

网络出版时间: 2016-6-6 13:52:32 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160606.1352.042.html>

调节性 T 细胞及相关细胞因子在慢性髓系白血病中的变化

陈曦希 杨明珍 夏瑞祥

摘要 目的 探讨未治和经治慢性髓系白血病(CML)患者外周血中调节性 T 细胞(Treg)及其相关细胞因子的变化。方法 流式细胞术检测 $CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}$ Treg 细胞占 $CD4^+$ T 细胞的比例,ELISA 法检测白介素-10(IL-10)、转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)和白介素-35(IL-35)的血浆浓度。结果 初诊组、复查组和对对照组间 Treg 细胞比例和血浆 IL-10 浓度差异无统计学意义。初诊组的血浆 TGF- $\beta 1$ 和 IL-35 浓度显著高于复查组和对对照组($P < 0.001$);复查组和对对照组间差异无统计学意义。结论 初诊 CML 患者的 TGF- $\beta 1$ 和 IL-35 水平升高,表明其在疾病的进展中发挥重要作用,并可能有判断疗效的价值。

关键词 慢性髓系白血病;调节性 T 细胞;转化生长因子- β ;白介素-35;肿瘤免疫

中图分类号 R 557+.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)07-1015-04

慢性髓系白血病(chronic myelocyticleukemia, CML)是一种发生在造血干细胞上的克隆性骨髓增殖性疾病,以 9 号染色体和 22 号染色体易位形成 BCR-ABL 融合基因为特征,该基因编码的蛋白(p210,分子量为 210 ku)有异常的酪氨酸激酶活性,在 CML 的发病中发挥重要作用^[1]。临床上 CML 分为慢性期、加速期和急变期。靶向药物酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKIs)是目前治疗 CML 的首选用药。尽管研究^[2]表明 CML 是一种有免疫原性的血液系统恶性肿瘤,但是大多数 CML 患者并不能建立有效的抗肿瘤免疫应答。这可能是由抑制抗肿瘤免疫应答的因素所致。近年来,调节性 T 细胞(Treg)在肿瘤免疫中的作用获得广泛关注。Treg 细胞负性调节免疫应答。在正常小鼠和人类,Treg 细胞占外周血 $CD4^+$ T 细胞的 5%~10%^[2-5]。而在肿瘤患者,异常增高的 Treg 细胞可

能抑制抗肿瘤免疫应答,加速肿瘤进展。分泌免疫抑制性细胞因子是 Treg 细胞发挥作用的主要途径^[4],如白介素-10(interleukin-10, IL-10)、转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)和白介素-35(interleukin-35, IL-35)。由于 CML 是最容易受免疫治疗影响的恶性肿瘤之一^[1],调控 Treg 细胞及其相关细胞因子表达可能成为 CML 治疗的新手段。但是对 Treg 细胞及其相关细胞因子在 CML 中的作用了解甚少。该研究通过检测 CML 患者外周血中 Treg 细胞及其相关细胞因子的水平,探究其在 CML 中的表达和临床意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2015 年 1 月~2015 年 9 月就诊于安徽医科大学第一附属医院血液科的 50 例成年 CML 患者。30 例为初诊未治患者(初诊组,其中慢性期 25 例、加速期 4 例、急变期 1 例),男 19 例,女 11 例,年龄 21~75 岁,中位年龄 47 岁。另 20 例为 TKI 治疗过程中的复查患者(复查组,BCR-ABL 210 转录本水平均已降至 10% 以下),男 13 例,女 7 例;年龄 21~75 岁,中位年龄 45 岁。诊断和分期符合《中国慢性髓系白血病诊断与治疗指南(2011 年版)》^[6]。以我院 20 例健康体检者为对照组,男 10 例,女 10 例;年龄 23~72 岁,中位年龄 47 岁。对照组无肿瘤、自身免疫性疾病及炎症性疾病。初诊组、复查组与对照组之间年龄和性别差异无统计学意义。

1.2 试剂和仪器 鼠抗人 CD25-FITC、CD127-PE、CD4-PC5 及同型对照抗体、红细胞裂解剂、磷酸盐缓冲液(PBS)及 NAVIOS 流式细胞仪均购自美国 Beckman Coulter 公司;ELISA 试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司;酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 标本采集 采集 CML 患者和健康体检者的晨起空腹外周血 6 ml,置于肝素钠抗凝真空采集管,轻轻混匀。标本分两部分处理:一部分立即送至实验室,进行 $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ Treg 细胞检测;另一部分以 2 000 r/min 离心 5 min 分离血浆,置于 EP

2016-04-22 接收

基金项目:安徽省科技攻关项目(编号:11010402168)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院血液科,合肥 230022

作者简介:陈曦希,女,硕士研究生;

杨明珍,男,教授,主任医师,硕士生导师,E-mail: yang-mz89@163.com.cn;

夏瑞祥,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: xrx2041@163.com

管并冻存于 -80°C 冰箱, 备用于细胞因子检测。

1.4 流式细胞仪检测 Treg 细胞比例 取流式上样管, 加入 $10\ \mu\text{l}$ CD25-PC5、 $20\ \mu\text{l}$ CD4-FITC、 $20\ \mu\text{l}$ CD127-PE, 再加入肝素钠抗凝全血 $100\ \mu\text{l}$ (同时设同型对照), 混匀, 4°C 避光孵育 $20\ \text{min}$ 。加入 $1\ \text{ml}$ 红细胞裂解剂, 混匀, 避光放置 $10\ \text{min}$ 。以 $1\ 500\ \text{r/min}$ 离心 $5\ \text{min}$, 弃上清液。用 PBS 洗涤后上流式细胞仪检测。每管收集 $30\ 000$ 个细胞。在前向角散射 (FSC) 一侧向角散射 (SSC) 散点图上圈定淋巴细胞群, 再以 CD4 和 SSC 设门选择 CD4^{+} 细胞, 分析 CD25 和 CD127 表达, 计算 $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^{\text{low/-}}$ Treg 细胞占 CD4^{+} T 细胞的比例。应用 Navios tetra 软件分析数据。

1.5 ELISA 法检测血浆细胞因子浓度 采用 ELISA 法测定血浆 IL-10、IL-35 和 TGF- β 1 浓度。严格按照试剂盒说明书进行操作。每份样本测定 3 孔, 用酶标仪检测每个测试孔的吸光度 (optical density, OD) 值, 计算平均浓度。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行分析, 符合正态分布的定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK- q 检验; 不符合正态分布的定量资料以中位数和四分位间距 [$M(Q_{25}, Q_{75})$] 表示, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验, 进一步两两比较采用扩展的 t 检验法。

2 结果

2.1 $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^{\text{low/-}}$ Treg 细胞占 CD4^{+} T 细胞比例 初诊组、复查组和对照组 $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^{\text{low/-}}$ Treg 细胞占 CD4^{+} T 细胞比例差异无统计学意义 ($F = 2.983, P > 0.05$), 但初诊组 $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^{\text{low/-}}$ Treg 细胞占 CD4^{+} T 细胞比例 [6.34 ± 1.97] % 略低于复查组 [6.41 ± 2.07] % 和对照组 [7.58 ± 1.48] % 趋势, 见图 1。

2.2 血浆 IL-10 浓度 血浆 IL-10 浓度在初诊组、复查组和对照组间的差异无统计学意义 ($H = 4.273, P > 0.05$), 见表 1。初诊组血浆 IL-10 浓度略低于复查组和对照组。

2.3 血浆 TGF- β 1 浓度 初诊组、复查组和对照组的血浆 TGF- β 1 浓度差异有统计学意义 ($H = 31.642, P < 0.001$)。其中, 初诊组的血浆 TGF- β 1 浓度显著高于复查组 ($t = 6.725, P < 0.001$) 和对照组 ($t = 5.801, P < 0.001$)。复查组和对照组差异无

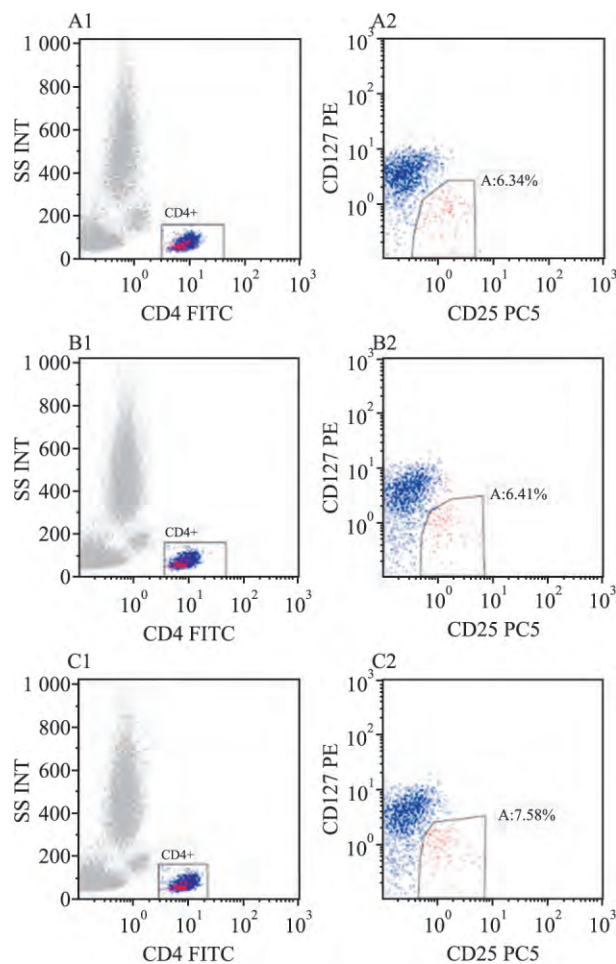


图1 $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^{\text{low/-}}$ Treg

细胞占 CD4^{+} T 细胞比例流式图

A: 初诊组; B: 复查组; C: 对照组; 1: CD4、SSC 设门选择 CD4^{+} T 细胞; 2: CD4、CD25、CD127 设门选择 $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^{\text{low/-}}$ Treg 细胞

统计学意义 ($t = 0.843, P > 0.05$), 见表 1。

2.4 血浆 IL-35 浓度 血浆 IL-35 浓度在初诊组、复查组和对照组的差异有统计学意义 ($H = 24.644, P < 0.001$)。进一步两两比较结果显示, 初诊组的血浆 IL-35 浓度显著高于复查组 ($t = 5.227, P < 0.001$) 和对照组 ($t = 4.975, P < 0.001$)。复查组和对照组差异无统计学意义 ($t = 0.229, P > 0.05$), 见表 1。

3 讨论

Treg 细胞负性调节免疫应答。异常增高的 Treg 细胞可能抑制肿瘤特异性免疫应答, 使肿瘤细胞能够逃避免疫监视, 从而加速肿瘤进展^[2]。一般认为, 分泌免疫抑制性细胞因子是 Treg 细胞发挥作用的主要途径^[4]。其中, IL-10、TGF- β 1 和 IL-35 是最

表1 Treg 细胞相关细胞因子的血浆浓度 [M(Q₂₅ , Q₇₅)]

项目	初诊组	复查组	对照组
IL-10(pg/ml)	12.90 (9.00 , 22.15)	17.54 (7.22 , 44.01)	20.73 (14.02 , 28.28)
TGF-β1(pg/ml)	27 720.89(8 419.50 , 62 035.14) ***###	3 448.61(1 606.03 , 6 776.40)	3 990.82(1 963.92 , 7 863.88)
IL-35(pg/ml)	32.97(22.46 , 60.79) ***###	16.10(12.98 , 22.94)	17.16 (12.91 , 23.57)

与复查组比较: *** $P < 0.001$; 与对照组比较: ### $P < 0.001$

重要的细胞因子。

研究^[3]显示, CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺Treg 细胞在多种实体肿瘤及血液系统恶性肿瘤患者的肿瘤组织或外周血中比例升高, 与疾病预后不良及进展有关。Rojas et al^[5]发现, 高表达 BCR-ABL 的 CML 患者的 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg 细胞比例升高。Zahran et al^[2]的研究也表明, 初诊 CML 患者的 CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺Treg 细胞比例显著高于健康对照组; 加速期和急变期患者高于慢性期患者; 治疗后获得完全分子学缓解的患者显著低于治疗前。但是, 当采用不同的分子标记 Treg 细胞时, 结果可能截然不同。CML 慢性期末治疗患者和加速急变期患者的 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞占外周血单个核细胞比例显著低于慢性期治疗患者和健康对照者^[7]。本研究同样以 CD4⁺、CD25^{high}和 CD127^{low/-}为标志物, 检测了 CML 患者外周血中 Treg 细胞水平。结果显示初诊组与复查组的外周血 CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-}Treg 细胞占 CD4⁺细胞比例的差异无统计学意义。在 70 份样本中, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-}Treg 细胞比例的最低值来自于唯一的急变期患者, 仅 1.2%。截然不同的研究结果可能是由对 Treg 细胞的标记不同或者样本量偏小导致。目前对于 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞和 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg 细胞究竟是不是同一细胞尚无定论, 对于如何定义和标志 Treg 细胞也没有统一标准。因此, 需要在扩大样本量的基础上明确标志物不同对检测 CML 患者外周血 Treg 细胞比例的影响。

IL-10 和 TGF-β 在体内的免疫抑制作用已经在多种实验模型上得到证实^[4]。但是, 在本研究中, 血浆 IL-10 浓度在 3 组间未见差异有统计学意义。IL-10 是一种多细胞源的细胞因子。因此, 血浆 IL-10 水平可能难以反映 CML 患者体内 Treg 细胞功能的变化。TGF-β 也是一种多细胞源的多功能细胞因子。研究^[7]表明, CML 肿瘤干细胞中的 BCR-ABL 肿瘤蛋白诱导 TGF-β1 产生, 后者激活 PI3K-Akt-NF-κB 信号转导通路。该通路的活化增加了基质金属蛋白酶 9(MMP-9) 的产生, 从而促进可溶性 Kit 配体(s-KitL) 和细胞间黏附分子 1(s-ICAM-1) 的合成。

异常增高的 MMP-9 会降解细胞外基质; s-ICAM-1 合成增加能够保护白血病细胞免受 T 淋巴细胞和 NK 细胞识别, s-KitL 合成增加能够动员 CML 细胞释放至外周循环^[8]。因此, TGF-β1 可能促进 CML 进展。此外, TGF-β1 还通过 PI3K-Akt-FoxO 信号通路维持 CML 肿瘤干细胞的干细胞样特性和致瘤活性^[9]。本研究的结果显示, 初诊组血浆 TGF-β1 浓度显著高于复查组和对照组, 而复查组和对照组之间差异无统计学意义。这表明检测血浆 TGF-β1 浓度可能有评价疗效的价值。

IL-35 是新近发现的抑制性细胞因子, 主要由活化的 Treg 细胞分泌^[10]。IL-35 不仅强效抑制 T 细胞增殖^[11], 还能够诱导初始 T 细胞转变为一种有免疫抑制作用的调节性 T 细胞(iT_h35), 形成“传染性耐受”, 将抑制活性最大化^[10, 12-13]。本研究初诊组血浆 IL-35 浓度显著高于复查组和对照组, 而复查组和对照组之间差异无统计学意义。考虑到初诊组的 Treg 细胞比例与复查组和对照组比较差异无统计学意义, 而主要由 Treg 细胞分泌的 IL-35 水平显著升高, 可以推测 CML 患者体内存在 Treg 细胞功能异常。确切的结果需要进一步的体外细胞功能测定研究。但是, 研究^[14]显示 IL-35 过度表达能够抑制肿瘤细胞生长、促进肿瘤细胞凋亡, 从而发挥抗肿瘤活性。因此, IL-35 对于不同肿瘤可能作用不同。IL-35 在 CML 中的作用有待进一步研究。

综上所述, 本研究通过检测外周血中 Treg 细胞及其相关细胞因子的水平, 表明初诊 CML 患者的 TGF-β1 和 IL-35 水平显著升高, 与机体细胞免疫功能紊乱可能互为因果。尚需进一步研究明确 Treg 细胞的功能状态以及 TGF-β1 和 IL-35 在疾病发生、发展中的具体作用, 联合 TKI 类药物, 对其进行调控可能是治疗 CML 的新方法。

参考文献

- [1] Rohon P. Biological therapy and the immune system in patients with chronic myeloid leukemia[J]. Int J Hematol, 2012, 96(1): 1-9.
- [2] Zahran A M, Badrawy H, Ibrahim A. Prognostic value of regulatory T cells in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients

- [J]. *Int J Clin Oncol* ,2014 ,19(4) : 753 – 60.
- [3] Moon H W , Kim B H , Park C M , et al. CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ regulatory T-cells in hematologic diseases[J]. *Korean J Lab Med* , 2011 ,31(4) : 231 – 7.
- [4] Shalev I , Schmelzele M , Robson S C , et al. Making sense of regulatory T cell suppressive function[J]. *Semin Immunol* ,2011 ,23(4) : 282 – 92.
- [5] Rojas J M , Wang L , Owen S , et al. Naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T-regulatory cells are increased in chronic myeloid leukemia patients not in complete cytogenetic remission and can be immunosuppressive [J]. *Exp Hematol* , 2010 ,38(12) : 1209 – 18.
- [6] 中华医学会血液学分会. 中国慢性髓系白血病诊断与治疗指南[J]. *中华血液学杂志* ,2011 ,32(6) : 426 – 32.
- [7] 周莉,徐运孝. 调节性T细胞在慢性粒细胞白血病中的表达及临床意义[J]. *中国肿瘤临床* ,2012 ,39(9) : 502 – 5.
- [8] Zhu X , Zhou X , He B , et al. Impaired immunomodulatory function of chronic myeloid leukemia cancer stem cells and the possible mechanism involved in it [J]. *Cancer Immunol Immunother* , 2013 ,62(4) : 689 – 703.
- [9] Miyazono K. Tumour promoting functions of TGF- β in CML-initiating cells[J]. *J Biochem* ,2012 ,152(5) : 383 – 5.
- [10] Yang Y , Xuan M , Zhang X , et al. Decreased IL-35 levels in patients with immune thrombocytopenia [J]. *Hum Immunol* ,2014 ,75(8) : 909 – 13.
- [11] Ringkowski S , Thomas P S , Herbert C. Interleukin-12 family cytokines and sarcoidosis[J]. *Front Pharmacol* ,2014 ,5(5) : 233.
- [12] Wu H , Li P , Shao N , et al. Aberrant expression of Treg-associated cytokine IL-35 along with IL-40 and TGF- β in acute myeloid leukemia[J]. *Oncol Lett* ,2012 ,3(5) : 1119 – 23.
- [13] Gu X , Tian T , Zhang B , et al. Elevated plasma interleukin-35 levels predict poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Tumor Biol* ,2015 ,36(4) : 2651 – 6.
- [14] Long J , Zhang X , Wen M , et al. IL-35 over-expression increases apoptosis sensitivity and suppresses cell growth in human cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun* ,2013 ,430(1) : 364 – 9.

Changes of regulatory T cells and their associated cytokines in patients with chronic myeloid leukemia

Chen Xixi , Yang Mingzhen , Xia Ruixiang

(*Dept of Hematology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230032*)

Abstract Objective To investigate the changes in the proportion of regulatory T(Treg) cells and in the levels of cytokines secreted by these cells in the peripheral blood in the patients with chronic myeloid leukemia(CML) .

Methods The enrolled subjects consisted of 30 CML patients who were newly diagnosed , 20 CML patients who were under the effective treatment of tyrosine kinase inhibitors(BCR-ABL 210 transcript ratio is below 10%) and 20 healthy donors whose age and sex were matched. Flow cytometry was used to detect CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low/-} Treg cells and CD4⁺ T cells. The enzyme linked immunosorbent assay was used to determine the plasma concentrations of interleukin-10(IL-10) , transforming growth factor- β 1(TGF- β 1) and IL-35. **Results** The proportions of Treg cells in CD4⁺ T cells were similar among the three groups. As concerns the three kinds of Treg-associated cytokines , there were no significant differences in the plasma concentrations of IL-10 among the three groups. However , compared with the treatment group and the control group , the plasma concentrations of TGF- β 1 and IL-35 in the newly diagnosed patients significantly increased($P < 0.001$) , with no significant difference between the treatment group and the control group. **Conclusion** Though the proportion of Treg cells did not significantly change in the newly diagnosed patients , the plasma concentrations of TGF- β 1 and IL-35 indeed significantly enhanced , suggesting the dysfunction of Treg cells in the newly diagnosed patients might be associated with the progression of disease. Effective treatment of tyrosine kinase inhibitors could down-regulate the plasma levels of these cytokines to baseline , suggesting that monitoring these cytokines might evaluate the efficacy of therapy.

Key words chronic myeloid leukemia; regulatory T cells; transforming growth factor- β ; interleukin-35; tumor immunity