

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.05.010

· 临床研究 ·

IL-21 对慢性粒细胞白血病患者调节性 T 细胞的影响

王东萍, 张连生, 曾鹏云, 易良才 (兰州大学第二医院 血液科, 甘肃 兰州 730030)

[摘要] **目的:** 观察白细胞介素 21(interleukin-21, IL-21)对慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)患者 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)的作用,为 CML 的免疫治疗提供新思路。**方法:** 收集兰州大学第二医院血液科初诊 CML 患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs),免疫磁珠法分选出 CD4⁺T 细胞。分别加入 50、100、200 ng/ml IL-21 与 CD4⁺T 细胞共培养 72 h 后,流式细胞术检测 Treg 的比例,并设生理盐水空白对照组。Real-time PCR 法检测 Treg 细胞中 *Foxp3* mRNA 的表达,ELISA 法检测各组细胞上清液中 IL-10、TGF- β 的水平。**结果:** 与空白对照组相比,50、100、200 ng/ml IL-21 组 CD4⁺CD25⁺Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例均降低[(3.42 ± 0.76)%、(6.81 ± 0.33)%、(7.98 ± 0.76)% vs (12.09 ± 0.91)% , $P < 0.05$];且 3 组的 *Foxp3* mRNA 均降低[(0.05 ± 0.02)、(0.16 ± 0.02)、(0.25 ± 0.02)] vs 1, $P < 0.05$];Treg 分泌 IL-10 量减少[(26.13 ± 7.28)、(44.88 ± 3.72)、(79.77 ± 3.94)] vs (133.00 ± 12.32) pg/ml, $P < 0.05$], 分泌 TGF- β 量也减少[(9.25 ± 0.84)、(16.70 ± 1.00)、(20.47 ± 1.60)] vs (26.05 ± 1.81) pg/ml, $P < 0.05$]。**结论:** IL-21 在体外可减少 CML 患者外周血中 Treg 的比例,并抑制其功能。

[关键词] 慢性粒细胞白血病(CML);IL-21;调节性 T 细胞(Treg);IL-10;TGF- β

[中图分类号] R733.7; R730.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)05-0517-04

Effect of IL-21 on regulatory T cells in chronic myeloid leukemia patients

WANG Dong-ping, ZHANG Lian-sheng, ZENG Peng-yun, YI Liang-cai (Department of Hematology, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of interleukin-21(IL-21) on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Tregs) in chronic myeloid leukemia (CML) patients. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected from newly diagnosed CML patients in the Hematology Department of Second Hospital of Lanzhou University, and CD4⁺T cells were isolated by magnetic beads. CD4⁺T cells were co-cultured with IL-21 (50, 100, and 200 ng/ml) and saline respectively for 72 h, and then the Treg ratio was determined by flow cytometry; *Foxp3* mRNA expression was examined by real-time PCR; and IL-10 and TGF- β in different cell supernatants were detected by ELISA. **Results:** Compared with the control group, the ratios of Treg in CD4⁺T cells were decreased in 50 ng/ml, 100 ng/ml and 200 ng/ml IL-21 groups ([3.42 ± 0.76]%, [6.81 ± 0.33]%, [7.98 ± 0.76]% vs [12.09 ± 0.91]%, $P < 0.05$); and *Foxp3* mRNA expressions were also decreased ([0.05 ± 0.02], [0.16 ± 0.02], [0.25 ± 0.02] vs 1, $P < 0.05$), the levels of IL-10 ([26.13 ± 7.28], [44.88 ± 3.72], [79.77 ± 3.94] vs [133.00 ± 12.32] pg/ml, $P < 0.05$) and TGF- β ([9.25 ± 0.84], [16.70 ± 1.00], [20.47 ± 1.59] vs [26.05 ± 1.81] pg/ml, $P < 0.05$) in cell supernatants were significantly decreased. **Conclusion:** IL-21 can inhibit the ratio and function of Treg in peripheral blood of CML patients.

[Key words] chronic myeloid leukemia (CML); IL-21; regulatory T cell (Treg); IL-10; TGF- β

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(5): 517-520]

[基金项目] 甘肃省科技支撑计划-社会发展计划(No.0804NKCA115)。Project supported by the Science and Technology Supporting and Social Development Program of Gansu Province (No.0804NKCA115)

[作者简介] 王东萍(1986-),女,甘肃省兰州市人,硕士生,主要从事肿瘤免疫治疗方面的研究。E-mail:wangdongping1016@126.com

[通信作者] 张连生(ZHANG Lian-sheng, corresponding author),E-mail:zls2170@yahoo.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120926.0850.004.html>

白血病患者体内存在复杂的免疫抑制网络, 调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)增多与疾病的发展、分期呈负相关^[1], 且 Treg 能抑制抗白血病免疫、降低免疫治疗的疗效。减少或抑制白血病患者体内的 Treg 可以达到治疗白血病的目的, 是目前白血病免疫治疗的重点。IL-21 作为一种新型的细胞因子, 具有广泛的生物学效应: 如促进 B 细胞产生抗体, 促进 NK 细胞、CD8⁺ T 细胞的增殖, 同时增加穿孔素、颗粒酶 B 的分泌; 减少 Treg 的产生等^[2]。在白血病患者体内 IL-21 的分泌下调^[3], 其减少与 Treg 的增多是否有相关性; IL-21 是否可降低白血病患者体内的 Treg 目前尚无相关研究。本研究通过体外实验观察 IL-21 对慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)患者 Treg 的影响, 为探索在 CML 免疫治疗中通过减少 Treg 从而打破免疫耐受提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 标本来源

选择兰州大学第二医院血液科初诊未治 CML 患者 9 例, 其中男 5 例、女 4 例, 中位年龄 31 岁。诊断和分期均符合张之南主编的《血液病诊断及疗效标准》, 且不合并自身免疫疾病、炎症性疾病。研究对象均由本人或家属签署知情同意书, 研究程序和治疗方案报医院伦理委员会审查批准。

1.2 主要试剂

RPMI 1640 购自美国 Gibco 公司, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。IL-2 为山东泉港药业有限公司提供, IL-21 购自美国 Peprotech 公司, 人淋巴细胞分离液 Ficoll-hypaque 购自北京 Solarbio 化学试剂公司, RT-PCR 试剂盒购自大连 TaKaRa 公司, CD4、CD25、Foxp3 单抗购自美国 BD 公司, 免疫磁珠分选试剂盒购自 Miltenyi Biotec 公司, ELISA 试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司。

1.3 磁珠法分选 CD4⁺ T 细胞

用 Ficoll 密度梯度离心法分离患者外周血单个核细胞, 计数并调整细胞密度。按 CD4⁺ T 细胞分离试剂盒说明加入适量生物素-抗体混合物及 CD4 抗生物素磁珠, 4℃ 孵育 15 min, 然后在 LD 分选柱上进行 CD4⁺ T 细胞的分选。将分选所得 CD4⁺ T 细胞加入 FITC-抗人 CD4, 4℃ 孵育 30 min, 并于流式机上检测 CD4⁺ T 细胞的纯度。

1.4 IL-21 与 CD4⁺ T 细胞的体外培养

向分选出的 CD4⁺ T 细胞加入 RPMI 1640 完全培养基(其中含 10% 胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、IL-2 100 U/ml), 并调整细胞浓度至 2×10^4 /ml, 加

入 12 孔培养板, 分别加入 50、100、200 ng/ml IL-21 (低、中、高剂量实验组), 每组 3 复孔, 并设生理盐水空白对照, 置于 5% CO₂、37℃ 饱和湿度培养箱中培养, 每日倒置显微镜观察细胞形态变化及生长情况, 72 h 后收集各组细胞。

1.5 流式细胞术检测各组细胞 Treg 比例

流式细胞仪检测 Treg 的表面标志及其比例, 在每个流式上样管中加入准备好的细胞悬液, 细胞数约为 1×10^6 个, 洗涤 2 遍。每组分为两管: 实验组和阴性对照组, 分别加入 CD4、CD25 单抗, 混匀后 4℃ 避光孵育 30 min, 离心 $1\,000 \times g$, 5 min, 弃上清, 加 1 ml 破膜剂, 4℃ 避光孵育 12 min, 离心 $1\,000 \times g$, 5 min, 弃上清。实验组加入稀释好的荧光标记 Foxp3 抗体 2.5 μl, 阴性对照组加入 IgG1 对照抗体, 4℃ 避光孵育 30 min, 洗涤, 离心, 加入 500 μl PBS 混匀, 上机检测。

1.6 Real-time PCR 检测各组细胞 Foxp3 mRNA 的表达

TRIzol 法从各组细胞中提取总 RNA, 逆转录获取 cDNA 后进行 PCR 扩增。目的基因 Foxp3 引物: 上游 5'-GGGTAGCCATGGAAACAGCA-3', 下游 5'-TCG-CATGTTGTGGAACCTGAAGTAG-3', 扩增片段长度为 73 bp。内参基因 β-actin 引物: 上游 5'-TGGCAC-CCAGCACAATGAA-3', 下游 5'-CTAAGTCATAGTC-CGCCTAGAAGCA-3', 扩增片段长度为 112 bp。反应体系 10 μl, 94℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环。结果 ΔCT 值由每组的基因的 CT 值减去 β-actin 的 CT 值得到, ΔΔCT 值为各组与空白对照组的 ΔCT 之差, 最后以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值表示结果。

1.7 ELISA 法检测上清中 IL-10 及 TGF-β 的水平

取各组细胞培养上清液, 用 ELISA 法分别测定 IL-10 及 TGF-β 的含量。具体操作按试剂盒说明书进行。

1.8 统计学处理

采用 SPSS11.0 统计软件, 所测数据用以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用方差分析, 进一步组间比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-21 处理的各组 CD4⁺ T 细胞生长良好

每日倒置显微镜下观察各组 CD4⁺ T 细胞形态及数量, 细胞呈圆形悬浮生长, 大小均等, 分散分布, 偶见成团, 折光性强, 表明细胞生长良好, 无污染, 可进行下一步实验。

2.2 IL-21 处理后各组细胞 Treg 比例均降低

各组 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3 免疫表型结果(图 1)

显示,与空白对照组相比,50、100、200 ng/ml 组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞占 CD4⁺T 的比例均降低[(3.42 ± 0.76)%、(6.81 ± 0.33)%、(7.98 ± 0.76)% vs (12.09 ± 0.91)% , $P < 0.05$]。因此,IL-21 干预后 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 比例均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

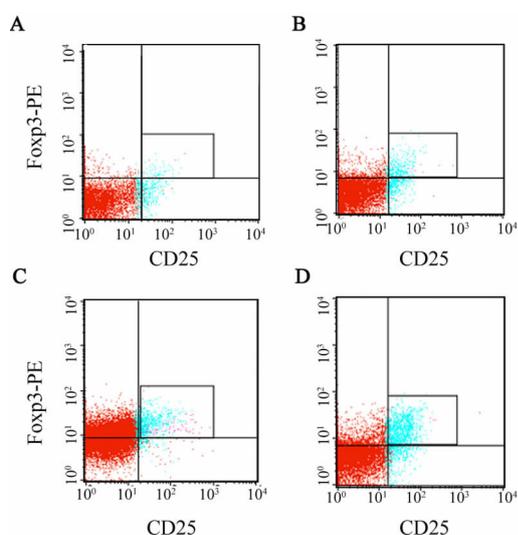


图1 流式细胞术检测各组 Treg 细胞比例

Fig.1 Ratio of Treg cells in different groups detected by flow cytometry

A: 50 ng/ml IL-21; B: 100 ng/ml IL-21;

C: 200 ng/ml IL-21; D: Control

2.3 IL-21 处理后各组细胞的 *Foxp3* mRNA 均降低

采用 real-time PCR 技术检测 *Foxp3* mRNA 的表达水平,3 种不同浓度的 IL-21 共培养后,与空白对照组相比较(将空白对照组标化为 1),则 50、100、200 ng/ml IL-21 共培养后,各组细胞的 *Foxp3* mRNA 较空白对照组均有降低[(0.05 ± 0.02)、(0.16 ± 0.02)、(0.25 ± 0.02) vs 1, $P < 0.05$]。

2.4 IL-21 处理降低细胞培养上清中 IL-10、TGF- β 的水平

采用 ELISA 法检测培养上清中的 IL-10、TGF- β 的水平。加入 IL-21 共培养后,与空白对照组相比,50、100、200 ng/ml IL-21 组细胞的 IL-10 水平较空白对照组均降低[(26.13 ± 7.28)、(44.88 ± 3.72)、(79.77 ± 3.94) vs (133.00 ± 12.32) pg/ml, $P < 0.05$];并且分泌 TGF- β 也减少[(9.25 ± 0.84)、(16.7 ± 1.00)、(20.47 ± 1.60) vs (26.05 ± 1.81) pg/ml, $P < 0.05$]。

3 讨论

CML 是造血细胞恶性疾病,伴随多种免疫细胞

功能异常:Treg 细胞增多,NK 细胞、CD8⁺ T 细胞功能减弱,树突状细胞的抗原提呈功能减弱,pDC 分泌 IFN- α 的能力减弱等。其中 Treg 细胞是一种免疫抑制细胞。天然性 Treg (natural occurring Treg, nTreg) 来自胸腺,在外周介导免疫耐受,并阻止自身免疫性疾病的发生;Treg 细胞的另一个亚群是诱导性 Treg (induced Treg, iTreg)。白血病细胞可诱导 iTreg 的产生,在 TGF- β 、PGE₂ 等存在下诱导 CD4⁺CD25⁻ 细胞转变为 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞^[4],所以在白血病中 Treg 增多,且与治疗疗效、疾病的分期和预后呈负相关^[5]。Zhou 等^[6]亦证实,在急性髓细胞白血病患者体内 CD4⁺CD25⁻ 细胞通过色氨酸分解代谢转变为 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞,导致 Treg 增多。Treg 可通过细胞接触直接诱导效应性 T 细胞凋亡,并抑制其功能^[7],分泌抑制性细胞因子 IL-10、TGF- β ,抑制树突状细胞的成熟,发挥免疫抑制作用。Foxp3 对 Treg 的分化发育及发挥免疫作用起重要作用^[8]。IL-10 和 TGF- β 是 Treg 发挥免疫抑制功能的两种主要细胞因子^[7]。

细胞因子具有广泛的生物学作用,在机体免疫反应中有着不可代替的作用。IL-21 是 IL-2 家族的新型细胞因子,由活化的 CD4⁺ T 细胞、Th17、NKT 细胞产生。IL-21 受体是异质二聚体,由 IL-21R 和 γ_c (CD123) 两个亚单位组成。IL-21 受体复合物可在淋巴组织中检测到,也表达于各种细胞如 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、树突状细胞、巨噬细胞及角质细胞^[4]。IL-21 通过 JAK/STAT 信号通路传递信号^[9]。传递信号时,IL-21R 与 JAK1 结合,而 γ_c 与 JAK3 结合,进一步转导至核内,主要活化 STAT1、STAT3,但较少活化 STAT4 和 STAT5^[10]。

白血病患者体内 Treg 细胞明显增高^[11]参与白血病的免疫病理过程;而苏梅芳等^[3]证实,在白血病患者体内 IL-21 的分泌减少。这两者是否有相关性? IL-21 的减低是否导致 Treg 明显增高? IL-21 是否可以通过减少白血病患者体内 Treg 细胞数量来降低 Treg 的功能,从而发挥抗肿瘤作用,该方面尚无相关报道。本实验将 IL-21 与 CML 患者 CD4⁺ T 细胞体外共培养,观察 IL-21 是否可以抑制 T 细胞向 Treg 的分化,同时了解 IL-21 对 Treg 在数量和功能方面的影响。通过倒置显微镜及免疫表型分析证实,不同浓度的 IL-21 均可降低 Treg 比例,其中以 50 ng/ml 的效果最为显著,且不呈浓度依赖性,可能的机制是 IL-21 浓度越高促进效应性 T 细胞的作用越强,而对 Treg 的抑制作用则减弱^[12]。在此基础上,运用 real-time PCR 技术对各组细胞中 *Foxp3*

mRNA 表达水平进行检测, 与免疫表型结果相似, IL-21 处理各组 *Foxp3* mRNA 均有所降低。同时采用 ELISA 法测定培养上清中 IL-10、TGF- β 的含量, 结果 IL-21 处理各组细胞上清中 IL-10、TGF- β 水平明显下降, 说明 IL-21 减少 Treg、降低 *Foxp3* mRNA 的表达与抑制细胞因子的分泌是一致的。

Treg 细胞能抑制自身反应性 T 细胞的活化和增殖。Peluso 等^[13]和 Li 等^[14]的研究证实, IL-21 可以增强自身反应性 T 细胞对 Treg 抑制作用的抵抗, IL-21 使得自身反应性 T 细胞在 Treg 存在的条件下仍可增殖。

本实验通过体外实验证实 IL-21 可减少 CML 患者 Treg, 可能的机制为: (1) IL-21 抑制 TGF- β 介导的 CD4⁺ CD25⁻ 细胞中 *Foxp3* 的表达。(2) IL-21 减少细胞中 *Foxp3* 的表达, 抑制 *Foxp3* 基因转录。(3) IL-21 阻止 TGF- β 依赖的 Treg 的产生, IL-21 抑制 TGF- β 在 CD4⁺ CD25⁻ T 细胞表达的同时抑制其在体外的功能^[15]。(4) IL-21 可促进 Treg 凋亡并抑制它的活性, 同时增强效应性 T 细胞对 Treg 抑制作用的抵抗, 克服 Treg 介导的抑制作用^[13]。(5) IL-21 诱导 Treg 细胞信号通路中 STAT3 磷酸化。IL-2 可通过诱导 STAT5 磷酸化上调 *Foxp3*, 所以与 IL-2 相比, IL-21 在肿瘤免疫治疗中可取得更长久的疗效, 减少肿瘤复发^[16]。

综上所述, 本研究证实, IL-21 在体外可降低 CML 患者 Treg 细胞的比例并抑制其功能, 为 CML 的免疫治疗提供了依据。现已证实 IL-21 在早期肾细胞癌及黑色素瘤 I 期和 II 期临床试验中安全可靠^[17], 所以 IL-21 单独或联合应用于白血病的临床治疗将成为可能。由于 IL-21 在自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮、硬皮病、多发性硬化病和类风湿关节炎中浓度增高^[18]。为使机体免疫系统达到平衡, 在抗白血病治疗的同时应避免自身免疫性疾病的发生, 因此, IL-21 浓度不宜过高。在今后的研究中, 可继续观察不同浓度, 尤其更小浓度的 IL-21 对血液系统其他恶性肿瘤中 Treg 的抑制作用及其对 CD4⁺ T 细胞向 Th1、Th2、Th17 分化的影响。

[参 考 文 献]

[1] Wang X, Zheng J, Liu J, et al. Increased population of CD4(+) CD25(high) regulatory T cells with their higher apoptotic and proliferating status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients [J]. Eur J Haematol, 2005, 75(6): 468-476.

[2] Andorsky DJ, Timmerman JM. Interleukin-21: Biology and application to cancer therapy [J]. Expert Opin Biol Ther, 2008, 8(9): 1295-1307.

[3] 苏梅芳, 昌锋, 咏梅, 等. IL-17 和 IL-21 在急性白血病患者中

的表达及意义 [J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(5): 1143-1146.

- [4] Ma J, Ma D, Ji C. The role of IL-21 in hematological malignancies [J]. Cytokine, 2011, 56(2): 133-139.
- [5] Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, et al. Correlation of high numbers of intratumoral *Foxp3*⁺ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma [J]. Haematologica, 2008, 93(2): 193-200.
- [6] Zhou Q, Bucher C, Munger M E, et al. Depletion of endogenous tumor-associated regulatory T cells improves the efficacy of adoptive cytotoxic T-cell immunotherapy in murine acute myeloid leukemia [J]. Blood, 2009, 114(18): 3793-3802.
- [7] Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function [J]. Autoimmun Rev, 2008, 7(5): 370-375.
- [8] 孙磊, 易寿南, 陈丽. 下调 *Foxp3* 基因表达对人调节性 T 细胞功能的影响 [J]. 中华医学杂志, 2011, 91(30): 2124-2128.
- [9] de Toter D, Meazza R, Capaia M, et al. The opposite effects of IL-15 and IL-21 on CLL B cells correlate with differential activation of the JAK/STAT and ERK1/2 pathways [J]. Blood, 2008, 111(2): 517-524.
- [10] Monteleone G, Pallone F, MacDonald TT. Interleukin-21 as a new therapeutic target for immune-mediated diseases [J]. Trends Pharmacol Sci, 2009, 30(8): 441-447.
- [11] 黄建霞, 张连生, 易良才, 等. 急性白血病患者外周血 Treg 细胞与 Th17 细胞的相关性 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(4): 430-433.
- [12] Comes A, Rosso O, Orengo AM, et al. CD25⁺ regulatory T cell depletion augments immunotherapy of micrometastases by an IL-21-secreting cellular vaccine [J]. J Immunol, 2006, 176(3): 1750-1758.
- [13] Peluso I, Fantini MC, Fina D, et al. IL-21 counteracts the regulatory T cell-mediated suppression of human CD4⁺ T lymphocytes [J]. J Immunol, 2007, 178(2): 732-739.
- [14] Li Y, Yee C. IL-21 mediated *Foxp3* suppression leads to enhanced generation of antigen-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes [J]. Blood, 2008, 111(1): 229-235.
- [15] Fantini MC, Rizzo A, Fina D, et al. IL-21 regulates experimental colitis by modulating the balance between Treg and Th17 cells [J]. Eur J Immunol, 2007, 37(11): 3155-3163.
- [16] Wuest TY, Willette-Brown J, Durum SK, et al. The influence of IL-2 family cytokines on activation and function of naturally occurring regulatory T cells [J]. J Leukoc Biol, 2008, 84(4): 973-980.
- [17] Hashmi MH, Van Veldhuizen PJ. Interleukin-21: Updated review of Phase I and II clinical trials in metastatic renal cell carcinoma, metastatic melanoma and relapsed/refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma [J]. Expert Opin Biol Ther, 2010, 10(5): 807-817.
- [18] Davis ID, Skak K, Smyth MJ, et al. Interleukin-21 signaling: Functions in cancer and autoimmunity [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(23): 6926-6932.

[收稿日期] 2012-06-11

[修回日期] 2012-08-14

[本文编辑] 韩丹, 周玲琳