

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.19.010
文章编号: 1005-8982 (2024) 19-0063-10

临床研究·论著

慢性淋巴细胞白血病患者Tfh细胞及其亚群水平的变化和临床意义研究*

张瑞, 郭沙, 曲建华

[新疆医科大学第一附属医院(新疆维吾尔自治区血液病研究所) 血液病中心,
新疆 乌鲁木齐 830054]

摘要: 目的 初步探讨Tfh细胞及其亚群在慢性淋巴细胞白血病(CLL)患者中的变化特点, 并分析其临床意义。**方法** 选取2021年1月—2023年9月新疆医科大学第一附属医院收治的70例初诊CLL患者为CLL组, 另选取该院体检健康人员50例为对照组。应用流式细胞术检测Tfh、Tfh1、Tfh2、Tfh17细胞比例, 并分析Tfh细胞PD-1和ICOS的表达水平; 实时荧光定量聚合酶链反应检测BCL-6、Blimp-1、IL-21基因表达; Western blotting检测BCL-6、Blimp-1蛋白表达; 酶联免疫吸附试验检测血清细胞因子IL-21的水平。**结果** CLL组外周血Tfh、Tfh1、PD-1⁺Tfh、ICOS⁺Tfh和PD-1⁺ICOS⁺Tfh细胞比例较对照组增加($P < 0.05$), 亚群比值Tfh1/(Tfh2+Tfh17)比值也升高($P < 0.05$)。与对照组相比, CLL组BCL-6、Blimp-1、IL-21基因和蛋白相对表达量均升高($P < 0.05$), BCL-6/Blimp-1比值也升高($P < 0.05$)。Pearson相关性分析结果显示, BCL-6基因和蛋白表达、BCL-6/Blimp-1比值、IL-21水平与Tfh、Tfh1/(Tfh2+Tfh17)均呈正相关($P < 0.05$)。临床指标分析结果显示, 随着IPI评分分组越靠后, Tfh细胞比例、Tfh1/(Tfh2+Tfh17)比值越高, 并且与骨髓中B淋巴细胞呈正相关($P < 0.05$), 与免疫球蛋白呈负相关($P < 0.05$)。**结论** CLL患者外周血Tfh细胞参与疾病发病机制, 并且Tfh细胞亚群存在偏向于Tfh1细胞的失衡, Tfh细胞的异常分化可能参与CLL的发病和体液免疫紊乱机制。

关键词: 慢性淋巴细胞白血病; 滤泡辅助性T细胞; 免疫紊乱

中图分类号: R733.72

文献标识码: A

Characteristics and significance of changes in Tfh cells and their subsets in patients with chronic lymphocytic leukemia*

Zhang Rui, Guo Sha, Qu Jian-hua

[Hematology Center, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University (Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute of Hematology), Uygur Autonomous Region, Xinjiang 830054, China]

Abstract: Objective To investigate the changes and clinical significance of Tfh cells and their subsets in patients with chronic lymphocytic leukemia(CLL). **Methods** Seventy newly diagnosed CLL patients admitted to the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University from January 2021 to September 2023 were selected as the CLL group, with 50 healthy individuals as the control group. The proportion of Tfh, Tfh1, Tfh2 and Tfh17 cells was detected by flow cytometry, and the expression levels of PD-1 and ICOS in Tfh cells were detected. The expression levels of BCL-6, Blimp-1 and IL-21 mRNA were detected by PCR. The protein levels of BCL-6 and Blimp-1 were detected by western blot. The serum levels of cytokine IL-21 were detected by ELISA. **Results** The proportions of Tfh, Tfh1, PD-1⁺Tfh, ICOS⁺Tfh, and PD-1⁺ICOS⁺Tfh cells in peripheral blood of CLL patients were

收稿日期: 2024-02-03

* 基金项目: 新疆维吾尔自治区“天山创新团队计划”项目(No.2022D14008)

[通信作者] 曲建华, E-mail: jhuaqu@163.com

significantly increased compared with healthy controls, and the subset ratio Tfh1/(Tfh2 + Tfh17) ratio was also significantly increased ($P < 0.05$). Compared with healthy controls, BCL-6, Blimp-1, and IL-21 levels were significantly increased in the CLL patient group, and the BCL-6/Blimp-1 ratio was also significantly increased ($P < 0.05$). After correlation analysis, BCL-6 levels, BCL-6/Blimp-1 ratio, and IL-21 levels were positively correlated with Tfh and Tfh1/(Tfh2 + Tfh17) ($P < 0.05$). Clinical indicator analysis revealed that higher IPI scores were associated with an increased proportion of Tfh cells and a higher Tfh1/(Tfh2 + Tfh17) ratio. Additionally, these parameters were positively correlated with bone marrow B lymphocytes ($P < 0.05$) and negatively correlated with immunoglobulin levels ($P < 0.05$). **Conclusion** Peripheral blood Tfh cells in CLL patients are involved in disease pathogenesis, and there is a subset imbalance skewing towards Tfh1 cells. The abnormal differentiation of Tfh cells may play a role in the pathogenesis of CLL and the mechanisms underlying humoral immune dysregulation.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia; follicular helper T cells; immune disorders

慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL) 是一种血液系统的恶性肿瘤,其特征是外周血、骨髓及淋巴组织中出现成熟的小 B 淋巴细胞克隆性增殖^[1]。CLL 发病机制中的一个主要特征是免疫系统紊乱或障碍,可表现为体液和细胞免疫缺陷,从而增加感染和继发性恶性肿瘤的发生率^[2-3]。目前细胞免疫靶向治疗较药物化疗有明显改善。虽然 CLL 的细胞免疫靶向治疗取得了进展,但是 CLL 仍无法治愈^[4]。CLL 患者体内存在由肿瘤 B 细胞和免疫细胞相互作用引起的免疫功能紊乱,提供了一个利于肿瘤生存、增殖的肿瘤微环境,使 CLL 肿瘤 B 细胞逃避免疫监视^[5]。CD4⁺T 免疫细胞是肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 的主要组成部分之一,其在评估肿瘤患者的疗效和预后中发挥重要作用^[6]。滤泡辅助性 T 细胞 (follicular helper T cell, Tfh) 是一类 CXCR5⁺的 CD4⁺效应 T 细胞亚群,是近年来发现的一种新型 T 细胞亚群^[7]。Tfh 细胞特征表现为 CXCR5、可诱导共刺激因子 (inducible costimulator, ICOS)、程序性死亡受体-1 (programmed death receptor-1, PD-1) 高表达,以及多种转录因子的参与,包括 B 细胞淋巴瘤因子-6 (B cell lymphoma-6, BCL-6)^[8]。Tfh 细胞是支持生发中心 B 细胞分化和存活的主要细胞亚群。Tfh 在促进 B 细胞增殖和 B 细胞转化为浆细胞并诱导抗体分泌当中起着关键作用^[7]。由于 CXCR3 和 CCR6 的表达存在差异, Tfh 细胞分为 CXCR3⁺CCR6⁻ (Tfh1 细胞)、CXCR3⁻CCR6⁺ (Tfh2 细胞)、CXCR3⁻CCR6⁺ (Tfh17 细胞) 3 个主要亚群,这些亚群具有不同的能力辅助 B 细胞发挥功能, Tfh17 和 Tfh2 细胞诱导原始 B 细胞产生抗体,而 Tfh1 细胞不能激活 B 细胞,具有较差的辅助 B 细胞能力^[9-10]。Tfh 细胞主要表达转录因子 BCL-6, 该转录

因子可区分 Tfh 细胞与其他辅助 T 细胞亚群,并且是维持 Tfh 细胞在淋巴结中发挥功能所必需的因子^[11]。BCL-6 的表达可被 B 细胞诱导成熟蛋白-1 (lymphocyte induced maturation protein-1, Blimp-1) 拮抗, BCL-6 的诱导和 Blimp-1 的下调在 Tfh 分化中同样重要^[12]。幼稚 CD4⁺T 细胞向 Tfh 细胞表型分化主要是由白细胞介素-21 (Interleukin-21, IL-21) 和白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 信号传导而介导^[13-14]。Tfh 细胞参与多种恶性肿瘤疾病的发病机制,而 BCL-6、Blimp-1、IL-21 这 3 种因子的表达变化在一定程度上反映 Tfh 细胞免疫应答状态。

目前关于 Tfh 细胞亚群的研究存在争议^[15-17],并且 Tfh 细胞有关的转录因子 BCL-6/Blimp-1 平衡对 Tfh 细胞分化及增殖的影响尚不明确,也未见分析与临床预后密切相关的 CLL 国际预后指数 (international prognostic index, IPI) 评分。本研究检测 Tfh 细胞比例、亚群比例及其他相关因子的水平,从细胞、相关转录因子和细胞因子 3 个层面探讨 Tfh 在 CLL 病程中的变化特点, Tfh 细胞及亚群的失衡在 CLL 患者免疫应答中的发挥重要作用,为 CLL 的病因分析和临床免疫治疗提供实验基础。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2021 年 1 月—2023 年 9 月新疆医科大学第一附属医院收治的初诊 CLL 患者 70 例作为 CLL 组,其中,男性 39 例,女性 31 例;年龄 41 ~ 83 岁,中位年龄 63 岁。依据国际 CLL 工作组的诊断标准^[18],所有 CLL 患者近 6 个月内未接受治疗。与其他的慢性 B 淋巴细胞增殖疾病相鉴别,包括:边缘区淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、华氏巨

球蛋白血症等、装细胞淋巴瘤。另选取在本院体检中心体检的正常健康人员 50 例为对照组。其中,男性 30 例,女性 20 例;年龄 40 ~ 81 岁,中位年龄 64 岁。两组性别、年龄等比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究经医院医学伦理委员会批准,所有研究对象签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器

流式荧光抗体、CD3-Pe-Cy7、CD4-FITC、CXCR5-PE、CXCR3-PE-CF594、CCR6-APC、PD-1-BB700、ICOS-AF700 均购自美国 BD 公司,流式细胞仪(型号:FACS Aria II)购自美国 BD 公司,TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒购自德国 Qiagen 公司,引物由上海生工生物工程有限公司合成。酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自上海巧伊生物技术有限公司,磁性细胞分选器及 CD4⁺T 细胞磁珠均购自德国 Miltenyi 公司。

1.3 方法

1.3.1 收集 CLL 患者的临床资料 包括患者年龄、性别、淋巴细胞计数、淋巴细胞比例、CD38、ZAP-70、 β_2 微球蛋白、IGVH 基因突变、p53 突变、荧光原位杂交技术检测结果,以及免疫分型结果中骨髓中 B 细胞占有核细胞百分比、免疫球蛋白水平。根据 IPI 评分对所有初诊 CLL 患者进行分层^[19],低危组 12 例,中危组 17 例,高危组 28 人,极高危组 13 例。

1.3.2 标本采集及外周血单个核细胞分离 采集所有研究对象晨起空腹肘静脉血 5 mL,置于 EDTA 抗凝的真空采血管中,1 500 r/min 离心 5 min,取上层血浆,置入 -80 °C 冰箱冷冻保存,用于检测血浆中细胞因子和免疫球蛋白水平。用 Ficoll 分离液密度梯度离心分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),取一部分稀释混匀后用于流式细胞术检测,另一部分用于 CD4⁺T 细胞分选,再进行后续实验。

1.3.3 流式细胞术检测 Tfh 细胞和 Tfh 细胞亚群 将 PBMC 置于试管中,加入 CD3-Pe-Cy7、CD4-FITC、CXCR5-PE、CXCR3-PE-CF594、CCR6-APC、PD-1-BB700、ICOS-AF700 对 PBMC 进行染色,同时设立同型对照管。4 °C 避光孵育 30 min。孵育后 PBS 液清洗 3 次,加入 500 μ L PBS 液重悬细胞,进行流式细胞

术检测。用 KAKULA 软件对流式细胞术获取的数据进行分析。CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ 表示 Tfh 细胞,CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁻ 表示 Tfh1 细胞,CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺CXCR3⁻CCR6⁻ 表示 Tfh2 细胞,CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺CXCR3⁻CCR6⁺ 表示 Tfh17 细胞,并分析 Tfh 细胞上 PD-1 和 ICOS 水平。

1.3.4 CD4⁺T 细胞分选 磁性细胞分选器分选 CD4⁺T 细胞,通过阳性选择分选 CD4⁺T 细胞。经流式细胞术验证,分离的 CD4⁺T 细胞 > 95% 纯度和 > 99% 活力。分选的 CD4⁺T 细胞用于 BCL-6、Blimp-1 和 IL-21 基因和蛋白检测。

1.3.5 qRT-PCR 检测 BCL-6、Blimp-1、IL-21 基因表达 采用 TRIzol 法提取免疫磁珠分选的 CD4⁺T 细胞的总 RNA,用核酸蛋白测定仪测定浓度。根据逆转录试剂盒的说明进行逆转录。BCL-6 正向引物:5'-GT CCGTGGGTGGTGGAGAACAAC-3',反向引物:5'-GG AATAAGAGGCTGGCGGTGTGB-3',长度均为 23 bp;Blimp-1 正向引物:5'-AGCAGCGACGAAGCCATGAAT C-3',长度 22 bp,反向引物:5'-GCGGGTAGGGAAGG GTCTTGTAG-3',长度 23 bp;IL-21 正向引物:5'-GGT CCTGGTGGGTCTGGTGAG-3',长度 21 bp,反向引物:5'-CTCTGGGGCGTCCCTTGTCTC-3',长度 20 bp;GADPH 正向引物:5'-GCCAAGCCCTGCCATGTAGT G-3',长度 21 bp,反向引物:5'-GCGTGACTGCTCCC TTTCTGTG-3',长度 22 bp。反应条件:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 60 s,共 40 个循环,重复 3 次取平均值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。

1.3.6 Western blotting 检测 BCL-6 和 Blimp-1 蛋白表达 分选的 CD4⁺T 细胞,按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,加入 5 \times 蛋白上样缓冲液混匀,100 °C 煮沸变性。吸取 5 μ g 蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后,并转移至 PVDF 膜上,封闭液封闭 1 h,分别加入一抗稀释液(1:1 000)4 °C 孵育过夜,加入二抗(1:5 000)孵育 2 h,ECL 显色,曝光,置显影仪中显影。以 GAPDH 为内参,用 Image J 图像分析软件对各组目的蛋白和内参蛋白的灰度值进行分析。

1.3.7 ELISA 检测细胞因子 IL-21 水平 取血浆样本,置于 4 °C 解冻,操作步骤严格按照说明书进行。按照 1:2 在待测血清样本中加入样本稀释液。分别设置标准工作液孔、空白对照孔和待测样品孔。以

标准工作液浓度为纵坐标,以相应的 OD 值为横坐标绘制标准曲线,计算 IL-21 水平。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 和 GraphPad Prism 9.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较用 t 检或方差分析,进一步两两比较用 LSD- t 检验;相关性分析采用 Pearson 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 Tfh、PD-1⁺Tfh、ICOS⁺Tfh 及 PD-1⁺ICOS⁺Tfh 细胞比例比较

两组 Tfh 细胞比例比较,差异有统计学意义 ($t =$

12.450, $P = 0.000$), CLL 组 Tfh 细胞比例 (19.47 ± 3.83)% 高于对照组 (12.29 ± 2.62)% (见图 1 和图 3A)。两组 Tfh 细胞上 PD-1 的表达水平比较,差异有统计学意义 ($t = 14.500$, $P = 0.000$), CLL 组 Tfh 细胞上 PD-1 的表达水平 (32.63 ± 5.75)% 高于对照组 (22.91 ± 4.05)% (见图 2 和图 3B)。两组 Tfh 细胞上 ICOS 的表达水平比较,差异有统计学意义 ($t = 23.720$, $P = 0.000$), CLL 组 Tfh 细胞上 ICOS 表达水平 (19.89 ± 2.74)% 高于对照组 (6.02 ± 0.585)% (见图 2 和图 3C)。两组 Tfh 细胞上 PD-1 和 ICOS 共表达水平比较,差异有统计学意义 ($t = 19.560$, $P = 0.000$), CLL 组 Tfh 细胞上 PD-1 和 ICOS 共表达水平 (15.97 ± 3.05)% 高于对照组 (3.24 ± 0.80)% (见图 2 和图 3D)。

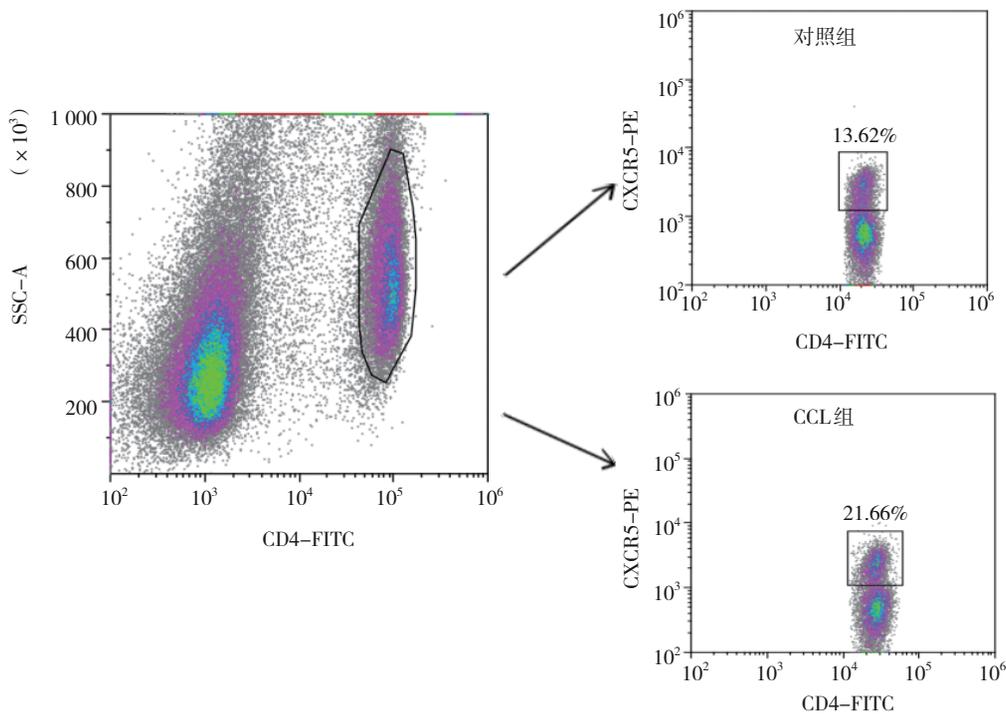


图 1 对照组与 CLL 组 Tfh 细胞流式细胞图

2.2 两组 Tfh 细胞亚群比较

两组 Tfh 细胞亚群 Tfh1 细胞比例比较,差异有统计学意义 ($t = 35.650$, $P = 0.000$), CLL 组 Tfh 细胞亚群 Tfh1 细胞比例 (45.43 ± 9.69)% 高于对照组 (33.97 ± 3.22)%; 两组 Tfh 细胞亚群 Tfh2 细胞比例比较,差异有统计学意义 ($t = 27.620$, $P = 0.000$), CLL 组 Tfh 细胞亚群 Tfh2 细胞比例 (25.93 ± 2.99)% 低于对照组 (31.64 ± 2.83)%; 两组 Tfh 细胞亚群 Tfh17 细胞比例比较,差异有统计学意义 ($t = 19.440$, $P = 0.000$), CLL 组 Tfh 细胞亚群 Tfh17 细胞比例

(18.10 ± 3.41)% 低于对照组 (21.17 ± 3.91)% (见图 4 和图 5A); 两组 Tfh1/(Tfh2+Tfh17) 比值比较,差异有统计学意义 ($t = 24.220$, $P = 0.000$), CLL 组 Tfh1/(Tfh2+Tfh17) 比值 (1.05 ± 0.27)% 高于对照组 (0.65 ± 0.07)% (见图 5B)。

2.3 两组 CD4⁺T 细胞 IL-21、BCL-6、Blimp-1 mRNA 相对表达量, BCL-6/Blimp-1 及 IL-21 水平比较

qRT-PCR 结果显示,两组 IL-21、BCL-6、Blimp-1 mRNA 相对表达量及 BCL-6/Blimp-1 比较,经 t 检

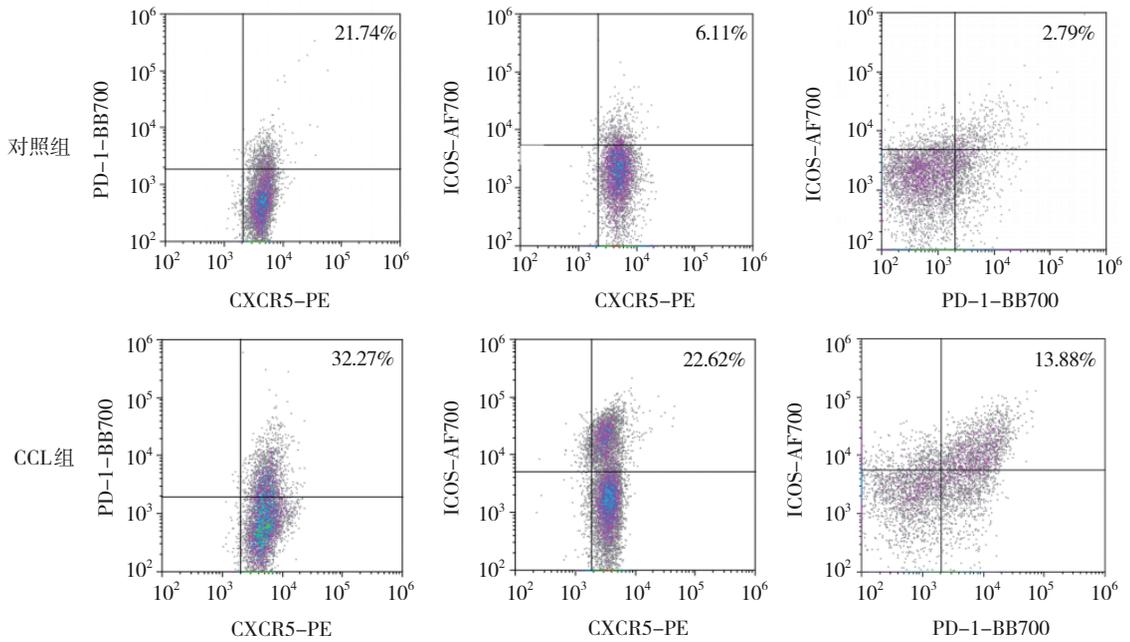
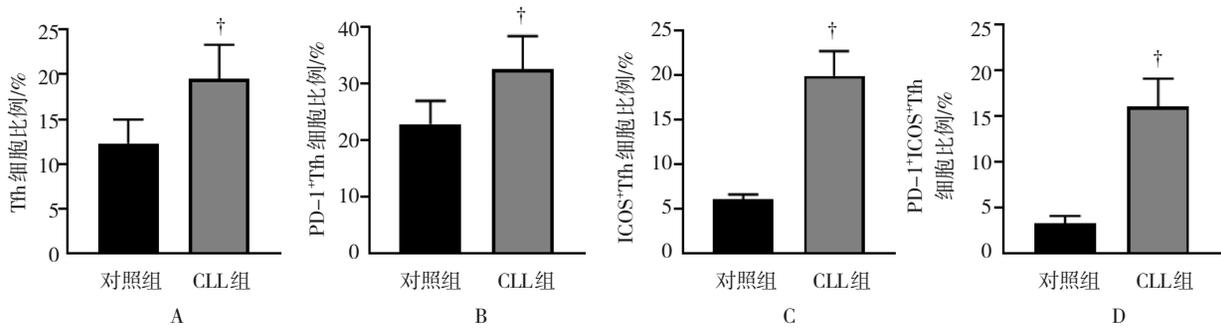


图 2 对照组与 CLL 组 PD-1⁺Tfh、ICOS⁺Tfh、PD-1⁺ICOS⁺Tfh 细胞流式细胞图



A: Tfh 细胞比例; B: Tfh 细胞 PD-1 的表达水平; C: Tfh 细胞 ICOS 的表达水平; D: Tfh 细胞 PD-1 和 ICOS 共表达水平。† 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 Tfh 细胞比例及表型变化

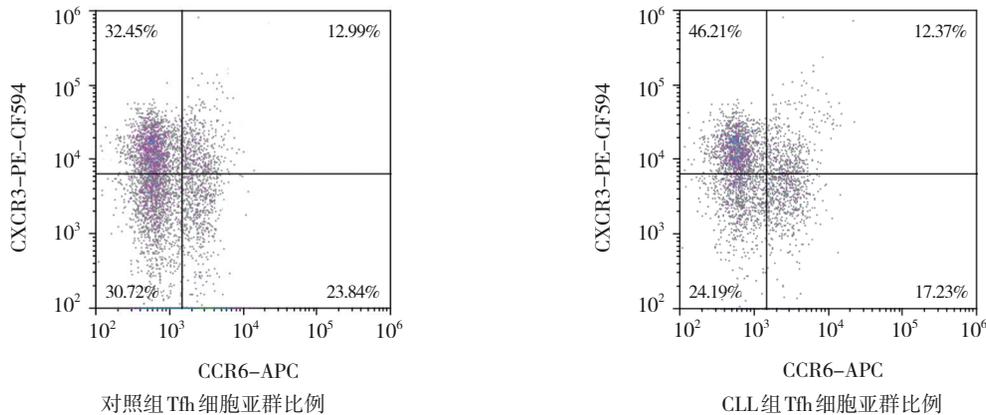
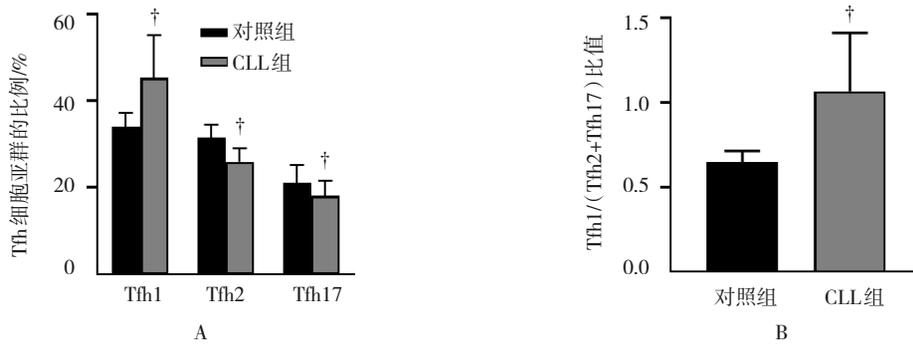


图 4 Tfh 细胞亚群流式图

验, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); CLL 组 IL-21、BCL-6、Blimp-1 mRNA 相对表达量及 BCL-6/Blimp-1 均高于对照组。ELISA 检测结果显示, 两组血清

IL-21 水平比较, 经 t 检验, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); CLL 组血清 IL-21 水平高于对照组。见表 1。



A: Tfh1、Tfh2、Tfh17细胞的比例; B: Tfh1/(Tfh2 + Tfh17)比值。†与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图5 Tfh细胞亚群及Tfh1/Tfh2+Tfh17比值变化

表1 两组CD4⁺T细胞IL-21 mRNA、Bcl-6 mRNA、Blimp-1 mRNA、Bcl-6/Blimp-1及IL-21水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

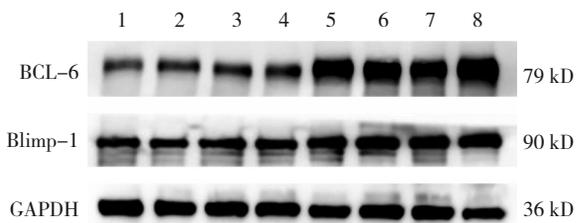
组别	n	IL-21 mRNA	Bcl-6 mRNA	Blimp-1 mRNA	Bcl-6/Blimp-1	IL-21/(pg/mL)
对照组	50	0.347 ± 0.081	0.039 ± 0.017	0.032 ± 0.008	1.239 ± 0.726	285.92 ± 31.06
CLL组	70	3.857 ± 0.892	2.558 ± 0.726	1.260 ± 0.429	2.558 ± 0.726	822.81 ± 74.37
t值		22.950	20.280	16.720	3.930	24.670
P值		0.000	0.000	0.000	0.032	0.000

2.4 两组CD4⁺T细胞BCL-6、Blimp-1蛋白相对表达量及BCL-6/Blimp-1的比较

CLL患者CD4⁺T细胞BCL-6、Blimp-1蛋白相对表达量及BCL-6/Blimp-1比较,经t检验,差异有统计学意义($P < 0.05$); CLL组均高于对照组。见表2和图6。

表2 两组CD4⁺T细胞Bcl-6和Blimp-1蛋白相对表达量及Bcl-6/Blimp-1的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	Bcl-6蛋白	Blimp-1蛋白	Bcl-6/Blimp-1
对照组	50	0.556 ± 0.175	0.613 ± 0.142	0.889 ± 0.147
CLL组	70	1.632 ± 0.337	1.042 ± 0.353	1.660 ± 0.372
t值		16.34	3.93	15.78
P值		0.000	0.015	0.000



1: HC1; 2: HC2; 3: HC3; 4: HC4; 5: CLL1; 6: CLL2; 7: CLL3; 8: CLL4。

图6 两组Bcl-6和Blimp-1蛋白表达

2.5 CLL患者Tfh细胞及亚群与BCL-6、Blimp-1 mRNA相对表达量、蛋白水平、细胞因子IL-21的相关性分析

进一步分析Tfh细胞、Tfh细胞上PD-1和ICOS表达及Tfh细胞亚群与转录因子BCL-6、Blimp-1、细胞因子IL-21之间的相关性,结果发现Bcl-6与Tfh、PD-1⁺Tfh、ICOS⁺Tfh、PD-1⁺ICOS⁺Tfh、Tfh1细胞比例及Tfh1/(Tfh2 + Tfh17)均呈正相关($r = 0.912$ 、 0.574 、 0.623 、 0.743 、 0.858 和 0.841 ,均 $P = 0.000$)。Blimp-1与Tfh2、Tfh17细胞比例均呈正相关($r = 0.432$ 和 0.529 , $P = 0.014$ 和 0.009)。Bcl-6/Blimp-1与Tfh、PD-1⁺Tfh、ICOS⁺Tfh、PD-1⁺ICOS⁺Tfh、Tfh1细胞比例及Tfh1/(Tfh2+Tfh17)均呈正相关($r = 0.834$ 、 0.543 、 0.493 、 0.729 、 0.873 和 0.927 ,均 $P < 0.05$),与Tfh2和Tfh17细胞比例均呈负相关($r = -0.419$ 和 -0.762 , $P = 0.010$ 和 0.000)。IL-21与Tfh、PD-1⁺Tfh、ICOS⁺Tfh、PD-1⁺ICOS⁺Tfh、Tfh1细胞比例及Tfh1/(Tfh2 + Tfh17)比值均呈正相关($r = 0.923$ 、 0.563 、 0.658 、 0.738 、 0.625 和 0.805 ,均 $P = 0.000$),与Tfh17细胞比例呈负相关($r = -0.827$, $P = 0.000$)。见图7。

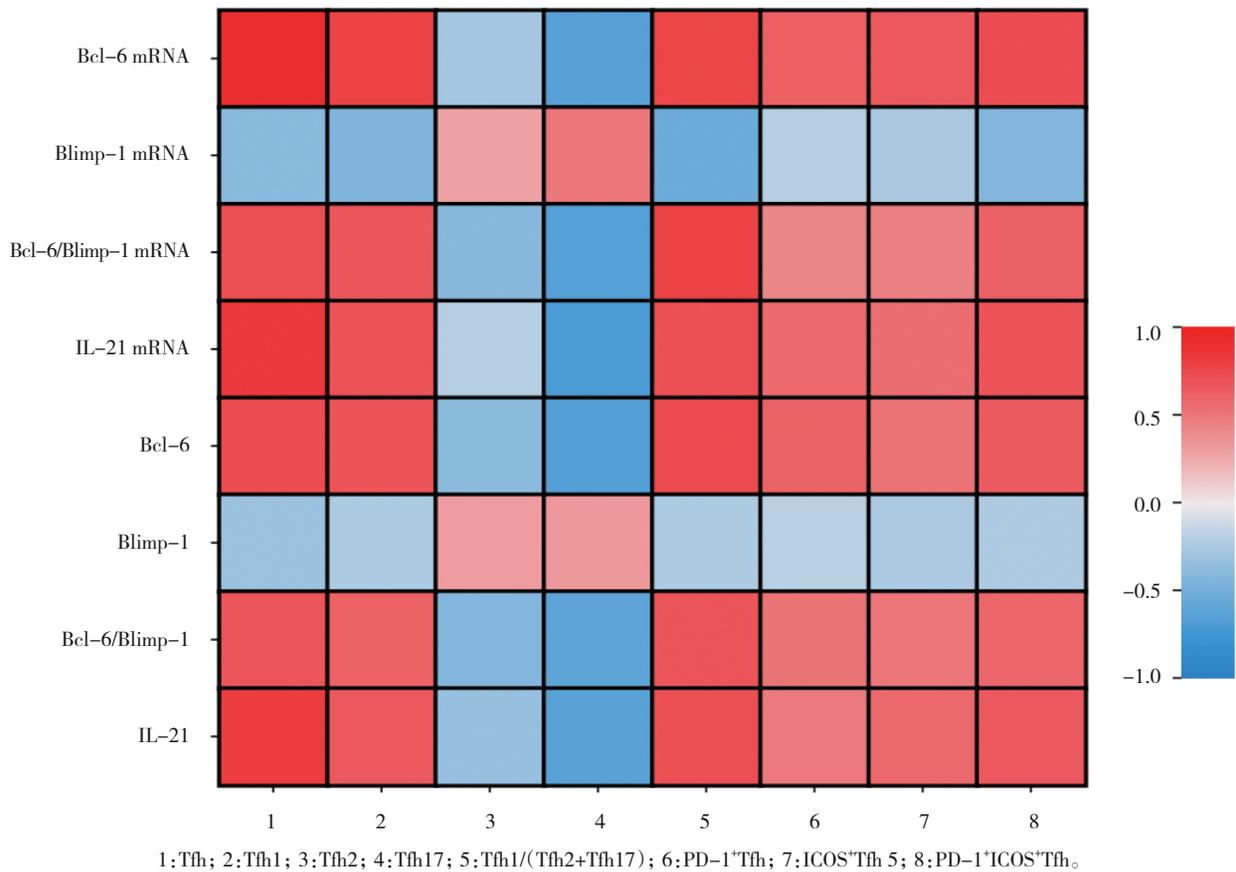


图 7 Tfh 细胞相关因子与 Tfh 细胞比例及其亚群相关性分析热图

2.6 CLL 组 Tfh 细胞、Tfh 细胞亚群与骨髓中 B 淋巴细胞、血清中免疫球蛋白 IgA、IgG、IgM 的相关性

Tfh、PD-1⁺Tfh、ICOS⁺Tfh、PD-1⁺ICOS⁺Tfh、Tfh1/(Tfh2 + Tfh17) 与骨髓中 B 淋巴细胞均呈正相关 ($r = 0.897, 0.833, 0.865, 0.871$ 和 0.912 , 均 $P = 0.000$), 与 IgM ($r = -0.870, -0.639, -0.669, -0.837$ 和 -0.812 , 均 $P = 0.000$)、IgG ($r = -0.832, -0.651, -0.673, -0.744$ 和

-0.755 , 均 $P = 0.000$)、IgA ($r = -0.509, -0.546, -0.477, -0.524$ 和 -0.563 , $P = 0.003, 0.003, 0.017, 0.004, 0.003$) 均呈负相关; Tfh2、Tfh17 细胞比例与骨髓中 B 淋巴细胞均呈负相关 ($r = -0.573$ 和 -0.804 , $P = 0.001$ 和 0.000), 与 IgM ($r = 0.409$ 和 0.534 , $P = 0.025$ 和 0.018)、IgG ($r = 0.461$ 和 0.505 , $P = 0.022$ 和 0.009)、IgA ($r = 0.413$ 和 0.424 , $P = 0.033$ 和 0.029) 均呈正相关。见图 8。

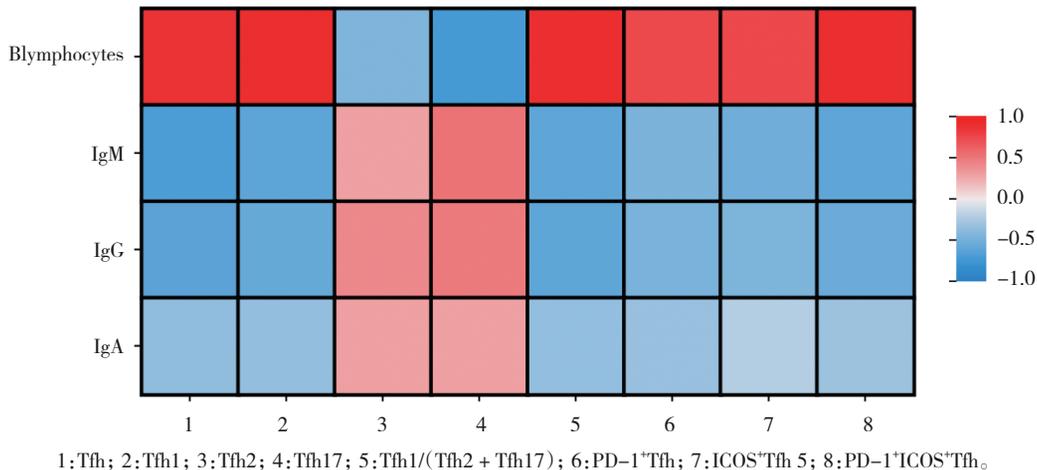


图 8 Tfh 细胞和其亚群与骨髓中 B 细胞、免疫球蛋白水平相关性分析热图

2.7 CLL 患者 Tfh 细胞、Tfh 细胞亚群、Bcl、Blimp-1 和 IL-21 在 IPI 评分分组中的比较

在 IPI 评分分组中, 各组 Tfh、PD-1⁺Tfh、ICOS⁺Tfh、PD1⁺ICOS⁺Tfh、Tfh1、Tfh2、Tfh17 细胞比例及 Tfh1/(Tfh2 + Tfh17) 比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。各组 Bcl-6 mRNA、Bcl-6 mRNA/Blimp-1 mRNA、Bcl-6 蛋白、Bcl-6 蛋白/Blimp-

1 蛋白、IL-21 mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。Bcl-6 mRNA 和蛋白相对表达量、Bcl-6 mRNA/Blimp-1 mRNA 及 IL-21 mRNA 相对表达量随病情严重程度逐渐升高 ($P < 0.05$), 各组 Blimp-1 mRNA 和蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 CLL 患者 Tfh 细胞、Tfh 细胞亚群、Bcl-6、Blimp-1 和 IL-21 在不同 IPI 评分分组中的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Tfh/%	PD-1 ⁺ Tfh/%	ICOS ⁺ Tfh/%	PD1 ⁺ ICOS ⁺ Tfh/%	Tfh1/%	Tfh2/%	Tfh17/%
低危组	12	17.23 ± 2.77	28.21 ± 3.21	17.55 ± 1.94	11.87 ± 2.77	41.21 ± 4.65	27.92 ± 1.43	20.92 ± 2.91
中危组	17	18.42 ± 2.36 ^①	29.01 ± 3.82 ^①	19.36 ± 2.32 ^①	13.25 ± 2.81 ^①	44.73 ± 5.34 ^①	26.48 ± 1.54	19.45 ± 2.65
高危组	28	19.11 ± 3.02 ^{①②}	32.62 ± 3.66 ^{①②}	21.29 ± 2.65 ^①	15.66 ± 2.69 ^{①②}	48.43 ± 5.09 ^{①②}	25.73 ± 1.96 ^①	18.33 ± 1.92 ^{①②}
极高危组	13	21.69 ± 2.41 ^{①②③}	34.47 ± 3.47 ^{①②③}	22.05 ± 2.34 ^{①②③}	17.91 ± 2.86 ^{①②③}	52.68 ± 4.32 ^{①②③}	24.61 ± 1.46 ^{①②③}	16.92 ± 12.31 ^{①②③}
F 值		45.623	23.892	19.010	31.185	28.256	17.724	8.902
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.016

组别	Tfh1/(Tfh2 + Tfh17)	Bcl-6 mRNA	Blimp-1 mRNA	Bcl-6 mRNA/Blimp-1 mRNA	Bcl-6 蛋白	Blimp-1 蛋白	Bcl-6 蛋白/Blimp-1 蛋白	IL-21 mRNA
低危组	1.20 ± 0.19	1.98 ± 0.44	1.28 ± 0.27	1.94 ± 0.23	1.41 ± 0.19	1.17 ± 0.15	1.43 ± 0.17	3.17 ± 0.56
中危组	1.12 ± 0.13 ^①	2.32 ± 0.39 ^①	1.21 ± 0.31	2.34 ± 0.19 ^①	1.56 ± 0.23 ^①	1.31 ± 0.20	1.62 ± 0.15 ^①	3.62 ± 0.63 ^①
高危组	1.01 ± 0.13 ^{①②}	2.87 ± 0.45 ^{①②}	1.19 ± 0.29	2.77 ± 0.25 ^{①②}	1.69 ± 0.24 ^{①②}	1.26 ± 0.22	1.78 ± 0.22 ^①	4.01 ± 0.59 ^{①②}
极高危组	0.91 ± 0.17 ^{①②③}	3.01 ± 0.34 ^{①②③}	1.22 ± 0.27	3.10 ± 0.21 ^{①②③}	1.88 ± 0.17 ^{①②③}	1.28 ± 0.16	1.92 ± 0.19 ^{①②③}	4.54 ± 0.67 ^{①②③}
F 值	16.038	29.110	0.540	7.450	18.850	1.050	6.340	31.660
P 值	0.003	0.000	0.127	0.015	0.000	0.094	0.023	0.000

注: ①与低危组比较, $P < 0.05$; ②与中危组比较, $P < 0.05$; ③与高危组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

目前许多研究显示, CLL 患者体内存在 T 细胞亚群失衡和功能异常, 其中包括 CD4/CD8 比值紊乱、Treg 细胞明显增殖和活化、T 细胞上耗竭标志物表达增加^[20-22], 说明免疫系统在 CLL 发生、发展中发挥重要作用, 因此, 了解 CLL 免疫系统对于优化目前治疗方案和改善患者预后至关重要。Tfh 细胞是 CD4⁺T 细胞的一个重要亚群, 在 B 细胞分化和诱导抗体产生中起重要作用^[23]。已有研究表明, CLL 患者 Tfh 细胞水平明显升高, 并且随着疾病进展 Rai 分期, Tfh 细胞水平逐渐升高^[15]。本研究同样发现 CLL 组患者 Tfh 细胞比例较对照组高, 并且与 CLL 肿瘤 B 细胞呈正相关; 在 IPI 评分中, 随着病情严重程度的上升, Tfh 细胞比例上升更加明显, 说明 Tfh 细胞的异常增殖可能在 CLL 的发病机制中起关键作用。

对 Tfh 细胞亚群研究存在争议, CHA 等^[16]研究

报道, Tfh1 细胞水平下降, Tfh2 和 Tfh17 细胞水平上升; 而 LE 等^[17]研究发现, Tfh1 细胞水平明显上升, Tfh2 和 Tfh17 细胞水平下降有差异, 但也有研究^[15]认为, Tfh2 细胞水平下降无差异。本研究结果发现, CLL 患者的 Tfh1 细胞比例和 Tfh1/Tfh2+Tf17 比值较对照组上升, Tfh2 和 Tfh17 细胞比例下降, 异常分化、增殖的 Tfh1 细胞与骨髓中的 CLL 肿瘤 B 细胞百分比呈正相关, 在 IPI 评分中, 极高危 CLL 中的 Tfh1 细胞和 Tfh1/Tfh2+Tfh17 比值升高, 说明 Tfh 细胞亚群失衡向 Tfh1 分化增加偏斜, 伴随 Tfh2 和 Tfh17 细胞群比例显著降低, 考虑 Tfh1 细胞可能支持恶性 CLL-B 细胞增殖, 参与到 CLL 疾病的免疫紊乱中。CLL 晚期患者体内的具有保护性抗体产生可能存在缺陷, 因此更容易发生感染, 机会感染是 CLL 的主要死亡原因之一^[2-3]。因此本研究分析了免疫球蛋白水平的改变, 考虑 Tfh 细胞亚群的失衡对免疫球蛋白的生成产生影响, 发现 Tfh、Tfh1 及亚群比值与 3 种免疫

球蛋白呈负相关,与 LE 等^[17]研究结果一致。推测 Tfh 细胞虽然增殖,但是这些功能异常的 Tfh 细胞无法辅助初始 B 细胞和 Tfh 细胞间相互作用提供信号, B 细胞无法分化为成熟浆细胞,并最终导致免疫球蛋白水平减低,在抗体介导的体液免疫应答中功能明显失调。Tfh1 有效调节 B 细胞分化的作用^[9], Tfh1 可能促进 CLL-B 细胞的分化与增殖, Tfh2 和 Tfh17 细胞水平下降,辅助 B 细胞发挥作用的能力降低, B 细胞无法分化为浆细胞分泌抗体。这些证据均指出 Tfh 蓄积和选择性偏向 Tfh1 表型与白血病 B 细胞克隆的扩增和正常 B 细胞功能的下降同时发生,导致 CLL 发病过程中的体液免疫功能障碍,细胞免疫和体液免疫失衡共同参与 CLL 的免疫紊乱机制。PD-1 是 T 细胞慢性活化或耗竭的标志物^[24]。WU 等^[15]研究发现, CLL 患者 CD4⁺T 细胞 PD-1 表达升高。本研究结果发现, CLL 患者不但 Tfh 细胞的比例增加,其表型与对照组也不同,显示出更高水平的 PD-1 和 ICOS, Tfh 细胞上 PD-1 的表达水平上升,与 CLL 肿瘤 B 细胞负荷相关,推测表型为 PD-1⁺Tfh 细胞可能与 Tfh 活化后帮助肿瘤细胞发生免疫逃逸。CLL 患者体内有一群表达高水平 PD-1 和 ICOS 双表达的细胞,并且与 CLL-B 细胞相关, Tfh 细胞产生异常高水平的共刺激分子,可能也刺激 CLL 肿瘤 B 细胞的存活和增殖。

在 CD4⁺T 细胞中, BCL-6 几乎只表达于 Tfh 细胞,调节 Tfh 细胞的分化和成熟^[11,25]。Bcl-6 的过表达在体内和动物实验中均能导致 Tfh 细胞中 CXCR5、PD-1、ICOS、IL-21 等标志物的上调,驱动 Tfh 细胞的分化^[26-27]。本研究结果发现, Bcl-6 水平升高,不但与 Tfh 细胞比例呈正相关,与 Tfh 细胞上的 PD-1 和 ICOS 表达也相关,推测 Bcl-6 增加促进了 T 辅助细胞向 Tfh 细胞分化,可能也与 Tfh 细胞表面的 PD-1 和 ICOS 的表达有关。CLL 患者 Bcl-6/Blimp-1 比例增加,并且与 Tfh 细胞和 Tfh1 细胞亚群呈正相关, Bcl-6/Blimp-1 平衡存在失衡,并且偏向于转录因子 Bcl-6 的表达,进一步支持 CLL 体内存在 Tfh 细胞的异常分化明显。本研究结果还发现, IPI 评分中的极高危组患者的 Bcl-6、Bcl-6/Blimp-1 最高,但 Blimp-1 在各分组中无差异,说明疾病状态下 Blimp-1 水平上升只是代偿性的增加,在疾病负荷越重时, Blimp-1 的代偿增加作用可能存在失效。在 CLL 疾病状态下, Bcl-6 水平上升,进一步促进 Tfh 细胞的

增殖分化,表明 Tfh 无论是在细胞水平,还是在转录因子水平和蛋白水平上均参与了 CLL 发病的免疫紊乱。

有研究认为,免疫微环境的细胞因子浓度改变也会影响细胞分化,其中 IL-21 是重要的影响因素之一^[28]。IL-21 通过激活 STAT-3 和上调 Bcl-6 mRNA 表达诱导幼稚 CD4⁺T 细胞向 Tfh 细胞分化, Tfh 细胞产生的 IL-21 又可以驱动 B 细胞分化为浆母细胞并产生抗体^[7,29]。IL-21 是 Tfh 细胞的主要效应因子,在癌症和体外实验的 TME 中 Tfh 细胞是 IL-21 的主要产生者^[30-31]。CLL 疾病状态下, T 细胞产生的 IL-21 可增强恶性 B 细胞增殖,是与 CLL 肿瘤负荷相关的细胞因子,在 CLL 患者的淋巴结肿中检测到 IL-21 水平上升^[32]。本研究结果发现, CLL 患者 IL-21 水平均上升, Tfh 细胞、Tfh1 细胞、效应 Tfh 细胞 (PD-1⁺ICOS⁺Tfh) 与 IL-21 水平呈正相关,说明 IL-21 参与 Tfh 细胞异常分化的调控。CLL 疾病状态下存在一种正反馈现象: Bcl-6 表达异常上升,促进 Tfh 细胞的克隆性增殖, Tfh 细胞又可分泌高水平的 IL-21。CLL 患者体内 IL-21 及 Bcl-6 对 Tfh 的分化均起正向调控作用,也一定程度上证明了 Tfh 细胞在 CLL 患者的免疫应答状态,尤其是 Bcl-6,其在 Tfh 细胞分化及产生相关效应因子 IL-21 的过程中起主要调节作用。

综上所述, CLL 患者外周血中 Tfh 细胞水平升高, Tfh 细胞亚群存在偏向于 Tfh1 细胞的失衡,并且与免疫球蛋白浓度呈负相关,提示 Tfh 细胞的异常分化可能参与 CLL 的发病和体液免疫紊乱机制。

参 考 文 献 :

- [1] PATEL K, PAGEL J M. Current and future treatment strategies in chronic lymphocytic leukemia[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 69.
- [2] TEH B W, TAM C S, HANDUNNETTI S, et al. Infections in patients with chronic lymphocytic leukaemia: mitigating risk in the era of targeted therapies[J]. *Blood Rev*, 2018, 32(6): 499-507.
- [3] ISHDORJ G, STREU E, LAMBERT P, et al. IgA levels at diagnosis predict for infections, time to treatment, and survival in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Blood Adv*, 2019, 3(14): 2188-2198.
- [4] PERUTELLI F, JONES R, GRIGGIO V, et al. Immunotherapeutic strategies in chronic lymphocytic leukemia: advances and challenges[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 837531.
- [5] MÉKINIAN A, QUINQUENEL A, BELKACEM K A, et al. Immuno-regulatory malignant B cells contribute to chronic lymphocytic leukemia progression[J]. *Cancer Gene Ther*, 2023, 30(7): 1018-1028.

- [6] SPEISER D E, CHIJOKE O, SCHAEUBLE K, et al. CD4⁺ T cells in cancer[J]. *Nat Cancer*, 2023, 4(3): 317-329.
- [7] OLATUNDE A C, HALE J S, LAMB T J. Cytokine-skewed Tfh cells: functional consequences for B cell help[J]. *Trends Immunol*, 2021, 42(6): 536-550.
- [8] ZHANG X, GE R L, CHEN H L, et al. Follicular helper CD4⁺ T cells, follicular regulatory CD4⁺ T cells, and inducible costimulator and their roles in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Mediators Inflamm*, 2021, 2021: 2058964.
- [9] GUTIÉRREZ-MELO N, BAUMJOHANN D. T follicular helper cells in cancer[J]. *Trends Cancer*, 2023, 9(4): 309-325.
- [10] KURATA I, MATSUMOTO I, SUMIDA T. T follicular helper cell subsets: a potential key player in autoimmunity[J]. *Immunol Med*, 2021, 44(1): 1-9.
- [11] CHOI J, CROTTY S. Bcl6-Mediated transcriptional regulation of follicular helper T cells (T_{FH}) [J]. *Trends Immunol*, 2021, 42(4): 336-349.
- [12] CIUCCI T, VACCHIO M S, CHEN T, et al. Dependence on Bcl6 and Blimp1 drive distinct differentiation of murine memory and follicular helper CD4⁺ T cells[J]. *J Exp Med*, 2022, 219(1): e20202343.
- [13] QUAST I, DVORSCEK A R, PATTARONI C, et al. Interleukin-21, acting beyond the immunological synapse, independently controls T follicular helper and germinal center B cells[J]. *Immunity*, 2022, 55(8): 1414-1430.e5.
- [14] PAPPILLION A, POWELL M D, CHISOLM D A, et al. Inhibition of IL-2 responsiveness by IL-6 is required for the generation of GC-T_{FH} cells[J]. *Sci Immunol*, 2019, 4(39): eaaw7636.
- [15] WU X, FAJARDO-DESPAIGNE J E, ZHANG C, et al. Altered T follicular helper cell subsets and function in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 674492.
- [16] CHA Z S, ZANG Y, GUO H J, et al. Association of peripheral CD4⁺ CXCR5⁺ T cells with chronic lymphocytic leukemia[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(6): 3579-3585.
- [17] LE SAOS-PATRINOS C, LOIZON S, ZOUINE A, et al. Elevated levels of circulatory follicular T helper cells in chronic lymphocytic leukemia contribute to B cell expansion[J]. *J Leukoc Biol*, 2023, 113(3): 305-314.
- [18] HALLEK M, CHESON B D, CATOVSKY D, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL[J]. *Blood*, 2018, 131(25): 2745-2760.
- [19] 朱华渊, 王莉, 乔佳, 等. CLL-IPI评分系统在中国慢性淋巴细胞白血病患者中的预后评估价值[J]. *中华血液学杂志*, 2018, 39(5): 392-397.
- [20] ROESSNER P M, SEIFFERT M. T-cells in chronic lymphocytic leukemia: guardians or drivers of disease? [J]. *Leukemia*, 2020, 34(8): 2012-2024.
- [21] ADEEGBE D, BARBI J, WING J. Editorial: regulatory T lymphocytes in cancer immunity[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1065570.
- [22] ARRUGA F, RUBIN M, PAPAZOGLU D, et al. The immunomodulatory molecule TIGIT is expressed by chronic lymphocytic leukemia cells and contributes to anergy[J]. *Haematologica*, 2023, 108(8): 2101-2115.
- [23] BETZLER A C, USHMOROV A, BRUNNER C. The transcriptional program during germinal center reaction - a close view at GC B cells, Tfh cells and Tfr cells[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1125503.
- [24] ZHANG P, WANG Y T, MIAO Q R, et al. The therapeutic potential of PD-1/PD-L1 pathway on immune-related diseases: based on the innate and adaptive immune components[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 167: 115569.
- [25] HOU Y R, CAO Y J, DONG L, et al. Regulation of follicular T helper cell differentiation in antitumor immunity[J]. *Int J Cancer*, 2023, 153(2): 265-277.
- [26] JANDL C, LIU S M, CAÑETE P F, et al. IL-21 restricts T follicular regulatory T cell proliferation through Bcl-6 mediated inhibition of responsiveness to IL-2[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14647.
- [27] DONG L, HE Y, CAO Y J, et al. Functional differentiation and regulation of follicular T helper cells in inflammation and autoimmunity[J]. *Immunology*, 2021, 163(1): 19-32.
- [28] CHABAB G, BONNEFOY N, LAFONT V. IL-21 signaling in the tumor microenvironment[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1240: 73-82.
- [29] ZHANG H C, CAVAZZONI C B, PODESTÀ M A, et al. IL-21-producing effector Tfh cells promote B cell alloimmunity in lymph nodes and kidney allografts[J]. *JCI insight*, 2023, 8(20): e169793.
- [30] LIN X, YE L Y, WANG X, et al. Follicular helper T cells remodel the immune microenvironment of pancreatic cancer via secreting CXCL13 and IL-21[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(15): 3678.
- [31] DONG Q, PU J, DU T T, et al. Astragalus-mediated stimulation on antigen-presenting cells could result in higher IL-21 production from CXCR5⁺ Tfh-like cells and better IL-21-mediated effector functions[J]. *Hum Immunol*, 2021, 82(6): 429-437.
- [32] PASCUTTI M F, JAK M, TROMP J M, et al. IL-21 and CD40L signals from autologous T cells can induce antigen-independent proliferation of CLL cells[J]. *Blood*, 2013, 122(17): 3010-3019.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 张瑞, 郭沙, 曲建华. 慢性淋巴细胞白血病患者 Tfh 细胞及其亚群水平的变化和临床意义研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(19): 63-72.

Cite this article as: ZHANG R, GUO S, QU J H. Characteristics and significance of changes in Tfh cells and their subsets in patients with chronic lymphocytic leukemia[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(19): 63-72.