

• 论 著 •

慢性粒细胞白血病患者骨髓部分细胞因子的表达及意义*

宋建新¹, 张 芹¹, 梅 芬², 欧阳红梅¹, 蒋雅先¹, 撒亚莲^{2△}

(云南省第一人民医院/昆明理工大学附属医院: 1. 血液病诊断室; 2. 临床基础研究所, 昆明 650032)

摘要:目的 探讨慢性粒细胞白血病(CML)患者不同时期骨髓白细胞介素(IL)-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10 及干扰素- γ (INF- γ)表达的变化。方法 应用流式细胞仪分析 30 例 CML 慢性期(CML-CP)、21 例加速期(CML-AP)、15 例急变期(CML-BP), 经治疗后缓解患者 42 例、未缓解患者 7 例的骨髓液中 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10 及 INF- γ 表达水平, 并与对照组比较。结果 CML 各组患者 INF- γ 、IL-2 水平均低于对照组($P < 0.05$), IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-10 均高于对照组($P < 0.05$)。随着病情进展, INF- γ 、IL-2 水平逐渐降低, 即 CML-BP < CML-AP < CML-CP, 且组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$); IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-10 逐渐增高, 即 CML-BP > CML-AP > CML-CP, 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。患者经治疗完全缓解后, INF- γ 、IL-2 有所回升, 但仍低于对照组($P < 0.01$), IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-10 有所降低, 同样也高于 CML-CP($P < 0.05$); 未缓解组 IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-10 及 IL-2、INF- γ 与急变期相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 在 CML 患者骨髓微环境中细胞因子水平的变化对 CML 的发生、发展及与预后评估有一定的意义; 检测 CML 骨髓 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-10 及 INF- γ 水平有望为 CML 患者免疫治疗及预后判断提供新的思路和理论依据。

关键词:慢性粒细胞白血病; 白细胞介素; 干扰素- γ

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.23.006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)23-3255-03

Expression of partial cytokines in bone marrow of chronic myeloid leukemia patients and its significance*

SONG Jianxin¹, ZHANG Qin¹, MEI Fen², OUYANG Hongmei¹, JIANG Yaxian¹, SA Yalian^{2△}

(1. Diagnostic Room of Hematological Diseases; 2. Research Institute of Clinical Basis, Yunnan

Provincial First People's Hospital/Affiliated Hospital of Kunming University of

Science and Technology, Kunming, Yunnan 650032, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and INF- γ expressions in bone marrow of chronic myeloid leukemia(CML) patients. **Methods** The IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and INF- γ expression levels were detected by using flow cytometry in 30 cases of CML chronic phase(CML-CP), 21 cases of CML accelerated phase(CML-AP), 15 cases of CML blastic phase(CML-BP), 42 cases of CML remission after treatment and 7 cases of non-remission. Then the detection results were compared with those in the control group. **Results** The expression levels of INF- γ and IL-2 in each CML groups were lower than those in the control group($P < 0.05$), while the expression levels of IL-1 β , IL-4, IL-6 and IL-10 were higher than those in the control group($P < 0.05$). With the disease condition progression, the INF- γ and IL-2 levels were gradually decreased, i. e., CML-BP < CML-AP < CML-CP, moreover which had statistical difference among groups($P < 0.05$); the expression levels of IL-1 β , IL-4, IL-6 and IL-10 were gradually increased, i. e., CML-BP > CML-AP > CML-CP, the difference among groups had statistical significance($P < 0.05$). After complete remission by treatment, the INF- γ and IL-2 levels were risen to some extent, but which were still lower than those in the control group($P < 0.01$), the expression levels of IL-1 β , IL-4, IL-6 and IL-10 were decreased to some extent, but likewise were higher than those in CML-CP($P < 0.05$); the levels of IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-2 and INF- γ had no statistical difference between the non-remission group and CML-BP group($P > 0.05$). **Conclusion** The changes of serum cytokines in bone marrow microenvironment of CML patients have certain significance to the occurrence, development and prognosis of CML; the detection of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and INF- γ levels in bone marrow is hopeful to provide new ideas and theoretical basis for immune therapy and prognosis judgment of CML patients.

Key words: chronic myeloid leukemia; cytokines; interferon- γ

慢性粒细胞白血病(CML)是起源于多能造血干细胞的恶性克隆性增殖性疾病, 根据临床病程可分为慢性期(CP)、加速期(AP)和急变期(BP)。骨髓微环境是由基质细胞、辅助细胞(T淋巴细胞和单核/巨噬细胞)、细胞外基质和细胞因子组成的一个有序的复杂结构, 其不仅提供造血细胞赖以生存、发育

及分化的场所, 同时其改变也为血液系统恶性肿瘤提供了一个合适的生存空间。细胞因子作为骨髓微环境的重要成分, 在维持骨髓微环境的动态平衡中起着重要作用。为切实反映骨髓微环境中细胞因子的变化对 CML 肿瘤细胞的影响, 本文通过对 CML 不同时期治疗前后骨髓液中细胞因子水平的检测, 探

* 基金项目: 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项应用基础研究项目资助(2014FZ070)。

作者简介: 宋建新, 男, 副主任医师, 主要从事血液病诊断研究。△ 通讯作者, E-mail: sayalian@126.com。

讨 CML 患者骨髓免疫微环境部分细胞因子改变在 CML 发病和化疗过程中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 66 例患者均来自云南省第一人民医院血液科门诊及住院患者,经骨髓细胞形态、细胞遗传学及分子生物学检查,符合 CML 各期的诊断标准^[1]。其中,CML-CP 30 例,CML-AP 21 例,CML-BP 15 例,男 42 例、女 24 例,年龄 18~78 岁、中位年龄 56 岁;经治疗后完全缓解 44 例,未缓解 7 例,其中 CML-CP 除 8 例失访全部完全缓解,21 例 CML-AP 患者中完全缓解 14 例、未缓解 3 例、4 例转外院治疗而失访,CML-BP 完全缓解 8 例、未缓解 4 例、治疗中 1 例死亡、2 例转外院失访。30 例缺铁性贫血患者作为对照组,其中男 18 例,女 12 例;年龄 18~76 岁,中位年龄 54.5 岁。本研究获医院伦理委员会批准,并征得所有受试者知情同意。

1.2 试剂与仪器 白细胞介素(IL)-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、干扰素- γ (IFN- γ)试剂盒购自 BD 公司。流式细胞仪为 Beckman Coulter 公司 FC500。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 采集 CML 患者治疗前后及初诊缺铁性贫血患者骨髓液 2.0 mL 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,3 000 r/min 离心 30 min,取上清液-80 °C 保存待测。

1.3.2 细胞因子检测 按照试剂盒说明书设计流式细胞术方案,绘制标准曲线。计算所需微球量,混合微球,以 1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入丢弃上清液相同量的增强剂

混合待用。取试管编号,每管加入 20 μ L 离心后的骨髓上清液,每管加入混合微球 50 μ L 及 PE 染料 50 μ L,避光孵育 3 h,加入 wash buffer 液 600 mL 混匀,1 500 r/min 离心 10 min 弃上清液,加入 300 μ L wash buffer 液混匀上机检测,用 FCAP 分析软件分析。

1.4 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

与对照组相比,CML-CP 患者骨髓微环境中 INF- γ 、IL-2 水平明显降低($t = 7.45, 10.69, P < 0.05$),IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-10 水平明显增高($t = 17.58, 11.08, 13.08, 11.30, P < 0.05$);INF- γ 、IL-2 在 CML-BP 明显低于 CML-AP($t = 8.05, 8.40, P < 0.05$),CML-AP 明显低于 CML-CP($t = 6.44, 6.61, P < 0.05$);IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-10 在 CML-BP 明显高于 CML-AP($t = 9.78, 6.89, 9.10, 9.74, P < 0.05$),CML-AP 明显高于 CML-CP($t = 15.64, 11.84, 9.61, 11.69, P < 0.01$);INF- γ 在缓解组与 CML-CP 比较差异无统计学意义($t = 1.21, P > 0.05$),IL-2 在缓解组高于 CML-CP($t = 2.97, P < 0.05$),但仍低于对照组($P < 0.05$);缓解组 IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-10 与 CML-CP 比较有所降低,但差异有统计学意义($t = 11.90, 7.08, 11.04, 6.18, P < 0.05$)。未缓解组 INF- γ 、IL-2、IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-10 水平与 CML-BP 组相比差异无统计学意义($t = 0.46, 0.90, 0.09, 0.57, 0.10, 2.20, P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10 及 INF- γ 水平检测结果($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	INF- γ
对照组	30	45.89 \pm 11.41	7.79 \pm 1.58	5.77 \pm 1.94	63.08 \pm 21.69	17.07 \pm 6.29	18.17 \pm 5.09
CML-CP	30	157.29 \pm 32.84	3.89 \pm 1.23	14.68 \pm 3.96	172.80 \pm 40.89	39.42 \pm 8.82	10.57 \pm 2.30
CML-AP	21	378.07 \pm 66.71	2.06 \pm 0.38	30.96 \pm 5.87	336.68 \pm 80.19	75.81 \pm 13.43	6.82 \pm 1.62
CML-BP	15	864.68 \pm 206.00	1.00 \pm 0.36	47.30 \pm 8.37	860.51 \pm 247.42	144.43 \pm 28.22	2.95 \pm 1.08
缓解组	44	84.75 \pm 18.85	4.80 \pm 1.32	9.18 \pm 2.65	89.31 \pm 23.47	29.10 \pm 5.30	11.40 \pm 3.21
未缓解组	7	855.71 \pm 260.23	0.85 \pm 0.41	49.44 \pm 7.80	850.06 \pm 200.77	118.85 \pm 16.84	3.20 \pm 1.39

3 讨论

CML 是获得性造血干细胞恶性克隆性疾病,其典型特征是 Ph 阳性并表达具有强酪氨酸激酶活性的 BCR/ABL 融合蛋白。CML 患者应用 ABL 酪氨酸激酶抑制剂(TKI)疾病很容易得到控制,但经治疗达完全细胞遗传学缓解的 CML 患者体内仍残留有 10⁷ 个左右包括白血病干细胞(LSC)的白血病细胞,这些微小残留 LSC 是 CML 不能被最终治愈和复发的根本原因,这可能与 BCR/ABL 基因突变及相关耐药性有关^[2]。正常情况下,造血微环境中具有调控活性的基质细胞等通过合成和释放造血因子和造血抑制因子来调控血细胞的生长,并维持血细胞在不同阶段的正常形态。细胞因子作为骨髓微环境的重要组成部分,在许多肿瘤的发生、发展中发挥重要作用。因此,了解 CML 骨髓微环境细胞因子的变化,进一步确定有效的治疗尤为重要。

IL-1 β 是一个多功能炎性细胞因子,主要由受到刺激的白

细胞产生,在机体免疫应答、炎性反应、造血调控和肿瘤免疫中起重要作用^[3]。有文献报道,在急性白血病(AL)患者血清中 IL-1 β 水平明显增高,且与 AML 患者病情进展及预后密切相关^[4-5];研究还发现,在无外来刺激的情况下,包括 CML 在内的 LSC 及其骨髓基质细胞均可通过自分泌、旁分泌途径产生大量 IL-1 β ^[6]。研究还显示,IL-1 β 可促进恶性细胞的生长、遗传的不稳定性及恶性细胞的克隆演变^[7]。

IL-2、INF- γ 属于 Th1 细胞因子,它们都具有诱导 Th1 细胞分化,介导激活 CD8⁺ CTL 细胞,产生致炎性细胞因子,增强自然杀伤(NK)细胞活性,从而发挥抗细菌、抗病毒和抗肿瘤的作用。文献报道,Th1 型细胞因子如 INF- γ 可将巨噬细胞极化为 M1 型巨噬细胞,参与 Th1 型免疫应答,作为诱导细胞和杀伤细胞的 M1 型巨噬细胞参与杀伤病原体 and 肿瘤细胞^[8]。在对 AL 的研究中发现,AL 患者血清中 IL-2、INF- γ 水平明显减低,且与 AL 患者病情进展及预后呈负相关^[9-11]。

IL-4、IL-6、IL-10 属于 Th2 型细胞因子,具有介导体液免疫应答,与抑制自身免疫有关。Th2 型细胞因子如 IL-4、IL-10 能把巨噬细胞极化为 M2 型即肿瘤相关巨噬细胞(TAM),主要参与 Th2 免疫调控,抑制免疫,对细胞内病原体和肿瘤细胞的杀伤能力下降,有利于肿瘤细胞的生长^[7]。另有文献报道,TAM 可以释放 G0S2(G0/G1switch gene2),加快细胞生长周期,对肿瘤细胞的增殖有很强的促进作用^[12]。IL-4、IL-6、IL-10 在 AL 中的作用已有了相关报道^[8-10], I 期在 AL 患者血清中水平明显增高,其增高与 AL 患者病情进展及预后呈正相关。

本研究通过流式细胞仪检测初诊 CML 不同时期、治疗后完全缓解和未缓解患者骨髓 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、INF- γ 检测发现,在 CML-CP IL-2、INF- γ 表达水平明显低于对照组,随着病情的进展逐渐降低,CML-BP<CML-AP<CML-CP,组间比较差异有统计学意义($P<0.05$);而 IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-10 在 CML-CP 则明显高于对照组,随着病情的进展逐渐增高,即 CML-BP>CML-AP>CML-CP,且组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。提示 CML 患者的骨髓造血微环境发生了异常变化,即在 CML 骨髓微环境中 Th1/Th2 平衡向 Th2 漂移,抑制了局部细胞免疫功能,进而使机体的整个免疫系统紊乱,导致对白血病细胞的免疫耐受,且机体细胞免疫功能随着病情的不断加重更进一步紊乱,以致恶性克隆冲破了机体的免疫监视,从而在免疫应答诱导和效应的多个环节上抑制机体抗肿瘤免疫应答,进而导致 CML 的病情进展。经治疗完全缓解后,IL-2、INF- γ 表达水平较有所增高,但 INF- γ 在缓解组与 CML-CP 比较差异无统计学意义($P>0.05$),IL-2 在缓解组高于 CML-CP($P<0.05$),但仍低于对照组($P<0.05$);IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-10 表达水平有所降低,但仍高于 CML-CP($P<0.05$)。说明 CML 经治疗后虽达到了形态学及基因水平的缓解,但免疫功能仍未恢复正常,还存在复发的因素。所以,在 CML 缓解后,如何恢复患者机体乃至骨髓微环境的免疫平衡,可能是最终清除白血病微小残留的途径之一。至于在 CML 患者骨髓微环境中,是否存在由细胞因子对巨噬细胞的极化,且巨噬细胞在 CML 中的作用及这些因子与白血病细胞之间如何相互作用还有待进一步研究。

总之,通过对 CML 患者骨髓部分细胞因子的研究发现,在 CML 患者骨髓微环境中细胞因子水平的变化对 CML 的发生、发展及与预后评估有一定的意义。检测 CML 患者骨髓 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-10 及 INF- γ 水平有望为 CML 患者免疫治疗及预后判断提供新的思路和理论依据。

参考文献

[1] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 2 版. 北京:科
(上接第 3254 页)
[11] Bax L, Ikeda N, Fukui N, et al. More than numbers; the power of graphs in meta-analysis[J]. Am J Epidemiol, 2009, 169(2):249-255.
[12] Ho KM, Tan JA. Use of L'Abbe and pooled calibration

学出版社,1997:134-136.

[2] Lucas CM, Wang L, Austin GM, et al. A population study of imatinib in chronic myeloid leukemia demonstrates lower efficacy than in clinical trials[J]. Leukemia, 2008, 22(10):1963-1966.
[3] Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, et al. Extracellular NM23-H1 protein inhibits the survival of primary cultured normal human peripheral blood mononuclear cells and activates the cytokine production[J]. Int J Hematol, 2009, 90(2):143-152.
[4] 张秀莲,张伟华,侯素敏,等. 急性髓系高白细胞白血病患者外周血白细胞介素-1 β 的表达及意义[J]. 白血病·淋巴瘤, 2011, 11(11):663-665.
[5] 韩莹,杨君. 急性白血病患者血清 bFGF、IL-1 β 和 TSCF 检测的临床价值[J]. 疑难病杂志, 2011, 9(9):685-687.
[6] Acalescu A, Zlei M, Aanei C, et al. Flow cytometry-based quantification of cytokine levels in AML patient's plasma and cell culture supernatants[J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Lasi, 2008, 112(1):196-202.
[7] Mantovani A, Garlanda C, Allavena P. Molecular pathways and targets in cancer-related inflammation[J]. Ann Med, 2010, 42(3):161-170.
[8] Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, et al. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations[J]. J Leukoc Biol, 2006, 80(6):1298-1307.
[9] 张雄,肖玉梅,刘传勇,等. 急性白血病患者化疗前后 IL-2 及 IL-6 水平测定的临床意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(7):1372-1373.
[10] 杨会志,汪健,孙自敏. 急性髓系白血病患者 T 淋巴细胞内细胞因子表达特性[J]. 中国实验血液学杂志, 2007, 15(6):1161-1164.
[11] 姜焕好,曾东良,吴春风,等. 急性白血病患者治疗前后血清 INF- γ 、VEGF、IL-10 及 IL-12 水平的变化及意义[J]. 医学综述, 2012, 1(2):299-300.
[12] Yuan A, Chen JJ, Yang PC. Pathophysiology of tumor-associated macrophages[J]. Adv Clin Chem, 2008, 45(2):199-233.

(收稿日期:2016-03-05 修回日期:2016-05-23)

plots to assess the relationship between severity of illness and effectiveness in studies of corticosteroids for severe sepsis[J]. Br J Anaesth, 2011, 106(4):528-536.

(收稿日期:2016-05-11 修回日期:2016-07-29)