

弥漫性大B细胞淋巴瘤化疗后外周血T细胞亚群的动态变化

符铃遥, 张红宾*

重庆医科大学附属第一医院, 重庆

收稿日期: 2023年4月9日; 录用日期: 2023年5月3日; 发布日期: 2023年5月12日

摘要

引言: 弥漫性大B细胞淋巴瘤(Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)患者体内T淋巴细胞亚群的转化和分布与疾病进展有关。CD4⁺T细胞亚群在体内启动和调节抗淋巴瘤免疫应答中的作用仍有争议。方法: 我们回顾性分析了31例DLBCL患者的临床资料, 他们接受了六个周期的一线治疗方案, 即利妥昔单抗联合环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙(R-CHOP)。我们分别在诊断和治疗后收集了这些患者的外周血样本, 循环淋巴细胞亚群的百分比由定量流式细胞术分析得出。结果: 我们记录了Th1细胞的逐渐增加, 这在T3时是显著的, Th2和Treg细胞的减少一直维持到R-CHOP治疗的T3时期。两个周期的治疗已经诱导Th1/Th2比率显著增长, 并从那时起持续增加。我们发现基线和T3时Th1/Th2比值与达到完全缓解(Complete Response, CR)之间存在显著相关性。Th1细胞百分比与CR实现之间存在相关性, Th1细胞的临界值为43.09。结论: 我们认为, 在新诊断的患者中, R-CHOP可能通过抑制Th2的扩增来改变Th1/Th2比值的转化, 这表明在治疗期间T细胞极化从促肿瘤T细胞应答强烈转变为抗肿瘤T细胞反应。

关键词

T细胞亚群, 弥漫性大B细胞淋巴瘤, 免疫化疗, Th1/Th2比值, 预后

Dynamic Changes in Peripheral Blood T-Cell Subset after Immunochemotherapy Treatment in Diffuse Large B-Cell Lymphoma

Lingyao Fu, Hongbin Zhang*

The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing

Received: Apr. 9th, 2023; accepted: May 3rd, 2023; published: May 12th, 2023

*通讯作者。

Abstract

Introduction: The transformation and distribution of specific T-cell subsets in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients are connected with disease progression. The role of CD4⁺T cell subsets in initiating and regulating anti-lymphoma immune response *in vivo* remains controversial. **Methods:** We retrospectively analyzed the clinical data of 31 patients diagnosed with DLBCL who underwent six cycles of rituximab-cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisolone (R-CHOP) chemotherapy or more, serving as the first-line therapy. We collected peripheral blood samples from these patients at diagnosis and post-treatment, and analyzed the percentages of circulating lymphocyte subsets by quantitative flow cytometry. **Results:** We documented a progressive increase of Th1 cells, which was significant at T3, and a decrease of Th2 and Treg cells which was maintained up to T3 of R-CHOP treatment. Two cycles of treatment have already induced significant growth in the Th1/Th2 ratio and maintained a progressive increase since then. We found a significant correlation between the level of Th1/Th2 ratio at baseline and T3, and the realization of the complete response (CR). There was a correlation between the percentage of Th1 cells and the realization of the CR, with the cut-off value of 43.09 of Th1 cells. **Conclusion:** We believe that in newly diagnosed patients, R-CHOP may change the transformation of Th1/Th2 ratio by inhibiting the amplification of Th2. This analysis showed that the higher Th1/Th2 ratio and the increase of Th1 cells significantly correlated with the CR achievement, which suggests a strong transformation of T-cell polarization from a pro- to an anti-tumor T-cell response during treatment.

Keywords

T-Cell Subsets, Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Immunochemotherapy, Th1/Th2 Ratio, Prognosis

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

DLBCL 是非霍奇金淋巴瘤(Non Hodgkin's lymphoma, NHL)最常见的亚型, 约占 NHL 的三分之一[1]。根据国际预后指数(International prognostic index, IPI)评分、病理类型和诊断时的表现状态(Performance status, PS)对其评估, R-CHOP 方案可显著提高 60%~80% 患者的生存率, 与 6 个周期的 CHOP 治疗相比, 6 个周期的 R-CHOP 方案显著改善了总生存率(Overall survival, OS) (3 年 OS: 78.1% vs. 67.7%) [2] [3]。大部分的 DLBCL 患者可在标准的 R-CHOP 方案后治愈, 尽管治疗方案的多样性可能会降低患者的难治性和死亡率, 但约 30% 的患者会朝着复发/难治性疾病发展[4]。由于生物多样性和异质性, 用于评估淋巴瘤患者预后的 IPI 评分可能无法准确预测单个患者的预后[5]。因此, 探索更准确的 R-CHOP 治疗患者的预后指标并制定个体化治疗策略以改善患者的预后和 OS 非常重要。淋巴细胞在 NHL 的免疫监测中发挥着重要作用。淋巴减少症是包括 DLBCL 在内的各种 NHL 亚型的不良预后因素, 这一观察支持了这一观点[6]。肿瘤浸润 T 细胞的类型和计数与 DLBCL 患者的预后和无复发生存率相关[7]。浸润性 CD8⁺T 细胞水平升高与更好的临床结果相关[8]。Treg 在淋巴瘤发病机制和进展中的重要性仍存在争议[9]。DLBCL 中 CD4⁺T 细胞的显著减少与 NHL 的各种不良预后因素相关。在接受 R-CHOP 治疗的 DLBCL 患者中, 诊断

时 CD4⁺T 细胞较低与预后不良显著相关[10]。与细胞免疫相关的干扰素 γ 由 Th1 淋巴细胞分泌, 而 Th2 淋巴细胞分泌高水平的白介素-4 和白介素-13, 并在体液免疫和抗体产生中占据关键地位[11]。Palma 等人观察到, 与对照组相比, 非进展性慢性淋巴细胞白血病患者表达大量 Th2 细胞[12]。尽管我们认为 Th2 细胞有利于肿瘤发生[13], 但这些 CD4⁺T 细胞亚群的作用仍有争议。在各种肿瘤类型的研究结果中发现, Th2 亚群在诱导抗肿瘤免疫中的矛盾作用[14]。NHL 患者 Th1 和 Th2 细胞亚群的百分比以及与 T 细胞亚群相关的细胞因子水平尚未得到充分研究, 包括肿瘤免疫中 Th1 和 Th2 细胞的极化。已经表明, 常规 CD4⁺T 细胞亚群在分型和功能平衡方面发生变化, 在 R-CHOP 治疗的临床缓解后, 这些失衡很难显著逆转[15] [16]。国内外研究中 R-CHOP 治疗对 T 细胞亚群影响的差异表明了收集临床数据和进行相关分析的重要性。我们观察了 R-CHOP 治疗后淋巴细胞亚群的动态变化。此外, 我们的目的是使用流式细胞术评估 DLBCL 患者在各治疗阶段的 Th1、Th2 淋巴细胞的极化及其与临床指标、疾病结局的相关性。为了识别新的预后标志物并实施有效的个性化免疫治疗, 进一步破译 R-CHOP 治疗前后 DLBCL 患者的免疫应答是绝对必要的。

2. 资料和方法

2.1. 一般资料

这是一项回顾性研究, 由重庆医科大学附属第一医院伦理委员会批准。在 2019 年 1 月至 2022 年 1 月期间, 我们整理了 31 名新确诊 DLBCL 患者的临床数据, 其中包括 13 名女性和 18 名男性。纳入标准: 1) 根据 2016 年修订的世界卫生组织淋巴肿瘤分类, 组织病理学和免疫组织化学检查新诊断为 DLBCL; 2) 年龄 ≥ 18 岁的患者; 3) 在本研究之前未开始任何治疗; 4) 用 6~8 个周期的 R-CHOP 处理, 周期为 21 天。排除标准包括严重的心脏、肝脏或肾脏功能障碍; 合并免疫或内分泌系统疾病; 既往有其他器官恶性肿瘤病史。本研究获得了所有参与患者的书面知情同意书。

2.2. 样本采集

在以下四个时间点, 在乙二胺四乙酸(EDTA)处理的试管中采集外周血以检测淋巴细胞亚群: T0, R-CHOP 开始前; T1, 在接受两个周期的治疗后; T2, 四个治疗周期后; T3, 六个周期治疗结束。

2.3. 流式细胞术

根据制造商的说明, 使用 TruCOUNT 管和 BD Multitest 6 色 TBNK 试剂盒(BD Biosciences)测定循环淋巴细胞亚群、NK 细胞的百分比和绝对计数。简而言之, 50 μ L 全血在室温下用 6 色 TBNK Ab 鸡尾酒在黑暗中标记 15 分钟。加入 450 μ L FACS 裂解溶液后, 用 FACSCanto 流式细胞仪处理样品。对于 CD4⁺T 辅助细胞亚群的胞浆内检测, 首先在 Golgi Stop 存在下, 用 50 ng/mL 佛波醇肉豆蔻酸盐(Phorbol myristate acetate, PMA)在经典培养基中加离子霉素(1 μ g/mL)培养新鲜分离的 PBMC 5 小时。T 细胞活化后用 PBS 洗涤两次, 按照制造商的说明使用人 Th1/Th2/Th17/Treg 表型试剂盒渗透并染色。最后使用 FACSDiva 软件(BD)分析通过流式细胞术洗涤和收集的细胞。Th1、Th2、Th17 和 Treg 细胞的结果以 CD4⁺T 细胞群的百分比来描述。

2.4. 统计分析

结果以平均值 \pm 标准差(SD)、中位数和四分位间距(IR)表示。通过方差分析(ANOVA)评估各组之间标记物的差异。通过 Spearman 秩相关检验确定两个连续变量之间的相关性。两个独立组的值可通过非配对双尾 *t* 检验或 Mann-Whitney *U* 检验进行比较。如果数据未能满足方差同质性假设, 我们应用韦尔奇检

验。使用 GraphPad Prism 第 6 版进行统计分析。所有结果的统计学差异由 $p < 0.05$ 确定。

3. 结果

3.1. 患者临床特征

本研究的 31 名患者, 诊断中位年龄 63 岁, 随访时间为 6~38 个月。使用 IPI 评分系统, 10 名(32.2%)患者被分类为低风险(评分 0~1), 8 名(25.8%)患者被分为中风险(评分 2), 9 名(29.0%)患者被划分为高风险(评分 3), 4 名(13.0%)患者被归类为高风险(评分 4~5)。其中, 共有 6 名患者被归类为 $PS \geq 2$, 25 名患者被归类为 $PS < 2$ 。总有效率为 87.1% (27/31), 其中 12 名患者达到 CR。纳入患者的临床特征如表 1 所示。

Table 1. General clinical information of patients

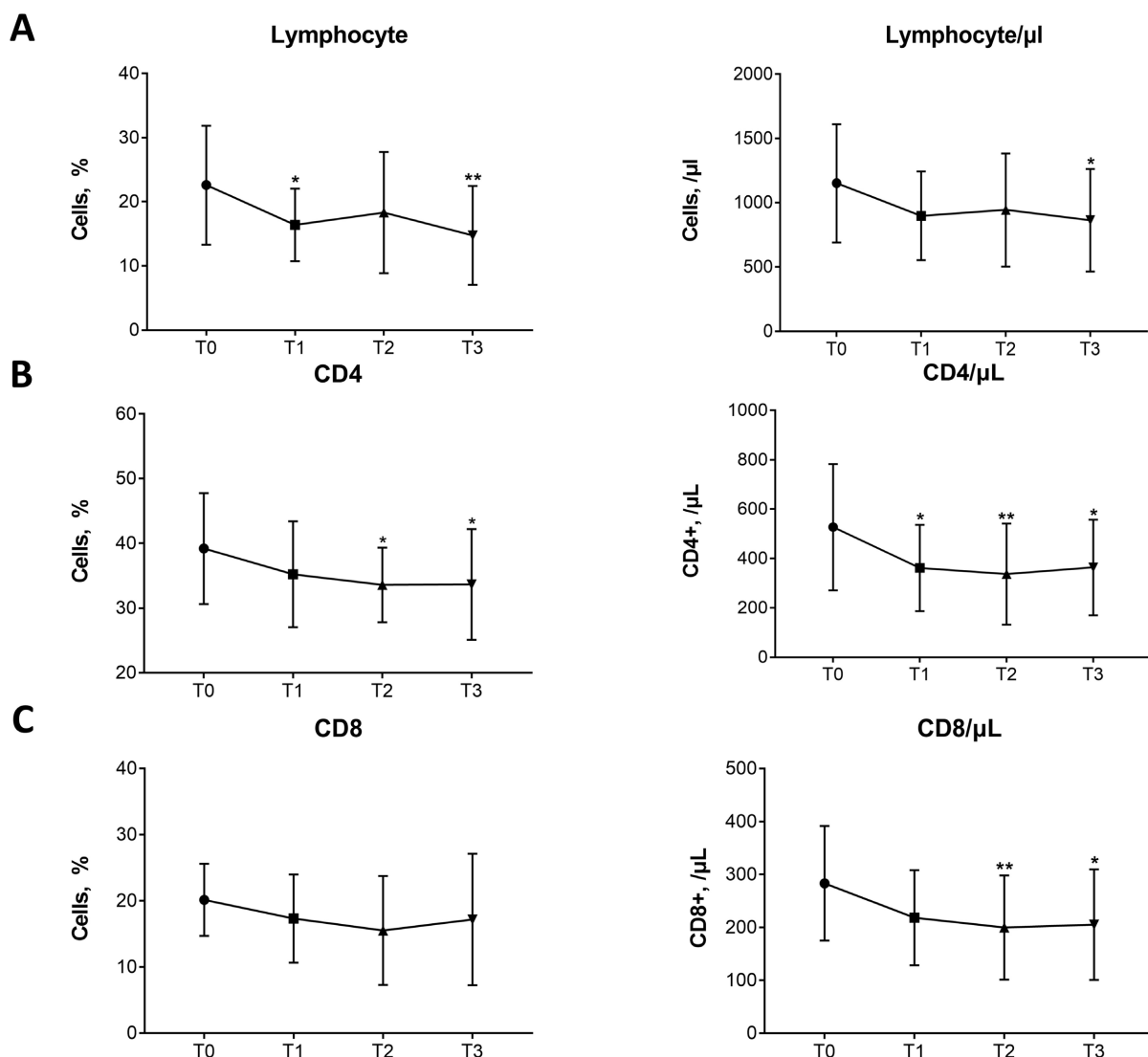
表 1. 患者一般临床资料

基本情况	n	构成百分比(%)
男	18	58.1
女	13	41.9
年龄(岁)		
≥63	42	61.7
<63	26	38.3
Ann Arbor 分期		
I 期	13	19.1
II 期	19	27.9
III 期	12	17.7
IV 期	24	35.3
IPI 评分		
0~1	10	32.2
2	8	25.8
3	9	29.0
4~5	4	13.0
PS		
$PS \geq 2$	6	19.4
$PS < 2$	25	80.6
疾病结局		
CR	12	38.7
No CR	19	61.3

3.2. R-CHOP 治疗 DLBCL 患者外周血淋巴细胞亚群的动态变化

我们发现, 淋巴细胞百分比在 2 个周期的治疗后显著下降, 此后一直保持($T0$ vs $T1$, $p = 0.017$; $T0$ vs $T3$, $p = 0.001$), 直到 6 个周期的 R-CHOP 治疗后达到最低(图 1(A))。淋巴细胞绝对数与百分比有相似的下降趋势, 但仅显示 $T3$ 和 $T0$ 之间的统计学显著性(图 1(A))。我们观察到, 与未治疗期相比, $CD4^+T$

细胞的百分比总体呈上升趋势(T0 vs T2, $p = 0.013$; T0 vs T3, $p = 0.015$) (图 1(B))。与未治疗时相比, CD4⁺和 CD8⁺T 细胞的总计数逐渐减少(CD4: T0 vs T1, $p = 0.012$; T0 vs T2, $p = 0.003$; CD8: T0 vs T2, $p = 0.007$)。计数显示出恢复的趋势, 但与 T0 时相比, T3 时也显著降低(CD4: T0 vs T3, $p = 0.014$; CD8: T0 vs T3, $p = 0.014$) (图 1(B)~(C))。T1 时 NK 细胞百分比明显较 T0 时更高, 后续仍保持较高水平(T0 vs T1, $p = 0.004$; T0 vs T3, $p = 0.016$) (图 1(D))。此外, 我们发现 Th1、Th17 细胞百分比在治疗后显著升高, 相反 Th2、Treg 细胞百分比在治疗后逐渐降低。特别是, Th1 细胞从 T0 时的 22.49% 开始增加(IR 14.32%~28.14%), 直到 T3 时其增长达到显著差异(IR 25.85%~42.99%) ($p = 0.017$) (图 2(A))。Th2 细胞从 T2 开始显著减少, 并在 T3 时保持稳定(T0 vs T2, $p = 0.029$; T0 vs T3, $p = 0.022$) (图 2(B))。尽管 Th17 细胞百分比仅在 4 个治疗周期后显著增加($p = 0.016$) (图 2(C)), 但 Treg 细胞仅在 T3 时显著减少($p = 0.035$) (图 2(D))。通过计算治疗期间 Th1 细胞与 Th2 细胞的比率, 可以更明确地表达 Th1 和 Th2 的转化, 这使我们能够通过单个值监测化疗期间 T 细胞亚群的调节。最早时间点的中值 Th1/Th2 比值为 0.51 (范围 0.32~0.91)。我们可以观察到 R-CHOP 治疗 2 个周期后 Th1/Th2 比值显著增加, 并在随后的时间点保持稳定增长(T0 vs T1, $p = 0.002$; T0 vs T2, T0 vs T3, $p < 0.0001$) (图 3)。



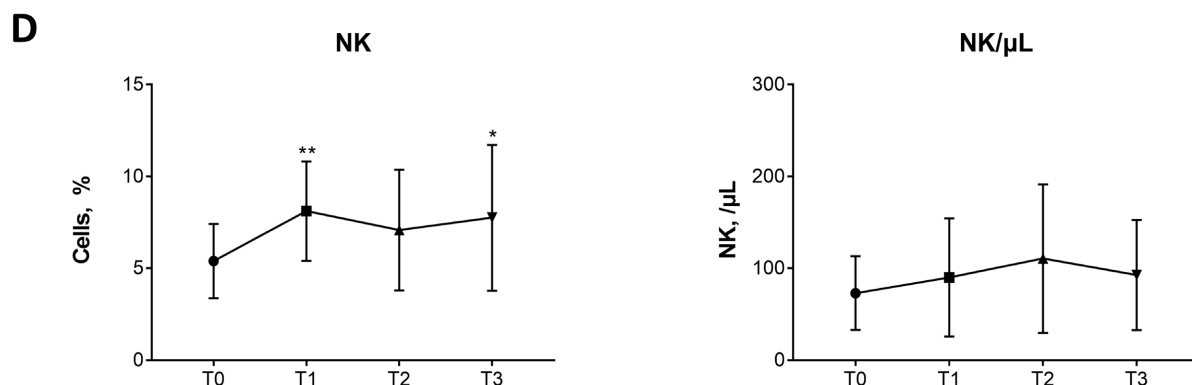


Figure 1. Dynamic changes of Lymphocyte, CD4⁺T, CD8⁺T cells and NK cells (all p values were the results of comparison with T0, *p < 0.05, **p < 0.01)

图 1. 淋巴细胞、CD4⁺T、CD8⁺T 细胞和 NK 细胞的动态变化(所有 P 值均为与 T0 时期比较, *p < 0.05, **p < 0.01)

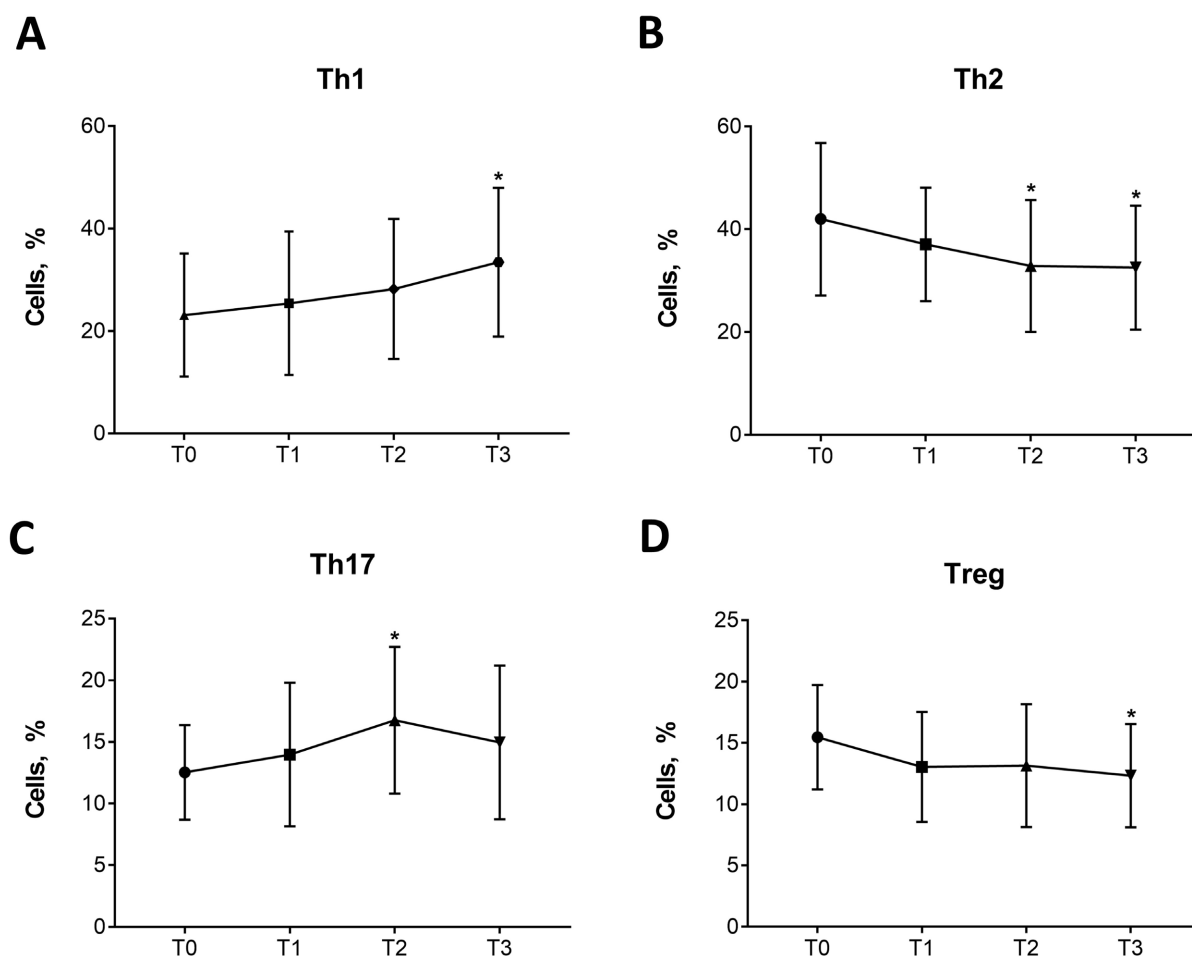


Figure 2. Changes of T-cell cytokine in paired peripheral blood samples before and after R-CHOP treatment

图 2. 配对外周血样本在 R-CHOP 治疗前后 T 细胞因子的变化

我们分析了 T0 和 T3 时 Th1 或 Th2 细胞频率对 Th1/Th2 比率的调节, 以确定 Th1/Th1 比率的降低与 Th1 和 Th2 细胞的变化之间的关系(表 2)。发现两个时间点 Th1/Th2 比值的增加与 Th1 和 Th2 细胞的变化之间存在显著相关性, 这与先前研究中 Th1/Th1 失衡与 DLBCL 的作用相对应[16] [17]。

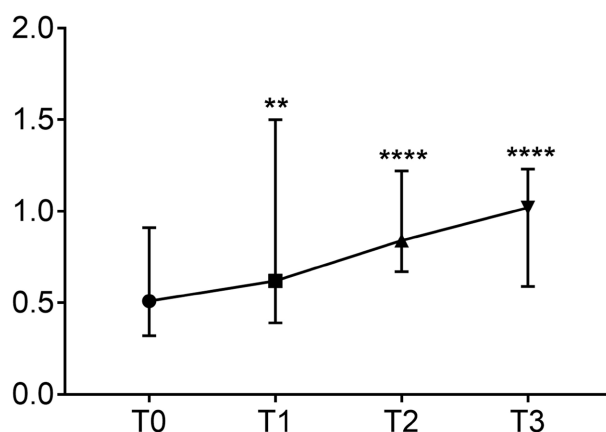


Figure 3. Longitudinal analysis of the Th1/Th2 ratio from paired peripheral blood samples before and after R-CHOP treatment (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$)

图 3. R-CHOP 治疗前后配对外周血样本的 Th1/Th2 比值纵向分析(** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$)

Table 2. Correlation analysis between the Th1/Th2 ratio and Th1 or Th2 cells at T0 (A) and T3 (B)

表 2. T0 (A)与 T3 (B)时 Th1/Th2 比值与 Th1 或 Th2 细胞的相关性分析

A			
	T0-Th1	T0-Th2	T0-Th1/Th2
T0-Th1	1.000	1.000	0.870
T0-Th2	1.000	1.000	0.870
T0-Th1/Th2	0.870	0.870	1.000
B			
	T3-Th1	T3-Th2	T3-Th1/Th2
T3-Th1	1.000	1.000	0.576
T3-Th2	1.000	1.000	0.576
T3-Th1/Th2	0.576	0.576	1.000

3.3. CD4⁺T 细胞的细胞因子产生、DLBCL 生物学和治疗反应的调节

为了研究 Th1 和 Th2 的调节与 R-CHOP 治疗后临床结果之间的关系, 我们根据 6 个治疗周期后的临床结果标记了 T0 和 T3 时间点的 Th1/Th2 比值。既往未治疗和 T3 期 Th1/Th2 比值较高与 CR 的实现呈正相关(T0: $p = 0.009$; T3: $p = 0.003$) (表 3)。因此, 我们根据患者的临床特征, 包括 PS、IPI 评分和疾病结局, 研究了 DLBCL 的 Th1、Th2 细胞频率和 Th1/Th2 比率。我们假设高 IPI 评分组的 Th2 细胞百分比高于低 IPI 评分组(中位数 41.66% vs 32.20%; $p = 0.044$) (图 4(A))。此外, 我们的结果显示, PS < 2 的 DLBCL 患者的 Th1 细胞比例显著高于 PS 患者 ≥ 2 (中位数 27.54% vs 20.33%; $p = 0.045$) (图 4(B))。此外, 与未处于缓解期的患者相比, CR 患者的 Th1 细胞百分比显著升高(中位数 35.85% vs 23.82%; $p = 0.029$) (图 4(C))。

在 31 名患者进行了 6 个 R-CHOP 周期(T3 期)后, 使用 ROC 曲线和相应 AUC 进行的分析表明, Th1 细胞的增加与 CR 的实现之间存在相关性, Th1 的临界值为 43.09% ($p = 0.017$) (图 5)。根据这一临界值, 31 名患者中有 7 名(22.6%)被视为 Th1 升高组(Th1 $> 43.09\%$), 24 名(77.4%)被认为是 Th1 下降组(Th1 $< 43.08\%$)。在高 Th1 组中, 所有患者均获得 CR。在 T3 期, Th1 细胞百分比超过 43.09%与 Th2 细胞减少

之间存在显著相关性($p = 0.001$) (表 4)。Th1 和 Th2 细胞的百分比、Th1/Th2 的比率与感染的发生率、部位和类型之间没有显著的相关性, 因为聚乙二醇化 G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) 具有普遍的长效作用, 在 31 名患者的队列中观察到较少的感染事件和较早的发生率。

Table 3. Modulation of Th1/Th2 ratio and clinical response to R-CHOP

表 3. Th1/Th2 比值的调节与 R-CHOP 治疗的临床结果

	No CR	CR	p
N	19	12	
男(%)	11 (57.9)	7 (58.3)	0.877
女(%)	8 (42.1)	5 (41.7)	
年龄(中位、范围)	57 (39~78)	61.5 (45~75)	0.052
T0-Th1/Th2 (中位、范围)	0.51 (0.32~0.58)	0.51 (0.32~0.91)	0.009
T3-Th1/Th2 (中位、范围)	0.99 (0.59~1.11)	1.03 (0.72~1.23)	0.003

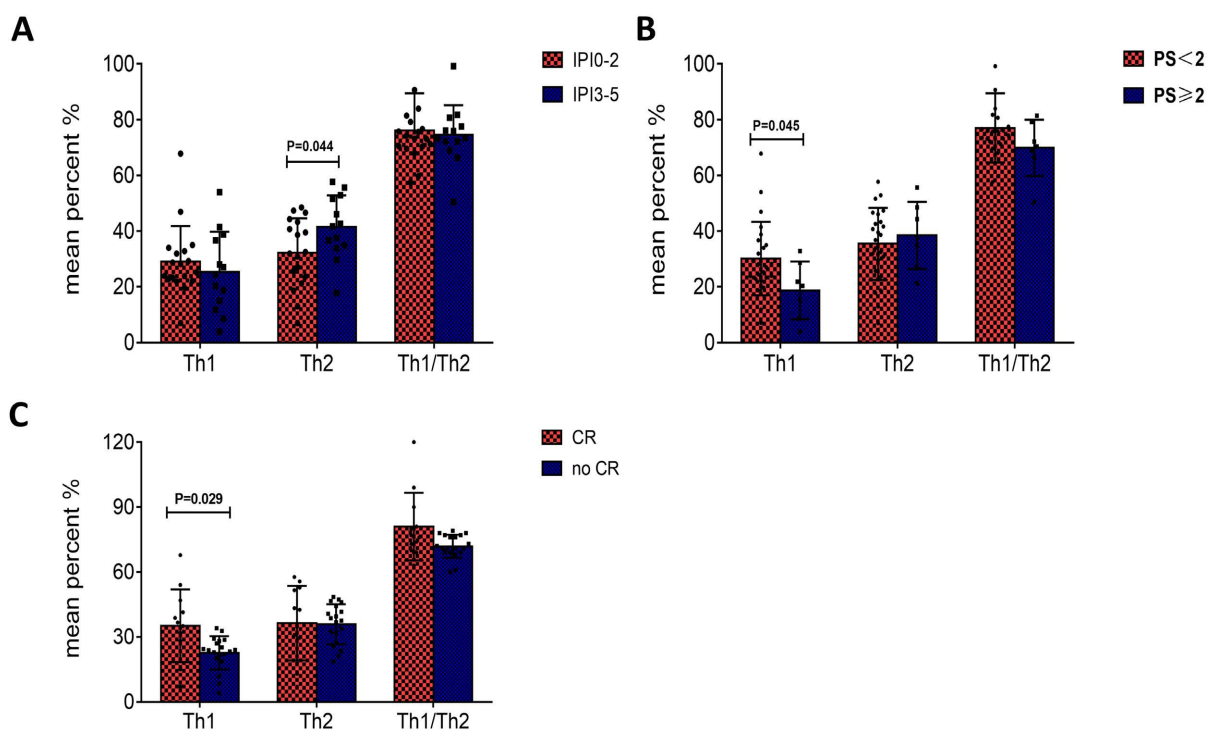


Figure 4. Comparison of CD4⁺T cell subsets according to the IPI score, PS and disease outcome grouping in DLBCL patients

图 4. DLBCL 患者根据 IPI 评分、PS 和疾病转归分组的 CD4⁺T 细胞亚群比较

Table 4. Th2 cells response to R-CHOP according to the 43.09 cut-off of Th1 cells at T3

表 4. 根据 T3 处 Th1 细胞的 43.09 截止值, Th2 细胞对 R-CHOP 的反应

	T3-Th1 细胞		p
	Th1 > 43.09	Th1 < 43.09	
N	7	24	
T3-Th2 细胞(中位、范围)	30.86 (12.97~51.62)	38.09 (6.96~57.67)	0.001

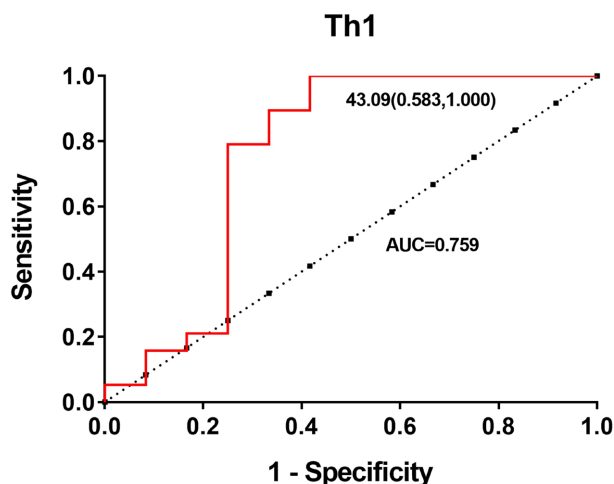


Figure 5. Th1 and response to treatment. ROC curve analysis for the optimal cut-off point of the Th1 at T3 of R-CHOP treatment

图 5. Th1 和对治疗的反应。R-CHOP 处理 T3 处 Th1 最佳临界点的 ROC 曲线分析

4. 讨论

R-CHOP 是目前 DLBCL 患者的标准治疗方案, 有助于提高患者的生存率。利妥昔单抗的抗肿瘤作用由多种机制介导, NK 和 T 细胞介导免疫系统的激活, 通过启动 CD4⁺T 细胞的分化而增强。淋巴瘤患者的免疫反应状态和治疗后免疫系统动力学的影响是维持基于利妥昔单抗化疗的长期保护和抗肿瘤疗效的关键因素[15] [18] [19]。特异性抗肿瘤 T 细胞克隆常常诱导无效的抗肿瘤免疫应答[20], 这可能是由于 T 细胞无应答、T 细胞亚群或 T 辅助细胞亚型失衡。事实上, 化疗不同阶段患者外周血 T 淋巴细胞亚群的分化扰乱了平衡, 免疫反应的抑制和监控系统的失效可能会促进肿瘤免疫逃逸机制的建立。然而, DLBCL 患者的 T 淋巴细胞亚群分布与疾病活动或临床结果之间的关系仍不清楚。在这项研究中, 我们发现化疗的细胞毒性效应导致 DLBCL 患者外周血中淋巴细胞、CD4⁺、CD8⁺T 细胞计数降低, NK 细胞百分比升高。在整个治疗期间, 淋巴细胞亚群的计数仍低于新诊断时, 但下降趋势的最早逆转发生在 T3。获得 CR 的患者 T 细胞的绝对数量和 NK 细胞的百分比高, 提示淋巴细胞亚群的绝对数量和百分比可以作为预测治疗反应的潜在指标, 但其在评估 R-CHOP 方案预后中的作用尚未得到充分研究。

在个体内变异分析中, 我们检测了 Th1、Th2、Th17 和 Treg 细胞因子亚群的百分比, 发现 R-CHOP 显著影响 T 细胞的分布。在 R-CHOP 治疗 2 个周期后, 体内 Th1/Th2 比率显著升高, 这与 Th1 和 Th2 细胞显著相关, 尽管我们的结果中的主导作用尚不清楚, 主要是通过抑制 Th2 活化和促进 Th1 亚型分化。我们注意到, 通过分析 Th1 和 Th2 细胞的调节与临床结果之间的关系, T3 时 Th1 细胞的百分比超过 43.09% 与 CR 的实现之间存在相关性。令人惊讶的是, 我们的结果显示, CR 患者和 PS < 2 患者的 Th1 细胞频率明显高于其他患者。根据这一结果, 观察到高 IPI 评分组患者的 Th2 细胞百分比显著高于其他组。

其他研究中介绍了 R-CHOP 治疗后 DLBCL 患者 Th1 和 Th2 细胞亚群的动态变化, 提出了一些相反的观点。在不同癌症类型的研究中, 已经注意到 Th2 亚型在诱导抗肿瘤免疫中的矛盾作用[14]。尽管 Th2 细胞似乎与肿瘤侵袭性相关, 但通过诱导 B 细胞活化或产生细胞因子 IL-10 来抑制免疫, 一些研究支持 Th2 及其标志性细胞因子 IL-4 的抑瘤特性参与肿瘤抑制, 包括恶性淋巴瘤、骨髓瘤、乳腺癌和黑色素瘤 [21] [22] [23] [24] [25]。关于 NHL 患者 Th2 细胞的临床意义的研究非常有限。Deghani 等人[22]评估了 48 名 DLBCL 患者的外周血样本, 他们发现缓解患者的 Th2 细胞百分比显著高于新诊断患者。Jones 等人[26]

揭示了 Th2 细胞分泌的 IL4 的高表达与抑制肿瘤细胞增殖和提高生存率显著相关。Kurtz 等人[27]证明皮下注射 IL-4 对惰性和侵袭性 NHL 具有抗肿瘤活性, 尽管内源性 IL-4 水平似乎与 NHL 的预后无关。Mori 等人[16]显示, 在 19 名未经治疗和 18 名处于 CR 期的 DLBCL 患者中, Th1 和 Th1/Th2 比例在达到 CR 的患者中更高。他们认为 Th1/Th2 失衡可能在促进淋巴瘤进展中发挥关键作用, Th1 优势状态可能有助于持久缓解。

尽管与我们的研究数据存在一些差异, 但他们的研究与我们的结果一致。Yin 等人[28]研究了治疗前后 DLBCL 患者 T 淋巴细胞亚群的动态变化以及相关调节基因的表达模式。他们表明, 与基线水平相比, 调节 Th1 和 Th2 细胞分化所需的转录因子在 3 个周期后显著增加。Deligne 等人[29]分析了抗 CD20 治疗诱导抗肿瘤 T 细胞反应的机制, 包括通过过继 T 细胞转移试验将活化的 CD4⁺T 细胞亚群分化为 Th1 表型。Puzzolo 等人[30]予以伊布替尼治疗 70 例新诊断的慢性淋巴细胞白血病患者中发现, 抑制 Th2 细胞的过度活化可能有助于宿主免疫监测, 并诱导 Th2/Th1 比值降低, 这与 CR 的实现有显著相关性。

因此, 我们的研究可以为以下事实提供证据: DLBCL 患者的 Th1 淋巴细胞与抗肿瘤免疫应答正相关, 因此, Th1 比例越高, 这些患者的表现状态越好, 预后良好, 病情持续缓解。

如今, 以往研究中 Th17 和 Treg 细胞的动态变化和免疫效应令人困惑。我们的结果表明, 在 R-CHOP 处理 2 个周期后, Treg 细胞的频率显著降低。与我们的结果一致, Chang 等人[31]发现 Treg 细胞下降, 并支持 Treg 可能损害抗肿瘤免疫, 并与不良预后相关。尽管 Treg 细胞已被证实与某些类型淋巴瘤的良好预后相关, 但它们与非 GCB 型 DLBCL 不一致[32]。Dehghani 等人[33]报道, 淋巴瘤患者中 Treg 绝对计数和 Treg/Th17 比值的高水平与良好的预后相关, 但 Th17 淋巴细胞水平在疾病不同阶段的患者之间变化不显著, 很可能是由于持续时间有限、未能平等地随访所有患者, 这需要进一步研究。

目前的研究有一些需要考虑的局限性。首先, 分析了相对较少的患者, 因此需要在更大的队列研究中确认新的预后标志物。其次, 没有记录 T 淋巴细胞亚群失衡与感染的发生、部位和类型之间的关系。第三, 我们的研究缺乏 Th1 和 Th2 细胞相关细胞因子的数据分析。未来需进一步描述 Th1 和 Th2 细胞相关细胞因子, 以阐明这些亚群在淋巴瘤患者疾病结局中的作用。淋巴细胞计数和表型也应包括在预测 DLBCL 患者未来 OS 和 PFS 中。

5. 总结

一些研究认为, 外周血 Th2 细胞频率的增加可能是预测 NHL 患者化疗反应和临床结局的良好预后因素。我们假设, 在新诊断的患者中, R-CHOP 可以通过限制 Th2 细胞的浸润来增强人体免疫反应并恢复有效的免疫监测, 这可能会诱导宿主抗肿瘤免疫激活并影响患者的预后。我们的结果表明, 治疗期间 Th1 细胞的增加和 Th2 细胞的减少之间存在显著的相关性, 并且由于治疗期间 T 细胞极化从促肿瘤向抗肿瘤 T 细胞反应的强烈转变, 因此与良好的预后相关。需要更大的病例系列甚至对照研究来确定 R-CHOP 治疗是否能够通过调节宿主免疫来抵抗感染风险并加强疾病控制。然而, 仍需要更多的研究来评估 R-CHOP 治疗期间 Th1 和 Th2 细胞相关的细胞因子, 以阐明 T 辅助细胞亚群的临床意义。

参考文献

- [1] Lossos, I.S., Czerwinski, D.K., Alizadeh, A.A., *et al.* (2004) Prediction of Survival in Diffuse Large-B-Cell Lymphoma Based on the Expression of Six Genes. *New England Journal of Medicine*, **350**, 1828-1837. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032520>
- [2] Martelli, M., Ferreri, A.J., Agostinelli, C., Di Rocco, A., Pfreundschuh, M. and Pileri, S.A. (2013) Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **87**, 146-171. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.12.009>
- [3] Molina, A. (2008) A Decade of Rituximab: Improving Survival Outcomes in Non-Hodgkin's Lymphoma. *Annual Re-*

- view of Medicine*, **59**, 237-250. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.59.060906.220345>
- [4] Younes, A., Thieblemont, C., Morschhauser, F., *et al.* (2014) Combination of Ibrutinib with Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone (R-CHOP) for Treatment-Naive Patients with CD20-Positive B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma: A Non-Randomised, Phase 1b Study. *The Lancet Oncology*, **15**, 1019-1026. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70311-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70311-0)
 - [5] Lossos, I.S. and Morgensztern, D. (2006) Prognostic Biomarkers in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, **24**, 995-1007. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.4786>
 - [6] Mociková, H. (2010) Prognostic Significance of Absolute Lymphocyte Count and Lymphocyte Subsets in Lymphomas. *Prague Medical Report*, **111**, 5-11. http://pmr.cuni.cz/Data/Files/PragueMedicalReport/pmr_111_2010_1/pmr2010a0001.pdf
 - [7] Galand, C., Donnou, S., Molina, T.J., Fridman, W.H., Fisson, S. and Sautès-Fridman, C. (2012) Influence of Tumor Location on the Composition of Immune Infiltrate and Its Impact on Patient Survival. Lessons from DCBCL and Animal Models. *Frontiers in Immunology*, **3**, Article 98. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00098>
 - [8] Wahlin, B.E., Sander, B., Christensson, B. and Kimby, E. (2007) CD8⁺ T-Cell Content in Diagnostic Lymph Nodes Measured by Flow Cytometry Is a Predictor of Survival in Follicular Lymphoma. *Clinical Cancer Research*, **13**, 388-397. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1734>
 - [9] D'Arena, G., Vitale, C., Coscia, M., *et al.* (2017) Regulatory T Cells and Their Prognostic Relevance in Hematologic Malignancies. *Journal of Immunology Research*, **2017**, Article ID: 1832968. <https://doi.org/10.1155/2017/1832968>
 - [10] Kusano, Y., Yokoyama, M., Terui, Y., *et al.* (2017) Low Absolute Peripheral Blood CD4⁺ T-Cell Count Predicts Poor Prognosis in R-CHOP-Treated Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood Cancer Journal*, **7**, e558. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.37>
 - [11] Chraa, D., Naim, A., Olive, D. and Badou, A. (2019) T Lymphocyte Subsets in Cancer Immunity: Friends or Foes. *Journal of Leukocyte Biology*, **105**, 243-255. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0318-097R>
 - [12] Palma, M., Gentilcore, G., Heimersson, K., *et al.* (2017) T Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia Display Dysregulated Expression of Immune Checkpoints and Activation Markers. *Haematologica*, **102**, 562-572. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.151100>
 - [13] Dobrzanski, M.J. (2013) Expanding Roles for CD4 T Cells and Their Subpopulations in Tumor Immunity and Therapy. *Frontiers in Oncology*, **3**, Article 63. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00063>
 - [14] Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. and Galon, J. (2012) The Immune Contexture in Human Tumours: Impact on Clinical Outcome. *Nature Reviews Cancer*, **12**, 298-306. <https://doi.org/10.1038/nrc3245>
 - [15] Battella, S., Cox, M.C., La Scaleia, R., *et al.* (2017) Peripheral Blood T Cell Alterations in Newly Diagnosed Diffuse Large B Cell Lymphoma Patients and Their Long-Term Dynamics Upon Rituximab-Based Chemoimmunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **66**, 1295-1306. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-2026-7>
 - [16] Mori, T., Takada, R., Watanabe, R., Okamoto, S. and Ikeda, Y. (2001) T-Helper (Th)1/Th2 Imbalance in Patients with Previously Untreated B-Cell Diffuse Large Cell Lymphoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **56**, 566-568. <https://doi.org/10.1007/s00262-001-0232-8>
 - [17] Sheng, L., Fu, D., Cao, Y., *et al.* (2022) Integrated Genomic and Transcriptomic Analyses of Diffuse Large B-Cell Lymphoma with Multiple Abnormal Immunologic Markers. *Frontiers in Oncology*, **12**, Article 790720. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.790720>
 - [18] Abès, R., Gélizé, E., Fridman, W.H. and Teillaud, J.-L. (2010) Long-Lasting Antitumor Protection by Anti-CD20 Antibody through Cellular Immune Response. *Blood*, **116**, 926-934. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-248609>
 - [19] Weiner, G.J. (2010) Rituximab: Mechanism of Action. *Seminars in Hematology*, **47**, 115-123. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2010.01.011>
 - [20] Yin, Q., Zha, X., Yang, L., *et al.* (2011) Generation of Diffuse Large B Cell Lymphoma-Associated Antigen-Specific Vα6/Vβ13+T Cells by TCR Gene Transfer. *Journal of Hematology & Oncology*, **4**, Article No. 2. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-4-2>
 - [21] Schreck, S., Friebel, D., Buettner, M., *et al.* (2009) Prognostic Impact of Tumour-Infiltrating Th2 and Regulatory T cells in Classical Hodgkin Lymphoma. *Hematological Oncology*, **27**, 31-39. <https://doi.org/10.1002/hon.878>
 - [22] Dehghani, M., Ramzi, M., Kalani, M., Golmoghaddam, H. and Arandi, N. (2022) Higher Peripheral Blood IFN-γ-/IL-4+ Th2 Lymphocytes Are Associated with Lower Rate of Relapse in Patients with Lymphoma. *Immunological Investigations*, **51**, 452-463. <https://doi.org/10.1080/08820139.2020.1840583>
 - [23] Yoon, N.K., Maresh, E.L., Shen, D., *et al.* (2010) Higher Levels of GATA3 Predict Better Survival in Women with Breast Cancer. *Human Pathology*, **41**, 1794-1801. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.06.010>
 - [24] Lorvik, K.B., Hammarström, C., Fauskanger, M., *et al.* (2016) Adoptive Transfer of Tumor-Specific Th2 Cells Eradi-

- cates Tumors by Triggering an *in Situ* Inflammatory Immune Response. *Cancer Research*, **68**, 64-76. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1219>
- [25] Purwar, R., Schlapbach, C., Xiao, S., *et al.* (2012) Robust Tumor Immunity to Melanoma Mediated by Interleukin-9-Producing T Cells. *Nature Medicine*, **18**, 1248-1253. <https://doi.org/10.1038/nm.2856>
- [26] Jones, E.A., Pringle, J.H., Angel, C.A. and Rees, R.C. (2002) Th1/Th2 Cytokine Expression and Its Relationship with Tumor Growth in B Cell Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL). *Leukemia & Lymphoma*, **43**, 1313-1321. <https://doi.org/10.1080/10428190290026385>
- [27] Kurtz, D.M., Tschetter, L.K., Allred, J.B., *et al.* (2007) Subcutaneous Interleukin-4 (IL-4) for Relapsed and Resistant Non-Hodgkin Lymphoma: A Phase II Trial in the North Central Cancer Treatment Group, NCCTG 91-78-51. *Leukemia & Lymphoma*, **48**, 1290-1298. <https://doi.org/10.1080/10428190701355028>
- [28] Yin, Q., Chen, L., Li, Q., *et al.* (2014) Changes of T-Lymphocyte Subpopulation and Differential Expression Pattern of the T-Bet and GATA-3 Genes in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Patients after Chemotherapy. *Cancer Cell International*, **14**, Article No. 85. <https://doi.org/10.1186/s12935-014-0085-9>
- [29] Deligne, C., Metidji, A., Fridman, W.-H. and Teillaud, J.-L. (2015) Anti-CD20 Therapy Induces a Memory Th1 Response through the IFN- γ /IL-12 Axis and Prevents Protumor Regulatory T-Cell Expansion in Mice. *Leukemia*, **29**, 947-957. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.275>
- [30] Puzzolo, M.C., Del Giudice, I., Peragine, N., *et al.* (2021) TH2/TH1 Shift under Ibrutinib Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Frontiers in Oncology*, **11**, Article 637186. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.637186>
- [31] Chang, C., Wu, S.-Y., Kang, Y.-W., *et al.* (2015) High Levels of Regulatory T Cells in Blood Are a Poor Prognostic Factor in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *American Journal of Clinical Pathology*, **144**, 935-944. <https://doi.org/10.1309/AJCPUJGMVV6ZF4GG>
- [32] Tzankov, A., Meier, C., Hirschmann, P., Went, P., Pileri, S.A. and Dirnhofer, S. (2008) Correlation of High Numbers of Intratumoral FOXP3⁺ Regulatory T Cells with Improved Survival in Germinal Center-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Follicular Lymphoma and Classical Hodgkin's Lymphoma. *Haematologica*, **93**, 193-200. <https://doi.org/10.3324/haematol.11702>
- [33] Dehghani, M., Kalani, M., Golmoghaddam, H., Ramzi, M. and Arandi, N. (2020) Aberrant Peripheral Blood CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Regulatory T Cells/T Helper-17 Number Is Associated with the Outcome of Patients with Lymphoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **69**, 1917-1928. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02591-y>