

Th22 细胞在慢性粒细胞白血病患者中的临床研究

陈萍¹ 胥莉¹ 王敏¹ 李大启¹ 纪春岩² 马道新²

[摘要] 目的:研究慢性粒细胞白血病(CML)患者外周血中 Th22 细胞的比例、相关转录因子芳香烃受体(AHR)的表达水平及细胞因子 IL-22 的浓度,探讨 Th22 细胞在 CML 免疫机制中的作用。方法:应用流式细胞术检测 Th22 细胞在 33 例 CML 患者(初诊 15 例,伊马替尼治疗后的 CML-CP 18 例)外周血中的比例,实时荧光定量 PCR 技术检测 CML 患者 Th22 相关转录因子 AHR mRNA 的表达水平,ELISA 法检测细胞因子 IL-22 的浓度。同时以 15 例正常者作为对照。结果:CML 初诊患者外周血的 Th22 细胞比例($0.43\% \pm 0.23\%$)明显低于伊马替尼治疗后的 CML-CP 患者($3.19\% \pm 1.76\%$, $P < 0.05$)和对照者($2.58\% \pm 0.98\%$, $P < 0.05$)。CML 初诊患者外周血单个核细胞的 AHR 基因转录水平(0.2129 ± 0.1746)与伊马替尼治疗后的 CML-CP 患者(0.8171 ± 0.3887 , $P < 0.05$)和对照者(0.4681 ± 0.1804 , $P < 0.05$)比较均明显降低。伊马替尼治疗后的 CML-CP 患者外周血 AHR mRNA 表达水平较对照者显著升高($P < 0.05$)。CML-CP 患者的外周血 IL-22 浓度较对照者显著升高[(100.94 ± 18.48) pg/ml : (85.14 ± 13.46) pg/ml, $P < 0.05$]。Th22 细胞的比例与 CML 患者外周血白细胞计数及 BCR-ABL% 均呈负相关。结论:Th22 细胞下调,Th22 免疫功能受损可能有助于 CML 的发生和发展。

[关键词] 白血病,粒细胞,慢性;Th22 细胞;IL-22

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2016.03.016

[中图分类号] R733.72 **[文献标志码]** A

Clinical study of Th22 cells in patients with chronic myeloid leukemia

CHEN Ping¹ XU Li¹ WANG Min¹ LI Daqi¹ JI Chunyan² MA Daoxin²

(¹Department of Hematology, Jinan Central Hospital, Affiliated to Shandong University, Jinan, 250013, China; ²Department of Hematology, Qilu Hospital of Shandong University)

Corresponding author: MA Daoxin, E-mail: daoxinma@sdu.edu.cn

Abstract Objective: To explore the ratio of Th22 cells, the expression of transcription factors AHR and their related cytokines IL-22 in peripheral blood of chronic myeloid leukemia (CML) patients, and to further investigate the role of Th22 cells in hematological tumor immune mechanisms. **Method:** The proportions of Th22 cells in peripheral blood of 33 patients with CML were evaluated by flow cytometry analysis. AHR mRNA expressions were examined by RT-PCR. The levels of cytokines IL-22 were measured by ELISA. Fifteen normal subjects were used as controls. **Result:** The ratio of Th22 cells was significantly decreased in newly-diagnosed CML (CML-NP) patients ($0.43\% \pm 0.23\%$) than those in chronic phase CML (CML-CP) patients ($3.19\% \pm 1.76\%$, $P < 0.05$) and controls ($2.58\% \pm 0.98\%$, $P < 0.05$). The expression of AHR was significantly decreased in CML-ND patients (0.2129 ± 0.1746) compared with CML-CP patients (0.8171 ± 0.3887 , $P < 0.05$) and controls (0.4681 ± 0.1804 , $P < 0.05$). The mRNA level of AHR was increased in CML-CP patients than that in controls ($P < 0.05$). The level of IL-22 in CML-CP patients was slightly higher than controls [(100.94 ± 18.48) pg/ml vs. (85.14 ± 13.46) pg/ml, $P < 0.05$]. There were significantly negative correlations between Th22 cells and peripheral white blood cell counts and BCR-ABL%. **Conclusion:** Down-regulation of Th22 cellular immunity and impaired Th22 immune function may contribute to the occurrence and development of CML.

Key words chronic myeloid leukemia; Th22 cells; IL-22

T 细胞数量异常,CD4⁺T 细胞与 CD8⁺T 细胞两个 T 细胞亚群水平的上调或下调,与机体的免疫功能紊乱和某些血液系统疾病的发生发展密切相关。异常的 Th 亚群和相关的细胞因子在慢性粒细胞白血病(CML)发生、发展中的作用,目前研究报道尚少见。Th22 细胞是最近发现的一种新型的 CD4⁺ Th 细胞亚群,高度表达芳香烃受体的关键转录因子(AHR)^[1],代表一个独立的终末分化的 T

细胞亚型,在外周免疫反应中发挥重要作用。Th22 细胞的发现为疾病的病因和治疗开辟了一个新的研究途径。国内外对 Th22 及其相关细胞因子在肿瘤学领域的研究刚刚起步,关于 Th22 细胞和 IL-22 在肿瘤免疫中的作用及其在肿瘤微环境中的分化和分布,目前的研究数据尚有限。Th22 细胞在血液系统恶性肿瘤(如骨髓增生异常综合征、急性髓细胞白血病)和非肿瘤性血液病(如肝细胞癌、肺癌)中的作用有了一些研究报道^[2-5]。到目前为止,尚未有 Th22 细胞亚群与 CML 相关的研究报

¹ 山东大学附属济南市中心医院血液内科(济南,250013)

² 山东大学齐鲁医院血液内科

通信作者:马道新, E-mail: daoxinma@sdu.edu.cn

道。本文主要研究 Th22 细胞及其关键转录因子 AHR 以及 IL-22 水平在 CML 患者中的作用,为进一步研究 Th22 细胞在 CML 免疫机制中的作用提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料

33 例 CML 患者来自于山东大学齐鲁医院、济南市中心医院门诊及住院患者,其中男 20 例,女 13 例;年龄 31~76 岁,中位 48 岁。所有 CML 患者经骨髓细胞形态学、染色体、BCR-ABL 基因检测,并参照 WHO 诊断标准确诊。其中初诊 15 例,伊马替尼治疗后疾病缓解的 CML 慢性期(CML-CP)患者 18 例。15 例外周血正常对照者来自于健康体检志愿者,其中男 8 例,女 7 例;年龄 23~51 岁,中位 41 岁。所有入选 CML 患者的临床资料见表 1。

1.2 主要仪器和试剂

离子霉素、莫能霉素、佛波酯:Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA; 流式抗体 CD4-PE-Cy5、IL-22-APC、IL-17-PE 和 IFN- γ -FITC: Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA; 流式细胞仪: BD FACS Calibur, USA; cDNA 逆转录试剂盒: 大连 Takara 生物公司; Trizol 试剂盒: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; Real-time RT-PCR 检测仪 (ABI PRISM-7500): Applied Biosystems, Foster City, CA, USA; 酶联免疫检测仪 (3550 型): eBioscience, San Diego, CA, USA。ELISA 试剂盒: Cat, BMS2017, eBioscience, USA。

1.3 方法

采用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离外周血的单个核细胞。

流式细胞术检测分析 Th22 细胞: ①吸取 100 μ l CML 患者的全血用于流式细胞检测, 100 μ l 全血+100 μ l 1640+佛波酯 50 μ l+莫能霉素 20 μ l+离子霉素 20 μ l 孵箱孵育 4 h; ②混匀后分别吸取 100 μ l 刺激后的全血加入流式管中, 按顺序依次加入 3 μ l CD4-PE-Cy5 抗体, 室温避光孵育 15~20 min, 加入 100 μ l 固定液(reagent A), 室温避光孵育 15 min。加 3 ml PBS, 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 100 μ l 破膜剂(reagent B), 加 IL-17-PE, IFN- γ -FITC, IL-22-APC 抗体各 3 μ l, 混匀, 室温避光孵育 20 min; ③加 PBS 液 3 ml,

1 200 r/min 离心 5 min 弃上清; ④加入 400 μ l 的 PBS 液重悬, 流式细胞检测仪分析数据。

实时荧光定量 PCR 法检测 CML 患者 AHR 的 mRNA 表达水平: ①提取总 RNA: 取出-80℃冻存的外周血单个核细胞, 加入 1 ml Trizol RNA 提取液至 EP 管, 吹打混匀, 室温环境中静置 5 min。加入 500 μ l 三氯甲烷来回混匀至粉色乳糜状, 静置 5 min, 放入 4℃离心机, 15 000 r/min, 离心 15 min。吸取分层后的上清液 400 μ l, 加入去 RNA 酶的 EP 管中。加入预冷的异丙醇 500 μ l, 来回摇动均匀, 使其成油观状, 室温环境中静置 15 min。4℃, 15 000 r/min, 离心 15 min, 弃除上清。加入 300 μ l 75%乙醇, 4℃, 15 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 室温下晾干, 加入 ddH₂O 20 μ l 测定 RNA 浓度。②逆转录反应: 取标本 RNA 1 μ l, 应用 cDNA 反转录试剂盒进行逆转录反应。③Real-time PCR: AHR 引物序列: Forward 5'-CAA ATC CTT CCA AGC GGC ATA-3'; Reverse 5'-CGC TGA GCC TAA GAA CTG AAA G-3'; GAPDH(内参基因)引物序列: Forward 5'-GCT CTC TGC TCC TCC TGT TC-3'; Reverse 5'-GTT GAC TCC GAC CTT CAC CT-3'。反应体系组成: 上游引物 0.4 μ l、下游引物 0.4 μ l、SYBR Green 5 μ l 和 cDNA 1 μ l, CML 患者外周血标本 cDNA 1 μ l, ddH₂O 3.2 μ l, 总体积 10 μ l。95℃预变性 5 min, 95℃ 15 s, 65℃ 15 s, 72℃ 45 s, 40 个循环, 溶解曲线显示为单峰, 为扩增产物特异性好, 根据溶解曲线进行数据结果分析。④结果分析: 计算 AHR 基因与内参基因(GAPDH)的相对含量。根据相对定量法计算出目的基因 mRNA 的相对拷贝数 $2^{-\Delta Ct}$ 。方法采用相对循环阈值(Ct)法, $\Delta Ct = \text{目的基因(AHR 基因)Ct 值} - \text{内参基因(GAPDH)Ct 值}$ 。

ELISA 法检测 CML 患者外周血中 IL-22 的浓度: 具体实验步骤按 ELISA 检测试剂盒说明书进行, 显色后立即用酶标仪检测 450 nm 波长的吸收度 A 值, 根据标准曲线确定 IL-22 的含量。

1.4 统计学处理

应用 SPSS13.0 软件分析实验结果。数据以 $\bar{x} \pm s$ 或中位数表示; 两组数值变量的比较采用独立样本 *t* 检验, 多个样本均数的比较采用方差分析; 根据双变量是否均服从正态分布, 变量之间的相关性分析采用 Pearson 相关法。以 $P < 0.05$ 为差

表 1 所有入选 CML 的临床资料

组别	WBC/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	HGB/(g $\cdot L^{-1}$)	PLT/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	BCR-ABL/%
CML 组(33 例)				
初诊 CML(15 例)	186.52 $\pm$ 141.36	106.33 $\pm$ 25.96	543.73 $\pm$ 306.96	79.17(23.54~176.62)
CML-CP(18 例)	5.89 $\pm$ 1.51	136.11 $\pm$ 16.18	195.61 $\pm$ 85.60	1.84(0.00~17.97)
对照组(15 例)	6.48 $\pm$ 2.42	130.93 $\pm$ 17.12	201.26 $\pm$ 107.03	—

异有统计学意义。

2 结果

2.1 Th22 细胞在 CML 患者中的比例

CML 初诊患者外周血的 Th22 细胞比例 ($0.43\% \pm 0.23\%$) 明显低于伊马替尼治疗后的 CML-CP 患者 ($3.19\% \pm 1.76\%$, $P < 0.05$) 和对照者 ($2.58\% \pm 0.98\%$, $P < 0.05$)。伊马替尼治疗后的 CML-CP 患者外周血的 Th22 细胞比例较对照者高, 但差异无统计学意义 ($P = 0.306$)。见图 1。

2.2 CML 患者 Th22 相关转录因子 AHR mRNA 表达

CML 初诊患者外周血单个核细胞的 AHR 基因转录水平 (0.2129 ± 0.1746) 与伊马替尼治疗后的 CML-CP 患者 (0.8171 ± 0.3887 , $P < 0.05$) 和对照者 (0.4681 ± 0.1804 , $P < 0.05$) 比较均明显降低。伊马替尼治疗后的 CML-CP 患者外周血 AHR mRNA 表达水平较对照者显著升高 ($P < 0.05$)。

2.3 CML 患者外周血中细胞因子 IL-22 浓度

CML-CP 患者的外周血 IL-22 浓度较对照者显著升高 [(100.94 ± 18.48) pg/ml : (85.14 ± 13.46) pg/ml, $P < 0.05$]。而 CML 初诊患者的外周血 IL-22 浓度 (91.60 ± 15.83) pg/ml 与伊马替尼治疗后的 CML-CP 患者及对照者比较, 均差异无统计学意义 ($P = 0.350, 0.139$)。

2.4 Th22 细胞与 CML 临床的相关性分析

Th22 细胞比例与 CML 患者外周血白细胞计数呈明显的负相关 ($r = -0.493$, $P = 0.007$)。Th22 细胞比例与 CML 患者外周血的 BCR-ABL% 亦呈明显的负相关 ($r = -0.407$, $P = 0.028$)。

3 讨论

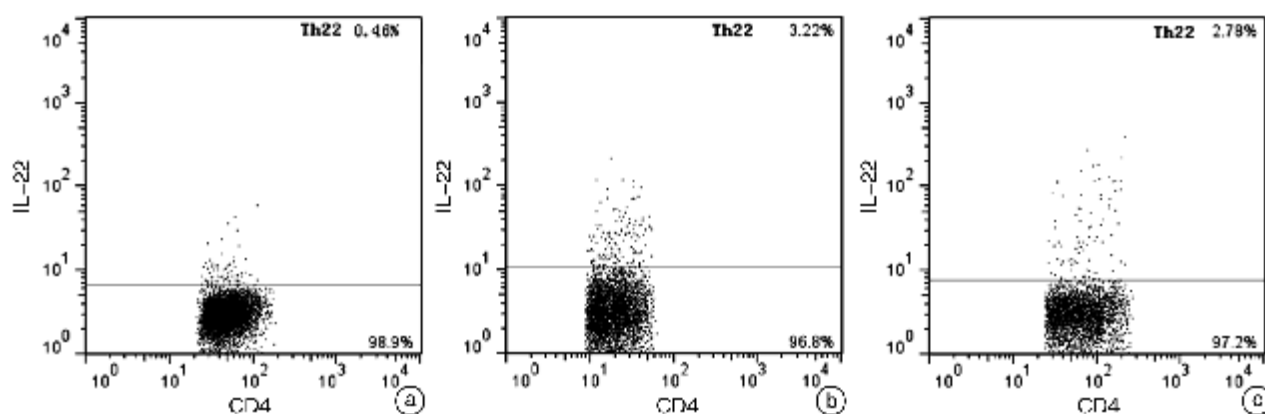
CML 是获得性造血干细胞恶性克隆性疾病, 伊马替尼成功治疗 Ph 染色体阳性的 CML 患者, 验证了 BCR-ABL 是 Ph 染色体阳性 CML 的关键

驱动因素。伊马替尼改变了 CML 疾病进程, 使 CML 由一种恶性肿瘤转变为可长期生存的慢性疾病, 开辟了 CML 分子靶向治疗的全新领域。接受伊马替尼一线治疗的 CML 患者, 尽管绝大多数能获得完全血液学、细胞遗传学和分子学反应, 出现前所未有的疗效, 但是仍有一部分患者由于对药物不耐受, 反应欠佳, 出现原发性或继发性耐药。此外高达 5% 的 CML 患者应用酪氨酸激酶抑制剂疾病仍持续进展, 不能维持长期的完全缓解, 导致治疗失败和疾病进展。

T 淋巴细胞免疫缺陷在肿瘤的进展中发挥了重要的作用, 这可能与肿瘤的启动和发展有关, 免疫治疗有可能成为一种有效控制肿瘤生长和复发的治疗方法。研究发现 CML 患者外周血中 $CD4^+$ $CD25^+$ Treg 淋巴细胞表达异常^[6]。CML 患者 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞水平与对照组比较明显降低, 表明 CML 患者存在免疫功能缺陷^[7]。

Th22 细胞是新近发现的一群独立于 Th1、Th2 和 Th17 的新型 $CD4^+$ Th 细胞亚群^[8], 完全不同于其他 T 细胞亚群, 它分泌 IL-22 和 TNF- α , 也可分泌 IL-26 和 IL-23, 不分泌 IL-17 和 IFN- γ , 转录因子 AHR 与配体结合可刺激 IL-22 产生, 当小鼠缺乏 AHR 后, 体内 Th22 细胞数量减少。最近的研究已经报道 Th22 和 IL-22 在自身免疫性疾病、实体瘤和一些血液系统恶性肿瘤发病中的重要作用, 而关于 Th22 细胞在肿瘤免疫中的作用是促进还是抑制, 目前结论不一。

本研究结果显示, CML 初诊患者外周血的 Th22 细胞 ($CD4^+$ IL-22 $^+$ IL-17 $^-$ IFN- γ^-) 较对照者显著降低, 伊马替尼治疗后缓解的 CML-CP 患者外周血的 Th22 细胞比例与初诊的 CML 比较显著升高, 提示 CML 患者体内存在 Th22 细胞缺陷。我们进一步对 Th22 的转录因子 AHR mRNA 水平进行分析, 发现 CML 初诊患者与伊马替尼治疗缓



a: 初诊 CML 组; b: CML-CP 组; c: 对照组。

图 1 Th22 细胞在各组中的比例

解后的 CML-CP 患者较对照者均明显降低,伊马替尼治疗缓解后的 CML-CP 患者外周血 AHR mRNA 表达水平较初诊患者显著升高。所有这些结果提示 CML 肿瘤细胞可能通过某种机制抑制 AHR 的表达,使 Th22 细胞比例下降,Th22 细胞下调和 Th22 免疫功能受损可能会导致 CML 的发生和发展。疾病获得完全缓解后 AHR mRNA 表达水平相应升高,Th22 细胞达到一定程度的恢复,这种免疫抑制为可逆性的过程。

作为 Th22 细胞主要的效应因子,IL-22 参与调控细胞的生长、增殖、细胞周期和凋亡,可能在加速或抑制肿瘤发生过程中起重要的作用^[9]。我们研究了 IL-22 在 CML 患者中的表达水平,发现 CML 初诊和伊马替尼治疗缓解后的 CML-CP 患者外周血 IL-22 水平较对照者均升高。上述结果提示 IL-22 对于 CML 的发生和进展可能具有促进作用。另外,本研究发现 CML 患者外周血中 Th22 细胞的比例与 IL-22 水平无相关性。已有研究表明,尽管免疫细胞如 Th22 和 Th17 细胞是主要的产生 IL-22 的 T 细胞亚群,IL-22 还可以由 CD8⁺ T 细胞和其他淋巴细胞表达,包括自然杀伤细胞的 NK22 亚群和 CD11c⁺ 细胞^[10-11]。我们的研究结果表明,在 CML 中 Th22 细胞并不是 IL-22 的主要来源,推测可能还有其他类型的细胞参与分泌 IL-22。

我们还分析了 Th22 细胞与 CML 患者外周血白细胞计数和 BCR-ABL% 之间的关系,发现 Th22 细胞与外周血白细胞计数和 BCR-ABL% 均存在显著的负相关。表明 Th22 细胞的比例可能与 CML 患者的肿瘤负荷相关,可能在评估治疗效果方面有重要的作用。

参考文献

- [1] Duhen T, Geiger R, Jarrossay D, et al. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10: 857-863.
- [2] Shao LL, Zhang L, Hou Y, et al. Th22 cells as well as Th17 cells expand differentially in patients with early-stage and late-stage myelodysplastic syndrome[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e51339.
- [3] Yu S, Liu C, Zhang L, et al. Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in peripheral blood of patients with acute myeloid leukemia[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 1927-1945.
- [4] Qin S, Ma S, Huang X, et al. Th22 cells are associated with hepatocellular carcinoma development and progression[J]. *Chin J Cancer Res*, 2014, 26: 135-141.
- [5] Zhuang Y, Peng LS, Zhao YL, et al. Increased intratumoral IL-22-producing CD4⁺ T cells and Th22 cells correlate with gastric cancer progression and predict poor patient survival[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61: 1965-1975.
- [6] 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): 502-505.
- [7] Li Y, Geng S, Yin Q, et al. Decreased level of recent thymic emigrants in CD4⁺ and CD8⁺ T cells from CML patients[J]. *J Transl Med*, 2010, 8: 47.
- [8] Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, et al. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10: 864-871.
- [9] Tian T, Yu S, Ma D. Th22 and related cytokines in inflammatory and autoimmune diseases[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2013, 17: 113-125.
- [10] Nograles KE, Zaba LC, Shemer A, et al. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 123: 1244-1252.
- [11] Cella M, Fuchs A, Vermi W, et al. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity[J]. *Nature*, 2009, 457: 722-725.
(收稿日期: 2015-05-07)
- (上接第 227 页)
- [3] Sperr WR, Lechner K, Pabinger I. Rituximab for the treatment of acquired antibodies to factor VIII[J]. *Haematologica*, 2007, 92: 66-71.
- [4] Shetty S, Bhave M, Ghosh K. Acquired hemophilia a: diagnosis, aetiology, clinical spectrum and treatment options[J]. *Autoimmun Rev*, 2011, 10: 311-316.
- [5] Kaneko H, Okada N, Matsui Y, et al. Refractory acquired hemophilia A successfully treated with CVP[J]. *Rinsho Ketsueki*, 2009, 50: 110-112.
- [6] Brzoska M, Krause M, Geiger H, et al. Immunoadsorption with single-use columns for the management of bleeding in acquired hemophilia A: a series of nine cases[J]. *J Clin Apher*, 2007, 22: 233-240.
- [7] Li J, Wang Z, Dai L, et al. Effects of rapamycin combined with low dose prednisone in patients with chronic immune thrombocytopenia[J]. *Clin Dev Immunol*, 2013, 2013: 548085.
- [8] Halleck F, Duerr M, Waiser J, et al. An evaluation of sirolimus in renal transplantation[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2012, 8: 1337-1356.
- [9] Manno R, Boin F. Immunotherapy of systemic sclerosis[J]. *Immunotherapy*, 2010, 2: 863-878.
- [10] Miano M, Poggi V, Banov L, et al. Sirolimus as maintenance treatment in an infant with life-threatening multiresistant pure red cell anemia/autoimmune hemolytic anemia[J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2014, 36: e145-e148.
- [11] Pardos-Gea J, Altisent C, Parra R, et al. Acquired haemophilia A. First line treatment with calcineurin inhibitors and steroid pulses: a 10-year follow-up study[J]. *Haemophilia*, 2012, 18: 789-793.
(收稿日期: 2015-11-03)