

IL10-592位点AA基因型对HLA-10/10全相合无关供者异基因造血干细胞移植预后的影响

杨志洛 邱桥成 丁子轩 潘芝娟 赵勤勤 何军

【摘要】目的 研究供患者IL10基因-592(rs1800872)单核苷酸多态性位点(SNP)不同基因型对HLA全相合无关供者异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)预后的影响。**方法** 104对HLA全相合供者和100名健康人的DNA样本,均采用Sanger法基因测序技术检测IL10-592位点SNP,并结合临床资料分析不同基因型对allo-HSCT各预后因素的影响。**结果** 当供患者IL10-592位点基因型相同且分别为AA/AA、AC/AC、CC/CC时,移植后Ⅲ~Ⅳ度急性移植物抗宿主病(aGVHD)发生率分别为47.1%、3.7%和0,三组间差异有统计学意义($P=0.002$)。当供患者IL10-592位点基因型不同,且患者为AA或供者为AA基因型时,不同基因型组合Ⅲ~Ⅳ度aGVHD发生率差异均有统计学意义($P=0.046$, $P=0.041$)。当患者IL10-592位点为AA、AC、CC基因型时,移植后Ⅲ~Ⅳ度aGVHD发生率分别为27.8%、10.2%、11.1%($P=0.072$);肠道aGVHD的发生率分别为22.2%、5.1%、11.1%($P=0.040$);2年总生存(OS)率分别为48.2%、75.1%、85.7%($P=0.002$);2年无病生存(DFS)率分别为48.5%、66.3%、76.2%($P=0.045$)。当供者IL10-592位点为AA、AC、CC基因型时,患者Ⅲ~Ⅳ度aGVHD发生率分别为26.5%、8.9%、0($P=0.024$);肠道aGVHD发生率分别为20.4%、4.4%、0($P=0.026$)。多因素分析结果提示患者或供者IL10-592位点AA基因型移植后有较高Ⅲ~Ⅳ度aGVHD发病风险($OR=3.3$, $P=0.049$; $OR=3.9$, $P=0.043$)。而患者或供者IL10-592位点为AA、AC、CC不同基因型时,对慢性GVHD发生率和复发率均无明显影响。**结论** 在HLA-10/10全相合无关供者allo-HSCT中,患者和(或)供者IL10-592位点AA基因型是allo-HSCT后发生较高Ⅲ~Ⅳ度aGVHD和较低OS、DFS率的不利因素。

【关键词】 白细胞介素10; 单个核苷酸多态性; 造血干细胞移植; 移植物抗宿主病; 总体生存; 无病生存

基金项目: 国家自然科学基金(81273226、81072435); 江苏省医学创新团队与领军人才(LJ201138); 江苏省临床医学科技专项(BL2014038、BL2013013)

Effects of IL10-592 locus of AA genotype on the incidence of aGVHD and survival after HLA-matched unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation Yang Zhiluo, Qiu Qiaocheng, Ding Zixuan, Pan Zhijuan, Zhao Qinjin, He Jun. *The First Affiliated Hospital of Soochow University, Jiangsu Institute of Hematology, Suzhou 215006, China*

Corresponding author: He Jun, Email: junhe1964@163.com

【Abstract】 Objective To explore the impact of IL10-592 (rs1800872) single nucleic acid polymorphism (SNP) on the prognosis of HLA matched unrelated hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). **Methods** The polymorphism of IL10-592 in 104 recipient-donor pairs and 100 healthy volunteers was analyzed with sequence based typing (SBT). **Results** When the genotype of IL10-592 in donors and recipients matched, AA/AA genotype had higher incidence of Ⅲ-Ⅳ aGVHD than AC/AC or CC/CC genotype (47.1%, 3.7%, 0, $P=0.002$). When the genotype of IL10-592 in donors and recipients mismatched, recipients with AC genotype or donors with AA genotype, there was significant different incidence of Ⅲ-Ⅳ aGVHD among donors or recipients with different genotype ($P=0.046$, $P=0.041$). The recipients with AA genotype had higher incidence of Ⅲ-Ⅳ aGVHD than AC or CC genotype (27.8% vs 10.2%, 11.1%; $P=0.072$), and higher incidence of intestinal aGVHD (22.2% vs 5.1%, 11.1%; $P=0.040$), lower incidence of 2-year overall survival (OS: 48.2% vs 75.1%, 85.7%; $P=0.002$), lower incidence of 2 year disease free survival (DFS: 48.5% vs 66.3%, 76.2%; $P=0.045$). Patients had higher incidence of Ⅲ-Ⅳ

aGVHD with donors of AA genotype than with donors of AC or CC genotype (26.5% vs 8.9%, 0; $P=0.024$), and higher incidence of intestinal aGVHD (20.4% vs 4.4%, 0; $P=0.026$). In multivariate analysis, the genotype of IL10-592AA in recipients and donors had increased risk of III-IV aGVHD ($OR=3.3$, $P=0.049$; $OR=3.9$, $P=0.043$). There were no statistical differences on the incidence of cGVHD and relapse. Conclusion In HLA-10/10 matched unrelated HSCT, the presence of IL10-592 AA genotype in recipients and/or donors is an adverse factor for III-IV aGVHD, worse OS and 2-year DFS.

【Key words】 Interleukin 10; Single nucleotide polymorphism; Hematopoietic stem cell transplantation; Graft versus host disease; Overall survival; Disease free survival

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81273266, 81072435); Jiangsu Province Medical Innovation Team (LJ201138); Clinical Medicine Science and Technology Projects of Jiangsu Province (2014038, BL2013013)

移植物抗宿主病(GVHD)是异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)后常见并发症。移植后约30%的患者发生重度急性GVHD(aGVHD)^[1]。近年关于非HLA区域一些炎性因子基因区域的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点的研究表明, IFN γ ^[2-3]、IL-2^[4]、CTLA4、TNF^[5-6]、IL-10^[7-10]等均与移植后aGVHD的发生有明显相关性。IL10-592是位于IL-10基因上游592个碱基的SNP位点,这个位点的碱基为A或C两种,组合成AA、AC、CC三种基因型。对欧洲人群的研究结果表明IL10-592位点CC基因型与移植后aGVHD的发生有明显相关性^[8-9],中国非血缘关系供者HSCT的研究结果提示,患者IL10-592位点CC基因型者移植后有较高III~IV度aGVHD的发生率^[10]。我们在供患者HLA-A、B、C、DRB1、DQB1全相合的基础上进一步探讨IL10-592基因型对移植预后因素的影响。

病例与方法

一、病例资料

选择2011年12月至2014年2月在苏州大学附属第一医院血液科行HLA-A、B、C、DRB1、DQB1(10/10)高分辨全相合非血缘(matched unrelated donor, MUD)allo-HSCT的104对恶性血液病患者及其无关供者为实验组。其中男62例,女42例,中位年龄27(8~59)岁。急性髓系白血病(AML)48例,急性淋巴细胞白血病(ALL)30例,慢性髓系白血病(CML)10例,骨髓增生异常综合征(MDS)10例,淋巴瘤4例,粒细胞肉瘤2例。诊断到移植中位时间5(3~192)个月。供受者性别相合61对,性别错配43对(男供女30例,女供男13例)。以来自全国30个省的100名健康志愿者作为对照组。

二、IL10-592位点基因多态性检测

1. DNA提取:留取移植前外周血单个核细胞。

用美国Promega公司试剂盒抽取基因组DNA,调整DNA浓度至100 ng/ml。冻存于-20℃冰箱备用。

2. Sanger法检测IL10-592位点基因型:用primer premier 5.0软件设计目的片段特异性引物(上游:5'-GCTGAAGAGGTGGAAACA-3',下游:5'-CACAGTGACGTGGACAAA-3')。Sanger基因测序技术:pre-PCR扩增目的片段,反应体系总体积10 μ l: Taq DNA polymerase 0.075 μ l, 上游引物0.2 μ l, 下游引物0.2 μ l, dNTP 0.2 μ l, Mg²⁺ 0.4 μ l, 10 \times 缓冲液1 μ l, 灭菌去离子水7.425 μ l, 模板DNA 0.5 μ l。反应程序:95℃预热5 min, 5℃解链20 s, 55℃复性30 s, 72℃延伸30 s。解链-复性-延伸共36个循环。纯化:PCR产物3 μ l, 虾碱酶1 μ l。反应程序:30℃30 min, 80℃15 min。测序反应:反应体系:bigdye7 μ l, 下游引物1 μ l, 纯化产物2 μ l。反应程序:95℃解链20 s, 50℃复性30 s, 62℃延伸110 s, 共25个循环。第2次纯化:产物10 μ l + EDTA 2 μ l + 纯乙醇25 μ l。振荡2 min。2 000 \times g离心15 min, 去除上清。沉淀物加80%乙醇45 μ l, 2 000 r/min离心5 min。去除上清。变性:沉淀物加HiDi 10 μ l, 95℃2 min。应用ABI-3730型基因分析仪对目的片段进行测序。

三、HSCT预处理方案和aGVHD的预防

1. 造血干细胞的采集和回输:104例患者移植物来源全部为供者外周血干细胞,输注单个核细胞中位数7.8(2.5~21.7) $\times 10^8$ /kg, CD34⁺细胞中位数为4.6(1.3~11.0) $\times 10^6$ /kg。

2. 预处理方案:其中92例采用改良BUCY+ATG(白消安+环磷酰胺+抗胸腺细胞球蛋白)方案,12例采用TBI(全身照射)+CY+ATG方案。

3. aGVHD的预防:采用长程环孢素A(CsA)+短程甲氨蝶呤(MTX)+霉酚酸酯(MMF)+ATG方案;移植前9天(-9 d)开始用CsA 3 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,将其药物浓度控制在200~400 μ g/L;MTX移植后第1

天(+1 d) 15 mg/m², +3、+6、+11 d 10 mg/m²; MMF 15 mg/kg, 每12 h 1次, -9 d起; ATG 2.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹, -5~-2 d。

四、统计学处理

用SPSS19.0软件进行统计分析,两样本率的比较用χ²检验。多因素对预后的影响用二元Logistic回归分析。事件累积发生率的比较采用Log-rank检验,生存率统计采用Kaplan-Meier进行分析。均为双侧检验。P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

一、供受者IL10-592位点基因型的频率分布

IL10-592位点AA、AC、CC基因型在对照组、实验组(供者和患者)的频率分布见表1。其中AA基因型在三组间的分布差异无统计学意义,AC与CC基因型在三组间的分布差异有统计学意义。

表1 各组IL10-592位点基因型的频率分布[例数(%)]

基因型	对照组 (100例)	供者 (104例)	患者 (104例)	P值
AA	41(41.0)	49(47.1)	36(34.6)	0.186
AC	40(40.0)	45(43.3)	59(56.7)	0.039
CC	19(19.0)	10(9.6)	9(8.7)	0.047

二、IL10-592位点不同基因型对重度aGVHD发生率及累及器官的影响

1. 供患者IL10-592位点不同基因型组合对重度aGVHD的影响:

(1)在104例HSCT后患者中有17例(16.3%)发生Ⅲ~Ⅳ度aGVHD。当供患者IL10-592位点基因型相同时,即供患者基因型组合分别为AA/AA、AC/AC、CC/CC时,Ⅲ~Ⅳ度aGVHD发生率分别为47.1%、3.7%、0,三组间差异有统计学意义(P=0.002)。

(2)当供患者IL10-592基因型不同,组合分别为AA/AC、AC/CC、AC/AA时,Ⅲ~Ⅳ度aGVHD发生率较高,分别为18.5%、50.0%、12.5%;当供患者IL10-592基因型组合AA/CC、CC/AA、CC/AC时无Ⅲ~Ⅳ度aGVHD发生,由于例数较少,两组间差异无统计学意义(P=0.336)。

2. 患者IL10-592位点不同基因型对aGVHD的发生及累及器官的影响:在发生Ⅲ~Ⅳ度aGVHD的17例患者中,累及皮肤7例,肠道12例,肝脏6例。

患者IL10-592位点为AA、AC、CC基因型时

Ⅲ~Ⅳ度aGVHD发生率分别为27.8%、10.2%、11.1%。三组间差异无统计学意义(P=0.072)。患者AA基因型肠道aGVHD的发生率最高且差异有统计学意义(P=0.040),各组间皮肤与肝脏aGVHD发生率差异无统计学意义。不同基因型各器官的aGVHD发生率见表2。

表2 患者IL10-592位点不同基因型累及器官的急性移植抗宿主病(aGVHD)发生率[例数(%)]

基因型	例数	aGVHD累及器官		
		皮肤	肠道	肝脏
AA	36	4(11.1)	8(22.2)	4(11.1)
AC	59	2(3.4)	3(5.1)	2(3.4)
CC	9	1(11.1)	1(11.1)	0
P值		0.298	0.040	0.217

3. 供者IL10-592位点不同基因型对aGVHD发生及累及器官的影响:供者IL10-592位点为AA、AC、CC基因型时,患者的Ⅲ~Ⅳ度aGVHD发生率分别为26.5%、8.9%、0。三组间差异有统计学意义(P=0.024)。供者为IL10-592AA基因型患者移植后有较高肠道aGVHD的发生率,且差异有统计学意义(P=0.026),供者为AA和AC基因型时皮肤aGVHD的发生率较高,但差异无统计学意义(表3)。

表3 供者IL10-592位点不同基因型累及患者器官的急性移植抗宿主病(aGVHD)发生率[例数(%)]

基因型	例数	aGVHD累及器官		
		皮肤	肠道	肝脏
AA	49	4(8.2)	10(20.4)	4(8.2)
AC	45	3(6.7)	2(4.4)	2(4.4)
CC	10	0	0	0
P值		0.643	0.026	0.529

4. 移植后Ⅲ~Ⅳ度aGVHD发生率的多因素分析:将患者移植时的年龄,从诊断到移植之间的病程,DPB1、DPA1位点,供患者IL10-592位点基因型纳入多因素分析,应用Logistic回归分析各因素对Ⅲ~Ⅳ度aGVHD发生率的影响。结果提示供患者IL10-592位点AA基因型对Ⅲ~Ⅳ度aGVHD的发病有明显影响(表4)。

三、IL10-592位点不同基因型对慢性移植抗宿主病(cGVHD)的影响

1. 供患者IL10-592位点不同基因型组合对cGVHD的影响:在104例患者中有9例移植后早期

表4 III~IV度急性移植物抗宿主病发生率的多因素分析

因素	OR值(95%CI)	P值
患者IL10-592AA	3.3(1.0~10.8)	0.049
供者IL10-592AA	3.9(1.0~14.7)	0.043
年龄(>27岁)	1.7(0.5~5.7)	0.372
DPA1 错配	4.2(0.6~29.8)	0.145
DPB1 错配	0.2(0.03~1.7)	0.154
移植前病程(≥6个月)	2.1(0.6~7.3)	0.265

(<100 d)死亡,排除在外。95例患者中46例(48.4%)移植后发生cGVHD。

(1)当供患者IL10-592位点基因型相合时,即供患者IL10-592基因型组合为AA/AA、AC/AC、CC/CC时,cGVHD发生率为38.5%、51.8%、100%,差异无统计学意义($P=0.726$)。

(2)当供患者IL10-592位点基因型不相合时,供患者基因型组合为AC/AA、CC/AA、CC/AC时,cGVHD发生率(61.5%、66.7%、60.0%)较高。供患者基因型组合为AA/AC、AA/CC、AC/CC时,cGVHD发生率(36.0%、40.0%、50.0%)较低。两组间差异无统计学意义($P=0.082$)。

2. 供患者IL10-592位点不同基因型对cGVHD发生率的影响:患者的IL10-592位点基因型为AA、AC、CC时移植后cGVHD发生率分别为51.7%、45.6%、55.6%。三组间差异也无统计学意义($P=0.783$)。供者IL10-592位点为AA、AC、CC基因型,患者移植后cGVHD发生率分别为37.2%、54.8%、70.0%,三组间差异无统计学意义($P=0.095$)。

四、IL10-592位点不同基因型对复发的影响

17例(16.3%)患者移植后本病复发。供患者IL10-592位点基因型相合,分别为AA/AA、AC/AC、CC/CC时复发率为17.6%、22.2%、0,差异无统计学意义($P=0.723$)。当供患者IL10-592位点基因型组合为AC/AA、CC/AA、AC/CC和AA/AC时,复发率分别为18.8%、33.3%、50.0%和11.1%,各组间差异无统计学意义($P=0.415$)。而基因型组合为AA/CC、CC/AC时无患者复发。患者的基因型为AA、AC、CC的移植后复发率分别为19.4%、15.3%、11.1%,三组间差异亦无统计学意义($P=0.785$)。供者基因型为AA、AC、CC的患者移植后复发率分别为12.2%、22.2%、10.0%,各组间差异无统计学意义($P=0.362$)。

五、IL10-592位点不同基因型对总体生存(OS)率的影响

104例患者中位随访时间18(1~43)个月,死亡

29例。其中死于复发11例,cGVHD 6例,aGVHD 5例,感染4例,多器官功能衰竭2例,弥漫性血管内溶血1例。当供患者IL10-592基因型相合组(AA/AA、AC/AC、CC/CC)时2年OS率为75.0%,不相合组(其他组合)2年OS为74.3%,两组间差异无统计学意义($P=0.858$)。

患者为AA、AC、CC基因型组移植后2年OS分别为48.2%、75.1%、85.7%。三组间差异有统计学意义($P=0.002$),见图1;供者IL10-592位点为AA、AC、CC基因型患者移植后2年OS率分别为56.3%、73.0%、88.9%,三组间差异无统计学意义($P=0.163$)。

六、IL10-592位点不同基因型对无病生存(DFS)率的影响

104例患者中17例复发,其中11例复发后死亡。28例死于急慢性排异及感染等非复发因素。当供患者IL10-592基因型相合时(AA/AA、AC/AC、CC/CC)2年DFS率为67.4%,不相合组2年DFS率为71.1%,两组间差异无统计学意义($P=0.502$)。

患者为AA、AC、CC基因型移植后2年DFS率分别为48.5%、66.3%、76.2%。三组间差异有统计学意义($P=0.045$),见图2;供者IL10-592位点为AA、AC、CC基因型患者移植后2年DFS率分别为

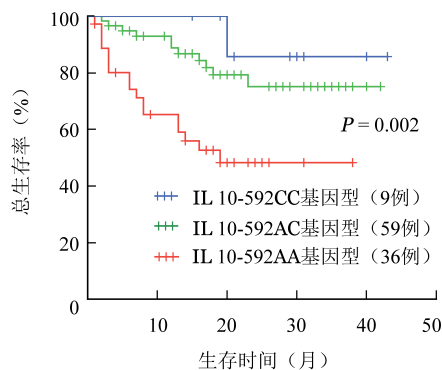


图1 患者IL10-592位点不同基因型组总体生存曲线

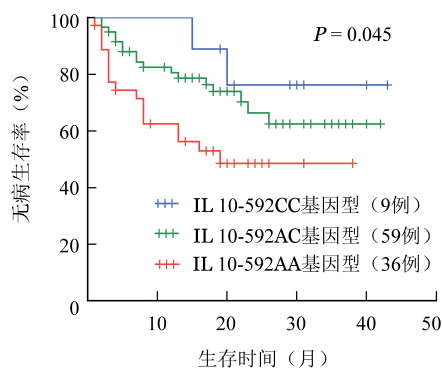


图2 患者IL10-592位点不同基因型组无病生存曲线

50.9%、65.5%、90.0%，三组间差异无统计学意义($P=0.261$)。

讨 论

在allo-HSCT后,供受者间次要组织抗原^[11]和一些炎性因子如IL-2、IL-4、IL-6、TNF、IFN、TGF、IL-10等在免疫反应中发挥着重要作用,位于这些炎性因子基因区域的SNP位点对这些基因的表达水平及蛋白功能有重要影响^[1-13]。本研究结果提示当供患者均为AA基因型时移植后Ⅲ~Ⅳ度aGVHD发生率最高,而CC基因型移植后Ⅲ~Ⅳ度aGVHD发生率低。现有研究表明IL10-592位点CC基因型在人群有较高的IL-10表达^[13],aGVHD主要病理过程由1型辅助T淋巴细胞及其表达的炎性因子介导^[14],IL-10主要功能为下调Th1类炎性因子以及MHC二类抗原的表达从而介导免疫耐受^[15-16],故IL10-592位点CC基因型人群对异基因抗原有较高的免疫耐受性,这与本实验结论IL10-592位点CC基因型患者移植后有较低的aGVHD发生率相一致。然而既往也有国内外研究表明IL10-592位点CC基因型患者移植后有较高的Ⅲ~Ⅳ度aGVHD发生率,可能是由于研究选择移植来源不同^[7-9],存在HLA错配位点的干扰因素^[10],以及人种与地域的不同可能存在一定的差异性。而本研究入组病例全部为无关供受者且HLA-10/10全相合,并且排除DP位点的因素。

本研究中患者中IL10-592位点CC基因型组移植后2年OS及DFS率最高,AC基因型组次之,AA基因型组最低。在供者IL10-592位点基因型分组中也发现这种趋势。可能与CC基因型供患者有较低的移植后排异有关。

参 考 文 献

[1] 陆再英,钟南山,谢毅,等.内科学.7版.北京:人民卫生出版社,2012:677-679.

[2] Cavet J, Dickinson AM, Norden J, et al. Interferon-gamma and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation[J]. Blood, 2001,98(5):1594-1600.

[3] 蔡小矜,宋阿霞,王华,等.供受者IFN- γ 基因+874位点单核苷酸多态性对恶性血液病患者HLA全相合同胞供者异基因造血干细胞移植疗效的影响[J].中华血液学杂志,2012,33(12):989-993. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2012.12.002.

[4] MacMillan ML, Radloff GA, Kiffmeyer WR, et al. High-producer interleukin-2 genotype increases risk for acute graft-versus-host disease after unrelated donor bone marrow transplantation

[J]. Transplantation, 2003, 76(12):1758-1762. doi: 10.1097/01.TP.0000095899.54052.89.

[5] Harkensee C, Oka A, Onizuka M, et al. Single nucleotide polymorphisms and outcome risk in unrelated mismatched hematopoietic stem cell transplantation: an exploration study [J]. Blood, 2012, 119(26):6365-6372. doi: 10.1182/blood-2012-01-406785.

[6] 王静波,潘凯枫,李丹,等.异基因骨髓移植中供者TNF α -308(G/A)基因型与受者急性移植抗宿主病的关系[J].中华血液学杂志,2002,23(8):397-399. doi: 10.3760/j.issn:0253-2727.2002.08.001.

[7] Lin MT, Storer B, Martin PJ, et al. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation [J]. N Engl J Med, 2003, 349(23):2201-2210. doi: 10.1056/NEJMoa022060.

[8] Sivula J, Turpeinen H, Volin L, et al. Association of IL-10 and IL-10Rbeta gene polymorphisms with graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation from an HLA-identical sibling donor [J]. BMC Immunol, 2009, 10:24. doi: 10.1186/1471-2172-10-24.

[9] Socié G, Loiseau P, Tamouza R, et al. Both genetic and clinical factors predict the development of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Transplantation, 2001, 72(4):699-706.

[10] Xiao H, Cao W, Lai X, et al. Immunosuppressive cytokine gene polymorphisms and outcome after related and unrelated hematopoietic cell transplantation in a chinese population [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2011, 17(4):542-549. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.04.013.

[11] Hambach L, Spierings E, Goulmy E. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: minor histocompatibility antigens [J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2007, 20(2):171-187. doi: 10.1016/j.beha.2006.09.002.

[12] Huang Q. Genetic study of complex diseases in the post-GWAS era [J]. J Genet Genomics, 2015, 42(3):87-98. doi: 10.1016/j.jgg.2015.02.001.

[13] Remmers EF, Cosan F, Kirino Y, et al. Genome-wide association study identifies variants in the MHC class I, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions associated with Behçet's disease [J]. Nat Genet, 2010, 42(8):698-702. doi: 10.1038/ng.625.

[14] Jaksch M, Mattsson J. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease [J]. Scand J Immunol, 2005, 61(5):398-409. doi: 10.1111/j.1365-3083.2005.01595.x.

[15] de Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation [J]. J Immunol, 1993, 150(11):4754-4765.

[16] Del PG, De Carli M, Almerigogna F, et al. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production [J]. J Immunol, 1993, 150(2):353-360.

(收稿日期:2015-11-14)

(本文编辑:董文革)