

骨髓增生异常综合征患者单个核细胞诱导的巨噬细胞的特征及功能

韩宇 王化泉 付蓉 瞿文 阮二宝 王小明 王国锦 吴玉红 刘鸿 宋嘉
关晶 邢莉民 李丽娟 江汇涓 刘惠 王一浩 刘春燕 张薇 邵宗鸿

【摘要】 目的 观察骨髓增生异常综合征(MDS)患者单个核细胞诱导的巨噬细胞的功能,分析其与MDS疾病发展的关系。方法 以2014年9月至2015年12月天津医科大学总医院血液科24例MDS患者为病例组,以15名健康志愿者为正常对照组。收集外周血标本并分离单个核细胞,体外以GM-CSF诱导分化形成巨噬细胞。在光学显微镜下观察巨噬细胞的形态;使用流式细胞术检测巨噬细胞的数量及其表面受体CD206、SIRP α 的表达水平;分别采用流式细胞术和免疫荧光显微镜检测巨噬细胞的吞噬功能。结果 ①MDS来源的巨噬细胞形态较正常对照差(形态不规则、细胞体积小、异形明显、无足突、数量减少),MDS外周血单个核细胞转化为巨噬细胞的转化率为(5.17 \pm 3.47)%,显著低于正常对照组的(66.18 \pm 13.43)%($t=3.529, P=0.001$);②MDS来源的巨噬细胞表面识别受体CD206的表达水平[(9.73 \pm 2.59)%]显著低于正常对照组[(51.15 \pm 10.82)%]($t=4.551, P<0.001$),SIRP α 的表达水平[(0.51 \pm 0.09)%]显著低于正常对照组[(0.77 \pm 0.06)%]($t=2.102, P=0.043$);③MDS来源的巨噬细胞吞噬免疫微球的吞噬指数、吞噬百分率分别为0.45 \pm 0.08、(23.69 \pm 3.22)%,显著低于正常对照组的0.92 \pm 0.07、(42.75 \pm 2.13)%(P 值均 <0.05),MDS来源的巨噬细胞吞噬单个核细胞的吞噬指数(0.24 \pm 0.04)显著低于正常对照组(0.48 \pm 0.96, $t=3.464, P=0.001$)。结论 MDS患者外周血单个核细胞诱导形成巨噬细胞能力下降,吞噬识别受体减少,吞噬能力减弱。

【关键词】 骨髓增生异常综合征; 巨噬细胞

基金项目:国家自然科学基金(81170472、81400088);天津市应用基础与前沿技术研究计划(14JCYBJC27200、09JCYBJC11200);天津市抗癌重大专项攻关计划(12ZCDZSY17900)

Characteristic and function of peripheral blood mononuclear cells-induced macrophages in patients with myelodysplastic syndrome Han Yu, Wang Huaquan, Fu Rong, Qu Wen, Ruan Erbao, Wang Xiaoming, Wang Guojin, Wu Yuhong, Liu Hong, Song Jia, Guan Jing, Xing Limin, Li Lijuan, Jiang Huijuan, Liu Hui, Wang Yihao, Liu Chunyan, Zhang Wei, Shao Zonghong*. *Department of Hematology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China*

Corresponding author: Shao Zonghong, Email: shaozonghong@sina.com

【Abstract】 Objective To explore characteristic and function of peripheral blood mononuclear cells (PBMNC)-induced macrophages in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) to couple with its progression. **Methods** A total of 24 MDS patients (11 low-risk patients and 13 high-risk group patients) referred to Department of Hematology of Tianjin Medical University General Hospital and normal controls were enrolled from September 2014 to December 2015. PBMNC was stimulated with GM-CSF to transform to macrophages. The morphology of macrophages was observed by microscope. The quantity of macrophages, CD206 and SIRP α on surface of macrophages were detected by flow cytometry. The phagocytic function of macrophages was analyzed by fluorescence microscopy and flow cytometry. **Results** The morphology of macrophages from MDS patients was abnormal. The percentage of transformed macrophages was (5.17 \pm 3.47)% in patients with MDS, which was lower than that in controls

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.08.011

作者单位:300052 天津医科大学总医院血液科[韩宇(现在河南大学淮河医院血液科)、王化泉、付蓉、瞿文、阮二宝、王小明、王国锦、吴玉红、刘鸿、宋嘉、关晶、邢莉民、李丽娟、江汇涓、刘惠、王一浩、刘春燕、张薇、邵宗鸿]

通信作者:邵宗鸿,Email:shaozonghong@sina.com

significantly [(66.18±13.43)%, $t=3.529$, $P=0.001$]. The expression of CD206 on macrophages from MDS patients was significantly lower than that of controls [(9.73±2.59)% vs (51.15±10.82)%, $t=4.551$, $P<0.001$]. The SIRP α level of macrophages from MDS patients was significantly lower than that of controls [(0.51±0.09)% vs (0.77±0.06)%, $t=2.102$, $P=0.043$]. The phagocytic index and the percentage of phagocytic of macrophages from MDS patients were significantly lower than those of macrophages from normal controls [0.45±0.08 vs 0.92±0.07, $t=-6.253$, $P=0.008$; (23.69±3.22)% vs (42.75±2.13)%, $t=-6.982$, $P=0.006$ respectively] by flow cytometry. The phagocytic index of MDS patients was significantly lower than that of controls (0.24±0.04 vs 0.48±0.96, $t=3.464$, $P=0.001$) by fluorescence microscopy. **Conclusion** The quantity, recognition receptors and phagocytosis of PBMNC-induced macrophages decreased in MDS patients.

【Key words】 Myelodysplastic syndrome; Macrophage

Fund program: National Natural Foundation of China (81170472, 81400088); Application Foundation and Frontier Technology Research Program of Tianjin (14JCYBJC27200, 09JCYBJC11200); Tianjin Major Cancer Focus Program (12ZCDZSY17900)

骨髓增生异常综合征(MDS)是骨髓造血干细胞克隆性增殖的恶性血液肿瘤,导致血细胞减少、一系或多系髓细胞的发育不全、无效造血和高风险向急性髓系白血病(AML)转化。临床研究和动物模型实验证实骨髓微环境和免疫因素在MDS发病机制中起重要作用^[1-2]。巨噬细胞是一种固有免疫细胞,具有很强的吞噬功能。近年来,关于巨噬细胞在恶性肿瘤发病机制中的研究越来越多^[3-4]。为探索巨噬细胞在MDS发病机制中的作用,我们对MDS患者外周血单个核细胞来源的巨噬细胞进行了研究,现报道如下。

病例与方法

1. 病例:以2014年9月至2015年12月我科24例MDS患者为病例组,男13例,女11例,中位年龄58.5(16~79)岁。按照WHO 2008诊断分型标准,难治性贫血(RA)1例,难治性贫血伴环形铁粒幼红细胞(RARS)2例,难治性贫血伴多系发育异常(RCMD)6例,难治性贫血伴有原始细胞增多1型(RAEB-1)1例,RAEB-2 13例,5q-综合征1例。按MDS国际预后积分系统(IPSS),低危3例、中危-1 8例、中危-2 11例、高危2例。以15名健康志愿者作为对照组,男10名,女5名,中位年龄28(25~36)岁。标本的取得均符合伦理要求。

2. 巨噬细胞的诱导:肝素抗凝管取MDS患者及健康志愿者外周血3 ml,采用淋巴细胞分离液分离单个核细胞,加入1 ml RPMI 1640培养基重悬,调整细胞密度为 2×10^6 /ml接种于6孔板,每孔2 ml。37℃、5%CO₂培养箱培养6 h,吸弃上清,用无菌PBS轻洗2次去除非黏附细胞,每孔加入含10%FBS的RPMI 1640培养液2 ml及GM-CSF,37℃、5%CO₂培

养箱中继续培养,每两天半量换液并加入GM-CSF,于培养第7天收集细胞。

3. 流式细胞术检测巨噬细胞表面受体的表达:取培养后细胞消化重悬置于流式管中,实验管中加入鼠抗人FITC-CD14、PE-CD68、APC-CD206或APC-表面受体信号调节蛋白 α (SIRP α)单克隆抗体各20 μ l,对照管分别加相应的IgG1同型对照5 μ l,室温避光孵育30 min,PBS洗涤2次,上机检测。

4. 流式细胞术检测巨噬细胞吞噬功能:取预处理好的荧光微球 2.5×10^7 个置于巨噬细胞培养板中孵育24 h,吸取培养基,PBS洗涤1次,胰酶消化得细胞悬液,离心,弃上清。每管加入300 μ l PBS重悬细胞,上机检测。

$$\text{吞噬百分率(PP)} = \frac{\text{吞噬荧光微球的巨噬细胞数}}{\text{巨噬细胞总数}} \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数(PI)} = \frac{\text{被吞噬的荧光微球的总数}}{\text{巨噬细胞总数}}$$

5. 免疫荧光显微镜观察巨噬细胞吞噬功能:羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂(CFSE)荧光染料染色骨髓单个核细胞,将得到的细胞悬液置于巨噬细胞培养板中孵育24 h,消化、离心,洗涤,吸取上述细胞悬液置于载玻片中间,在荧光显微镜下观察。计数CFSE荧光阳性细胞占总巨噬细胞数量的比例。

6. 统计学处理:应用SPSS 21.0软件分析实验结果。实验数据为定量资料,均符合正态分布且方差齐,用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组资料的比较采用独立样本 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 巨噬细胞形态和数量比较:光学显微镜下检测到MDS组来源的巨噬细胞的形态较正常对照组

差(形态不规则、细胞体积小、异形明显、无足突、数量减少)(图1)。流式细胞术检测到MDS患者外周血单个核细胞诱导的巨噬细胞(CD14⁺CD68⁺细胞)阳性细胞率为(5.17±3.47)%,显著低于正常对照组的(66.18±13.43)%($t=3.529, P=0.001$)。

2. 巨噬细胞表面识别受体CD206及SIRP α 的表达水平比较:流式细胞术检测结果显示,MDS组外周血单个核细胞诱导的巨噬细胞 CD14⁺CD68⁺CD206⁺细胞率[(9.73±2.59)%]显著低于正常对照组[(51.15±10.82)%]($t=4.551, P<0.001$), CD14⁺CD68⁺SIRP α ⁺细胞率[(0.51±0.09)%]亦显著低于正常对照组[(0.77±0.06)%]($t=2.102, P=0.043$)。

3. 巨噬细胞吞噬功能比较:流式细胞术检测MDS组外周血单个核细胞诱导的巨噬细胞吞噬免疫微球的吞噬指数为0.45±0.08,吞噬百分率为(23.69±3.22)%,均显著低于正常对照组的0.92±0.07及(42.75±2.13)%(P 值均<0.05)。荧光显微镜观察MDS组来源的巨噬细胞吞噬骨髓单个核细胞的吞噬指数(0.24±0.04)显著低于正常对照组(0.48±0.06)($t=3.464, P=0.001$)(图2)。

讨 论

先前的研究报道显示内皮细胞、巨噬细胞和癌症相关的成纤维细胞在肿瘤发生和发展中起促进

作用。目前研究认为大部分免疫系统被赋予了双重功能,是机体的双刃剑。免疫细胞一方面可以通过产生抗肿瘤的细胞因子而直接破坏肿瘤细胞,起到抗肿瘤作用;另一方面,免疫细胞通过促进炎症反应、血管生成等作用起到促进肿瘤生长的作用。另外,已经浸润到肿瘤组织中的免疫细胞能够创造一个包括细胞因子、趋化因子、生长因子和血管生成因子的微环境促进肿瘤的进展^[3,5]。

在传统的意义上,巨噬细胞是固有免疫细胞,发挥杀伤肿瘤细胞的作用。巨噬细胞的生物学作用包括抗原呈递、靶细胞的细胞毒作用、清除杂物、组织重塑、炎症调控、免疫诱导、血栓形成和各种形式的内吞作用。现在,越来越多的证据表明巨噬细胞通过促进肿瘤细胞的生长、血管生成、转移和免疫抑制在原发性肿瘤和转移性肿瘤中发挥了积极的作用。在肿瘤的发生、发展中,肿瘤相关巨噬细胞(TAM)能够影响肿瘤组织的不同方面,具体包括血管生成和血管形成、基质的形成和溶解、促进或抑制肿瘤细胞的生长。当TAM被激活时,它们可通过细胞毒性作用或细胞凋亡作用诱导肿瘤细胞的死亡,和(或)通过肿瘤微血管的改变引起肿瘤的破坏性反应^[4]。

我们研究发现MDS患者外周血单个核细胞诱导的巨噬细胞的数量低于正常对照组,并显示出发

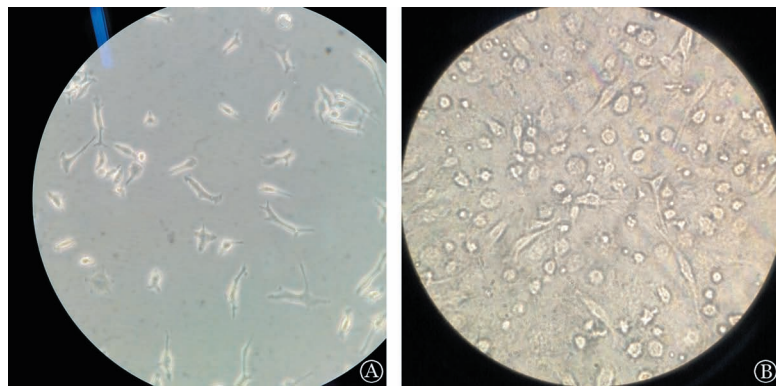


图1 光学显微镜下检测骨髓增生异常综合征患者(A)和正常对照(B)外周血单个核细胞诱导的巨噬细胞的形态、数量的比较(×400)

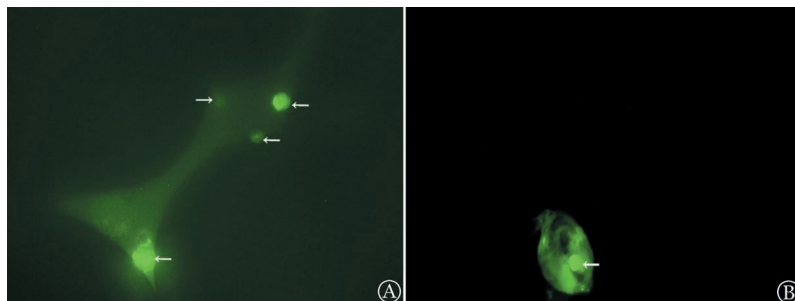


图2 荧光显微镜下检测骨髓增生异常综合征患者(A)和正常对照(B)外周血单个核细胞诱导的巨噬细胞吞噬骨髓单个核细胞的能力

育不良的特点。这表明,发育异常的MDS单个核细胞诱导成为正常巨噬细胞的能力减弱。

李晓等^[6]用碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶免疫酶标技术分析了30例MDS患者(其中相对低危组24例、相对高危组9例)骨髓塑料冷包埋切片中巨噬细胞数量,发现低危MDS患者CD68⁺细胞表达水平明显高于对照组,呈现高凋亡状态,而高危MDS患者CD68⁺细胞表达水平明显减少。

我们通过流式细胞术联合荧光免疫微球和免疫荧光显微镜两种方法,均证实MDS患者外周血单个核细胞诱导形成的巨噬细胞吞噬指数和吞噬百分率均明显下降。这表明,即使是诱导形成的MDS巨噬细胞的吞噬能力也较差,难以发挥正常巨噬细胞的吞噬病原微生物和免疫监视的功能,可能是MDS患者感染发生率高和疾病易进展的原因之一。

在这项研究中,我们观察到MDS患者组的巨噬细胞CD206和SIRP α 的水平较正常对照组明显下降。CD206是巨噬细胞甘露糖受体,介导巨噬细胞识别微生物进而吞噬内化^[6]。而SIRP α 是信号调节蛋白 α 链,它是一种跨膜蛋白,其胞外区含有3个免疫球蛋白超家族样结构域,其中N末端的区域介导与CD47的结合^[7-8]。这或许可以解释为什么我们看到与正常对照组比较,MDS患者来源的巨噬细胞无法识别或吞噬“肿瘤细胞”。因此,我们可以说,MDS来源的巨噬细胞正常功能的受损可能是肿瘤生长和发展的肿瘤生物学结果。

通过本研究,我们发现MDS患者外周血单个核细胞诱导形成巨噬细胞能力下降,吞噬识别受体减少,吞噬能力减弱。

参考文献

- [1] 王化泉, 邵宗鸿. 免疫“妥协”和骨髓增生异常综合征细胞克隆[J]. 中华血液学杂志, 2005, 26(1): 60-62.
- [2] Adès L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes [J]. Lancet, 2014, 383 (9936): 2239-2252. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61901-7.
- [3] Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy [J]. Immunity, 2014, 41 (1):49-61. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.010.
- [4] Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, et al. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function [J]. Nat Immunol, 2016, 17 (1):34-40. DOI: 10.1038/ni.3324.
- [5] Mantovani A, Sozzani S, Locati M, et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes [J]. Trends Immunol, 2002, 23 (11):549-555.
- [6] 李晓, 应韶旭, 刘慧芝, 等. 骨髓增生异常综合征巨噬细胞增生与造血细胞凋亡的相关性[J]. 中华病理学杂志, 2003, 32(3): 226-229.
- [7] Paveley RA, Aynsley SA, Turner JD, et al. The Mannose Receptor (CD206) is an important pattern recognition receptor (PRR) in the detection of the infective stage of the helminth *Schistosoma mansoni* and modulates IFN γ production [J]. Int J Parasitol, 2011, 41 (13-14):1335-1345. DOI: 10.1016/j.ijpara.2011.08.005.
- [8] Barclay AN, Van den Berg TK. The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRP α) and CD47: structure, function, and therapeutic target [J]. Annu Rev Immunol, 2014, 32:25-50. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120142.

(收稿日期:2016-10-09)

(本文编辑:刘爽)

·读者·作者·编者·

关于提供伦理委员会批准文件及受试对象知情同意书的通知

根据中华医学会杂志社的相关规定,当以人体为研究对象时,作者应该说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位、地区或国家)所制订的伦理学标准并提供该委员会的批准文件复印件,同时在正文中说明受试对象或其监护人是否知情同意。

本刊编辑部