, 5.175, 6.218, 3.768, 3.826$, 均 $P<0.01$; HC vs HR, $F_{HC}=8.361, 7.028, 4.278, 4.279, 5.829, 6.170, 4.926, 5.182$, 均 $P<0.001$ 。

3 讨论

急性髓系白血病 (AML) 是一种恶性血液肿瘤, 治疗效果差, 生存率低, 目前新型免疫治疗是治疗 AML 的有效方法^[7-8]。T 细胞衰竭是机体在肿瘤持续的抗原刺激下出现的免疫状态低下, 髓系白血病的共刺激信号能够促进 Th1 细胞功能衰竭, 通过上调 PD1, TIM-3, LAG-3 和 CTLA-4 等免疫位点, 引起相应的 IL-2, TNF- α 和 IFN- γ 分泌减少, 诱导 T 细胞衰竭^[1,9-10]。Tex 在肿瘤的发生发展中发挥着重要的作用, Tex 可削弱机体的免疫, 引起肿瘤细胞发生免疫逃逸反应和免疫攻击, 促进肿瘤的生长和增殖。既往研究表明初诊 AML 患者骨髓中 CD8⁺T 淋巴细胞功能丧失与 AML 患者预后不良相关, 主要与丧失肿瘤表面抗原、诱导 T 淋巴细胞的耗竭、触发免疫逃逸有关^[8, 11]。有研究提示白血病患者异基因造血干细胞移植后体内的 Tex 增多, 能够预测其复发风险明显增多^[12]。可见, 免疫位点的免疫逃逸机制参与了肿瘤的发生发展过程。因此, 逆转 T 细胞功能反应降低的免疫检查点可能是治疗 AML 患者有效的靶向免疫治疗方法。

AML 患者中白血病细胞与抗原呈递细胞具

表达差异 见表5。AML 不同疾病阶段患者的外周血和骨髓中 CD4⁺TIM-3⁺T 细胞和 CD8⁺TIM-3⁺T 细胞产生 IL-2 和 IFN- γ 细胞因子比较, HR 患者外周血和骨髓产生 IL-2 和 IFN- γ 细胞因子表达水平明显低于 HC 组和 ND 组 ($F=5.841, 5.017$, 均 $P<0.001$)。

有共同的细胞表面特征, 能够与 Th1 细胞相互作用, 上调 T 细胞的抗原受体 T 细胞 (T cell receptor, TCR), 触发 T 细胞增殖和减少细胞因子或趋化因子的分泌而发挥作用^[11]。AML 患者中 PD1, TIM-3 等常见免疫检查点可抑制免疫应答, 诱发 T 细胞耗竭, 导致免疫逃逸发生, 参与该病的发病过程^[13]。目前, 多项研究已证实 PD1 及其他 T 细胞抑制性通路参与 AML 疾病进展, 其中 PD1 是 CD28 受体家族的一个重要的抑制性免疫检测点, 在活化的效应性 T 细胞 (Teff 细胞) 和 Tex 细胞表面表达, 包括 PDL1 和 PDL2 两个配体, 在正常免疫反应状态下, PD1 能阻止 TCR 活化信号通路的传递, 具有抑制 T 细胞活化功能, 发挥免疫逃逸作用^[14-16]。TIM-3 是 Tex 细胞表面的另一个重要的抑制性通路受体, 而肿瘤的发生发展与 TIM-3 的高表达密切相关^[17-20]。

为了检测 AML 患者外周血和骨髓中 T 细胞的免疫检查点 (PD1 和 TIM-3) 的表达情况与 AML 疾病发生发展的相关性。本研究发现, AML 患者中外周血和骨髓中 PD1 和 TIM-3 表达明显增高, 与既往研究一致^[15, 19], 表明 PD1 和 TIM-3 的表达上

调与机体免疫功能下降和抗白血病能力下降有关,能够促进 AML 疾病的发生发展^[15,19-21]。本研究提示骨髓中 CD4⁺PD1⁺TIM-3⁺T 和 CD8⁺PD1⁺TIM-3⁺T 细胞表达明显高于外周血,可能与 AML 患者骨髓微环境中存在更多的抑制性免疫因子、T 细胞受损严重、免疫检查点的 Tex 水平表达增加有关^[8,22-23]。在外周血和骨髓中,CD8⁺PD1⁺TIM-3⁺T 细胞的表达量明显高于 CD4⁺PD1⁺TIM-3⁺T 细胞,提示 AML 患者疾病发展过程中 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞功能受损更为严重。经治疗后获得 CR 的 AML 患者外周血和骨髓中 PD1 的表达均下降,能够有效提高机体的免疫功能,而 NR 和 HR 患者的 T 细胞表面的 PD1 和 TIM-3 明显增加,可能与 AML 患者治疗后出现白血细胞耐药和治疗疗效不佳有关。另外,HR 患者外周血和骨髓中 PD1⁺T 和 TIM-3⁺T 细胞所产生 IL-2 和 IFN- γ 细胞因子表达水平明显低于对照组和 ND 患者,表明 AML 复发患者免疫功能低下,诱发 T 细胞耗竭,细胞因子的分泌减少,能够促进肿瘤的增殖分化。

综上所述,本研究通过检测 AML 不同疾病阶段患者的外周血和骨髓中 CD4⁺PD1⁺TIM-3⁺T 细胞和 CD8⁺PD1⁺TIM-3⁺T 细胞表达水平,研究发现,CR 患者外周血和骨髓中 CD4⁺/CD8⁺PD1⁺TIM-3⁺T 细胞数量较 ND 患者明显减少,HR 患者明显增多;与外周血标本比较,骨髓 T 细胞耗竭更为明显,外周血和骨髓中 CD8⁺PD1⁺TIM-3⁺T 细胞表达明显高于 CD4⁺PD1⁺TIM-3⁺T;另外,HR 患者外周血和骨髓中 PD1⁺T 细胞和 TIM-3⁺T 细胞所产生 IL-2 和 IFN- γ 细胞因子表达水平明显降低,提示 AML 复发患者存在 T 细胞耗竭水平明显增多,分泌的免疫性 IL-2 和 IFN- γ 细胞因子减少的现象,参与了疾病的发生发展。因而,在 AML 治疗过程中,动态监测 PD1 和 TIM-3 等免疫位点的表达水平变化,能够预测 AML 患者临床治疗疗效和疾病进展的预后判断。

参考文献:

- [1] OZKAZANC D, YOYEN-ERMIS D, TAVUKCUOGLU E, et al. Functional exhaustion of CD4(+) T cells induced by co-stimulatory signals from myeloid leukaemia cells[J]. Immunology, 2016, 149(4): 460-471.
- [2] 刘盼,马敏婷,魏素菊. 逆转 T 细胞耗竭在肿瘤免疫治疗中研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(5): 639-642.
- [3] LIU Pan, MA Minting, WEI Suju. Research progress of reversing T cell depletion in tumor immunotherapy [J]. Chinese Journal of Immunology, 2020,36(5): 639-642.
- [4] 程娜,田领章,刘炜. 不同免疫检查点基因在急性髓细胞白血病中的表达与临床意义[J]. 中国医师杂志, 2019,21(8):1185-1189.
- [5] CHENG Na, TIAN Lingzhang, LIU Wei. The expression and clinical significance of immune checkpoints in acute myeloid leukemia [J]. Journal of Chinese Physician, 2019,21(8):1185-1189.
- [6] 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.
- [7] 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 复发难治性急性髓系白血病中国诊疗指南(2017 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2017, 38(3): 183-184.
- [8] Leukemia and Lymphoma Group, Chinese Society of Hematology, Chinese Medical Association. The guidelines for diagnosis and treatment of acute myelogenous leukemia(relapse/refractory) in China (2017) [J]. Chinese Journal of Hematology, 2017, 38(3): 183-184.
- [9] 崔杰克. 白血病细胞来源微泡在 T 细胞耗竭中的作用及机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2018: 1-111.
- [10] CUI Jieke. The role and mechanism of microvesicles derived from leukemia cells in T cell depletion[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2018:1-111.
- [11] ARBER D A, ORAZI A, HASSERJIAN R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia[J]. Blood, 2016, 127(20): 2391-2405.
- [12] JIA Bei, WANG Liru, CLAXTON D F, et al. Bone marrow CD8 T cells express high frequency of PD-1 and exhibit reduced anti-leukemia response in newly diagnosed AML patients[J]. Blood Cancer Journal, 2018, 8(3): 34.
- [13] 谢仁古丽·阿力木, 马佳佳, 庞楠楠, 等. 免疫检查点抑制剂在血液系统恶性肿瘤治疗中的研究进展[J]. 新疆医科大学学报, 2020, 43(1): 121-124.
- [14] XIE RENGULI·Alimu, MA Jiajia, PANG Nannan, et al. Research progress of immune checkpoint inhibitors in the treatment of hematological malignancies[J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2020, 43(1): 121-124.
- [15] 王季石. CAR-T 和 PD-1 单克隆抗体在急性髓系白血病治疗中的进展和趋势[J]. 中国实验血液学杂志, 2020,28(3):1069-1074.
- [16] WANG Jishi. Progress and trend of CAR-T and PD-1 blockade in the treatment of acute myeloid leukemia-review [J]. Journal of Experimental Hematology, 2020,28(3):1069-1074.
- [17] CHEN Shaohua, ZHA Xianfeng, SHI Li, et al. Upregulated TCR ζ improves cytokine secretion in T cells from patients with AML[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2015, 8: 72.
- [18] KONG Y, ZHANG J, CLAXTON D F, et al. PD-1(hi) TIM-3(+) T cells associate with and predict leukemia relapse in AML patients post allogeneic stem cell transplantation [J]. Blood Cancer Journal, 2015, 5(7): e330.
- [19] LICHTENEGGER F S, KRUPKA C, HAUBNER S, et al. Recent developments in immunotherapy of acute myeloid leukemia[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2017, 10(1): 142.

- [14] 周歌, 王叨, 刘玉峰. PD1/PD-L1 通路在急性白血病中作用的研究进展 [J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2020, 25(1): 50-52.
ZHOU Ge, WANG Dao, LIU Yufeng. Research progress on the role of PD1/PD-L1 pathway in acute leukemia [J]. Journal of China Pediatric Blood and Cancer, 2020, 25(1): 50-52.
- [15] JELINEK T, MIHALYOVA J, KASCAK M, et al. PD-1/PD-L1 inhibitors in haematological malignancies: update 2017 [J]. Immunology, 2017, 152(3): 357-371.
- [16] 温春媚, 李自宣, 王禹, 等. PD-1 在急性 T 淋巴细胞白血病细胞中的表达及其临床意义 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(7): 768-775.
WEN Chunmei, LI Zixuan, WANG Yu, et al. Expression of PD-1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells and its clinical significance [J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy, 2019, 26(7): 768-775.
- [17] 马金凤, 李彩霞, 吴德沛, 等. Tim-3 在急性髓系白血病患者 NK 细胞上的表达特征及其临床意义 [J]. 中华血液学杂志, 2019, 40(9): 755-758.
MA Jinfeng, LI Caixia, WU Depei, et al. Expression of Tim-3 on natural killer cells in patients with acute myeloid leukemia and its clinical significance [J]. Chinese Journal of Hematology, 2019, 40(9): 755-758.
- [18] 徐良静, 徐金格, 李晓莉, 等. Tim-3 在急性白血病患者原代细胞中的表达及其与临床特征的相关性 [J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(6): 517-519.
XU Liangjing, XU Jingge, LI Xiaoli, et al. Expression of Tim-3 in acute leukemia cells and its clinical significance [J]. Chinese Journal of Hematology, 2016, 37(6): 517-519.
- [19] TAN Jiaxiong, CHEN Shaohua, LU Yuhong, et al. Higher PD-1 expression concurrent with exhausted CD8⁺ T cells in patients with de novo acute myeloid leukemia [J]. Chinese Journal of Cancer Research, 2017, 29(5): 463-470.
- [20] 伍香玲. 急性白血病治疗前后外周血单个核细胞 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白 3 的表达水平及意义 [J]. 实用医院临床杂志, 2017, 14(5): 85-87.
WU Xiangling. Expression level and significance of T cell immunoglobulin mucin 3 in peripheral blood mononuclear cells before and after treatment in patients with acute leukemia [J]. Practical Journal of Clinical Medicine, 2017, 14(5): 85-87.
- [21] ZAHARAN A M, MOHAMMED SALEH M F, SAYED M M, et al. Up-regulation of regulatory T cells, CD200 and TIM3 expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia [J]. Cancer Biomarkers : Section a of Disease Markers, 2018, 22(3): 587-595.
- [22] 张丛笑, 王迎. T 细胞耗竭与白血病的嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法 [J]. 国际输血及血液学杂志, 2019, 42(6): 519-523.
ZHANG Congxiao, WANG Ying. T cell exhaustion and chimeric antigen receptor T cell immunotherapy in leukemia [J]. International Journal of Blood Transfusion and Hematology, 2019, 42(6): 519-523.
- [23] 葛梦君, 徐开林, 许婷, 等. PD-1, TIM-3, VISTA 在急性髓系白血病患者 T 细胞上的表达及意义 [J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28(3): 748-752.
GE Mengjun, XU Kailin, XU Ting, et al. Expression and significance of PD-1, TIM-3 and VISTA on T cell of acute myeloid leukemia patients [J]. Journal of Experimental Hematology, 2020, 28(3): 748-752.

收稿日期: 2021-01-15 修回日期: 2021-08-13

(上接第 137 页)

- [14] MISHRA Y, PATHAK B K, MOHAKUDA S S, et al. Relation of D-dimer levels of COVID-19 patients with diabetes mellitus [J]. Diabetes & Metabolic Syndrome, 2020, 14(6): 1927-1930.
- [15] YANG Yicheng, XIAO Zhiqiang, YE Kaiyan, et al. SARS-CoV-2: characteristics and current advances in research [J]. Virology Journal, 2020, 17(1): 117.
- [16] 郑雨桐, 闫美田, 王兰, 等. 新型冠状病毒肺炎患者并发心肌损伤的实验室及临床相关研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2021, 36(1): 85-91.
ZHENG Yutong, YAN Meitian, WANG Lan, et al. Laboratory and clinical study on COVID-19 patients with myocardial injury [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2021, 36(1): 85-91.
- [17] RAJ K, CHANDNA S, DOUKAS S G, et al. Combined use of wells scores and d-dimer levels for the diagnosis of deep vein thrombosis and pulmonary embolism in COVID-19: A retrospective cohort study [J]. Cureus, 2021, 13(9): e17687.
- [18] CAI Yuli, SHI Shaobo, YANG Fan, et al. Fasting blood glucose level is a predictor of mortality in patients with COVID-19 independent of diabetes history [J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2020, 169: 108437.
- [19] RONCON L, ZUIN M, RIGATELLI G, et al. Diabetic patients with COVID-19 infection are at higher risk of ICU admission and poor short-term outcome [J]. Journal of Clinical Virology, 2020, 127: 104354.
- [20] XU Zihui, WANG Zhongjing, WANG Shuo, et al. The impact of type 2 diabetes and its management on the prognosis of patients with severe COVID-19 [J]. Journal of Diabetes, 2020, 12(12): 909-918.
- [21] 中华医学会糖尿病学分会. 糖尿病患者合并新型冠状病毒肺炎的管理建议 [J]. 中华糖尿病杂志, 2020, 12(2): 73-75.
Diabetes Society of Chinese Medical Association. Management suggestions for patients with diabetes and novel Coronavirus pneumonia [J]. Chinese Journal of Diabetes Mellitus, 2020, 12(2): 73-75.
- [22] SHAO Shiyang, YANG Qin, PAN Ruping, et al. Interaction of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and diabetes [J]. Frontiers in Endocrinology, 2021, 12: 731974.
- [23] METWALLY A A, MEHTA P, JOHNSON B S, et al. COVID-19-induced new-onset diabetes: trends and technologies [J]. Diabetes, 2021, 70(12): 2733-2744.

收稿日期: 2021-10-25

修回日期: 2022-02-23