

· 临床论著 ·

益气补肾颗粒治疗对微小残留白血病患者 CD4⁺ CD8^{high} T 淋巴细胞和自然杀伤细胞的影响

许勇钢 麻 柔 杨晓红 唐旭东 孙淑贞

摘要 目的 探讨益气补肾颗粒治疗后 CD4⁺ CD8^{high} T 淋巴细胞的变化及其对微小残留白血病 (minimal residual leukemia, MRL) 预后的意义。**方法** 用多参数流式细胞技术比较分析 36 例 MRL 患者应用益气补肾颗粒治疗前后 CD4⁺ CD8^{high} T 淋巴细胞亚群和自然杀伤细胞 (NK 细胞) 改变。**结果** (1) MRL 患者 3 年持续完全缓解率、生存率分别为 75.0%、80.5%, 5 年持续完全缓解率、生存率分别为 63.9%、72.2%。(2) 与治疗前比较, 治疗后的 MRL 的 CD4⁺ CD8^{high} T 淋巴细胞百分率 (%) 和绝对值显著上升 ($P < 0.01$); (3) 与治疗前比较, 治疗后 MRL 的 NK 细胞百分率 (%) 和绝对值均显著上升 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 益气补肾颗粒可能通过调节机体自身免疫功能, 提高 CD4⁺ CD8^{high} T 和 NK 细胞的绝对数量, 杀伤或抑制体内残存白血病细胞, 延长 MRL 患者的无病生存期。

关键词 微小残留白血病; 益气补肾颗粒; CD4⁺ CD8^{high} T 淋巴细胞; 自然杀伤细胞

Effect of Yiqi Bushen Granule on the Peripheral CD4⁺ CD8^{high} T-lymphocyte and Natural Killer Cell in Patients with Minimal Residual Leukemia XU Yong-gang, MA Rou, YANG Xiao-hong, et al *Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091)*

ABSTRACT Objective To explore the effect of Yiqi Bushen Granule (YBG) on CD4⁺ CD8^{high} T lymphocyte in patients with minimal residual leukemia (MRL) and to probe its prognosis after treatment. **Methods** The changes of CD4⁺ CD8^{high} T lymphocyte subgroup and natural killer (NK) cells in 36 patients (16 males and 20 females) received long-term (>3 months) YBG therapy before and after treatment were analyzed using multi-parameter flow cytometry and controlled by those in 34 healthy persons (19 males and 15 females). **Results** The 3-year and 5-year complete remission rates in MRL patients were 75.0% and 63.9%; their 3-year and 5-year survival rates were 80.5% and 72.2%, respectively; as compared with the baseline, the absolute value and percentage of CD4⁺ CD8^{high} T lymphocyte and NK cells were all significantly raised after treatment ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** YBG could prolong the disease-free survival in MRL patients by way of regulating the immune function of organism, elevating the amount of CD4⁺ CD8^{high} T lymphocyte and NK cells to kill or suppress the residual leukemic cell in body.

KEYWORDS minimal residual leukemia; Yiqi Bushen Granule; CD4⁺ CD8^{high} T lymphocytes; natural killer cell

微小残留白血病 (minimal residual leukemia, MRL), 首先由荷兰学者 Hagenbeek 提出, 是指急性白血病 (acute leukemia, AL) 经治疗获完全缓解后体内残留微量白血病细胞的状态, 是白血病复发的根源, 也是影响 AL 患者长期存活的主要因素^[1]。MRL 有明显免疫功能缺陷。越来越多的证据表明免疫介导的事件有

助于消灭造血系统恶性肿瘤患者体内的肿瘤细胞。中医扶正治疗提高和恢复肿瘤患者免疫功能的作用已得到越来越多的证实^[1,2]。CD4⁺ CD8⁺ T 淋巴细胞具有独特的功能, 其又称双阳性 (double positive, DP) T 细胞, DP T 细胞又分为 CD4⁺ CD8^{high} T 和 CD4⁺ CD8^{low} T 两个亚群, 可能最终分化为 CTL、NKT 或 $\gamma\delta$ T 淋巴细胞, 参与抗肿瘤免疫应答^[3-5]。然而到目前为止对 DPT 淋巴细胞亚群研究极少^[6]。本研究旨在分析益气补肾颗粒前后 MRL 患者 CD4⁺ CD8^{high} T 淋巴细胞亚群的特点, 并探讨益气补肾颗粒后 DP T 淋巴细胞的变化对 MRL 预后的意义。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30472284); 首都医学发展科研基金 (中医药) 重大课题资助项目 (No. I-1)

作者单位: 中国中医科学院西苑医院 (北京 100091)

通讯作者: 麻 柔, Tel: 010-62835627, E-mail: xyg312@yahoo.com.cn

资料与方法

1 临床资料 2004 年 2 月—2008 年 12 月在中国中医科学院西苑医院血液科病房及门诊就诊的患者,诊断标准按照《血液病诊断及疗效标准》^[7],AL 经治疗达完全缓解 (complete remission, CR) 后并完成 3 个巩固强化疗程治疗,或以流式细胞仪或部分有特异性基因改变者以聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 测定 MRL 细胞的存在。入组患者共 36 例 (MRL 组),男 16 例,女 20 例;年龄 22~75 岁,中位年龄 49 岁;按亚型分类, M_2 17 例, M_3 13 例, M_4 2 例, M_5 3 例, M_7 1 例。健康人组 34 例,全部为健康体检者,其中男 19 例,女 15 例,年龄 17~60 岁,中位年龄 51 岁。

2 治疗方法 MRL 组给予益气补肾颗粒 (由中国中医科学院西苑医院制剂室提供,主要成分为黄精、首乌、天冬,13 g/袋),每次 1 袋,每天 2 次温开水送服。患者原定化疗方案不变,并继续巩固化疗。在临床研究过程中,对并发症如感染、发热,粒细胞缺乏,血红蛋白或血小板减少,可进行抗感染或退热,或使用粒细胞集落刺激因子,或输注悬浮红细胞或血小板及使用促红细胞生成素,促血小板生成素等对症处理。除此以外,任何与本方案有关的中西药物均不得使用。以 3 个月为 1 个疗程,一般治疗在 1 个疗程以上。自患者入组服用益气补肾颗粒满 3 个月之日起进行随访,死亡患者随访至死亡日,存活患者随访至 2009 年 6 月 30 日,最短 3 个月,最长 61 个月,中位随访时间 37 个月。

3 观察项目及检测方法

3.1 试剂 所用单克隆抗体 (Monoclonal Antibody, McAb) 均为抗人 IgG 型 (IgG1、IgG2a) McAb, FITC、PE、ECD、PE-CY5 荧光直接标记。V α 24-fitc/CD3-pe/CD8-ecd/CD4-pc5, CD3-fitc/CD19-pe/CD56-pc5 及其同型对照 IgG1-fitc/IgG1-pe/IgG1-ecd/IgG1-pc5, OptiLyse C 是美国 BECKMAN-COULTER 公司的产品;PBS:pH 7.2,含 0.1% NaN₃。

3.2 检测方法 分别取 MRL 组患者入组后和服药 3 个月后及健康人组静脉血 2 mL,2% EDTA-Na₂ 抗凝,用血细胞分析仪 (MEK-6318 型,日本 NIHON KO-

HDEN 公司)计数外周血淋巴细胞绝对值。常规方法标记细胞,混匀后室温避光温育 30 min,溶血、洗涤后离心,4 h 内上机检测。采用多参数流式细胞仪 (EPICS-ELITE 型,美国 BECKMAN-COULTER 公司), Flow-Check 校准光路,应用四色荧光分析法,采取 FS-vSS 设门,确定淋巴细胞群,分析 10 000 个细胞/样本, CD4⁺CD8^{high} T 细胞检测分析 5 × 10⁴ 个细胞以上,应用 EXPO32 软件分析结果。

3.3 细胞数量计算方法 由流式细胞仪直接读出;绝对值由外周血淋巴细胞计数绝对值乘以百分比相应细胞的百分比得出。

4 疗效评定标准 参照急性白血病持续完全缓解 (CCR) 和白血病复发标准^[7],判定 MRL 患者 3 年和 5 年 CCR 和复发情况。

5 统计学方法 应用 SPSS 13.0 软件包进行计算。采用 Wilcoxon 非参数检验比较各组内治疗前后差异。所有统计检验均采用双侧检验。

结 果

1 MRL 组 CCR 及存活率比较 36 例 MRL 患者中 3 年 CCR 率、生存率分别为 75.0% (27/36)、80.5% (29/36),5 年 CCR 率、生存率分别为 63.9% (23/36)、72.2% (26/36)。随访 3 年和 5 年,仅有 2 例和 3 例患者复发 (但仍存活)。

2 MRL 组治疗前后与健康人组 CD4⁺CD8^{high}T、CD4⁺CD8^{low}T 及 CD4⁺CD8⁺T 比较 (表 1) 与健康人组比较,MRL 组治疗前 CD4⁺CD8^{high}T 和 CD4⁺CD8⁺T 的百分率显著上升 ($P < 0.01$);治疗后 CD4⁺CD8^{high}T 百分率和绝对值显著上升 ($P < 0.01, P < 0.05$)、CD4⁺CD8⁺T 百分率和绝对值显著上升 ($P < 0.01$)。与 MRL 治疗前比较,治疗后 MRL 的 CD4⁺CD8^{high}T 百分率和绝对值显著上升 ($P < 0.01$)、CD4⁺CD8⁺T 百分率和绝对值显著上升 ($P < 0.01, P < 0.05$)。

3 MRL 组治疗前后与健康人组 B 细胞和 NK 细胞比较 (表 2) 与健康人组比较,治疗前 MRL 的 NK 细胞的百分率和绝对值均显著降低 ($P < 0.01, P < 0.05$);治疗后 MRL 的 B (CD3⁻CD19⁺) 细胞绝对值和 NK 细胞绝对值有显著降低 ($P < 0.05$)。与治疗前比

表 1 MRL 组治疗前后与健康人组 CD4⁺CD8^{high}T、CD4⁺CD8^{low}T 及 CD4⁺CD8⁺T 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	CD4 ⁺ CD8 ^{high} T		CD4 ⁺ CD8 ^{low} T		CD4 ⁺ CD8 ⁺ T	
			百分率 (%)	绝对值 (×10 ⁹ /L)	百分率 (%)	绝对值 (×10 ⁹ /L)	百分率 (%)	绝对值 (×10 ⁹ /L)
健康人	34		0.77 ± 0.56	0.0151 ± 0.0138	0.37 ± 0.28	0.0076 ± 0.0089	1.17 ± 0.64	0.0226 ± 0.0177
MRL	36	治前	1.34 ± 0.54 ^{△△}	0.0176 ± 0.0084	0.54 ± 0.46	0.0070 ± 0.0062	1.88 ± 0.76 ^{△△}	0.0247 ± 0.0120
		治后	1.89 ± 0.86 ^{**△△}	0.0282 ± 0.0143 ^{**△}	0.54 ± 0.29	0.0086 ± 0.0056	2.43 ± 0.91 ^{**△△}	0.0369 ± 0.0165 ^{*△△}

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与健康组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

表 2 MRL 组治疗前后与健康人组 B 细胞和 NK 细胞比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	B(CD3 ⁻ CD19 ⁺)		CD3 ⁺ CD56 ⁺		NK(CD3 ⁻ CD56 ⁺)	
			百分率(%)	绝对值($\times 10^9/L$)	百分率(%)	绝对值($\times 10^9/L$)	百分率(%)	绝对值($\times 10^9/L$)
健康人	34		8.16 $\pm$ 3.51	0.153 $\pm$ 0.084	5.95 $\pm$ 3.71	0.105 $\pm$ 0.06	16.65 $\pm$ 7.63	0.314 $\pm$ 0.189
MRL	36	治前	6.73 $\pm$ 9.45	0.113 $\pm$ 0.187	7.26 $\pm$ 9.15	0.097 $\pm$ 0.138	12.99 $\pm$ 5.94 [△]	0.173 $\pm$ 0.094 ^{△△}
		治后	6.46 $\pm$ 5.81	0.101 $\pm$ 0.112 [△]	5.11 $\pm$ 3.98	0.078 $\pm$ 0.065	14.27 $\pm$ 7.64 [*]	0.221 $\pm$ 0.149 ^{**△}

注:与本组治疗前比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与健康人组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

较,治疗后 MRL 的 NK 细胞的百分比(%)和绝对值显著上升($P<0.05$, $P<0.01$)。

讨 论

近年来随着对疾病研究的进展,人们认识到 AL 患者免疫功能低下,正常免疫监视功能受损。AL 完全缓解后处于 MRL 阶段,免疫功能虽有所恢复,但仍较正常人低下,表现为相应的免疫效应细胞或分子数量减少或功能缺陷^[1]。

中医扶正治疗提高和恢复肿瘤患者免疫功能的作用已得到越来越多的证实^[8]。益气补肾颗粒,系中国中医科学院西苑医院血液科在长期临床实践中总结的院内制剂,以益气养阴,扶正祛邪,尤其适用于 MRL 的临床治疗,已经取得了良好的临床疗效^[1,8]。我们观察到 MRL 患者 3 年 CCR、生存率分别为 75.0%、80.5%,5 年 CCR、生存率分别为 63.9%、72.2%,与我们既往的报道^[1]结果相似,明显高于其他国内外报道^[9],这也从一方面说明益气补肾颗粒的可靠疗效。

为了进一步观察益气补肾颗粒的作用,我们观察了益气补肾颗粒对 CD4⁺CD8^{high}T 淋巴细胞的影响。现代免疫学认为:在 T 淋巴细胞分化成熟过程中,T 祖细胞在胸腺经历前 T 淋巴细胞,双阴性(CD4⁻CD8⁻)T 淋巴细胞,DP(CD4⁺CD8⁺)T 淋巴细胞,发育成熟为单阳性(CD4⁺CD8⁻,CD4⁻CD8⁺)T 淋巴细胞。在 DP T 淋巴细胞中,又分为 CD4⁺CD8^{high}T 和 CD4⁺CD8^{low}T 两亚群。研究显示,外周血 DP T 细胞是一种独特的 T 细胞,是成熟的记忆细胞,具有典型 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞功能,此外 DPT 细胞中含有穿孔素和颗粒酶 A 与 CD8⁺T 细胞中含量相当,在某些病毒感染中,DPT 细胞比例增加,提示这群细胞参与抗感染适应性免疫应答,可导致病毒感染细胞的快速降解^[4,5]。本研究显示,治疗后的 MRL 的 CD4⁺CD8^{high}T 淋巴细胞百分率和绝对值均较治疗前上升($P<0.01$);与健康组比较,治疗前 MRL 的 CD4⁺CD8^{high}T 淋巴细胞百分率差异有统计学意义($P<0.01$);在 DP T 淋巴细胞中,CD4⁺CD8^{high}T 细胞亚群所占比重明显大于 CD4⁺CD8^{low}T 细胞亚群,这与我们观察到的治疗后 CD4⁺CD8⁺T 淋巴细胞百分率和绝对值与 CD4⁺CD8^{high}T 淋

巴细胞有相似变化的情况($P<0.01$)相一致。治疗后 MRL 的 CD4⁺CD8^{high}T 淋巴细胞亚群的显著升高,提示益气补肾颗粒能延长 MRL 患者缓解的机理之一,可能是通过提高 CD4⁺CD8^{high}T 淋巴细胞数量,使得其抗原特异性增强,从而抑制体内残存白血病细胞实现的。

NK 细胞是外周血中常见的淋巴细胞亚群,其细胞表型为 CD3⁻CD56⁺,具有免疫监视、抗感染及免疫调节等功能。NK 细胞具有与 CTL 细胞相似的大颗粒淋巴细胞的形态特征,含有大量的穿孔素和颗粒酶 B,可杀伤某些肿瘤细胞等靶细胞^[10],在肿瘤的发生、发展过程中,NK 细胞既可以通过“内识别”方式(如 NCRs、NKG2D、SLAMs、DNAMs 等)直接识别恶性转化癌细胞并被活化,也可以在辅助细胞(单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞等)的作用下被活化后使 NK 细胞得以发挥其杀伤功能^[11]。有关研究表明,家族性 NK 细胞功能低下的人群,其肿瘤发生率也增高^[12]。我们观察到与扶正治疗前相比,治疗后 MRL 的 NK 细胞的百分率和绝对值上升($P<0.05$, $P<0.01$),但 NK 细胞的绝对值仍明显低于健康组($P<0.05$),这就提示益气补肾颗粒可能通过调节机体免疫,提高 NK 细胞的绝对数量来杀伤肿瘤细胞,延长 MRL 的无病生存期。

总之,本研究表明益气补肾颗粒可能通过调节机体自身免疫功能,提高 CD4⁺CD8^{high}T 和 NK 细胞的绝对数量,从而抑制 MRL 患者体内残存白血病细胞,这可能是益气补肾颗粒治疗 MRL,延缓 MRL 患者复发,延长 MRL 的无病生存期的机理之一。

参 考 文 献

[1] Ma R, Liu F, Yang JM, et al. Clinical study on effect of Fuzheng Kangbai Granule on long-term survival of patients with acute leukemia[J]. Chin J Integr Med, 1998, 4(4): 259-262.

[2] 张姗姗,许勇钢,杨晓红,等. 微小残留白血病患者细胞免疫功能与中医分型关系研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(1):36-41.

Zhang SS, Xu YG, Yang XH, et al. Study on relationship between cellular immunity and TCM typing in patients with minimal residual leukemia. Chin J Integr Tradit West Med, 2004, 24(1):36-41.

- [3] Weiss L, Roux A, Garcia S, et al. Persistent expansion in a human immunodeficiency virus-infected person of V beta-restricted CD4⁺ CD8⁺ T lymphocytes that express cytotoxicity-associated molecules and are committed to produce interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha[J]. J Infect Dis, 1998, 178(4):1158-1162.
- [4] Zloza A, Sullivan YB, Connick E, et al. CD8⁺ T cells that express CD4 on their target, are detected *in vivo*, and can be productively infected by T-tropic HIV[J]. Blood, 2003, 102(6):2156-2164.
- [5] Michelina N, Eur-Cheol S, Luis C, et al. Peripheral CD8⁺ CD8⁺ T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions[J]. Blood, 2004, 104(2):478-486.
- [6] Theilgaard-Monch K, Raaschou-Jensen K, Palm H, et al. Flow cytometric assessment of lymphocyte subsets, lymphoid progenitors, and hematopoietic stem cells in allogeneic stem cell grafts[J]. Bone Marrow Transplantation, 2001, 28(11):1073-1082.
- [7] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2007:103-134.
Zhang ZN, Shen D. Standards in diagnosis and therapeutic effect of hematosis[M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2007:103-134.
- [8] 许勇钢, 麻柔, 胡乃平, 等. 扶正抗白冲剂对微小残留白血病患者免疫功能及生存期的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(2):123-125.
Xu YG, Ma R, Hu NP, et al. Effect of Fuzheng Kangbai granule on immune function and survival time in minimal residual leukemia model in mice[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2001, 21(2):123-125.
- [9] 麻柔, 刘锋主编. 白血病的中西医结合治疗对策[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008:1.
Ma R, Liu F, editors. Treatment strategy in leukemia with combination of TCM with Western medicine[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008:1.
- [10] Pittet MJ, Speiser DE, Valmori D, et al. Cutting edge: cytolytic effect or function in human circulating CD8⁺ T cells closely correlates with CD56 surface expression[J]. J Immunol, 2000, 164(3):1148-1152.
- [11] 田志刚. 基于 NK 细胞的肿瘤免疫治疗研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16(1):2-5.
Tian ZG. Progress in NK cell-based immunotherapy of tumor[J]. Chin J Cancer Biotherapy, 2009, 16(1):2-5.
- [12] Montelli TC, Peracoli MT, Gabarra RC, et al. Familial cancer: depressed NK-cell cytotoxicity in healthy and cancer affected members[J]. Arq Neuropsiquiatr, 2001, 59(1):6-10.

(收稿:2009-12-16 修回:2010-03-15)

第四届世界中医药心血管病学术研讨会暨第八届全国中西医结合 治疗心血管病培训班会议通知

由世界中医药学会联合会心血管病专业委员会主办, 广东省中医院、中国中医科学院西苑医院承办的第四届世界中医药心血管病学术研讨会暨第八届全国中西医结合治疗心血管病培训班, 将于 2010 年 9 月 17—19 日在广州市广东大厦召开。会议将邀请陈可冀院士、范维琥教授、阮新民教授、史大卓教授及美国、德国的著名心血管病专家进行演讲。

征文内容 中医及中西医结合防治心血管病及其相关疾病的新理论、新技术、新方法、新思路; 临床试验、临床报道、经验总结; 循证医学荟萃分析、系统评价; 基础实验研究; 综述及述评等。也欢迎有助于开拓中医、中西医结合研究思路的多学科技术、方法的论文。要求: 论文 3 000 字左右, 中、英文均可; 500~800 字的中英文摘要; 详细注明作者姓名、职称、所在单位、地址、邮编及联系方式(电话、传真、电子信箱)。

投稿方式 (1) 电子信箱: qgzxyjhgbhy@163.com, 邮件主题: 国际会议; (2) 邮寄: 510105 广东省广州市二沙岛大通路 261 号, 广东省中医院二沙岛分院心血管科, 王云飞收; 信封上注明“国际会议”字样。

征文截止日期 2010 年 7 月 31 日。

会议期间将同时进行世界中医药学会联合会心血管病专业委员会的换届改选工作。欢迎国内外从事中医及中西医结合心血管病研究及相关领域的同道们踊跃投稿并参加本次大会。

联系电话: 020-87351238 转 63222、63221, 联系人: 王云飞、盛小刚。