

重型再生障碍性贫血患者SLAMF6表达状态的初步研究

曾立洁 刘春燕 丁少雪 张田 邵宗鸿 付蓉

【摘要】 目的 探讨SLAMF6在重型再生障碍性贫血(SAA)CD8⁺T细胞中的表达情况及其与疾病免疫状态的相关性。方法 选取2017年2月至2018年4月天津医科大学总医院血液科收治的初治SAA患者21例,以15例健康人外周血标本作为正常对照,应用流式细胞术(FCM)检测外周血CD8⁺T细胞SLAMF6表达量,并与患者HGB、PLT、中性粒细胞绝对值、网织红细胞绝对值、骨髓造血功能(粒系百分比、红系百分比、淋系百分比、巨核细胞数)等临床指标及CD8⁺T细胞功能分子穿孔素、颗粒酶B、IFN- γ 表达量进行相关性分析。进一步采用anti-SLAMF6 Ab阻断其功能,FCM检测CD8⁺T细胞穿孔素、颗粒酶B、IFN- γ 分泌量。结果 初治SAA患者CD8⁺T细胞SLAMF6表达量明显低于正常对照,差异有统计学意义[(56.29 \pm 12.97)%对(80.96 \pm 7.36)%, $t = -7.672, P < 0.001$];初治SAA患者CD8⁺T细胞SLAMF6表达量与HGB、PLT、中性粒细胞绝对值、网织红细胞绝对值、骨髓粒系百分比、骨髓红系百分比均呈正相关($P < 0.05$),与CD8⁺T细胞穿孔素、颗粒酶B、IFN- γ 表达量均呈负相关($P < 0.05$);anti-SLAMF6 Ab阻断该信号分子后,初治SAA患者CD8⁺T细胞anti-SLAMF6 Ab处理组穿孔素、颗粒酶B、IFN- γ 表达量较未处理组明显增多,差异有统计学意义(P 值均 < 0.05)。结论 SLAMF6在SAA患者CD8⁺T细胞中明显低表达,其可能作为负性免疫调节分子通过影响CD8⁺T细胞功能分子的分泌参与SAA的发生机制。

【关键词】 再生障碍性贫血; SLAMF6; T淋巴细胞亚群

A preliminary study on SLAMF6 expression in patients with severe aplastic anemia Zeng Lijie, Liu Chunyan, Ding Shaoxue, Zhang Tian, Shao Zonghong, Fu Rong. Department of Hematology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China
Corresponding author: Fu Rong, Email: florai@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the expression of SLAMF6 on CD8⁺T cells in patients with severe aplastic anemia (SAA) and its correlation with disease immune status. **Methods** By flow cytometry (FCM), SLAMF6 expression level in peripheral blood CD8⁺T cells was detected in 21 patients with SAA and 15 normal controls respectively from February 2017 to April 2018. The correlation between SLAMF6 expression level and hematopoietic functions, including HGB, PLT, the neutrophil granulocyte and reticulocyte absolute value in peripheral blood, hyperplasia degree (percentage of granulocytes, erythrocytes, lymphocytes and megakaryocytes in bone marrow) and perforin, granzyme B, IFN- γ expression level in CD8⁺T cells were evaluated. To further confirm the effect of SLAMF6 on CD8⁺T cells, anti-SLAMF6 Ab was used to block SLAMF6 pathway (IgG as control), and FCM was used to detect the perforin, granzyme B, and IFN- γ production of CD8⁺T cells. **Results** The expression of SLAMF6 on CD8⁺T cells in untreated SAA patients [(56.29 \pm 12.97)%] was significantly lower than that of normal controls [(80.96 \pm 7.36)%] ($t = -7.672, P < 0.001$). The expression of SLAMF6 on CD8⁺T cells in SAA patients were positively correlated with the HGB, PLT, the neutrophil granulocyte and reticulocyte absolute value in peripheral blood, percentage of granulocytes, erythrocytes in bone marrow (all $P < 0.05$), but they were negatively correlated with the percentage of lymphocytes in bone marrow, and the expression of perforin, granzyme B, and IFN- γ of CD8⁺T cells (all $P < 0.05$). After blocking SLAMF6 pathway by anti-SLAMF6 Ab, the expression levels of perforin, granzyme B and IFN- γ in SAA patients were significantly

higher than those in the untreated group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$).

Conclusions SLAMF6 is significantly down-regulated on CD8⁺ T cells in SAA patients, which may act as a negative immunoregulatory molecule participating in the mechanism of SAA by affecting the functional molecules secretion on CD8⁺ T cells.

【Key words】 Aplastic anemia; SLAMF6; T lymphocyte subsets

重型再生障碍性贫血(SAA)是以骨髓造血功能衰竭为特征的血液系统重症。免疫抑制治疗(IST)为年轻无同胞相合供者的SAA患者的首选治疗方案。IST联合促造血治疗SAA的缓解率达70%,但仍有近30%的患者治疗无效。因此进一步探索SAA免疫发病机制,开拓新的治疗方向、建立有效的诊断及判断预后的指标至关重要。本研究中我们分析SLAMF6在SAA患者CD8⁺ T细胞中的作用机制,探索该分子在SAA免疫发病机制中所扮演的角色,为进一步明确SAA免疫发病机制提供理论基础。

对象与方法

1. 病例:以天津医科大学总医院血液科2017年2月至2018年4月收治的21例初治SAA患者为研究对象,男10例,女11例,中位年龄45(24~75)岁,诊断及疗效标准符合《再生障碍性贫血诊断与治疗中国专家共识(2017年版)》^[1]。以15例正常健康人为正常对照,男8例,女7例,中位年龄32(21~58)岁。方案获天津医科大学伦理委员会批准,所有研究对象签署知情同意书。

2. 主要试剂与仪器:鼠抗人CD3-FITC(APC)、CD8-PerCP(FITC)、SLAMF6-PE、IFN- γ -APC、穿孔素-PE、颗粒酶B-PE单抗、同型对照、溶血素、破膜剂、佛波酯、离子霉素、蛋白转运抑制剂等均购自美国BD公司。anti-SLAMF6-Ab购自德国美天旎公司。流式细胞仪为美国BD公司FACS Calibur。

3. 胞膜蛋白标记:实验管中加入鼠抗人SLAMF6、CD8和CD3的荧光标记单克隆抗体5 μ l,对照管加入相应的同型对照抗体,每管中分别加入肝素抗凝全血50 μ l,混匀,4 $^{\circ}$ C避光孵育15 min,加入1 ml溶血素,室温避光8 min溶解红细胞,离心弃上清,PBS洗2次,上机检测。

4. 胞质蛋白标记:将50 μ l破膜剂加入上述溶血后的标本,分别加入穿孔素-PE、颗粒酶B-PE、IFN- γ -APC单抗各5 μ l,4 $^{\circ}$ C避光孵育15 min,破膜固定,PBS洗2次,上机检测。

5. 体外anti-SLAMF6 Ab阻断实验:取5例初治

SAA患者外周血标本与含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基1:2混合置于24孔培养板,每孔500 μ l,加入anti-SLAMF6 Ab及对照抗体山羊IgG(终浓度10 μ g/ml)37 $^{\circ}$ C孵育6 h,检测IFN- γ 表达需同时加入佛波酯(终浓度25 ng/ml)、离子霉素(终浓度1 μ g/ml)、蛋白转运抑制剂(终浓度10 μ g/ml),收集细胞于流式管中,处理标本方法同上,上机检测,实验设2个复孔,重复2次。

6. 统计学处理:采用SPSS 23.0统计软件进行分析,对符合正态分布且方差齐性的计量资料,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验,相关性分析采用Spearman法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

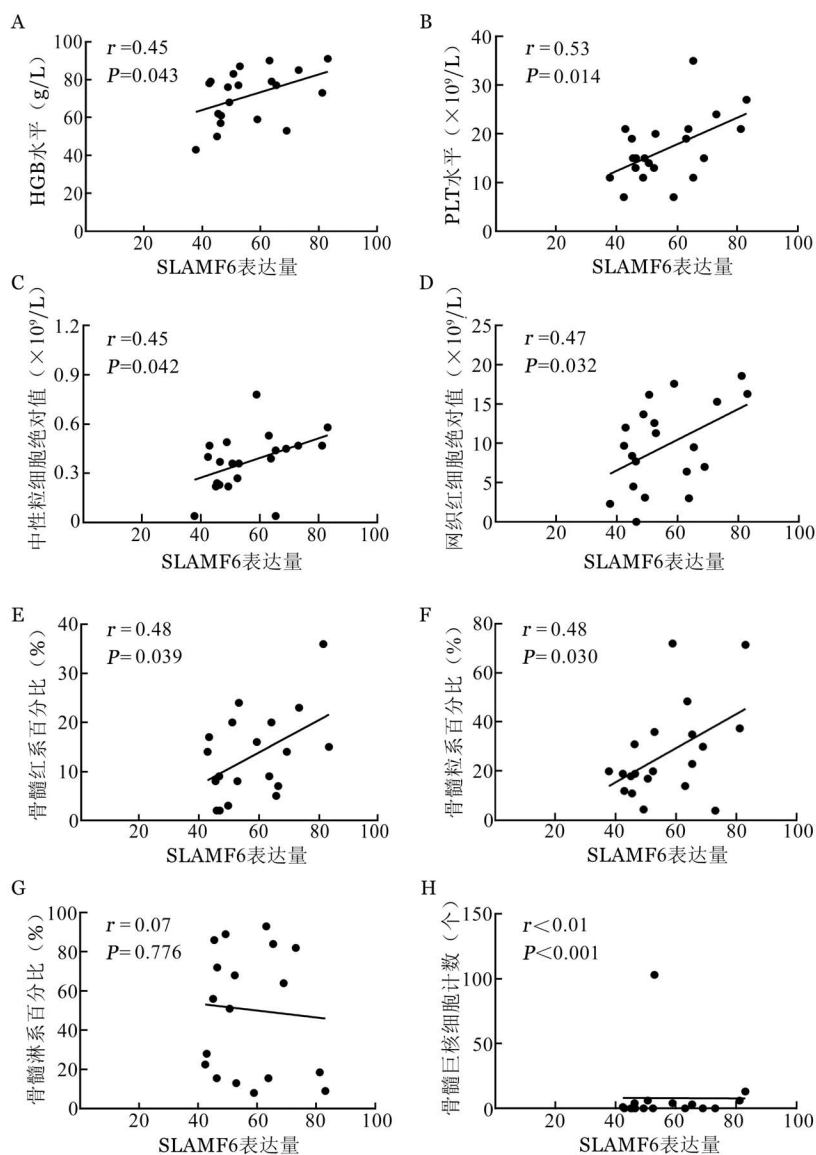
结 果

1. SAA患者CD8⁺ T细胞SLAMF6的表达量:初治SAA患者外周血CD8⁺ T细胞SLAMF6的表达量为(56.29 \pm 12.97)%,明显低于正常对照的(80.96 \pm 7.36)%($t = -7.672, P < 0.001$)。

2. SLAMF6表达量与临床指标相关性分析:初治SAA患者外周血CD8⁺ T细胞SLAMF6表达量与HGB($r = 0.45$)、PLT($r = 0.53$)、中性粒细胞绝对值($r = 0.45$)、网织红细胞绝对值($r = 0.47$)、骨髓粒系百分比($r = 0.48$)、骨髓红系百分比($r = 0.48$)均呈正相关(P 值均 < 0.05),与骨髓淋系百分比、骨髓巨核细胞数无明显相关性(图1)。

3. SLAMF6表达量与CD8⁺ T细胞功能分子表达相关性分析:初治SAA患者外周血CD8⁺ T细胞SLAMF6表达量与CD8⁺ T细胞穿孔素($r = -0.45$)、颗粒酶B($r = -0.48$)、IFN- γ ($r = -0.44$)表达均呈负相关(P 值均 < 0.05)(图2)。

4. 体外实验穿孔素、颗粒酶B、IFN- γ 表达情况分析:anti-SLAMF6 Ab作用于SAA患者CD8⁺ T细胞后,anti-SLAMF6 Ab组与未处理组相比,CD8⁺ T细胞穿孔素表达上调[(51.96 \pm 14.59)%对(37.48 \pm 13.79)%, $t = -4.967, P = 0.008$]、颗粒酶B表达上调[(50.22 \pm 16.02)%对(37.18 \pm 12.61)%, $t = -4.406, P = 0.012$]、IFN- γ 表达上调[(62.14 \pm 15.77)%对(45.18 \pm 15.02)%, $t = -4.420, P = 0.012$](图3)。



A:HGB;B:PLT;C:中性粒细胞绝对值;D:网织红细胞绝对值;E:骨髓红系比例;F:骨髓粒系比例;G:骨髓淋系比例;H:骨髓巨核细胞计数

图1 初治重型再生障碍性贫血患者CD8⁺T细胞SLAMF6表达量与临床指标相关性分析

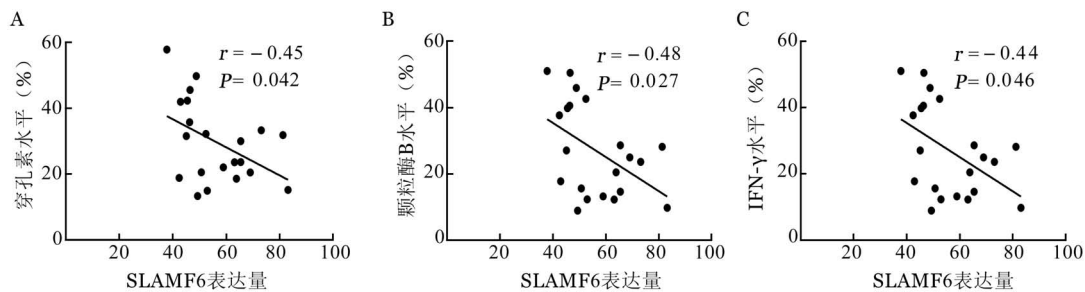


图2 初治重型再生障碍性贫血患者CD8⁺T细胞SLAMF6表达量与CD8⁺T细胞功能分子穿孔素(A)、颗粒酶B(B)、IFN- γ (C)表达相关性分析

讨论

SAA是以全血细胞重度减少和骨髓造血功能衰竭为特点的血液系统重症,临床表现为严重的贫

血、出血和感染,致死率高预后差。绝大多数SAA属获得性,目前认为T淋巴细胞异常活化、功能亢进造成骨髓损伤在获得性SAA发病机制中占主要地位。并且自从1970年引入强化免疫抑制治疗以来,

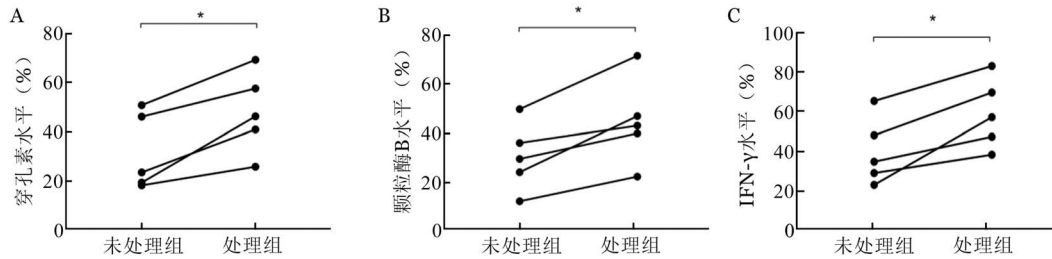


图3 体外实验比较anti-SLAMF6 Ab处理与否再生障碍性贫血患者CD8⁺T细胞穿孔素(A)、颗粒酶B(B)及IFN- γ (C)表达水平

以及支持治疗的优化,SAA患者的预后已取得明显改善。对年龄>35岁或年龄虽≤35岁但无HLA相合同胞供者的SAA患者首选ATG/ALG和环孢素A(CsA)的IST^[2-3],因此,近年来对于SAA的发病机制集中于其免疫状态的研究。

SAA患者体内重要的效应细胞CTL(主要为CD8⁺T细胞)数量增多、功能增强,体外实验证实对骨髓造血细胞具有明显的抑制作用^[4]。Risitano等^[5]扩增AA患者外周血T细胞受体(TCR)-V β ,通过测序技术发现AA患者TCR-V β 的互补可变区3(CDR3)出现数个寡克隆或单克隆峰,含CDR3优势克隆的CD8⁺T细胞比例明显增高,CDR3优势克隆的含量与AA患者病情呈正相关。穿孔素、颗粒酶B作为CTL主要效应分子,是其发挥功能很重要的一环。激活的CTL与靶细胞结合后脱颗粒释放的穿孔素可直接插入靶细胞膜导致靶细胞渗透性溶解,或是通过在靶细胞膜上形成的孔道协同颗粒酶B启动靶细胞凋亡程序损伤细胞^[6]。本课题组前期研究表明穿孔素PRF1基因突变可能是部分SAA患者的遗传易感因素^[7]。Lin等^[8]及Chen等^[9]通过建立IFN- γ ARE-del小鼠模型发现骨髓微环境中的IFN- γ 可直接抑制骨髓三系造血祖细胞的增殖和多系分化,从而造成再生障碍性贫血等骨髓衰竭性疾病。CD8⁺T细胞比例、穿孔素、颗粒酶B及IFN- γ 表达量在SAA患者中明显升高,在SAA的发生发展中起重要作用,且免疫抑制有效的SAA患者CD8⁺T细胞内这些效应分子明显下调^[3,10]。故CD8⁺T细胞的功能亢进在SAA发病中发挥了重要作用,如何拮抗该细胞功能亦成为临床及科研研究的重点。

SLAMF6是信号转导淋巴细胞激活分子家族(SLAMF)的一员,在NK、T、B等免疫细胞上均有表达^[11]。Wang等运用基因敲除技术发现SLAMF6^{-/-}小鼠Th1类细胞因子增多、Th2类细胞因子缺陷^[12-13]。SLAMF6起到负性调控自身免疫性疾病的

作用,SLAMF6在系统类型红斑狼疮(SLE)中发挥的重要作用已有报道,例如SLAMF6表达量与狼疮活动度呈正相关,其通过改变Th17^[14]或IFN- γ ^[15]的产生参与疾病进程,Eisenberg等^[16]通过体内或体外实验研究发现,SLAMF6可激活CD8⁺T细胞生物学功能,从而在肿瘤免疫方面发挥重要作用。因此,本研究我们致力于探索SLAMF6是否对SAA的发生发挥作用,是否参与CD8⁺T细胞功能亢进等SAA免疫失衡环节。通过临床检测发现,初治SAA患者外周血CD8⁺T细胞SLAMF6表达明显下降,相关性分析结果亦显示CD8⁺T细胞SLAMF6表达量与HGB、PLT、中性粒细胞绝对值、网织红细胞绝对值、骨髓红系百分比、骨髓粒系百分比呈正相关,与穿孔素、颗粒酶B、IFN- γ 表达量呈负相关,提示SLAMF6可能参与SAA疾病进程。其中,SAA患者外周血CD8⁺T细胞SLAMF6表达量与骨髓淋系百分比、骨髓巨核细胞数无明显相关性,可能与样本数量尚少,SAA患者残存骨髓造血干细胞数量、质量,对血小板生成素反应,血常规恢复记录时间及个体异质性有关^[17]。体外利用anti-SLAMF6 Ab封闭SLAMF6信号途径后,进一步促进CD8⁺T细胞穿孔素、颗粒酶B、IFN- γ 的分泌,基于这个结果,我们认为SLAMF6的低表达可能是引起CD8⁺T细胞进一步激活而导致SAA骨髓衰竭,加重疾病进程的重要因素。

综上所述,SLAMF6在SAA患者CD8⁺T细胞中明显低表达,且与SAA患者血红蛋白、血小板、中性粒细胞绝对值、网织红细胞绝对值、骨髓造血功能等临床指标呈正相关,与CD8⁺T细胞功能分子穿孔素、颗粒酶B、IFN- γ 表达量呈负相关,anti-SLAMF6 Ab阻断SLAMF6后,CD8⁺T细胞穿孔素、颗粒酶B、IFN- γ 明显增高,提示SLAMF6与SAA的发生发展密切相关,其可能作为负性免疫调节分子通过促进CD8⁺T细胞功能亢进参与SAA的发生机

制。SLAMF6参与SAA的具体机制将在我们今后的研究中进一步明确。

参考文献

- [1] 中华医学会血液学分会红细胞疾病(贫血)学组. 再生障碍性贫血诊断与治疗中国专家共识(2017年版)[J]. 中华血液学杂志, 2017, 38(1): 1-5. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.01.001.
- [2] Scheinberg P, Young NS. How I treat acquired aplastic anemia [J]. Blood, 2012, 120(6): 1185-1196. DOI: 10.1182/blood-2011-12-274019.
- [3] Zeng Y, Katsanis E. The complex pathophysiology of acquired aplastic anaemia [J]. Clin Exp Immunol, 2015, 180(3):361-370. DOI: 10.1111/cei.12605.
- [4] Xing L, Liu C, Fu R, et al. CD8+HLA-DR+ T cells are increased in patients with severe aplastic anemia [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(3):1252-1258. DOI: 10.3892/mmr.2014.2344.
- [5] Risitano AM, Maciejewski JP, Green S, et al. In-vivo dominant immune responses in aplastic anaemia: molecular tracking of putatively pathogenetic T-cell clones by TCR beta-CDR3 sequencing [J]. Lancet, 2004, 364(9431): 355-364. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16724-X.
- [6] Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis [J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(12):940-952. DOI: 10.1038/nri1983.
- [7] 张剑, 付蓉, 王君, 等. 获得性重型再生障碍性贫血患者穿孔素基因突变检测 [J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 26(2):431-434.
- [8] Lin FC, Karwan M, Saleh B, et al. IFN- γ causes aplastic anemia by altering hematopoietic stem/progenitor cell composition and disrupting lineage differentiation [J]. Blood, 2014, 124(25): 3699-3708. DOI: 10.1182/blood-2014-01-549527.
- [9] Chen J, Feng X, Desierto MJ, et al. IFN- γ -mediated hematopoietic cell destruction in murine models of immune-mediated bone marrow failure [J]. Blood, 2015, 126(24):2621-2631. DOI: 10.1182/blood-2015-06-652453.
- [10] Sloan E, Kim S, Maciejewski JP, et al. Intracellular interferon-gamma in circulating and marrow T cells detected by flow cytometry and the response to immunosuppressive therapy in patients with aplastic anemia [J]. Blood, 2002, 100(4):1185-1191. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0035.
- [11] Cannons JL, Tangye SG, Schwartzberg PL. SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity [J]. Annu Rev Immunol, 2011, 29:665-705. DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409-101302.
- [12] Wang N, Keszei M, Halibozek P, et al. Slamf6 negatively regulates autoimmunity [J]. Clin Immunol, 2016, 173:19-26. DOI: 10.1016/j.clim.2016.06.009.
- [13] Wang N, Halibozek PJ, Yigit B, et al. Negative regulation of humoral immunity due to interplay between the SLAMF1, SLAMF5, and SLAMF6 receptors [J]. Front Immunol, 2015, 6: 158. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00158.
- [14] Chatterjee M, Hedrich CM, Rauen T, et al. CD3-T cell receptor co-stimulation through SLAMF3 and SLAMF6 receptors enhances ROR γ t recruitment to the IL17A promoter in human T lymphocytes [J]. J Biol Chem, 2012, 287(45):38168-38177. DOI: 10.1074/jbc.M112.415067.
- [15] Chatterjee M, Kis-Toth K, Thai TH, et al. SLAMF6-driven co-stimulation of human peripheral T cells is defective in SLE T cells [J]. Autoimmunity, 2011, 44(3):211-218. DOI: 10.3109/08916934.2010.530627.
- [16] Eisenberg G, Engelstein R, Geiger-Maor A, et al. Soluble SLAMF6 receptor induces strong CD8+ T-cell effector function and improves anti-melanoma activity in vivo [J]. Cancer Immunol Res, 2018, 6(2):127-138. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0383.
- [17] Boddu P, Garcia-Manero G, Ravandi F, et al. Clinical outcomes in adult patients with aplastic anemia: a single institution experience [J]. Am J Hematol, 2017, 92(12): 1295-1302.

(收稿日期:2018-05-26)

(本文编辑:刘爽)

·读者·作者·编者·

作者投稿须知

1. 按本刊要求写作:登录《中华血液学杂志》网站(<http://www.hematoline.com>),参见首页作者中心栏中的“投稿须知”及“写作指导”栏目。

2. 作者注册:请打开本刊网站首页点击“在线投稿”即进入中华医学会网站(<http://www.cma.org.cn>)。在网站首页注册并申请为杂志作者(用户名和密码为您在中华医学会统一的登录信息,请牢记!忘记密码可通过电子信箱索取)。

3. 投稿:注册成功后进入“业务中心”。点击【远程稿件管理系统】,相应的功能即显示在下方。点击“作者投稿”,按要求填写内容,摘要在字数允许范围内尽可能详细,并上传原稿(点击“暂存”稿件进入【我的草稿】模块)。选择《中华血液学杂志》,并点击“投稿”。

4. 邮寄纸稿及介绍信:请在投稿平台上下载论文投递介绍信及授权书,签字盖章后连同原稿打印件(注明稿件编号)一并寄至本刊编辑部。

本刊编辑部