

外周血 NK 细胞绝对值在慢性淋巴细胞白血病中的预后价值

王文婷,王 莉,吴雨洁,朱华渊,吴 微,曹 蕾,梁金花,范 磊,李建勇,徐 卫*

(南京医科大学第一附属医院血液科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探索外周血自然杀伤(NK)细胞绝对值在慢性淋巴细胞白血病(CLL)患者中的分布、与其他临床指标的相关性及其预后价值。方法:回顾性分析 2005—2014 年 126 例初诊 CLL 患者的临床资料。Mann-Whitney *U* 检验及 Kruskal-Wallis 检验分析 NK 细胞绝对值与其他临床指标的相关性。生存分析采用 Kaplan-Meier 法,预后因素分析采用 Cox 比例风险模型。结果:126 例初诊 CLL 患者外周血 NK 细胞绝对值的中位值为 0.54×10^9 个/L($0.01 \times 10^9 \sim 4.11 \times 10^9$ 个/L),将 NK 细胞绝对值 0.20×10^9 个/L 作为预测 CLL 患者预后的分界值。126 例患者中位随访 44.5 个月,NK 细胞绝对值 $\geq 0.2 \times 10^9$ 个/L 组与 $< 0.2 \times 10^9$ 个/L 组的 5 年总生存率(OS)分别为 71.9%和 48.4%($P=0.031$)。单因素生存分析显示外周血低 NK 细胞绝对值($< 0.20 \times 10^9$ 个/L)与较短的 OS 相关($P=0.019$);多因素生存分析发现 NK 细胞绝对值对 CLL 的 OS 具有独立预后意义($P=0.005$)。结论:初诊 CLL 患者外周血 NK 细胞数量可能反映自身免疫水平,NK 细胞数量减低提示预后不良。

[关键词] 慢性淋巴细胞白血病;NK 细胞绝对值;预后

[中图分类号] R551.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)05-611-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20170519

Prognostic value of absolute NK cell count in peripheral blood of chronic lymphocytic leukemia

Wang Wenting, Wang Li, Wu Yujie, Zhu Huayuan, Wu Wei, Cao Lei, Liang Jinhua, Fan Lei, Li Jianyong, Xu Wei*
(Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the distribution of absolute natural killer (NK) cell count in peripheral blood in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL), and evaluate correlation with other clinical indicators and its prognostic value. **Methods:** The information of a total of 126 patients with CLL treated in the First Affiliated Hospital of NJMU from 2005 to 2014 were collected in this retrospective study. Comparisons of NK cell count as continuous parameter in different groups were described using Mann-Whitney *U* test and the Kruskal-Wallis test. Kaplan-Meier method was used to survival analysis, and the Cox proportional hazards models were used for the estimation of prognostic factors. **Result:** The median absolute NK cell counts were 0.54×10^9 /L (range: $0.01 \times 10^9 \sim 4.11 \times 10^9$ /L) in all the 126 CLL cases. The most discriminative cut-points of NK cell counts at diagnosis was defined as 0.20×10^9 /L. With a median follow-up of 44.5 months, patients with NK cell count $\geq 0.20 \times 10^9$ /L had a 5-year overall survival (OS) of 71.9%, whereas patients with NK cell count $< 0.20 \times 10^9$ /L had a 5-year OS of 48.4% ($P=0.031$). Univariate analysis showed that low NK cell count was associated with inferior OS ($P=0.019$), and multivariate analysis confirmed NK cell count as an independent risk factor ($P=0.005$). **Conclusion:** Absolute NK cell count in peripheral blood of CLL patients may reflect level of immunity, the reduction of NK cell count indicate poor prognosis.

[Key words] chronic lymphocytic leukemia; absolute NK cell count; prognosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(05): 611-614, 646]

慢性淋巴细胞白血病(CLL)是主要发生在中老年人群的一种成熟 B 淋巴细胞克隆增殖性肿瘤,以

形态学成熟的小淋巴细胞在外周血、骨髓、脾脏和淋巴结聚集为特征。CLL 患者的中位生存期约 10 年,但不同患者的预后呈高度异质性。年龄、临床分期、外周血淋巴细胞计数及倍增时间、细胞遗传学及分子遗传学异常等临床和实验指标均是重要的预后因素^[1]。

[基金项目] 国家自然科学基金(81370657)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: xuwei0484@jssph.org.cn

自然杀伤(natural killer, NK)细胞是一种天然免疫细胞,在人体免疫应答中发挥重要作用,是机体抗肿瘤作用的第一道防线^[2-3]。NK 细胞数量能够在一定程度上反映机体免疫状态。Palmer 等^[4]对 166 例 CLL 患者进行研究,发现高 NK 细胞与恶性克隆性 B 细胞(MBC)比值(NK:MBC)与 CLL 疾病早期及免疫球蛋白重链可变区(IGHV)基因突变具有显著相关性($P < 0.001$)。关于 NK 细胞绝对值对 CLL 的预后价值尚未明确。本研究选取南京医科大学第一附属医院血液科 126 例患者作为观察对象,研究 CLL 患者外周血 NK 细胞数量,分析与其他临床指标的相关性及其预后价值。

1 对象和方法

1.1 对象

回顾性分析南京医科大学第一附属医院血液科 2005—2014 年收治的 126 例初诊 CLL 患者临床资料。所有患者均符合 CLL 诊断标准^[5]:①外周血 B 淋巴细胞绝对值 $\geq 5 \times 10^9$ 个/L,且 ≥ 3 个月;②形态以成熟小淋巴细胞为主,幼稚淋巴细胞 $< 10\%$;③典型的免疫表型特征:sIg^{dim}、CD5⁺、CD19⁺、CD20^{dim}、CD200⁺、CD23⁺、FMC7⁻、CD22⁻、CD79 β ⁻及轻链限制性表达。患者的一般临床资料,包括年龄、性别、Binet 分期、血清白蛋白和 $\beta 2$ -微球蛋白($\beta 2$ -MG)水平,CD38 和 ZAP-70 表达、p53 和 ATM 基因缺失、p53 和 IGHV 突变等均纳入分析,并将 p53 缺失及突变均归为 p53 基因异常。80 例患者具有治疗指征^[5]接受治疗,其中 39 例使用了含利妥昔单抗的治疗方案,所有治疗方案对预后的影响均无统计学意义。截至 2016 年 1 月,中位随访 44.5(12~130)个月,共 30 例患者死亡,5 年总生存率(OS)为 66.1%。

1.2 方法

收集 126 例患者初诊时外周血流式细胞分析结果,获得淋巴细胞比例及 NK 细胞比例,结合同时段血常规白细胞计数,算得初诊时患者 NK 细胞绝对值。NK 细胞定义为 CD3⁻CD16⁺和(或)CD56⁺细胞。使用的流式抗体包括:CD3-FITC、CD4-PE、CD8-APC、CD16-PE 及 CD56-APC 鼠抗人单克隆荧光抗体及其同型对照抗体(BD Biosciences,美国)。白蛋白正常范围为 ≥ 40 g/L, $\beta 2$ -MG 范围为 ≤ 52.53 mg/L。CD38 和 ZAP-70 的 cut-off 值分别为 30%和 20%。Sanger 直接测序检测 p53 基因第 4~9 外显子突变。IGHV 基因突变、p53 缺失及 ATM 缺失的 cut-off 值分别为 98%、5%及 7%。

1.3 统计学方法

使用 SPSS21.0、Graphpad Prism 6 及 X-tile 软件^[6]进行统计学分析。X-tile 软件判断 NK 细胞数量的最佳 cut-off 值, Mann-Whitney *U* 检验及 Kruskal-Wallis 检验分析 NK 细胞绝对值与其他临床指标的相关性。生存分析采用 Kaplan-Meier 法,预后因素分析采用 Cox 比例风险模型。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床特征

共 126 例患者纳入分析,男 85 例,女 41 例,中位年龄 58(23~84)岁, ≥ 60 岁的患者 61 例(48.4%)。根据 Binet 临床分期系统,Binet A 期 37 例(29.4%), Binet B 期 43 例 (34.1%), Binet C 期 46 例 (36.5%)。47 例(37.6%)患者初诊时白蛋白低于正常水平,85 例(67.5%)患者的 $\beta 2$ -MG 高于正常值。外周血淋巴细胞流式分析显示 CD38 及 ZAP-70 阳性的患者分别为 24 例(19.5%)、64 例(53.8%)。18 例(14.3%)患者 p53 基因异常,68 例(45.2%)患者有 IGHV 基因突变,29 例(23.0%)患者具有 ATM 基因缺失(表 1)。126 例患者外周血 NK 细胞绝对值的中位值为 0.54×10^9 个/L($0.01 \times 10^9 \sim 4.11 \times 10^9$ 个/L)。

2.2 NK 细胞数量与各临床指标的相关性

NK 细胞数量与各临床指标之间的关系见表 1。分析发现 ZAP-70 阳性组的 NK 细胞绝对值明显低于 ZAP-70 阴性组,差异有统计学意义(0.39×10^9 个/L vs 0.91×10^9 个/L, $P = 0.005$)。在其他各组中 NK 细胞分布并无差异。

2.3 NK 细胞数量对患者预后的影响

使用 X-tile 软件判断 NK 细胞绝对值的最佳 cut-off 值为 0.20×10^9 个/L。126 例患者的 5 年 OS 率为 66.1%。高 NK 细胞数($\geq 0.20 \times 10^9$ 个/L)组与低 NK 细胞数($< 0.20 \times 10^9$ 个/L)组患者的生存曲线见图 1。低 NK 细胞数组较高 NK 细胞数组的预后差,生存期明显缩短,其 5 年 OS 分别为 48.3%和 71.9% ($P = 0.031$)。

单因素分析结果显示,年龄、Binet 分期、p53 基因异常、IGHV 基因突变均对患者 OS 具有预后价值 (P 均 < 0.05 , 表 2)。多因素分析结果显示,年龄(HR = 0.218, 95% CI: 0.086~0.547, $P = 0.001$), p53 基因异常(HR = 4.248, 95% CI: 1.653~10.917, $P = 0.004$), IGHV 基因突变(HR = 2.476, 95% CI: 1.083~5.657, $P = 0.032$)及 NK 细胞绝对值(HR = 3.226, 95% CI: 1.416~7.349, $P = 0.005$)均为影响患者 OS 的独立预后因素(表 2)。

表 1 126 例慢性淋巴细胞白血病患者 NK 细胞数与临床特征相关性

Table 1 Correlations between NK cell count and disease features of chronic lymphocytic leukemia

组别	NK 细胞数		P 值
	例数 [n(%)]	中位数 ($P_{25} \sim P_{75}$)	
年龄(岁)			0.99
<60	65(51.6)	0.47(0.18~1.06)	
≥60	61(48.4)	0.55(0.25~0.98)	
性别			0.26
男	85(67.5)	0.56(0.24~1.05)	
女	41(32.5)	0.43(0.13~1.00)	
Binet 分期			0.09*
A	37(29.4)	0.44(0.22~0.94)	
B	43(34.1)	0.75(0.29~1.42)	
C	46(36.5)	0.36(0.13~0.99)	
白蛋白(n=125)			0.39
正常	78(62.4)	0.57(0.18~1.29)	
下降	47(37.6)	0.45(0.26~0.91)	
β2-MG			0.47
正常	41(32.5)	0.59(0.25~1.01)	
异常	85(67.5)	0.53(0.18~1.05)	
CD38(n=123)			0.09
阳性(≥30%)	24(19.5)	0.28(0.13~0.95)	
阴性	99(80.5)	0.57(0.27~1.03)	
ZAP-70(n=119)			0.005
阳性(≥20%)	64(53.8)	0.39(0.17~0.72)	
阴性	55(46.2)	0.91(0.27~1.21)	
p53 异常			0.24
是	18(14.3)	0.49(0.21~0.98)	
否	108(85.7)	0.75(0.24~1.52)	
IGHV 突变(n=124)			0.25
是	68(54.8)	0.58(0.27~1.01)	
否	56(45.2)	0.50(0.17~1.05)	
ATM 缺失			0.33
是	35(17.0)	0.57(0.29~1.14)	
否	171(83.0)	0.52(0.18~0.98)	
NK 细胞绝对数 (个/L)			
<0.20×10 ⁹	31(24.6)		
≥0.20×10 ⁹	95(75.4)		

*:NK 细胞数与 Binet 分期相关性使用 Kruskal-Wallis 检验。

3 讨论

NK 细胞是固有免疫系统的重要组成部分,可特异直接杀伤靶细胞,也可分泌细胞因子或趋化因

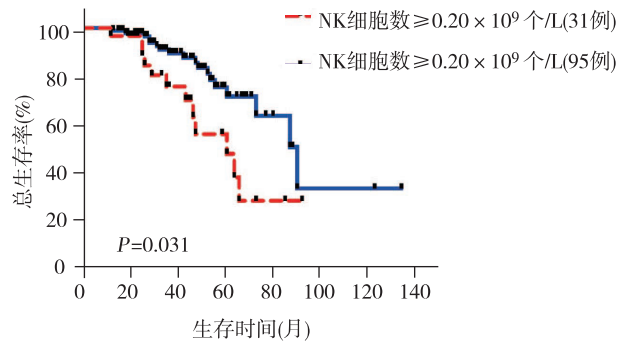


图 1 126 例慢性淋巴细胞白血病患者高 NK 细胞数组与低 NK 细胞数组的生存比较

Figure 1 Prognostic impact of NK cell value on overall survival(OS) in 126 patients with chronic lymphocytic leukemia

子调节其他免疫细胞的活性,进而激活适应性免疫,在机体抗肿瘤中发挥至关重要的作用。本研究结果表明在 CLL 患者中 NK 细胞数量的分布存在显著差异,初诊时 NK 细胞数量低的患者预后不良。

由于 NK 细胞的杀伤活性无 MHC 限制,其细胞免疫应答效率明显高于 T 细胞和 B 细胞,属于速发效应细胞^[7]。很多研究着力于探索 NK 细胞数量及功能的临床意义,以期提示疾病预后,其中包括淋巴瘤。Shafer 等^[8]回顾性分析 276 例滤泡淋巴瘤患者,发现外周血低 NK 细胞绝对值组(0.15×10^9 个/L)较高 NK 细胞绝对值组具有更低的 OS($P=0.02$)。Plonquet 等^[9]发现外周血 NK 细胞数量与弥漫性大 B 细胞淋巴瘤年龄调整国际预后指数(aaIPI)2 或 3 分的患者临床预后相关。本研究结果显示,在所有患者中,低 NK 细胞计数被证实与患者 5 年 OS 时间明显缩短有密切关系,NK 细胞数量可作为预后标记物提示预后。

利妥昔单抗(美罗华)作为最早应用于临床的 CD20 单克隆药物,对 CD20 阳性的恶性淋巴瘤具有良好的疗效,包括 CLL。利妥昔单抗主要通过抗体依赖的细胞毒作用(ADCC)和补体依赖的细胞毒作用杀伤 B 细胞^[10]。在 ADCC 途径中,利妥昔单抗通过 CD16 的介导趋使 NK 细胞向恶性 B 细胞迁移,并将其清除。基于 NK 细胞的这一作用,NK 细胞数量的减少将会导致细胞活化受损从而降低了利妥昔单抗介导的细胞毒作用,影响利妥昔单抗的疗效^[11]。

基于上述结果,促进 NK 细胞活化或许会成为

表 2 126 例慢性淋巴细胞白血病患者预后因素分析

Table 2 Univariable and multivariate analysis of overall-survival (OS) in 126 patients with chronic lymphocytic leukemia

因素	单因素分析		多因素分析	
	HR(95% CI)	P 值	HR(95%CI)	P 值
年龄(<60 岁 vs. ≥60 岁)	0.376(0.175~0.806)	0.012	0.218(0.086~0.547)	0.001
性别(男 vs. 女)	1.407(0.603~3.286)	0.430		
Binet 分期(A+B vs. C)	2.296(1.094~4.821)	0.028	1.697(0.778~3.703)	0.184
白蛋白(正常 vs. 下降)	1.736(0.825~3.656)	0.146		
β2-MG(正常 vs. 异常)	2.113(0.862~5.182)	0.102		
CD38(<30% vs. ≥30%)	1.584(0.669~3.750)	0.296		
ZAP-70(<20% vs. ≥20%)	0.864(0.407~1.836)	0.704		
p53 异常(是 vs. 否)	2.824(1.195~6.672)	0.018	4.248(1.653~10.917)	0.004
IGHV 突变(是 vs. 否)	2.819(1.274~6.240)	0.011	2.476(1.083~5.657)	0.032
ATM 缺失(是 vs. 否)	1.378(0.586~3.239)	0.462		
NK 细胞数(<0.2×10 ⁹ 个/L vs. ≥0.2×10 ⁹ 个/L)	2.398(1.153~4.990)	0.019	3.226(1.416~7.349)	0.005

潜在的治疗靶点。来那度胺已被证实对难治复发的 CLL 具有显著疗效^[12]。既往研究结果发现使用来那度胺治疗后的 CLL 患者其 NK 细胞数量、细胞毒活性及 NK 细胞介导的 ADCC 作用均显著增强^[13-14]。对于 NK 细胞数量减少的这部分 CLL 患者,来那度胺有望成为可行的替代治疗。除此之外,细胞治疗被视为恶性肿瘤新的治疗方法。NK-92 细胞可以选择性杀伤多种肿瘤细胞,如骨髓瘤、白血病、黑色素瘤及乳腺癌等^[15],而 NK-92 细胞对 CLL 有无疗效尚有待进一步研究。

本研究将 126 例初诊 CLL 患者按照外周血 NK 细胞绝对值进行分组,发现 NK 细胞数量在 CLL 患者中的分布差异有统计学意义。NK 细胞绝对值 ≥ 0.20×10⁹ 个/L 提示预后良好,与年龄、p53 基因异常、IGHV 基因突变均为影响患者 OS 的独立预后因素。NK 细胞数量是否有望成为一个新的相对独立的 CLL 患者生存预后指标,仍需要前瞻性大样本多中心临床试验进一步验证。

[参考文献]

- [1] Foa R, Del Giudice I, Guarini A, et al. Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia[J]. *Haematologica*, 2013, 98(5):675-685
- [2] Luetke-Eversloh M, Killig M, Romagnani C. Signatures of human NK cell development and terminal differentiation [J]. *Front Immunol*, 2013, 4(4):499
- [3] Aggarwal A, Sharma A, Bhatnagar A. Bi(o)communications among peripheral blood fractions:a focus on NK and NKT cell biology in rheumatoid arthritis[J]. *Au-*

toimmunity, 2013, 46(4):238-250

- [4] Palmer S, Hanson CA, Zent CS, et al. Prognostic importance of T and NK-cells in a consecutive series of newly diagnosed patients with chronic lymphocytic leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2008, 141(5):607-614
- [5] Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment [J]. *Am J Hematol*, 2015, 90(5):446-460
- [6] Camp RL, Dolled-Filhart M, Rimm DL. X-tile: a new bioinformatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(21):7252-7259
- [7] Sharma R, Das A. Organ-specific phenotypic and functional features of NK cells in humans [J]. *Immunol Res*, 2014, 58(1):125-131
- [8] Shafer D, Smith MR, Borghaei H, et al. Low NK cell counts in peripheral blood are associated with inferior overall survival in patients with follicular lymphoma [J]. *Leuk Res*, 2013, 37(10):1213-1215
- [9] Plonquet A, Haioun C, Jais JP, et al. Peripheral blood natural killer cell count is associated with clinical outcome in patients with aaIPI 2-3 diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Ann Oncol*, 2007, 18(7):1209-1215
- [10] Weiner GJ. Rituximab: Mechanism of action [J]. *Semin Hematol*, 2010, 47(2):115-123
- [11] Kim JK, Chung JS, Shin HJ, et al. Influence of NK cell count on the survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP [J]. *Blood Res*, 2014, 49(3):162-168
- [12] Ferrajoli A, Lee BN, Schlette EJ, et al. Lenalidomide in-

(下转第 646 页)

无气腹胃壁肌层缺损患儿感染不易扩散,病情相对稳定,疾病对生命支持系统和机体内环境影响小,常可取得满意疗效。

[参考文献]

[1] Lee DK, Shim SY, Cho SJ, et al. Comparison of gastric and other bowel perforations in preterm infants: a review of 20 years' experience in a single institution[J]. Korean J Pediatr, 2015,58(8):288-293

[2] Lin CM, Lee HC, Kao HA, et al. Neonatal gastric perforation: report of 15 cases and review of the literature[J]. Pediatr Neonatol, 2008,49(3):65-70

[3] Byun J, Kim HY, Noh SY, et al. Neonatal gastric perforation: a single center experience[J]. World J Gastrointest Surg, 2014,6(8):151-155

[4] 张晓军, 郭 斌, 张新荣, 等. 先天性胃壁肌层缺损的上消化道造影及多层螺旋 CT 诊断[J]. 南京医科大学学报

(自然科学版), 2009,29(11):1583-1584

[5] 胡 博, 叶祖萍, 戴春娟, 等. 先天性胃壁肌层缺损诊疗分析[J]. 临床儿科杂志, 2011,29(6):583-584

[6] Hyginus EO, Jideoffor U, Victor M, et al. Gastrointestinal perforation in neonates: aetiology and risk factors[J]. J Neonatal Surg, 2013,2(3):30

[7] Terui K, Iwai J, Yamada S, et al. Etiology of neonatal gastric perforation: a review of 20 years' experience[J]. Pediatr Surg Int, 2012,28(1):9-14

[8] 裴洪岗, 毛建雄, 张 翊, 等. 新生儿胃穿孔发病原因分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013,21(6):87-88

[9] Yang CY, Lien R, Fu RH, et al. Prognostic factors and concomitant anomalies in neonatal gastric perforation[J]. J Pediatr Surg, 2015,50(8):1278-1282

[10] 林 素, 林振浪. 先天性胃壁肌层缺损致新生儿胃穿孔 12 例临床分析[J]. 中国新生儿科杂志, 2016,31(1):55-57

[收稿日期] 2016-12-13

(上接第 614 页)

duces complete and partial remissions in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia [J]. Blood, 2008, 111(11):5291-5297

[13] Chen CI, Bergsagel PL, Paul H, et al. Single-agent lenalidomide in the treatment of previously untreated chronic lymphocytic leukemia[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(9):1175-1181

[14] Arora M, Gowda S, Tuscano J. A comprehensive review of lenalidomide in B-cell non-Hodgkin lymphoma[J]. Ther Adv Hematol, 2016, 7(4):209-221

[15] Suck G, Linn YC, Tonn T. Natural killer cells for therapy of leukemia[J]. Transfus Med Hemother, 2016, 43(2):89-95

[收稿日期] 2017-02-13

科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读,可将数字分成组,从小数点起,向左或向右每 3 位分成 1 组,组间留空隙(约为一个汉字的 1/4),不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如 453 000 000 可写成 45 300 万或 4.53 亿或 4 亿 5 300 万,但不能写成 4 亿 5 千 3 百万;三千元写成 3 000 元或 0.3 万元,但不能写成 3 千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值,包括小数与百分数,不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围,使用波浪号“~”。如 10%~20%, (2~6)×10³ 或 2×10³~6×10³, 30~40 km。