



邹善华，副主任医师，副教授，复旦大学附属中山医院血液科副主任，中华医学会上海分会血液学专科委员会委员兼秘书，中国淋巴瘤联盟委员；兼任《中华血液学杂志》通讯编委及《实用内科学》第14版编委。主要从事血液肿瘤临床和相关研究工作。参编专著8部，在国内外期刊上发表论文40余篇。

合并乙肝病毒感染对弥漫大B细胞淋巴瘤患者细胞免疫功能的影响

魏征 程韵枫 王志梅 邹善华

复旦大学附属中山医院血液科，上海 200032

[摘要] 背景与目的：乙型肝炎病毒(hepatitis virus B, HBV)感染与弥漫大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)密切相关，前期研究发现在接受联合免疫化疗的DLBCL患者中，HBsAg阳性者生存较差，但具体机制有待进一步证实。本研究通过分析HBV感染对DLBCL患者细胞免疫的影响，为阐明这一机制寻找细胞免疫方面的证据。**方法**：2004年3月—2013年6月共294例住院初治的DLBCL患者纳入本研究。采用四色流式分析患者外周血CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺细胞计数及CD4⁺/CD8⁺细胞比例，比较HBsAg阳性及阴性的DLBCL患者发病时、化疗后2~4个月、化疗后4~6个月及化疗后6~12个月上述参数的时序改变及2组间的差异。**结果**：与HBsAg阴性患者相比，HBsAg阳性DLBCL患者化疗前各淋巴细胞亚群差异无统计学意义($P>0.05$)；外周血CD4⁺细胞计数在化疗后2~4个月显著低于HBsAg阴性患者；HBsAg阳性患者CD4⁺/CD8⁺比例降低，在化疗后4~12个月显著低于HBsAg阴性患者。**结论**：合并HBV感染对DLBCL患者化疗前细胞免疫状态无明显影响；HBsAg阳性的DLBCL患者化疗后出现更为明显和持续的细胞免疫抑制。

[关键词] 弥漫大B细胞淋巴瘤；细胞免疫；化疗

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.10.009

中图分类号：R733 文献标志码：A 文章编号：1007-3639(2014)10-0765-05

The impact of hepatitis B virus concurrent infection on peripheral T cells in diffuse large B cell lymphoma patients WEI Zheng, CHENG Yun-feng, WANG Zhi-mei, ZOU Shan-hua (Department of Hematology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: ZOU Shan-hua E-mail: zou.shanhua@zs-hospital.sh.cn

[Abstract] **Background and purpose:** The clinical relevance of HBV infection with respect to diffuse large B cell lymphoma(DLBCL) patients and immune patterns of T lymphocyte subsets during chemotherapy remains unclear. This study aimed to identify the characteristics of T-cell mediated immunity in DLBCL patients with HBV infection, thereafter, to explore the possible cell-mediated immune mechanisms of HBsAg positive HBV infection on the survival of DLBCL. **Methods:** A total of 294 newly diagnosed DLBCL patients were enrolled in this cohort study. Four-color flow cytometric method was used to enumerate the absolute number of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T lymphocytes and the

CD4⁺/CD8⁺ ratio in peripheral blood samples, at the onset of disease, 2-4, 4-6 and 6-12 months after the initiation of chemotherapy, individually. **Results:** The absolute number of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T lymphocytes in both groups were similar at the onset of disease; the count of CD4⁺ lymphocytes was lower in HBsAg positive group during 2 to 4 months after the initiation of chemotherapy, compared with that in the HBsAg negative group. During 4 to 12 months after chemotherapy, the CD4⁺/CD8⁺ ratio in peripheral blood samples was significantly lower in HBsAg positive group. **Conclusion:** For newly diagnosed DLBCL patients who received chemotherapy, the dynamic nature of cell mediated immune response was characterized as a low counts of CD4⁺ T lymphocyte during the first several cycles of chemotherapy followed by a decreased circulating CD4⁺/CD8⁺ ratio. Depressions of cell immunity after chemotherapy in HBsAg positive DLBCL patients were greater and prolonged.

[**Key words**] Diffuse large B cell lymphoma; Cell immunity; Chemotherapy

弥漫大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)是我国最常见的淋巴瘤病理亚型;在DLBCL患者中,乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染率明显高于其他恶性肿瘤乃至淋巴造血系统恶性肿瘤,包括T细胞淋巴瘤及滤泡淋巴瘤等^[1-5]。前期研究证实HBsAg阳性的DLBCL患者在接受联合免疫化疗后,获得与HBsAg阴性患者类似的缓解率,但长期预后较差^[6]。HBV慢性感染患者存在细胞免疫功能削弱,CD4⁺细胞减少,CD4⁺/CD8⁺比例降低的现象^[7-8];但HBV感染的DLBCL患者在化疗过程中细胞免疫变化情况尚不明确。本研究通过分析HBsAg阳性及阴性的DLBCL患者化疗前后细胞免疫差异,探索合并HBV感染对DLBCL患者细胞免疫影响的规律,为进一步阐述HBV感染对DLBCL患者预后影响的机制建立理论基础。

1 资料和方法

1.1 患者资料

顺序收集2004年3月—2013年6月,复旦大学附属中山医院血液科住院化疗的294例DLBCL患者,其中乙肝表面抗原(HBsAg)阳性59例,HBsAg阴性235例。该回顾性研究获复旦大学附属中山医院伦理委员会批准。

入选标准:①复旦大学附属中山医院病理确诊为DLBCL的初治患者;②年龄≥16岁;③具有完整的HBsAg及乙肝核心抗体(HBcAb)初筛及随访资料;④完成治疗前及治疗后至少2次外周血淋巴细胞亚群分型检测;⑤采用CHOP样方案(环磷酰胺、表柔比星、长春地辛及泼尼松)或

R-CHOP样方案(CHOP样方案联合利妥昔单抗)初始治疗6~8个疗程。

排除标准:①合并HCV感染及HIV感染;②原发性中枢神经系统淋巴瘤。

1.2 临床评价及治疗

所有患者在化疗前接受HBV血清标志物检测,包括至少HBsAg及HBcAb。病理诊断由病理科根据WHO淋巴造血肿瘤诊断标准确诊为DLBCL^[9]。病理亚型主要根据Bcl-6、CD10及Mum-1染色区分为生发中心型(germinal center B-cell like, GCB)、非生发中心型(non-germinal center B-cell like, non-GCB)^[10-11];以及其他罕见的特殊亚型及无法分类的患者,包括由其他淋巴瘤亚型转化而来的转化型弥漫大B细胞淋巴瘤(transformed DLBCL, t-DLBCL)。治疗前通过CT或PET-CT判断病灶累及范围及病灶最大径,记录原发病灶位置(淋巴结或结外)及评估结外病灶数目,骨髓穿刺涂片及活检病理判断有无骨髓累及;使用Ann-Arbor分期对患者进行分期分组,并使用国际预后指数(International Prognosis Index, IPI)评分^[12]。

所有患者均接受改良CHOP样或R-CHOP样方案进行初始诱导治疗,具体为CHOP方案:环磷酰胺(750 mg/m²,第1天,静脉滴注);长春地辛(2.8 mg/m²,截顶剂量4 mg/m²,第1天,静脉滴注);表柔比星(70 mg/m²,第1天,静脉滴注),以及泼尼松(70 mg/m²,第1~5天,口服)联合化疗,21 d为1个疗程;采用R-CHOP方案者在CHOP方案基础上联用利妥昔单抗(375 mg/m²,第0天,静脉滴注)。

1.3 主要材料

四色流式检测试剂盒MultiTEST IMK Kit购自BD公司(anti-CD3 FITC/anti-CD8 PE/anti-CD45PerCP/anti-CD4APC; anti-CD3 FITC/anti-CD16+CD56 PE/anti-CD45 PerCP/anti-CD19 APC)

1.4 淋巴细胞亚群分型检测

患者首次化疗前及常规疗程化疗前, EDTA抗凝管抽取清晨空腹静脉血2 mL, 进行四色抗体标记检测并由FACS Calibur流式细胞仪上机检测, BD FACS Diva软件分析, 得到CD3、CD4、CD8和CD19阳性细胞占淋巴细胞比例, 并计算CD3、CD4和CD8阳性细胞绝对计数待进一步分析。根据检测时点, 将检测数据分为化疗前、化疗后2~4个月、4~6个月及6~12个月的结果, 在同一检测时间区间内多次结果取最后一次检测结果进行分析。

1.5 统计学处理

所有数据采用SPSS 19.0进行统计分析。各组患者的一般临床特征作为分类资料, 使用 χ^2 检验比较组间差异。各组患者白细胞计数、淋巴细胞亚群分类比例及绝对计数等计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 以 F 检验确定数据正态性, 独立样本 t 检

验比较2组数据间均值; 不符合正态分布的数据采用Wilcoxon秩和检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基线情况

将HBsAg阳性及阴性DLBCL患者发病时各项临床特征进行比较, 包括年龄、性别、临床分期分组、IPI分组、起病部位(淋巴结或结外), 病理亚型(生发中心来源或非生发中心来源、或转化型DLBCL及其他少见或无法分类亚型)以及初治方案不同。各临床特征在组间比较差异无统计学意义(表1)。

2.2 外周血淋巴细胞亚群在DLBCL患者化疗不同阶段的变化

将HBsAg阳性及阴性DLBCL患者化疗过程中不同阶段外周血T淋巴细胞亚群计数在组间进行比较(表2), 可以发现: ①HBsAg阳性患者在化疗前CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺细胞计数及CD4⁺/CD8⁺比例与HBsAg阴性患者相比, 差异无统计学意义($P>0.05$, 图1); ②HBsAg阳性患者CD4⁺细胞计数化疗后均低于HBsAg阴性患者, 以化疗后2~4个月时差异有统计学意义($P<0.05$,

表1 伴或不伴HBV感染的DLBCL患者基线情况比较

Tab. 1 Comparison of the clinical characters between DLBCL patients with or without concurrent HBV infection

Item	HBsAg positive group (n=59)	HBsAg negative group (n=235)	P value
Male	39	135	0.227
Age >60 years	22	98	0.537
Stage			
I - II	16	88	0.335
III - IV	43	147	
Group			
A	32	117	0.541
B	27	118	
IPI			
Low risk	21	85	0.976
Low-intermediate risk	10	36	
High-intermediate risk	15	57	
High risk	13	57	
Onset sites (extra nodal)	42	175	0.608
Subtype			
GCB	18	64	0.859
Non-GCB	17	80	
t-DLBCL	3	9	
Unclassified	21	82	
R-CHOP regimen	23	114	0.190

GCB: Germinal center B-cell like; Non-GCB: Non-germinal center B-cell like.

图1A); ③HBsAg阳性患者CD4⁺/CD8⁺比例低于HBsAg阴性患者, 化疗后4~6个月起至化疗后12个月差异均有统计学意义($P<0.05$, 图1C); ④化疗早期(2~4个月)时, HBsAg阳性患者CD3⁺细胞计数相比HBsAg阴性患者显著降低, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图1D)。

表2 伴或不伴有HBV感染的DLBCL患者化疗过程中外周血淋巴细胞亚群比较

Tab. 2 Comparison of lymphocyte subgroups in peripheral blood in different stages of chemotherapy between DLBCL patients with or without concurrent HBV infection

Time from onset/month	Lymphocyte subgroups in peripheral blood	HBsAg positive group (n=59)	HBsAg negative group (n=235)	P value
Onset	CD3 ⁺	0.98±0.45	1.07±0.58	0.176
	CD4 ⁺	0.51±0.24	0.58±0.33	0.067
	CD8 ⁺	0.41±0.29	0.44±0.3	0.616
	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.57±0.93	1.58±0.92	0.971
2-4	CD3 ⁺	0.89±0.41	1.05±0.48	0.026*
	CD4 ⁺	0.43±0.19	0.52±0.25	0.015*
	CD8 ⁺	0.39±0.23	0.47±0.33	0.106
4-6	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.32±0.66	1.41±0.84	0.444
	CD3 ⁺	0.98±0.50	0.96±0.49	0.798
	CD4 ⁺	0.41±0.17	0.48±0.24	0.063
	CD8 ⁺	0.50±0.37	0.43±0.33	0.234
6-12	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.09±0.56	1.37±0.79	0.041*
	CD3 ⁺	1.07±0.64	1.00±0.67	0.591
	CD4 ⁺	0.38±0.17	0.48±0.45	0.212
	CD8 ⁺	0.63±0.57	0.47±0.37	0.118
	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0.92±0.59	1.24±0.72	0.011*

SD: Standard deviation; *: $P<0.05$.

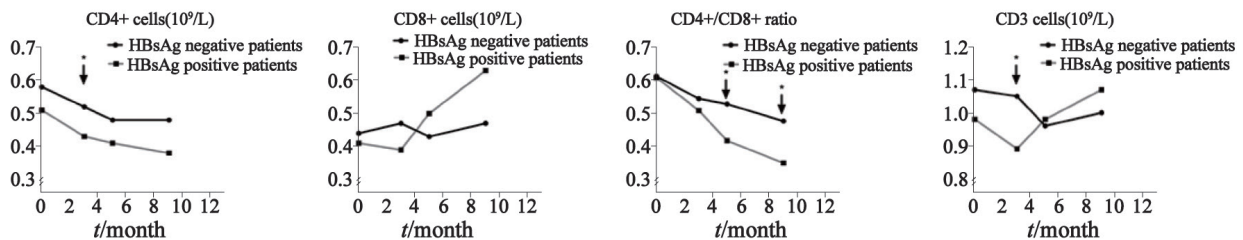


图1 HBsAg阳性或阴性患者化疗过程阶段淋巴细胞亚群变化趋势

Fig. 1 Trend of lymphocyte subgroups in peripheral blood in different stages of chemotherapy in DLBCL patients

3 讨论

DLBCL是我国最常见的淋巴瘤病理亚型, 我国DLBCL占淋巴瘤比例高达50%~60%, 高于欧美国家报道的30%左右。国内外多宗回顾性研究显示, 在DLBCL患者中, HBV感染率明显高于其他恶性肿瘤乃至淋巴造血系统恶性肿瘤, 包括T细胞淋巴瘤及滤泡淋巴瘤等^[1-5]。因此, HBV感染与DLBCL密切相关。前期研究证实HBsAg阳性的DLBCL患者在接受联合免疫化疗后, 获得与HBsAg阴性患者类似的缓解率, 但长期预后较差^[6]。HBV慢性感染患者存在细

胞免疫功能削弱, CD4⁺细胞减少, CD4⁺/CD8⁺比例降低^[7-8]; 但合并HBV感染对于DLBCL患者细胞免疫变化的影响目前鲜有报道。因此本研究对于这部分患者细胞免疫变化规律的描述, 对进一步阐明HBV感染对于DLBCL患者预后影响的具体机制有重要意义。

本研究中, HBsAg阳性DLBCL患者与HBsAg阴性者的发病特征相比, 在发病年龄、性别分布、淋巴瘤的分期、IPI分组及病理亚型差异均无统计学意义, 提示HBV感染与否并未影响到淋巴瘤患者的肿瘤特性。另外, 发病时HBsAg阳性患者的各主要T淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺细胞绝对计

数)分布,以及CD4⁺/CD8⁺细胞比例与HBsAg阴性患者差异无统计学意义,提示HBV感染与否在发病初期并未对DLBCL患者的细胞免疫造成显著影响。HBV感染与DLBCL发病之间虽然存在密切联系,但本研究中也未发现HBV感染是直接造成DLBCL发病的相应证据。

然而,DLBCL患者在化疗后,HBsAg阳性患者CD4⁺细胞计数化疗后均低于HBsAg阴性患者,化疗后2~4个月时差异有统计学意义;而在化疗后HBsAg阳性DLBCL患者CD4⁺/CD8⁺比例低于HBsAg阴性患者,化疗后4~6个月起至化疗后12个月差异仍有统计学意义。提示合并HBV感染的DLBCL患者在化疗后出现的细胞免疫抑制,不仅程度更为严重,而且时间较为持久。

淋巴瘤发生、发展过程中,宿主的免疫因素具有很重要的作用;宿主免疫因素的削弱,使肿瘤监视减弱,最终可导致肿瘤复发进展^[13]。结合本研究及前期研究结果可以推测,合并HBV感染对于DLBCL患者的肿瘤特性及发病初期的细胞免疫并无显著影响^[6],因此患者经过标准化疗后可以取得类似的缓解率;但由于HBsAg阳性患者存在治疗后较为严重而持续的细胞免疫抑制,宿主免疫系统对于肿瘤监视作用削弱,导致疾病复发进展增多,最终长期预后相对较差。

总之,合并HBV感染使DLBCL患者化疗后出现更为严重而持久的细胞免疫抑制,可能是导致其预后不良的重要因素;对这部分患者细胞免疫的监控及进一步深入研究,有望改变其不良预后。

[参 考 文 献]

- [1] PARK S C, JEONG S H, KIM J, et al. High prevalence of hepatitis B virus infection in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma in Korea [J]. *J Med Virol*, 2008, 80(6): 960-966.
- [2] NATH A, AGARWAL R, MALHOTRA P, et al. Prevalence of hepatitis B virus infection in non-Hodgkin lymphoma: a systematic review and meta-analysis [J]. *Intern Med J*, 2010, 40(9): 633-641.
- [3] WANG F, XU R H, HAN B, et al. High incidence of hepatitis B virus infection in B-cell subtype non-Hodgkin lymphoma compared with other cancers [J]. *Cancer*, 2007, 109(7): 1360-1364.
- [4] MARCUCCI F, MELE A. Hepatitis viruses and non-Hodgkin lymphoma: epidemiology, mechanisms of tumorigenesis, and therapeutic opportunities [J]. *Blood*, 2011, 117(6): 1792-1798.
- [5] 刘卫平, 郑文, 王小沛, 等. 405例非霍奇金淋巴瘤患者乙型肝炎病毒感染率分析 [J]. *中华血液学杂志*, 2011, 32(8): 521-524.
- [6] WEI Z, ZOU S, LI F, et al. HBsAg is an independent prognostic factor in diffuse large B cell lymphoma patients in rituximab era: result from a multicenter retrospective analysis in China [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(3): 845-854.
- [7] 肖光明, 姚细安, 连粤湘, 等. 乙型肝炎患者外周血T淋巴细胞亚群的变化 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2005, 8(1): 22-24.
- [8] 李秀梅, 梁树人, 李顺天, 等. 乙型肝炎患者外周血T细胞亚群的分析及意义 [J]. *山东医药*, 2012, 52(20): 63-65.
- [9] SWERDLOW S H, CAMPO E, HARRIS N L, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues [M]. Lyon: IARC Press, 2008: 233-237.
- [10] 闵大六, 周晓燕, 陆洪芬, 等. B细胞性非霍奇金淋巴瘤中BCL-6、CD10和BCL-2的蛋白表达及其临床病理意义 [J]. *中国癌症杂志*, 2006, 16(3): 169-173.
- [11] HANS C P, WEISENBURGER D D, GREINER T C, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray [J]. *Blood*, 2004, 103(1): 275-282.
- [12] A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project [J]. *N Engl J Med*, 1993, 329(14): 987-994.
- [13] DAVE S S. Host factors for risk and survival in lymphoma [J]. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*, 2010: 255-258.

(收稿日期: 2014-07-15)