

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.06.008

Th17 细胞及其相关细胞因子在沙利度胺联合 CHOP 方案治疗 DLBCL 患者中的价值*

李 丽¹, 杨一飞², 杨俊超¹, 周丽云^{3△}

(1 河北工程大学附属医院血液内科, 河北邯郸 056002; 2. 河北工程大学附属医院(临床医学院)学科建设与研究生教育办公室, 河北邯郸 056002; 3. 浙江省嘉兴市第一医院肝病研究所 034000)

摘要:目的 探讨辅助性 T 细胞 17(Th17 细胞)及其相关细胞因子[白细胞介素(IL)-17]在沙利度胺联合 CHOP 方案(环磷酰胺+长春新碱+吡柔比星+地塞米松)治疗弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)患者中的价值。方法 选择 36 例 DLBCL 患者作为试验组,按 Ann Arbor/Cotswolds 分期系统进行分期,给予沙利度胺联合 CHOP 方案进行治疗,抽取治疗前后外周血清,比较治疗前后、有效组和无效组上述细胞的变化;同时选取 20 例健康体检者作为对照组,比较对照组与试验组患者上述细胞及其细胞因子变化。结果 沙利度胺联合 CHOP 方案治疗 DLBCL 患者总有效率为 80.6%,试验组较对照组外周血清中 Th17 细胞及 IL-17 明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),且分期越高,下降越明显;同时治疗有效组较无效组上述细胞及细胞因子明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 沙利度胺联合 CHOP 方案可能通过干预 Th17 细胞及相关细胞因子治疗 DLBCL, Th17 细胞及其相关细胞因子可作为沙利度胺联合 CHOP 方案治疗 DLBCL 是否有效的指标之一。

关键词:辅助性 T 细胞; 沙利度胺; CHOP 方案; 弥漫大 B 细胞淋巴瘤

中图分类号:R552

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)06-0745-04

The value of Th17 cell and its related cytokines in the thalidomide combined with CHOP regimen treatment in patients with diffuse large B-cell lymphoma*

LI Li¹, YANG Yifei², YANG Junchao¹, ZHOU Liyun^{3△}

(1. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056002, China; 2. Department of Discipline Construction and Graduate Education, Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering (School of Clinical Medicine), Handan, Hebei 056002, China; 3. Institute of Liver Diseases, First Hospital of Jiaxing, Jiaxing, Zhejiang 034000, China)

Abstract: Objective To investigate the value of helper T cells 17 (Th17) cell and its related cytokines (IL-17) in the thalidomide combined with CHOP regimen treatment of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). **Methods** A total of 36 cases of DLBCL patients as experimental group which were staged according to Ann Arbor/Cotswolds staging system and given them thalidomide combined with CHOP regimen treatment. Peripheral serum was extracted before and after treatment. And Th17 cells and related cytokines were compared. At the same time, 20 healthy volunteers peripheral blood samples were extracted as controls. Cells change in healthy and DLBCL patients were compared. **Results** The effective of thalidomide combined with CHOP regimen treatment of DLBCL was 80.6%. Compared with the control group, Th17 cells and their related cytokines in the experimental group were significantly decreased ($P < 0.05$), and the higher the period, the more obvious of decline. While the above-mentioned cells and cytokines were significantly higher in the effective treatment group than in the ineffective group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Thalidomide combined with CHOP regimen may through intervene Th17 cells and related cytokines to treat DLBCL, and Th17 cell and its related cytokines can be used as indicators of the effectiveness of thalidomide combined with CHOP regimen in the treatment of DLBCL.

Key words: helper T cells; thalidomide; CHOP regimen; diffuse large B cell lymphoma

* 基金项目:河北省重点研发计划健康医疗与生物医药专项项目(18277782D)。

作者简介:李丽,女,副主任医师,主要从事血液疾病方面的研究。△ 通信作者, E-mail:1071815100@qq.com。

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)是一种临床上最常见的非霍奇金淋巴瘤,在西方国家占成人非霍奇金淋巴瘤的 30%~40%^[1],在我国占成人非霍奇金淋巴瘤的 50%~60%^[2]。DLBCL 是一类形态学、免疫表型、生物学特征以及临床表现具有高度异质性的侵袭性恶性肿瘤,这导致 DLBCL 患者在对药物治疗的反应和预后上存在很大差异^[3]。近年来,随着分子靶向治疗技术在 DLBCL 治疗中的应用和发展,R-CHOP 化疗方案(利妥昔单抗+环磷酰胺+多柔比星+长春新碱+泼尼松)已经成为治疗 DLBCL 的一线方案。但由于利妥昔单抗价格昂贵,因此研究者致力于寻找一种基于 CHOP 方案(环磷酰胺+长春新碱+多柔比星+泼尼松)更经济有效的方案。DLBCL 的发生、发展与机体免疫失衡有密切的关系,近年来不断有学者尝试使用沙利度胺联合 CHOP 方案用于治疗 DLBCL,并取得了一些成果,但对于其尚未进行深入的探索,本研究旨在探索辅助性 T 细胞 17(Th17 细胞)及其相关细胞因子[白细胞介素(IL)-17]在 DLBCL 患者外周血清中的变化及在沙利度胺联合 CHOP 方案治疗前后 DLBCL 患者外周血清中上述细胞及其因子的变化,探讨其在沙利度胺联合 CHOP 方案治疗 DLBCL 患者中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1 月至 2017 年 3 月在河北工程大学附属医院(以下简称“本院”)血液内科首次诊断为 DLBCL 患者共 36 例为试验组,所有患者均符合《中国弥漫大 B 细胞淋巴瘤诊断与治疗指南》^[4]中关于 DLBCL 的诊断标准。采用 Ann Arbor/Cotswolds 分期系统对 DLBCL 患者进行分期,其中 I~II 期 12 例,III~IV 期 24 例。所有入选患者均未接受过放化疗等特殊治疗,并同时排除患者自身免疫性疾病、病毒性肝炎、炎症及其他恶性肿瘤。同时选取同时期健康体检者 20 例作为对照组。本研究均取得所有研究对象知情同意及符合伦理标准,已通过本院伦理委员会审批。两组研究对象的性别、年龄等构成差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。见表 1。

表 1 两组研究对象一般资料比较[n(%)]

组别	n	男	年龄>60岁
试验组	36	21(58.3)	16(44.4)
对照组	20	13(36.1)	9(45.0)

1.2 方法 试验组患者于化疗前空腹抽取静脉血,然后给予沙利度胺+CHOP 化疗,具体为环磷酰胺 0.6 g,第 1、8 天;长春新碱 30 mg,第 1、8 天;多柔比星 40 mg,第 1、8 天;泼尼松 80 mg,第 1 天至第 8 天。沙利度胺 100 mg/d,自每个疗程化疗第 1 天开始服用

至每个疗程化疗结束后停止服用,8 个化疗周期后,空腹抽取静脉血。同时空腹抽取对照组静脉血作为对照。

1.2.1 Th17 细胞的检测 采用流式细胞术对 Th17 细胞进行检测。取各组标本单个核细胞悬液,按 Th17 流式试剂盒说明书依次加入适量的丙二醇甲醚醋酸酯(PMA)、离子霉素→恒温孵育 2 h→加入 BD GolgiPlug™蛋白转运抑制剂→培养 4 h→加入 FITC-CD4 抗体→磷酸盐溶液(PBS)洗涤→加入破膜液→加入 Alexa Fluor 647/CD3 FITC/CD8 IL-17 抗体→孵育 20 min,上机检测。

1.2.2 IL-17 水平的检测 采用酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测 IL-17 水平。取各组标本的外周血清,严格按照试剂盒说明书进行操作,依次加入标本、生物素化检测抗体、酶结合物稀释液、显色底物,最后加入终止液及底物,最后在酶标仪内测量 A_{450} 值,保存最终结果。

1.2.3 ROR γ t mRNA 表达量的检测 采用实时荧光定量聚合酶链反应(Rt-PCR 法)检测各组中 ROR γ t mRNA 表达量。Troizl 法提取各标本血清总 RNA,以 β -actin 为内参,依次加入引物,加入反应体系,设置反应条件(95 °C 预变性 60 s,95 °C 变性 15 s,58 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 45 s,主循环 40 次),进行 PCR 循环,1%琼脂糖凝胶电泳中进行 PCR 产物电泳,紫外投射反射分析仪分析结果。各引物如下: β -actin,F 为 5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3';R 为 5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3'。IL-17,F 为 5'-GTC AAT GCG GAG GGA AAG-3';R 为 5'-CAC GAA GCA GTT TGG GAC-3'。ROR γ t,F 为 5'-CCT GGG CTC CTC GCC TGA CC-3';R 为 5'-TCT CTC TGC CCT CAG CCT TGC C-3'。

1.3 仪器与试剂 人类 Th17 流式试剂盒(美国 eBioscience 公司),IL-17、ROR γ t 试剂盒(美国 Biolegend 公司),Troizl 试剂(北京天根生物科技有限公司),流式细胞仪(赛默飞世尔科技有限公司),Rt-PCR 仪,高速离心机(湘仪器械生物公司),-80 °C 冰箱(日本三洋公司)。

1.4 疗效评价标准^[4] 完全缓解(CR):所有病灶均消失。部分缓解(PR):可测量病灶缩小,没有新病灶。稳定(SD):未达 CR、PR 或进展(PD)。PD:未达 CR、PR。总有效率=(CR 例数+PR 例数)/总例数×100%。

1.5 统计学处理 所有数据采用 SPSS20.0 软件进行统计学分析,每组试验至少重复 3 次,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学

意义。

2 结 果

2.1 临床疗效 8个疗程后进行临床疗效评价,入组患者均进行详细的体格检查、血常规、上腹CT,必要时行PET-CT进行检查,8个疗程后达CR者20例,PR者9例,SD者5例,PD者2例,总有效率80.6%。将治疗有效的29例称为有效组,而治疗无效的7例称为无效组。

2.2 治疗前试验组与对照组外周血中 Th17 细胞及 IL-17 水平的比较 I~II期、III~IV期试验组患者 Th17 细胞、IL-17 水平均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);III~IV期患者外周血中 Th17 细胞及 IL-17 均低于 I~II 期患者,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 治疗前试验组与对照组外周血中 Th17 细胞及 IL-17 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Th17 细胞(%)	IL-17(pg/mL)
对照组	20	2.650±0.077	7.960±0.556
I~II期试验组	12	1.520±0.318*	6.897±0.100*
III~IV期试验组	24	0.520±0.386*	5.263±0.126*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

2.3 治疗后有效组与无效组血清 Th17 细胞及 IL-17 水平的比较 8个疗程沙利度胺联合 CHOP 方案治疗后,结果发现有效组中患者外周血中 Th17 细胞及 IL-17 水平较无效组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 治疗后有效组与无效组外周血中 Th17 细胞及 IL-17 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Th17 细胞(%)	IL-17(pg/mL)
有效组	29	2.24±0.097	7.367±0.168
无效组	7	1.43±0.498	6.130±0.737
P		0.037	0.040

2.4 治疗后有效组与无效组 IL-17 mRNA、ROR γ t mRNA 表达水平比较 结果发现 29 例沙利度胺联合 CHOP 方案治疗有效组中,IL-17 mRNA、ROR γ t mRNA 表达水平分别为 13.960±0.089、0.647±0.188;而 7 例治疗无效组患者外周血清中 IL-17 mRNA、ROR γ t mRNA 表达水平分别为 8.513±0.225、0.273±0.050,与治疗有效组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨 论

DLBCL 是一种发病率随年龄增加而增高的非霍奇金淋巴瘤,其具有高度的异质性和侵袭性。研究发现,其发病风险在免疫缺陷患者中明显增加,因此认为其发病可能与机体免疫有关^[5]。免疫调节因子沙利度胺具有调节淋巴细胞的作用,它能诱导细胞毒 T

细胞的增殖,从而降低 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞的比例,起到抗肿瘤的作用,对于初治甚至复发难治性多发性骨髓瘤具有良好的治疗效果^[6]。近年来有学者尝试使用沙利度胺联合 CHOP 方案治疗 DLBCL,并发现较单用 CHOP 方案可明显提高 DLBCL 患者化疗缓解率^[7-8],但对于其具体的作用机制尚不十分明确。

初始 CD4⁺ T 细胞受到抗原刺激后在转录因子 STAT3 和 ROR γ t 的调控下^[9],并在肿瘤坏死因子(TNF)- β 、IL-6、IL-1 的作用下能够分化成为 Th17 细胞^[10-12]。Th17 细胞是不同于 Th1 和 Th2 细胞的一种新的细胞亚群,其主要通过产生 IL-17A 发挥作用,但是还能够分泌 IL-21、IL-22、TNF- α 和 IL-26 等炎症因子及趋化因子 2(CCL2)^[13]。研究显示其在炎症、自身免疫性疾病以及肿瘤等疾病的发生、发展中起着重要的作用,随着对其研究的深入,国内外学者相继发现其与 DLBCL 的发生、发展具有密切相关的联系,如 YANG^[14] 在 DLBCL 患者外周血中发现其 Th17 细胞比例较健康者明显降低,钟伟杰等^[15] 研究发现,DLBCL 患者外周血中 Th17 细胞及 IL-17 表达低于健康对照者,并进一步研究发现 Th17 细胞及其相关因子与淋巴瘤国际预后指数(IPI)评分具有密切相关的关系。本研究通过对比健康体检者及 DLBCL 患者外周血清中 Th17 细胞及 IL-17,结果发现 DLBCL 患者外周血中 Th17 细胞及 IL-17 较健康体检者表达量明显降低,并发现 DLBCL 分期越高,表达量越低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),说明 Th17 细胞及 IL-17 与 DLBCL 的发生、发展具有密切相关的联系。本研究在患者享有完全知情同意的基础上给予入组的 DLBCL 患者沙利度胺联合 CHOP 方案进行治疗,在 8 个疗程治疗结束后,发现入组的患者总有效率达到 80.6%,这与报道的研究结果相似^[16]。进一步对比 DLBCL 患者有效组与无效组中患者外周血清中 Th17 细胞及 IL-17 表达,结果发现有效组中外周血清中 Th17 细胞及 IL-17 表达量较无效组中表达量明显升高,同时有效组中 IL-17 mRNA 表达量也较无效组中明显升高($P < 0.05$),说明沙利度胺联合 CHOP 方案治疗 DLBCL 机制可能与提高患者外周血中 Th17 细胞及 IL-17 表达量有关。

综上所述,沙利度胺联合 CHOP 方案可通过上调 Th17 细胞及 IL-17 水平来发挥抗 DLBCL 作用,Th17 细胞可作为沙利度胺联合 CHOP 方案治疗 DLBCL 是否有效的价值评判标准之一。但由于本研究样本量较少,患者随访时间短,未进行相关的生存分析及未进行相关的信号通路检测,关于 Th17 细胞及 IL-17 在 DLBCL 患者体内具体的作用及在沙利度胺联合 CHOP 方案治疗 DLBCL 患者中的价值需要进一步的研究分析。

参考文献

- [1] MARTELLI M, FERRERI A J, AGOSLINELLI C, et al. Diffuse large B-cell lymphoma[J]. Crit Rev Oncol Hemato, 2013, 87(2):146-171.
- [2] 李小秋, 李甘地, 高子芬, 等. 中国淋巴瘤亚型分布: 国内多中心性病例 10 002 例分析[J]. 诊断学理论与实践, 2012, 11(2):111-115.
- [3] LOSSOS I S, MORGENZSTERN D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(6):995-1007.
- [4] 中华医学会血液学分会. 中国弥漫大 B 细胞淋巴瘤诊断与治疗指南[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(10):724-726.
- [5] O'CONNOR O A, CZUCZMAN M S. Novel approaches for the treatment of NHL: proteasome inhibition and immune modulation[J]. Leuk Lymphoma, 2008, 49(Suppl 1):59-66.
- [6] MOEHLER T. Clinical experience with Thalidomide and lenalidomide in multiple myeloma[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2012, 12(4):372-390.
- [7] 黄春晖. 沙利度胺联合 CHOP 方案治疗弥漫大 B 细胞淋巴瘤临床研究[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2016, 10(5):741-743.
- [8] 杨英姿. CHOPE 方案单用或与沙利度胺联合治疗复发难治性非霍奇金淋巴瘤疗效的比较[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(1):84-88.
- [9] IVANOV I I, MCKENZIE B S, ZHOU L, et al. The orphan nuclear receptor ROR gamma t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17(+) T helper cells[J]. Cell, 2006, 126(6):1121-1133.
- [10] VELDHONEN M, HOCKING R J, ATKINS C J, et al. TGF beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells[J]. Immunity, 2006, 24(2):179-189.
- [11] CARRIER Y, GAO W, KORN T, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells[J]. Nature (London), 2006, 441(7090):235-238.
- [12] MANGAN P R, HARRINGTON L E, O'QUINN D B, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage[J]. Nature, 2006, 441(790):231-234.
- [13] OUYANG W, KOLLS J K, ZHENG Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation[J]. Immunity, 2008, 28(4):454-467.
- [14] YANG Z Z. Malignant B cells skew the balance of regulatory T cells and TH17 cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma[J]. Cancer Res, 2009, 69(13):5522-5530.
- [15] 钟伟杰, 李庆山, 许昕, 等. 弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者 Th17 细胞及相关细胞因子水平与预后的关系[J]. 广东医学, 2016, 37(5):674-677.
- [16] JI D, LI Q, CAO J, et al. Thalidomide enhanced the efficacy of CHOP chemotherapy in the treatment of diffuse large B cell lymphoma: a phase II study[J]. Oncotarget, 2016, 7(22):33331-33339.
- (收稿日期:2018-08-29 修回日期:2018-12-18)
- (上接第 744 页)
- [5] PENNO E C, CRUMP J A, BAIRD S J. Performance Requirements to Achieve Cost-Effectiveness of Point-of-Care Tests for Sepsis Among Patients with Febrile Illness in Low-Resource Settings[J]. Am J Trop Med Hyg, 2015, 93(4):841-849.
- [6] 黄静沁, 左玫, 李智, 等. POCT 法与 Roche 电化学发光法检测心肌标志物的比较[J]. 检验医学, 2010, 25(9):734-736.
- [7] 贺喜艳. POCT 法和 Roche 电化学发光法对心肌标志物的检测比较[J]. 临床医学, 2014, 34(11):112-113.
- [8] 王彬, 岳化葵, 熊玮, 等. POCT 检测肌红蛋白对心肌梗死的诊断价值[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(5):722-724.
- [9] SANJAY S T, FU G, DOU M, et al. Biomarker detection for disease diagnosis using cost-effective microfluidic platforms[J]. Analyst, 2015, 140(21):7062-7081.
- [10] FAN J, MA J, XIA N, et al. Clinical Value of Combined Detection of CK-MB, MYO, cTnI and Plasma NT-proBNP in Diagnosis of Acute Myocardial Infarction[J]. Clin Lab, 2017, 63(3):427-433.
- [11] 安园. 分析急性心肌梗死诊断中心肌损伤标志物联合应用的临床价值[J]. 影像研究与医学应用, 2018, 2(6):18-19.
- [12] TANYANYIWA D, DANDARA C, BHANA S A, et al. Implementation of POCT in the diabetic clinic in a large hospital[J]. Afr Health Sci, 2015, 15(3):902-907.
- [13] GAO T, CAO X, GE P, et al. A self-assembled fluorescent organic nanoprobe and its application for sulfite detection in food samples and living systems [J]. Org Biomol Chem, 2017, 15(20):4375-4382.
- [14] 梁玉庚, 孙笑菊, 武飞飞, 等. 胶体金免疫层析法与化学发光法在心肌梗死诊断中的价值比较[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(22):5601-5602.
- [15] 胥国强, 康清秀, 李文楷, 等. 5 种床旁检测法与 Abbott 化学发光法检测心肌标志物的对比研究[J]. 四川医学, 2018, 39(2):157-160.
- (收稿日期:2018-08-10 修回日期:2018-11-21)