

## CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc 细胞 在急性白血病患者化疗前后外周血中的表达及临床意义

周 静<sup>1</sup>, 陈建安<sup>1</sup>, 丁 茜<sup>1</sup>, 何永明<sup>1</sup>, 吴东升<sup>2</sup>, 陈丽莉<sup>1</sup>(中山大学附属东华医院检验科<sup>1</sup>、血液内科<sup>2</sup>, 广东 东莞 523110)

**【摘要】** 目的 探讨 CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc 细胞在急性白血病患者化疗前后外周血中的表达及其临床意义。方法 应用流式细胞术检测急性白血病初诊患者 40 例, 化疗后完全缓解患者 30 例和健康体检者 30 例的外周血 CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Ts 细胞的表达情况。结果 急性白血病初诊患者外周血中 CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc 细胞的表达率为(7.83±4.83)%, 较健康对照组表达率[(14.92±4.13)%]明显偏低, 差异具有统计学意义( $P<0.01$ ); 化疗后完全缓解患者外周血 CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc 细胞的表达率为(8.21±5.68)%, 较健康对照组明显偏低, 差异具有统计学意义( $P<0.01$ ); 完全缓解组外周血 CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc 细胞的表达率与初诊患者组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 缓解组 CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T 细胞的表达率为(43.87±16.47)%, 均比初诊患者组[(31.53±7.25)%]和健康对照组[(33.65±7.08)%]的表达率明显偏高, 差异具有统计学意义( $P<0.01$ ); 急性髓细胞白血病(AML)和急性淋巴细胞白血病(ALL)的外周血 CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc 细胞的表达率分别为(7.90±4.63)%和(6.47±2.86)%, 均明显低于健康对照组, 差异均具有统计学意义( $P<0.01$ ); CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc 细胞与 CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T 细胞的直线回归相关系数  $r=0.098$ , 差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 其无正相关关系。结论 CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc 细胞在急性白血病初诊患者和化疗后完全缓解患者的外周血中表达明显偏低, 提示其抗肿瘤能力下降, 需要通过有效干预患者的免疫功能, 提高机体的抗肿瘤能力, 对提高急性白血病的疗效有重要意义。

**【关键词】** 急性白血病; 肿瘤; 外周血; CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc**【中图分类号】** R733.71 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2015)12—1778—03

**Expression of CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc cell in the peripheral blood of patients with acute leukemia before and after chemotherapy and its clinical significance.** ZHOU Jing<sup>1</sup>, CHEN Jian-an<sup>1</sup>, DING Qian<sup>1</sup>, HE Yong-ming<sup>2</sup>, WU Dong-sheng<sup>2</sup>, CHEN Li-li<sup>1</sup>. Department of Clinical Laboratory<sup>1</sup>, Department of Hematology and Oncology<sup>2</sup>, Donghua Hospital Affiliated to Zhongshan University, Dongguan 523110, Guangdong, CHINA

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression of CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc cell in the peripheral blood of patients with acute leukemia before and after chemotherapy and its clinical significance. **Methods** The expression rates of CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc cell in peripheral blood were detected by flow cytometry in 40 newly diagnosed patients with acute leukemia (group A), 30 patients with complete remission after chemotherapy (group B), and 30 healthy physical examiners (group C). **Results** The expression rate of CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc cell of group A was (7.83±4.83)%, significantly lower than that of group C [(14.92±4.13)%,  $t=5.68$ ,  $P<0.01$ ]. The expression rate of CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc cell of group B was (8.21±5.68)%, which was significantly lower than that of group C ( $P<0.01$ ) and not significantly different from that of group A ( $P>0.05$ ). The expression rate of CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T cell in group B was significantly higher than that of group A and group C [(43.87±16.47)% vs (31.53±7.25)% and (33.65±7.08)%,  $P<0.01$ ]. The expression rate of CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc cells of acute myelocytic leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL) were (7.90±4.63)% and (6.47±2.86)%, significantly lower than those of group C ( $P<0.01$ ). The linear regression correlation coefficient ( $r$ ) between CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Ts cells and CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T cells was 0.098, with no statistically significant difference ( $P>0.05$ ) and no positive correlation between them. **Conclusion** The expressions of CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc cells in peripheral blood in newly diagnosed patients with acute leukemia and those in complete remission after chemotherapy are significantly lowered, indicating its decreased anti-tumor ability. To effectively intervene in immunity function of patients and to improve the anti-tumor ability are of great significant to improve the curative effect of acute leukemia.

**【Key words】** Acute leukemia; Tumor; Peripheral blood; CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc

目前认为免疫系统的免疫监视是抗肿瘤作用的第一道防线,有研究<sup>[1]</sup>结果表明,肿瘤组织内浸润的免疫细胞数量越多,其抗肿瘤作用越明显,预后更好。CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞是一种杀伤性免疫细胞,对肿瘤的免疫监视及杀伤中起重要作用,急性白血病作为恶性非实体性肿瘤,其外周血的分布情况及其免疫抑制中的作用目前尚不清楚。本研究通过对急性白血病患者治疗前和化疗后CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞在外周血表达水平的变化规律,探讨CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞的抗肿瘤作用,为有效干预患者的免疫功能提供参考。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2013年5月至2014年5月前来我院就诊的初诊急性白血病患者40例,抽取外周乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝全血2 ml,同时抽取骨髓液涂片送检做骨髓形态学和组织化学分析,并抽取肝素抗凝骨髓液送检用流式细胞仪做白血病免疫分型,从而确诊急性白血病和分型,其中男性23例,女性17例,年龄16~65岁。选取部分在我院化疗后完全缓解者30例,同时选择健康体检人群30例,抽取外周EDTA抗凝全血。

1.2 试剂与仪器 仪器为美国贝克曼-库尔特公司的FC500 MCL流式细胞仪,日本奥林巴斯BX-51型显微镜;试剂为广州康润试剂公司提供的贝克曼-库尔特公司生产的CD<sub>45</sub>-藻红蛋白-花青苷7(Phycoerythrin cyanin 7, PC7)/CD<sub>28</sub><sup>-</sup>异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)/CD<sub>8</sub><sup>-</sup>藻红蛋白(Phycoerythrin, PE)等荧光抗体试剂,磷酸盐缓冲溶液(Phosphate buffered solution, PBS),红细胞裂解液。

1.3 检测方法 分别加入CD<sub>45</sub>-pc7、CD<sub>8</sub>-PE、CD<sub>28</sub>-FITC荧光抗体试剂各5 μl至同一流式专用管内底端,同时加入50 μl抗凝全血避光反应20 min,加入RBC裂解液500 μl,避光20 min后加入PBS上机检测,用CD<sub>45</sub>/SS设门圈定淋巴细胞群,在十字门图中分析CD<sub>8</sub><sup>+</sup>而CD<sub>28</sub><sup>-</sup>性区域细胞的百分比,即为CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>-</sup>Ts细胞表达率;在CD<sub>8</sub><sup>+</sup>而CD<sub>28</sub><sup>+</sup>性区域的百分比,即为CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞表达率;在CD<sub>8</sub><sup>+</sup>性区域的百分比,即为CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞表达率。

1.4 统计学方法 应用SPSS11.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用t检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,线性回归方法分析CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞与CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞的关系,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

### 2 结果

2.1 各组受试者间的CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>-</sup>Ts细胞表达率比较 初诊患者组和化疗后完全缓解组的外周血CD<sub>8</sub><sup>+</sup>

CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞的表达率均明显低于健康对照组( $t=5.68、4.35, P<0.01$ );完全缓解组外周血CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞的表达率与初诊患者组比较差异无统计学意义( $t=0.286, P>0.05$ ),且CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞的表达率均明显高于健康对照组和初诊患者组( $t=2.985、4.556, P<0.01$ ),见表1。

表1 各组受试者间的CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞表达率比较( $\bar{x}\pm s, \%$ )

组别	例数	CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> CD <sub>28</sub> <sup>+</sup> Tc细胞	CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> T细胞
初诊患者组	40	7.83±4.83 <sup>a</sup>	31.53±7.25
完全缓解组	30	8.21±5.68 <sup>a</sup>	43.87±16.47 <sup>ab</sup>
健康对照组	30	14.92±4.13	33.65±7.08

注:与健康对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;完全缓解组与初诊患者组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

2.2 初诊患者急性髓细胞白血病[AML,不包括急性早幼粒细胞白血病(APL)]、APL和急性淋巴细胞白血病(ALL)与健康对照组间CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞表达率比较 AML和ALL外周血CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞的表达率均明显低于健康对照组( $t=5.138、4.667, P<0.01$ );APL组的CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞表达率明显低于健康对照组( $t=2.852, P<0.01$ );AML和ALL组的CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞的表达率均明显高于APL组( $t=2.112、2.080, P<0.05$ ),见表2。

表2 AML(不包括APL)、APL和ALL与健康对照组间CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞表达率比较( $\bar{x}\pm s, \%$ )

组别	例数	CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> CD <sub>28</sub> <sup>+</sup> Tc细胞	CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> T细胞
AML(不包括APL)	28	7.90±4.63 <sup>a</sup>	32.72±6.93 <sup>b</sup>
ALL	6	6.47±2.86 <sup>a</sup>	30.87±4.45 <sup>b</sup>
APL	6	10.58±6.23	26.62±10.15 <sup>a</sup>
健康对照组	30	14.92±4.13	33.65±7.08

注:与健康对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与APL比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

2.3 急性白血病患者CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞与CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞的关系 CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞与CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞的直线回归相关系数 $r=0.098$ ,相关系数显著性检验 $P>0.05$ ,差异无统计学意义,其无正相关关系,见图1。

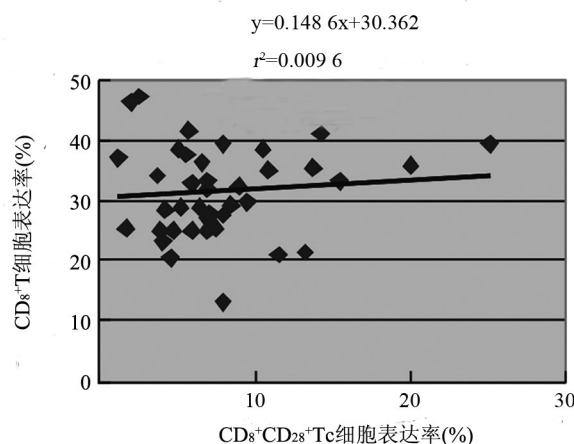


图1 CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞与CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞的直线回归关系图

### 3 讨论

CD<sub>28</sub>分子为细胞共刺激分子,表达于95%的CD<sub>4</sub><sup>+</sup>和50%~95%的CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞上,能与抗原提呈细胞上的B7分子结合所介导的共刺激信号协助激活T细胞的增殖和包括IL-2在内的多种淋巴因子的分泌,并能阻止细胞无反应性的诱导。CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞根据CD<sub>28</sub>的表达与否分为细胞毒性T细胞(CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>)和抑制性T细胞(CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>-</sup>)。CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>T细胞主要为激活的细胞毒性T淋巴细胞(CTL),与肿瘤直接接触,通过排粒作用释放穿孔素和颗粒酶等细胞毒性物质,溶解靶细胞;同时还可能释放一些细胞因子诱导靶细胞凋亡<sup>[2]</sup>。在机体内,CTL的活化需要双信号刺激,首先肿瘤细胞通过表面的MHC I-肿瘤抗原肽复合物与TCR-CD<sub>3</sub>结合形成活化的第一信号;同时肿瘤表面上的协同刺激分子,如B7、细胞间粘附分子1、淋巴细胞功能相关分子-3(LFA-3)等,与CTL上相应的分子受体CD<sub>28</sub>、LFA-1及LFA-2等结合形成活化的第二信号。CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞减少及CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>-</sup>Ts细胞增加是T淋巴细胞功能下降的标志<sup>[3-4]</sup>。CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞数量显著减少,导致机体缺乏有效的“第二信使”来活化CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞,从而使机体免疫功能下降<sup>[5-6]</sup>。

有文献<sup>[7-10]</sup>报道CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞在多种肿瘤患者的外周血表达比例降低,刘晓光等<sup>[7]</sup>报道了51例结肠癌患者外周血CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞较健康对照组有明显降低,分别为(8.60±3.95)%和(13.37±2.78)%( $P<0.01$ )。宋丁等<sup>[8]</sup>报道了38例原发性肝癌患者外周血CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞较健康对照组有明显降低( $P<0.01$ ),分别为(9.42±2.90)%和(12.68±3.67)%。吉顺荣等<sup>[9]</sup>报道了52例B细胞胰腺癌患者外周血CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞较正常对照组有明显降低( $P<0.01$ ),分别为(9.88±4.32)%和(14.12±4.95)%。杜晓辉等<sup>[10]</sup>报道了胃癌患者外周血CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞较健康对照组有明显降低。本研究中急性白血病初诊患者外周血CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞表达率为(7.83±4.83)%,较健康对照的组(14.92±4.13)%有明显减低( $P<0.01$ ),与上述肿瘤患者的报道相符。提示除了CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞在急性白血病患者抗肿瘤效应作用减少,化疗后完全缓解患者的CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞的表达率较初诊患者无明显变化,可能化疗对机体的免疫功能有一定的损伤作用,从而使患者的抗肿瘤作用无明显增加,因此需要通过免疫调节治疗的手段干预患者的CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞表达,使其表达上调,从而提高患者的抗肿瘤作用,可能对杀死残留白血病细胞和减少复发率有一定的作用。

在急性白血病的各分型之间,发现AML、ALL和APL患者外周血CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞的表达均低于对照组,存在明显差异,而AML、ALL与APL患者外周血

CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞的表达无明显差别,因标本的数量较少,其关系有待进一步研究。健康个体CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>-</sup>Ts细胞的表达率对外周血CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞的升高具有相同的功能,然而在一些感染、慢性疾病和肿瘤疾病中并非如此,有的是CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞升高而导致CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞升高,有的是CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>-</sup>Ts细胞升高而导致CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞升高<sup>[11]</sup>,因此不同的疾病它们之间的关系可能有所不同。本研究发现急性白血病患者外周血CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞与CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞无正相关,因此外周血CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞的升高不是由CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞的升高而导致,本研究中CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞与CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞的直线回归相关系数 $r=0.098$ ,相关系数显著性检验 $P>0.05$ ,差异无统计学意义。

综上所述,本研究结果表明CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>Tc细胞在急性白血病初诊患者和化疗后完全缓解患者的外周血中表达明显偏低,抗肿瘤作用减弱,因此需要通过有效的干预患者的免疫功能,提高机体抗肿瘤作用的能力,对提高急性白血病的疗效有重要意义。

### 参考文献

- Melief CJ, Toes RE, Medema JP, et al. Strategies for immunotherapy of cancer [J]. *Adv Immunol*, 2000, 75: 235-282.
- 邹春英, 吕培中, 宋峰, 等. 老年肺癌患者血清T淋巴细胞CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>的检测及临床意义[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2007, 14(18): 1389-1391.
- Alves NL, Arosa FA, Vanlier RA. IL-21 sustains CD<sub>28</sub> express on IL-15 activated human naive CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T cells [J]. *J Immunol*, 2005, 175(2): 755-762.
- Godlove J, Chiu WK, Weng NP. Gene expression and generation of CD<sub>28</sub><sup>-</sup>CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T cells mediated by interleukin 15 [J]. *Exp Gerontol*, 2007, 42(5): 412-415.
- Martinez-Escribano JA, Hernandez-Caselles T, Campillo JA, et al. Changes in the number of CD<sub>80</sub><sup>+</sup>, CD<sub>66</sub><sup>+</sup>, and CD<sub>28</sub><sup>+</sup> peripheral blood lymphocytes have prognostic value in melanoma patients [J]. *Hum Immunol*, 2003, 64(8): 796-801.
- Tsukishiro T, Donnenberg AD, Whiteside TL. Rapid turnover of the CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>-</sup>T cell subset of effector cells in the circulation of patients with head and neck cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2003, 52(10): 599-607.
- 刘晓光, 金秀国, 刘波, 等. 结肠癌患者外周血淋巴细胞CD<sub>8</sub>和CD<sub>28</sub>的表达[J]. *肿瘤学杂志*, 2007, 13(1): 68-69.
- 宋丁, 王燕云. CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>-</sup>T细胞在原发性肝癌患者外周血的表达及意义[J]. *中国实验诊断学*, 2009, 13(4): 493-494.
- 吉顺荣, 姚宛彤, 张波, 等. 胰腺癌患者外周血CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>和CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>-</sup>T淋巴细胞亚群的分析[J]. *上海医学*, 2012, 35(4): 316-319.
- 杜晓辉, 林利利, 宁宁, 等. 胃癌患者血清调节性T细胞、细胞毒性T淋巴细胞的检测及意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(12): 2704-2706.
- 裘宇容, 杨春莉, 陈炼波, 等. 原发性肝癌患者CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>和CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>-</sup>T细胞亚群的分析[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(1): 72-73.

(收稿日期:2014-11-22)