

多发性骨髓瘤患者外周血Th17和Treg细胞比率的平衡关系研究

李晶晶 牛倩 唐笛娇 蒋能刚 金咏梅 粟军 贾永前

【摘要】 目的 探讨多发性骨髓瘤(MM)患者外周血中辅助性T细胞17(Th17)和CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞(Treg细胞)比率的平衡关系及其在MM发病机制中的作用。方法 70例MM患者分为初发组30例,平台期组23例,复发/难治组17例,以20名健康体检者为正常对照组。流式细胞术检测MM患者和正常对照者外周血中T细胞亚群及Th17和Treg细胞占CD4⁺T细胞的比率。结果 初发组及复发/难治组患者外周血Th17细胞的比率分别为(1.62±0.65)%和(1.45±0.51)%,与正常对照组[(0.72±0.33)%]及平台期组[(0.74±0.29)%]比较,均明显增高(P 值均 <0.05);Treg细胞比率分别为(0.55±0.23)%和(0.82±0.54)%,与正常对照组[(2.33±0.90)%]及平台期组[(1.69±0.70)%]比较,明显减低(P 值均 <0.05),Th17/Treg细胞比值明显增高(P 值均 <0.05);平台期患者CD3⁺CD4⁺T细胞以及Th17细胞比率与正常对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),Treg细胞比率明显低于正常对照组,Th17/Treg细胞比值明显高于正常对照组。结论 MM患者外周血T细胞亚群紊乱以CD4⁺T细胞减少为主,MM患者体内存在Th17细胞比率升高和Treg细胞比率降低所致的Th17/Treg细胞比例失衡,随疾病稳定而趋于正常,该免疫失衡可能在MM的发生、发展中起重要作用。

【关键词】 多发性骨髓瘤; Th17细胞; T淋巴细胞,调节性; Th17/Treg细胞比例

Imbalance of Th17 and Treg cells in peripheral blood from multiple myeloma patients LI Jing-jing, NIU Qian, TANG Di-jiao, JIANG Neng-gang, JIN Yong-mei, SU Jun, JIA Yong-qian*. *Department of Hematology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, 610041, China*

Corresponding author: JIA Yong-qian, Email: jia_yq@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the ratio of Th17 cells and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cells in peripheral blood from patients with multiple myeloma (MM) and explore its pathological effects. **Methods** 70 MM patients were divided into three groups: newly diagnosed group ($n=30$), plateau stage group ($n=23$) and relapsed/refractory group ($n=17$). The controls consisted of 20 healthy donors. The frequencies of Th17 and Treg cells were detected by flow cytometry. **Results** Compared with controls [(0.72±0.33)%] and plateau stage group [(0.74±0.29)%], frequencies of Th17 cells were higher in newly diagnosed group [(1.62±0.65)%] and relapsed/refractory group [(1.45±0.51)%], respectively ($P<0.05$). Compared with controls [(2.33±0.90)%] and plateau stage group [(1.69±0.70)%], frequencies of Treg cells were significantly lower in newly diagnosed group [(0.55±0.23)%] and relapsed/refractory group [(0.82±0.54)%], respectively ($P<0.05$). The ratios of Th17/Treg in newly diagnosed group and relapsed/refractory group were higher than those in controls ($P<0.05$). There were no differences of the frequencies of CD3⁺CD4⁺T cells and Th17 cells between plateau stage group and controls. The frequencies of Treg cells were significantly lower in plateau stage group than that in controls ($P<0.05$), and the ratio of Th17/Treg was significantly higher in plateau stage group than that in controls ($P<0.05$). **Conclusion** The remarkable abnormality of T cells subsets was reduction of CD4⁺T cells in MM. Higher frequency of Th17 and lower ratio of Treg could lead to imbalance of Th17/Treg, which may play a critical role in the pathogenesis of MM.

【Key words】 Multiple myeloma; Th17 cells; T-lymphocytes, regulatory; Th17/Treg cells ratio

随着治疗技术的不断发展,多发性骨髓瘤(MM)患者中位生存期由3年延长到6年,但是MM仍然被认为是一种不可治愈的疾病^[1]。骨髓微环境中细胞因子的变化、重要膜受体的改变、肿瘤细胞前体细胞中癌基因突变以及多种机制的相互协同作用是该病发生的重要因素^[2]。辅助性T细胞17(Th17细胞)通过其分泌的细胞因子(主要是IL-17)来促进中性粒细胞的动员、募集和活化,促进炎症反应,在感染性疾病、自身免疫性疾病和肿瘤的发生、发展中发挥重要作用。与此相反,CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(Treg细胞)的免疫抑制作用表现为抑制效应T细胞、抑制炎症反应以及维持自身免疫耐受^[3]。有研究表明Th17、Treg细胞以及二者比例失衡在自身免疫性疾病及肿瘤发生机制中有重要作用^[4-7]。我们旨在分析MM患者不同疾病状态外周血中Th17、Treg细胞的水平及Th17/Treg细胞的比值,初步阐明Th17/Treg细胞比例失衡在MM发生、发展中的可能作用。

病例和方法

1. 病例:以我院2012年9月至2013年4月收治的70例MM患者为研究对象,男35例,女35例,中位年龄58.0(57.9±10.9)岁,全部病例均经骨髓涂片、免疫球蛋白定量、血清M蛋白电泳、X线检查等确诊,均符合文献^[8]的诊断标准。初治30例;复发难治17例;平台期23例。70例患者基本情况见表

1. 住院患者分别曾用MP(马法兰、泼尼松)、M2(马法兰、泼尼松、长春新碱、环磷酰胺)、VAD(长春新碱、阿霉素、地塞米松)方案并配合应用沙利度胺等进行多次化疗。以20名健康体检者为正常对照组,男16名,女4名,中位年龄57.5(59.4±15.8)岁,无相关自身免疫性疾病、肿瘤或近期感染史。采集空腹静脉血2 ml,肝素钠抗凝,所有标本均在采集后2 h内进行处理。

2. 试剂与仪器:PerCp标记CD3/FITC标记CD4/PE标记CD8三联鼠抗人单抗、FITC标记CD4/APC标记CD25二联鼠抗人单抗、PE标记的Foxp3鼠抗人单抗、PerCp标记的鼠抗人CD3单抗、FITC标记的鼠抗人CD8单抗、PE标记的IL-17A鼠抗人单抗、PerCP标记的鼠抗人同型对照IgG1、FITC标记的鼠抗人同型对照IgG1、PE标记的鼠抗人同型对照IgG1,以及FACSCalibur型流式细胞仪及CellQuest Pro软件均购自美国BD公司。人Treg细胞染色试剂盒购自美国eBioscience公司。佛波酯(PMA)、离子霉素(ionomycin)和莫能霉素(monensin)购自美国Sigma公司。RPMI 1640培养基和灭活新生牛血清购自成都哈里生物工程有限公司。

3. T细胞亚群检测:取未刺激的肝素钠抗凝全血50 μl,加入10 μl PerCp标记CD3/FITC标记CD4/PE标记CD8三联鼠抗人单抗,4℃避光孵育30 min,加入2 ml溶血剂,避光放置5 min,完全溶血

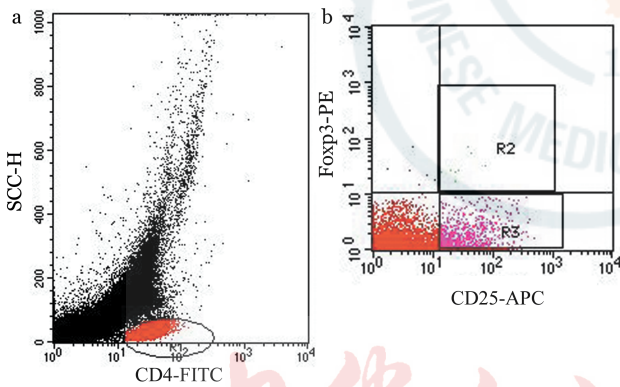
表1 70例多发性骨髓瘤(MM)患者基本情况[例数(%)]

| 项目 | 初发MM组(30例) | 平台期MM组(23例) | 复发/难治MM组(17例) |
|-----------------|------------|-------------|---------------|
| D-S分期 | | | |
| I | 5(16.7) | 3(13.0) | 2(11.8) |
| II | 6(20.0) | 4(17.4) | 3(17.6) |
| III | 19(63.3) | 16(69.6) | 12(70.6) |
| ISS分期 | | | |
| I | 3(10.0) | 5(21.7) | 2(11.8) |
| II | 9(30.0) | 3(13.0) | 5(29.4) |
| III | 18(60.0) | 15(65.3) | 10(58.8) |
| M蛋白免疫学分型 | | | |
| IgG | 13(43.3) | 11(47.9) | 7(41.2) |
| IgA | 9(30.0) | 8(34.8) | 4(23.5) |
| IgD | 2(6.7) | 1(4.3) | 1(5.9) |
| 轻链型 | 3(10.0) | 2(8.7) | 3(17.6) |
| 其他 | 3(10.0) | 1(4.3) | 2(11.8) |
| 血清肌酐>176 μmol/L | 4(13.3) | 5(21.7) | 3(17.6) |
| 骨髓浆细胞比例≥0.500 | 9(30.0) | 12(52.2) | 11(64.7) |

注: D-S分期: Durie-Salmon分期; ISS分期: 国际分期

后,加入 2 ml PBS 洗涤 1 次,300×g 离心 5 min,弃上清,上 FACSCalibur 流式细胞仪检测,采用 CellQuest Pro 软件分析数据,以 CD3⁺T 细胞设门,结果以 CD3⁺CD4⁺细胞在 CD3⁺T 细胞中的比率进行统计。

4. Treg 细胞的检测:取未经刺激培养的肝素钠抗凝全血 50 μl,加入 10 μl FITC 标记 CD4/APC 标记 CD25 二联鼠抗人抗体,4 °C 避光孵育 30 min,溶血、洗涤。加入 1 ml 破膜/固定剂破膜 45 min,配套洗液洗涤。加入 1 μl 正常鼠血清 4 °C 封闭 15 min,再加入 10 μl PE 标记的鼠抗人 Foxp3 单抗(或加入 10 μl PE 标记的鼠抗人 IgG1 作为同型对照)4 °C 避光孵育 30 min,洗涤,上 FACSCalibur 流式细胞仪检测,采用 CellQuest Pro 软件分析数据。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺细胞即为 Treg 细胞。结果以 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺细胞在未刺激 CD3⁺CD4⁺细胞中的比率进行统计(图 1)。



a:以 CD4⁺T 细胞设门; b:CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 细胞即为 Treg 细胞
图 1 流式细胞术检测多发性骨髓瘤患者 Treg 细胞比率

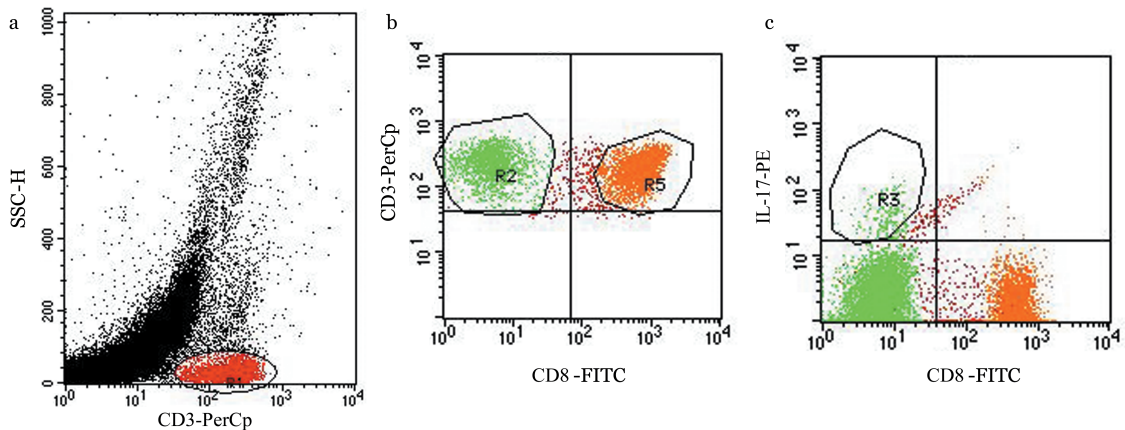
5. Th17 细胞的检测:500 μl 肝素钠抗凝全血用 RPMI 1640 培养液按 1:1 的比例稀释后,加入 50 μl

PMA(终浓度 50 μg/L)、1 μl 离子霉素(终浓度 1 mg/L)和 1 μl 莫能霉素(终浓度 1 mg/L)并充分混匀,于 37 °C、5% CO₂细胞培养箱中培养 4 h。取培养后全血 100 μl,加入 10 μl PerCp 标记的抗 CD3 单抗和 10 μl FITC 标记的抗 CD8 单抗,4 °C 避光孵育 30 min,溶血、洗涤,加入 1 ml 破膜/固定剂破膜 45 min,洗涤,加入 10 μl PE 标记的鼠抗人 IL-17A 单抗(或加入 10 μl PE 标记的鼠抗人 IgG1 作为同型对照),4 °C 避光孵育 30 min,洗涤,上 FACSCalibur 流式细胞仪检测,采用 CellQuest Pro 软件分析数据。在预实验及查阅文献中发现,CD4⁺T 细胞在 PMA 刺激培养过程中会发生内吞现象,导致细胞分群不明^[9],所以我们采用 CD8⁻反标 CD4⁺T 细胞,以 CD8⁻T 细胞设门,读取 CD8⁻IL-17⁺T 细胞在 CD3⁺CD8⁻T 细胞中的比率(图 2)。

6. 统计学处理:采用 SPSS 16.0 统计学软件进行分析。符合正态分布的数据以均数±标准差表示,两组间的比较采用 Student *t* 检验,多组间的比较采用方差分析,组间两两比较采用 SNK 检验。若方差不齐,则组间比较采用秩和检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

结 果

1. MM 患者 T 细胞亚群分析:与正常对照组和平台期组相比,初发组患者未经刺激 CD3⁺CD4⁺T 细胞比率降低(*P* < 0.05)。与正常对照组相比,复发/难治组患者未经刺激 CD3⁺CD4⁺T 细胞比率明显降低(*P* < 0.05);与正常对照组和平台期组相比,复发/难治组患者外周血细胞刺激培养后 CD3⁺CD8⁻T 细胞比率均明显降低(*P* 值均 < 0.05)(表 2)。



a:以 CD3⁺T 细胞设门; b:标记的 CD3⁺CD8⁺T 细胞; c: CD3⁺CD8⁺IL-17⁺ 细胞即为 Th17 细胞

图 2 流式细胞术检测多发性骨髓瘤患者 Th17 细胞比率

2. MM 患者 Th17 细胞、Treg 细胞比率及二者比值分析:与正常对照组和平台期组比较,初发组 Th17 细胞比率均明显升高($P<0.05$),Treg 细胞比率均明显降低($P<0.05$);复发/难治组 Th17 细胞比率均明显升高($P<0.05$),Treg 细胞比率均明显降低($P<0.05$)。初发组与复发/难治组之间 Th17 细胞、Treg 细胞比率差异均无统计学意义(P 值均 >0.05)。平台期组与正常对照组比较 Th17 细胞比率差异无统计学意义($P>0.05$),而平台期组 Treg 细胞比率低于正常对照组($P<0.05$)。与正常对照组和平台期组比较,初发组和复发/难治组 Th17/Treg 细胞比值均明显升高(P 值均 <0.05),平台期组 Th17/Treg 细胞比值较正常对照组升高($P<0.05$)(表 2)。

讨 论

MM 是以浆细胞克隆性增殖为主要特征的造血系统恶性肿瘤,MM 患者存在免疫功能的异常,表现为 T 细胞数量和功能的异常。Goodyear 等^[10]研究发现,MM 患者 CD4⁺T 细胞的表达受抑制,Ogawara 等^[11]观察 56 例 MM 患者后发现初诊和复发的 MM 患者 Th1/Th2 细胞比值较正常对照组明显增高。Sharma 等^[12]证实,MM 患者中 Th1 细胞相关细胞因子 IFN- γ 含量下降,Th2 细胞相关因子 IL-4、IL-10 含量均显著升高。以上研究结果表明,在 MM 患者中 CD4⁺T 细胞免疫功能失调是确实存在的。我们在研究中发现以 CD3⁺T 细胞设门,初发 MM 患者组与正常对照组相比,其外周血 CD4⁺T 细胞的比率显著降低;治疗后的复发/难治组 MM 患者 T 细胞各亚群比例与初发组患者差异无统计学意义;药物治疗后进入平台期的 MM 患者外周血 CD4⁺T 细胞的比率可见恢复,与正常对照组相比差异无统计学意义。研究结果提示在 MM 患者外周血中 CD4⁺T 细胞减少影响着 MM 的发生和发展。

Treg 细胞是一类可起负调节作用的 CD4⁺CD25⁺T 细胞亚群,按其起源可分为天然型(nTreg)和诱导

型(iTreg)。Foxp3 作为 nTreg 的特征性转录因子,也是参与 nTreg 分化和发育的关键分子^[13]。nTreg 主要通过细胞直接接触发挥作用,抑制 CD4⁺T 细胞的增殖及相关细胞因子的分泌。iTreg 受特异性抗原刺激由初始 T 细胞在特定微环境和某些细胞因子的诱导下分化而成,特别是依赖 TGF- β 的存在,Treg 细胞在免疫负调节中发挥重要作用^[14]。本研究结果表明,与正常对照组相比,初发和复发/难治 MM 患者组 Treg 细胞比率均明显降低($P<0.05$),经过化疗药物治疗后,平台期 MM 患者 Treg 细胞比率稍有升高,但仍然低于正常对照组。本实验结果提示 MM 患者外周血中 Treg 细胞减少,免疫负调控作用减弱。

Treg 细胞与恶性肿瘤、感染及免疫疾病关系的研究是近年来的研究热点。在许多实体肿瘤患者中,外周血或骨髓 Treg 细胞数量的增加与肿瘤的发生、发展呈正相关,当选择性去除 Treg 细胞或抑制其功能均有助于肿瘤的免疫治疗^[15-16]。Feyler 等^[17-18]研究发现,MM 患者外周血 Treg 细胞比率增加,且与疾病的严重程度呈正相关。但也有研究表明,在 MM 患者中 CD4⁺CD25⁺细胞数量增加,而表达 Foxp3 的调节 T 细胞的数量明显减少,且这些细胞有功能缺陷^[19],与我们的研究结果相符。因此 MM 患者 Treg 细胞的表达情况存在争议^[20]。这可能与 MM 患者个体的免疫微环境或患者疾病进程有关,也可能与研究结果的表达方式(绝对细胞计数或是相对细胞比率)、抗体的选择或样本量的大小等因素有关。

Th17 细胞通过其分泌的细胞因子(主要是 IL-17)来促进中性粒细胞的动员、募集和活化,介导促炎症反应,在感染性疾病、自身免疫性疾病和肿瘤的病理过程中发挥重要作用。我们的实验结果显示,和正常对照组相比,初发组及复发/难治组 MM 患者 Th17 水平均明显升高($P<0.05$),结果与 Treg 细胞的变化趋势相反。经过化疗后的平台期

表 2 不同疾病状态多发性骨髓瘤患者 T 细胞亚群比率的变化(%, $\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 例数 | 未刺激 CD3 ⁺ CD4 ⁺ / CD3 ⁺ T 细胞 | 刺激后 CD3 ⁺ CD8 ⁺ / CD3 ⁺ T 细胞 | Th17 细胞 | Treg 细胞 | Th17/Treg 比值 |
|--------|----|--|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 正常对照组 | 20 | 52.52 \pm 8.19 | 38.26 \pm 8.48 | 0.72 \pm 0.33 | 2.33 \pm 0.90 | 0.35 \pm 0.20 |
| 初发组 | 30 | 48.08 \pm 9.62 | 27.28 \pm 5.36 ^{ab} | 1.62 \pm 0.65 ^{ab} | 0.55 \pm 0.23 ^{ab} | 3.42 \pm 1.94 ^{ab} |
| 复发/难治组 | 17 | 43.10 \pm 12.75 ^a | 29.49 \pm 9.65 ^{ab} | 1.45 \pm 0.51 ^{ab} | 0.82 \pm 0.54 ^{ab} | 2.56 \pm 1.76 ^{ab} |
| 平台期组 | 23 | 49.91 \pm 14.48 | 36.68 \pm 9.75 | 0.74 \pm 0.29 | 1.69 \pm 0.70 ^a | 0.51 \pm 0.27 ^a |

注:^a与正常对照组比较, $P<0.05$;^b与平台期组比较, $P<0.05$

MM患者Th17水平恢复,与正常对照组检测结果相近。MM患者体内Th17细胞以及Treg细胞的改变造成Th17/Treg细胞比例失衡,提示MM患者体内存在Th17促炎作用的增强,而Treg抗炎效应减弱。

大量研究表明Th17细胞的比率与肿瘤的发生相关,但Th17细胞表达增加或减少同样具有争议性^[21],这与Th细胞的分化过程、Th17细胞与Treg细胞的平衡关系以及个体肿瘤微环境的异质性都有一定的关系。而MM患者外周血Th17细胞的增加已被证实,与我们的实验结果相符合^[22]。

目前,对于MM患者中Th17、Treg细胞共同作用机制的研究较少,本研究结果表明,MM患者外周血中Th17细胞的比率明显增加而Treg细胞的比率显著降低,导致了Th17/Treg细胞比例失衡,且该平衡向Th17细胞一方偏移。我们的实验结果与部分文献报道一致,但该结论仍存在争议,表明MM患者Th17/Treg细胞平衡的调节机制更为复杂。所以,在MM患者Th17和Treg细胞相关免疫治疗中,我们不能单纯通过降低或升高一种细胞的比率来达到抑制MM疾病发生、发展的作用,而是根据患者个体差异来调节并维持Treg/Th17细胞比例的平衡。

参考文献

- [1] Mahindra A, Laubach J, Raje N, et al. Latest advances and current challenges in the treatment of multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol*, 2012, 9:135-143.
- [2] Kuehl WM, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J Clin Invest*, 2012, 122: 3456-3463.
- [3] Muller YD, Seebach JD, Bühler LH, et al. Transplantation tolerance: Clinical potential of regulatory T cells. *Self Nonself*, 2011, 2: 26-34.
- [4] Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10: 248-256.
- [5] Chi LJ, Lu HT, Li GL, et al. Involvement of T helper type 17 and regulatory T cell activity in tumour immunology of bladder carcinoma. *Clin Exp Immunol*, 2010, 161: 480-489.
- [6] Chatila TA. Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116: 949-959.
- [7] Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, et al. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev*, 2008, 223: 87-113.
- [8] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准. 3版. 北京: 科学出版社, 2007: 232-233.
- [9] 毛建华,陈自敏,汤永明,等. 佛波酯对人外周血淋巴细胞CD3和CD4及CD8分子表达的作用. *浙江大学学报(医学版)*, 2004, 33: 155-159.
- [10] Goodyear OC, Pratt G, McLarnon A, et al. Differential pattern of CD4+ and CD8+ T-cell immunity to MAGE-A1/A2/A3 in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and multiple myeloma. *Blood*, 2008, 112: 3362-3372.
- [11] Ogawara H, Hiroshi H, Tohru Y, et al. High Th1/Th2 ratio in patients with multiple myeloma. *Leuk Res*, 2005, 29: 135-140.
- [12] Sharma A, Khan R, Joshi S, et al. Dysregulation in T helper 1/T helper 2 cytokine ratios in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*, 2010, 51: 920-927.
- [13] Ziegler SF, Buckner JH. FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. *Microbes Infect*, 2009, 11: 594-598.
- [14] Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, et al. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*, 2007, 148: 32-46.
- [15] Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood*, 2006, 108: 804-811.
- [16] Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*, 2008, 124: 13-22.
- [17] Feyler S, Scott GB, Parrish C, et al. Tumour cell generation of inducible regulatory T-cells in multiple myeloma is contact-dependent and antigen-presenting cell-independent. *PLoS One*, 2012, 7: e35981.
- [18] Feyler S, von Lilienfeld-Toal M, Jarmin S, et al. CD4(+)CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are increased whilst CD3(+)CD4(-)CD8(-)alpha-betaTCR(+) Double Negative T cells are decreased in the peripheral blood of patients with multiple myeloma which correlates with disease burden. *Br J Haematol*, 2009, 144: 686-695.
- [19] Prabhala RH, Neri P, Bae JE, et al. Dysfunctional T regulatory cells in multiple myeloma. *Blood*, 2006, 107: 301-304.
- [20] Braga WM, Atanackovic D, Colleoni GW. The role of regulatory T cells and TH17 cells in multiple myeloma. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 293479.
- [21] Prabhala RH, Pelluru D, Fulciniti M, et al. Elevated IL-17 produced by TH17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma. *Blood*, 2010, 115: 5385-5392.
- [22] Ye J, Livergood RS, Peng G. The role and regulation of human Th17 cells in tumor immunity. *Am J Pathol*, 2013, 182:10-20.

(收稿日期:2013-05-31)

(本文编辑:刘志红)