

• 论 著 •

Galectin-9 在多发性骨髓瘤患者 Th17/Treg 失衡中的意义

潘 鑫,王 娟,徐冬云,张亚辉,徐永茂[△]

中国人民解放军陆军第七十一集团军医院肿瘤血液科,江苏徐州 221000

摘 要:**目的** 探究半乳糖凝集素 9(Galectin-9)在多发性骨髓瘤(MM)患者调节性 T 细胞/辅助性 T 细胞 17(Th17/Treg)失衡中的意义。**方法** 选取 2020 年 1 月至 2021 年 6 月该院收治的 105 例初诊 MM 患者(MM 组)和 61 例体检健康人员(对照组)为研究对象,采用 RT-PCR 检测外周血 Galectin-9、T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3(Tim-3) mRNA 相对表达水平,采用流式细胞术检测外周血 Th17、Treg 水平,采用 ELISA 法检测血清白细胞介素(IL)-17、IL-10 水平,并进行对比分析。**结果** MM 组患者外周血 Galectin-9 mRNA、Tim-3 mRNA、Th17、Th17/Treg 高于对照组,CD4⁺T 低于对照组($P<0.05$);Pearson 相关性分析显示,Galectin-9 mRNA 与 Tim-3 mRNA、Th17、Th17/Treg 表达呈正相关($r=0.376、0.491、0.389,P<0.05$),与 CD4⁺T、Treg 表达呈负相关性($r=-0.408、-0.477,P<0.05$);MM 组血清 IL-17、IL-10 水平及 IL-17/IL-10 比值均高于对照组($P<0.05$);MM 患者 Galectin-9 mRNA 随 ISS 分期、DS 分期增加而逐渐增高,染色体异常、血清游离轻链比值(sFLCR)异常患者 Galectin-9 分别高于染色体正常、sFLCR 正常患者($P<0.05$);相关性分析显示,Galectin-9 与 Tim-3、ISS 分期、DS 分期、染色体、sFLCR 呈正相关($r=0.604、0.605、0.630、0.662,P<0.001$)。**结论** MM 患者存在明显的外周血 Galectin-9 水平偏高及 Th17/Treg 失衡,Galectin-9 可能通过调控 Tim-3 表达参与了 Th17/Treg 失衡及 MM 病情进展过程。

关键词:半乳糖凝集素 9; 多发性骨髓瘤; Th17/Treg; 免疫平衡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.08.023 **中图法分类号:**R733.3

文章编号:1673-4130(2022)08-1006-04 **文献标志码:**A

Significance of Galectin-9 in Th17/Treg imbalance in patients with multiple myeloma

PAN Xin, WANG Juan, XU Dongyun, ZHANG Yahui, XU Yongmao[△]

Department of Tumor Hematology, the 71st Group Army Hospital of the People's Liberation Army, Xuzhou, Jiangsu 221000, China

Abstract:**Objective** To explore the significance of Galectin-9 in Th17/Treg imbalance in patients with multiple myeloma(MM). **Methods** From January 2020 to June 2021, 105 newly diagnosed MM patients(MM group) and 61 healthy persons(control group) undergoing physical examination as the subject of study were selected from a hospital. The relative expression levels of Galectin-9 and TIM-3 mRNA in peripheral blood were detected by RT-PCR. Flow cytometry was used to detect the Th17, Treg, Th17/Treg in the peripheral blood. ELISA method was used to detect the levels of serum interleukin-17(IL-17) and interleukin-10(IL-10), and comparative analysis was performed. **Results** Galectin-9 mRNA, Tim-3 mRNA, Th17, Th17/Treg in the MM group were higher than those in the control group, while CD4⁺T was lower than the control group($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that Galectin-9 mRNA was positively correlated with Tim-3 mRNA, Th17, Th17/Treg expression($r=0.376、0.491、0.389,P<0.05$). There was negative correlation with CD4⁺T and Treg expression($r=-0.408、-0.477,P<0.05$). The serum levels of IL-17, IL-10 and the IL-17/IL-10 ratio in the MM group were higher than those in the control group($P<0.05$). The level of Galectin-9 mRNA gradually increased with the increase of ISS and DS stages. The level of Galectin-9 mRNA in patients with chromosomal abnormalities and abnormal serum free light chain ratio(sFLCR) was higher than that of patients with normal chromosomes and normal sFLCR($P<0.05$). Correlation analysis showed that the serum levels of Galectin-9 mRNA was positively correlated with ISS staging, DS staging, chromosome, and sFLCR($r=0.604、0.605、0.630、0.662,P<0.001$). **Conclusion** MM patients had high galectin-9 level and imbalance of Th17/Treg, Galectin-9 may be involved in Th17/Treg imbalance and MM progression by regulating the ex-

作者简介:潘鑫,女,主治医师,主要从事贫血、淋巴瘤研究。 [△] **通信作者,**E-mail:px98762021@163.com。

本文引用格式:潘鑫,王娟,徐冬云,等. Galectin-9 在多发性骨髓瘤患者 Th17/Treg 失衡中的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(8): 1006-1009.

pression of Tim-3.

Key words: Galectin-9; multiple myeloma; Th17/Treg; immune balance

多发性骨髓瘤(MM)是一种近年来发病率逐渐升高的血液系统肿瘤,好发于中老年人^[1]。MM以分泌异常的单克隆浆细胞在骨髓内大量增殖为主要特征,其发生发展与机体免疫状态密切相关,特别是与T淋巴细胞亚群有关。调节性T细胞(Treg)和辅助性T细胞17(Th17)均为重要的T淋巴细胞亚群,前者可控制自身免疫疾病和抑制肿瘤免疫反应起到抗炎作用,后者主要通过分泌白细胞介素-17(IL-17)而起到促炎作用,两者在细胞分化及功能作用上相互抑制,共同维持机体局部免疫平衡^[2-3]。已有学者发现,MM患者体内存在明显的Th17/Treg失衡,表现为Th17细胞比例升高和Treg细胞比例降低,且有多种因子参与其中^[4]。半乳糖凝集素9(Galectin-9)是一种急性髓系白血病、恶性淋巴瘤等血液系统肿瘤中表达异常的半乳糖凝集素,主要参与细胞聚集黏附、机体免疫调节等过程。相关研究显示,Galectin-9可与其配体T细胞免疫球蛋白黏蛋白分子3(Tim-3)结合,在机体免疫效应阶段清除效应Th17细胞、抑制T细胞介导免疫反应作用,推测其可能通过与Tim-3作用而参与了Th17/Treg失衡过程^[5]。本次研究通过检测MM患者外周血Th17、Treg细胞水平及Galectin-9表达情况,探讨Galectin-9在MM患者Th17/Treg失衡中的作用及与临床病理关系,以期为临床判断MM病情进展及预后提供一定参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2020年1月至2021年6月本院收治的105例初诊MM患者(MM组)作为研究对象。纳入标准:(1)参考文献[6]确诊为MM的初诊患者,采血前未进行过放化疗、免疫靶向治疗等;(2)不伴其他浆细胞相关疾病;(3)研究对象知情并签署同意书。排除标准:(1)急慢性感染性疾病;(2)传染性疾病;(3)自身免疫性疾病、恶性肿瘤等或其他血液疾病。另选同期在本院体检健康人员61例作为对照组,同样排除急慢性感染性疾病、自身免疫性疾病、传染性疾病、恶性肿瘤等或其他血液疾病。MM组男67例、女38例,年龄35~75岁、平均(54.76±8.72)岁;对照组男40例、女21例,年龄40~72岁、平均(55.12±8.34)岁。两组患者性别、年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经本院医学伦理委员会审核通过。

1.2 方法

1.2.1 Galectin-9、Tim-3 mRNA 相对表达水平检测 采集MM组患者入院次日、对照组体检当日空腹静脉血6 mL,取4 mL于抗凝管中保存,用于分离单个核细胞(PBMC):将全血与等体积磷酸盐缓冲液(PBS)混匀,加入淋巴细胞分离液,以2 000 r/min进

行密度梯度离心,吸取中间白色絮状细胞层,为PBMC。在提取的PBMC中加入Trizol试剂提取总RNA,并检测RNA浓度。采用SYBR@ Premix Ex TaqTM II试剂盒(日本宝日医生物技术有限公司)进行RT-PCR反应,扩增反应条件:95℃ 30 s,95℃ 5 s,40个循环,60℃ 30 s退火。内参选用 β -action,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达水平。引物为Galectin-9:上游5'-CTTTCATCACCACCATTCTG-3',下游5'-ATCTGGAACCTCTGAGCACTG-3'; Tim-3:上游5'-CAGATACTGGCTAAATGGG-3',下游5'-CTTGGCTGGTTTGTATGAC-3'; β -action:上游5'-TGACGTGGACATCCGAAAG-3',下游5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'。

1.2.2 外周血CD4⁺T、Th17、Treg水平检测 采用流式细胞仪(BD公司,FACSCalibur型)检测,采用全血法配置分析液,FACS Multi SET程序获得CD4⁺T水平,采用BD Cell Quest软件分析测定CD4⁺T中Th17、Treg水平,并计算Th17/Treg比例,试剂盒来自美国罗氏公司。

1.2.3 血清IL-17、IL-10水平检测 采用酶联免疫吸附试验(ELISA):取2 mL全血以3 500 r/min离心10 min后取上清液冻存用于ELISA检测,将ELISA试剂盒室温静置30 min,按照需要浓度稀释标准品,在各孔中加入血清100 μ L和标准品,36℃作用90 min,空白孔加入通用的稀释液及标准品,洗板后在各反应孔加入生物素化抗体100 μ L,空白孔加入抗体稀释液,作用60 min,洗板后各反应孔加入100 μ L酶标抗体,空白孔加入酶结合物稀释液,作用30 min,洗板后各孔加入100 μ L 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色,作用15 min,随后加入100 μ L终止液,在3 min内采用酶标仪读取各标本吸光度(A值),并根据标准品浓度及对应A值绘制标准曲线。

1.3 统计学处理 采用SPSS22.0软件包进行数据分析,符合正态分布计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以%表示,组间比较采用 χ^2 检验;相关性分析采用Spearman或Pearson检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组外周血Galectin-9、Tim-3 mRNA表达情况 MM组Galectin-9、Tim-3 mRNA相对表达水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表1。Pearson相关性分析显示,Galectin-9 mRNA与Tim-3 mRNA表达呈正相关($r=0.376, P=0.005$)。

2.2 两组外周血T淋巴细胞亚群表达情况 MM组患者外周血Th17、Th17/Treg高于对照组,Treg水平低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表

2. Pearson 相关性分析显示, Galectin-9 mRNA 与 Th17、Th17/Treg 表达呈正相关($r=0.491, 0.389, P<0.05$), 与 $CD4^{+}T$ 、Treg 表达呈负相关性($r=-0.408, -0.477, P<0.05$)。

表 1 两组外周血 $CD4^{+}T$ 细胞上 Galectin-9 表达情况($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Galectin-9 mRNA	Tim-3 mRNA
MM 组	105	1.24±0.17	5.24±0.76
对照组	61	0.31±0.04	1.63±0.25
<i>t</i>		2.024	6.254
<i>P</i>		0.009	<0.001

表 2 两组外周血 T 淋巴细胞亚群表达情况($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	$CD4^{+}T$ ($\times 10^3/\mu L$)	Th17 (%)	Treg (%)	Th17/Treg
MM 组	105	0.42±0.07	5.84±1.53	1.92±0.83	3.62±1.94
对照组	61	1.31±0.28	4.32±1.02	2.14±0.57	2.13±0.72
<i>t</i>		6.725	1.247	0.764	0.256
<i>P</i>		<0.001	0.026	0.042	0.034

2.3 两组血清 IL-17、IL-10 水平及 IL-17/IL-10 比值比较 MM 组血清 IL-17、IL-10 水平及 IL-17/IL-10 比值均高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见表 3。

表 3 两组血清 IL-17、IL-10 水平及 IL-17/IL-10 比值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-17 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-17/ IL-10 比值
MM 组	105	25.74±5.56	23.82±5.17	1.02±0.42
对照组	61	20.61±4.32	19.14±4.72	1.44±0.63
<i>t</i>		6.254	5.254	4.025
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 MM 患者 Galectin-9 mRNA 表达与临床病理关系 MM 患者 Galectin-9 mRNA 随 ISS 分期、DS 分期增加而逐渐增高, 见表 4。Spearman 相关性分析显示, Galectin-9 mRNA 与 ISS 分期、DS 分期呈正相关($r=0.604, 0.605, P<0.001$); 染色体异常、血清游离轻链比值(sFLCR)异常患者 Galectin-9 mRNA 分别高于染色体正常、sFLCR 正常患者, Pearson 相关性分析显示, Galectin-9 mRNA 与染色体、sFLCR 呈正相关($r=0.630, 0.662, P<0.001$)。

表 4 MM 患者 Galectin-9 mRNA 与临床病理关系($\bar{x}\pm s$)

临床病理	<i>n</i>	Galectin-9 mRNA	<i>F/t</i>	<i>P</i>
ISS 分期				
I 期	17	1.03±0.32	5.152	0.017
II 期	40	1.23±0.41		

续表 4 MM 患者 Galectin-9 mRNA 与临床病理关系($\bar{x}\pm s$)

临床病理	<i>n</i>	Galectin-9 mRNA	<i>F/t</i>	<i>P</i>
III 期				
48		1.45±0.36		
DS 分期				
I 期	23	1.04±0.37	6.205	0.012
II 期	35	1.19±0.46		
III 期	47	1.43±0.32		
染色体				
正常	64	1.07±0.34	1.025	0.013
异常	41	1.38±0.32		
sFLCR				
正常	33	1.03±0.28	1.306	0.009
异常	72	1.39±0.37		

3 讨 论

MM 是以浆细胞大量增殖为主要特性的恶性血液系统肿瘤, 患者体内存在明显的 T 淋巴细胞数量和功能异常。相关研究显示, 与健康人群相比, MM 患者体内存在 $CD4^{+}T$ 细胞水平抑制^[7]。还有学者发现无论初诊或复发 MM 患者体内均存在明显的 Th17/Treg 比例偏高^[8]。Treg 细胞是一类在多种恶性肿瘤及免疫性疾病中表达异常的淋巴细胞, 主要起到抑制效应 T 细胞和维持自身免疫耐受作用, 目前其在 MM 中表达存在争议^[9]。Th17 细胞因具有促炎作用而被认为在 MM 的溶骨性病变中起到促进病程作用, 而在 MM 中表达情况也并未达成共识^[10]。这可能与 MM 患者个体微环境、疾病进程等多种因素有关。本次研究结果显示, MM 患者外周血 Th17 占比明显偏高, 而 Treg 占比偏低, 引发 Th17/Treg 失衡, 且平衡向 Th17 方向移动, 提示 Th17 在 MM 发病过程中起作用。IL-17 是 Th17 特异性分泌的细胞因子, 能促进初始 T 淋巴细胞向 Th17 细胞分化, 在众多自身免疫疾病或恶性肿瘤中高表达。相关研究显示, Treg 细胞能通过分泌 IL-10、TGF- β 等因子来发挥免疫抑制作用^[11]。本次研究中显示 MM 患者 IL-17、IL-10 水平及 IL-17/IL-10 比值均高于健康人群, 进一步证实了 MM 中存在向 Th17 偏移。有学者认为 Th17、IL-17 的表达增加是骨髓瘤细胞与其所处微环境相互作用结果^[12]。还有研究认为 Th17 能通过分泌相关细胞因子与恶性肿瘤细胞结合, 在促进肿瘤血管生成、骨质破坏等过程中起到重要作用^[13]。本次研究中 MM 患者 IL-10 表达也升高, 这可能与 IL-10 能引发免疫抑制, 促进肿瘤细胞免疫逃逸有关。而 IL-17/IL-10 比值偏高提示 MM 患者体内存在 IL-17/IL-10 比值失衡引发的免疫紊乱, 且以 Th17 细胞分泌的 IL-17 为优势, 表现为促进骨髓瘤细胞增殖和免疫抑制作用。Galectin-9 是一种串联重复的半乳糖凝聚素, 其

基因位于染色体 17q11.1 上,主要起到趋化嗜酸性粒细胞、免疫调节、促进肿瘤细胞侵袭转移等作用。相关研究显示, Galectin-9 可与 Th1 细胞表面标记分子 Tim-3 结合,影响 T 细胞对 IFN- γ 的分泌,降低 T 细胞对肿瘤生长的抑制作用^[14]。本研究显示, MM 组 Galectin-9、Tim-3 mRNA 相对表达水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 Tim-3、Galectin-9 均参与了 MM 发生发展过程。本次研究中血 Galectin-9 mRNA 与 Tim-3 mRNA 表达呈正相关,提示两者在 MM 中可相互影响。多项研究显示, Tim-3、Galectin-9 共同参与了肿瘤浸润转移、血管形成、免疫逃逸等多过程调控,而 Tim-3/Galectin-9 通路能通过介导 T 细胞失能从而导致肿瘤的进展^[15]。Tim-3 目前已经被证实能参与 Th17 的免疫调控过程,且能耗尽机体 CD4⁺ T 细胞和有效抑制 Treg 细胞的抗肿瘤免疫功能^[16-17]。本研究中 Galectin-9 mRNA 表达与 Th17、Th17/Treg 表达呈正相关,与 CD4⁺ T、Treg 表达呈负相关,提示 Galectin-9 同样参与了 Th17/Treg 失衡过程,而此过程可能是通过 Galectin-9/Tim-3 通路调节的。还有学者发现, Tim-3、Galectin-9 与恶性肿瘤患者临床病理参数之间存在相关,两者高表达均可提示预后较差^[18]。本次研究中 MM 患者 Galectin-9 表达与 ISS 分期、DS 分期、染色体、sFLCR 存在一定相关性。其中染色体异常及分期增加多提示预后不良; sFLCR 提示克隆性浆细胞水平变化,此指标变化早于骨髓瘤细胞变化^[19-20],提示 Galectin-9 表达可在早期提示 MM 病情进展及预后,而此过程可能与 Th17/Treg 失衡情况密切相关。综上所述, MM 患者存在明显的外周血 Galectin-9 水平偏高及 Th17/Treg 失衡, Galectin-9 可能通过调控 Tim-3 表达参与了 Th17/Treg 失衡及 MM 病情进展过程。

参考文献

- [1] ZHUANG Y, JIN Z C, YAO H, et al. Targeting autophagy in multiple myeloma[J]. Leuk Res, 2017, 59(7): 97-104.
- [2] 苏荣,吕微风,杨延斌,等. 52 例多发性骨髓瘤患者细胞免疫表型分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(14): 1690-1693.
- [3] FUJITA K, IWAMA H, OURA K, et al. Cancer Therapy Due to Apoptosis: Galectin-9[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(1): 74-79.
- [4] 董嶂,杜蓉,薛茜文,等. Tim-3 及其配体 Galectin-9 在宫颈鳞癌患者中的表达及意义[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(5): 577-582.
- [5] 周林,王广洲,管俊,等. 骨髓瘤患者外周血中 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} 调节性 T 细胞及淋巴细胞亚群的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(11): 1393-1395.
- [6] 中国医师协会血液科医师分会,中华医学会血液学分会,中国医师协会多发性骨髓瘤专业委员会. 中国多发性骨髓瘤诊治指南(2020 年修订)[J]. 中华内科杂志, 2020, 59(5): 341-346.
- [7] ENNINGA E A L, CHATZOPOULOS K, BUTTERFIELD J T, et al. CD206-positive myeloid cells bind galectin-9 and promote a tumor-supportive microenvironment[J]. J Pathol, 2018, 245(4): 468-477.
- [8] 闫岩,李燕郴,耿传营,等. 不同临床分期骨髓瘤的 C-MYC 蛋白和 MDSC, Th17 细胞与发病的相关性[J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27(6): 1881-1886.
- [9] 龚莉欣,邱录贵,郝牧. 多发性骨髓瘤患者骨髓微环境中 CD4⁺ T 细胞亚群生物学特征及其作用的研究现状[J]. 国际输血及血液学杂志, 2021, 44(1): 1-6.
- [10] YASINSKA I M, SAKHNEVYCH S S, PAVLOVA L, et al. The Tim-3-Galectin-9 pathway and its regulatory mechanisms in human breast cancer[J]. Front Immunol, 2019, 10(5): 1594-1596.
- [11] 王扬扬,郑骁,朱纯超,等. 胃食管结合部腺癌组织中免疫检查点 Tim-3/Gal-9 表达及 T 细胞浸润分析[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2020, 7(6): 540-549.
- [12] YAYI H, KEYI J, RAFAL D, et al. Galectin-9 in non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2019, 136(12): 80-85.
- [13] 刘洋,王新有,王秀娟,等. ITP 患者血清中可溶性 Tim3/Galectin9 水平及其临床意义[J]. 免疫学杂志, 2019, 11(9): 799-804.
- [14] 谢仁古丽·阿力木,曾雪娇,庞楠楠,等. TIM-3/galectin-9 参与慢性淋巴细胞白血病患者 T 细胞的负性调控[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2020, 36(11): 65-69.
- [15] NAMBIAR D K, AGUILERA T, CAO H, et al. Galectin-1-driven T cell exclusion in the tumor endothelium promotes immunotherapy resistance[J]. J Clin Invest, 2019, 129(12): 5553-5567.
- [16] 王辉,张利娟,杨芳. 半乳糖凝集素-9 和 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3 在口腔扁平苔藓和口腔鳞状细胞癌组织中的表达及临床意义[J]. 癌症进展, 2020, 18(6): 42-45.
- [17] 代娇,宋秋玲,段慧英,等. 活动性肺结核患者 Tim-3/Galectin-9 的表达变化及其与巨噬细胞相关细胞因子的相关性[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(7): 95-99.
- [18] CHOU F C, CHEN H Y, KUO C C, et al. Role of galectins in tumors and in clinical immunotherapy[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2): 430-432.
- [19] 周艳,罗枫,伍世钢,等. TPO, HBME-1, CK19, Galectin-3, CyclinD1 检测在甲状腺良恶性病变中的鉴别诊断价值[J]. 海南医学, 2020, 31(1): 33-36.
- [20] 黄祖华,莫李婵,何南云,等. Tim-3 和 Galectin-9 介导在脓毒症中的免疫调节及其机制研究[J]. 临床急诊杂志, 2019, 20(4): 35-38.

(收稿日期: 2021-07-27 修回日期: 2022-03-12)