

祛铁治疗对IPSS低危/中危-1骨髓增生异常综合征患者EPO-Stat5信号通路及调节性T细胞表达的影响

张耀 韩爽 郭垞 张青霞 常春康

Effect of iron chelation therapy on EPO-Stat5 signaling pathway and Treg expression in IPSS low risk / medium risk-1 group myelodysplastic syndrome patients Zhang Yao, Han Shuang, Guo Cha, Zhang Qingxia, Chang Chunkang
Corresponding author: Chang Chunkang, Department of Hematology, The Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201306, China. Email: changchunkang7010@aliyun.com

骨髓增生异常综合征(MDS)为造血干细胞克隆性疾病,以骨髓病态造血为特征。低危/中危-1 MDS属于疾病早期,其病理表现以骨髓造血细胞过度增殖和凋亡为主,贫血是常见的临床特征之一。长期输血是MDS患者出现铁过载的主要原因^[1]。部分铁过载的MDS患者接受祛铁治疗后血常规可恢复正常,能不依赖输血长期生存^[2]。红细胞生成依赖EPO-EPOR-Janus激酶2-转录激活因子5(Stat5)信号转导。Foxp3是调节性T细胞(Treg细胞)特异性标志物,其表达与Stat5的调控有关^[3],在MDS中的表达尚有争议。铁过载对EPO-Stat5信号通路及Treg细胞表达的影响尚不清楚。本研究我们初步探讨祛铁治疗对IPSS低危/中危-1 MDS患者EPO、Stat5、Treg细胞表达及红细胞生成的影响,现报道如下。

病例与方法

1. 病例:以2014年3月至2018年1月我院诊治的IPSS分组为低危/中危-1的42例MDS患者为研究对象,男24例,女18例,中位年龄54(32~81)岁。MDS诊断、分型及预后分组参照文献^[4]标准,其中难治性血细胞减少伴单系发育异常(RCUD)1例,难治性贫血伴环状铁粒幼红细胞(RARS)6例,难治性血细胞减少伴多系发育异常(RCMD)35例。排除活动性炎症、肝病、肿瘤、溶血和酗酒等因素的影响,以血清铁蛋白(SF) > 1 000 μg/L为铁过载^[5]。42例MDS患者中,铁过载组22例,对照组20例。本研究征得我院伦理委员会批准,样本的取得均经患者知情同意。

2. 治疗:铁过载组中18例患者接受甲磺酸去铁胺(20~60 mg·kg⁻¹·d⁻¹,持续皮下泵入12 h)或地拉罗司(30 mg·kg⁻¹·d⁻¹,口服)祛铁治疗,14 d为1个疗程,治疗4个疗程复查相关指

标进行评估。全部42例患者检测指标近1个月内未接受重组EPO治疗,祛铁治疗期间患者仅接受输血、雄激素、益血生胶囊等促造血支持治疗。

3. 标本采集及处理:采集全部患者治疗前及18例祛铁治疗组患者治疗4个疗程时外周血5 ml,EDTA抗凝。取其中2 ml常规分离血浆,行ELISA检测;取其中200 μl提取总RNA,行PCR检测;余下用淋巴细胞分离液收集单个核细胞,调整细胞数为1×10⁶行流式细胞术检测。

4. 血红蛋白、网织红细胞、促红细胞生成素及铁代谢指标检测:采用Sysmex XE-2100全自动血细胞分析仪测定HGB、网织红细胞绝对计数(Ret)。放射免疫法测定EPO、血清铁蛋白(SF)含量,亚铁嗉显色法测定血清铁(SI)、总铁结合力(TIBC)。

5. 流式细胞术检测外周血CD3⁺CD4⁺T细胞表面CD25及Foxp3表达:常规处理后实验管加入鼠抗人FITC-CD3、PerCP-CD4、APC-CD25、PE-Foxp3单抗各20 μl,对照管加入FITC-小鼠IgG_{2a}、PerCP-小鼠IgG_{2a}、APC-小鼠IgG_{2a}、PE-小鼠IgG_{2a}单抗各20 μl,上FACS Calibur流式细胞仪进行检测,抗体及仪器均为美国BD公司产品,通过CELL Quest软件分析CD3⁺CD4⁺/CD3⁺、CD3⁺CD4⁺CD25⁺/CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD3⁺CD4⁺细胞比例。

6. ELISA法检测血浆中p-STAT5浓度:采用人磷酸化(p)-Stat5 ELISA试剂盒(美国BIM Bioscience公司产品),实验要求和步骤严格按照说明书进行,450 nm波长处测定各孔的吸光度值。绘制标准曲线,计算样品p-Stat5浓度。

7. RQ-PCR检测外周血中Stat5及Foxp3 mRNA表达:Stat5(货号DHS065456)、Foxp3(货号DHS067532)、ACTB(货号DHS579991)引物由上海杏园生物科技有限公司合成。提取单个核细胞的总RNA,按照TransScript Green One-Step qRT-PCR SuperMix试剂盒(北京全式金生物技术有限公司产品)进行PCR反应。反应条件:逆转录,45℃ 5 min;预变性,94℃ 30 s;40个循环的扩增,95℃ 10 s,60℃ 30 s。以ACTB为内参照,使用LightCycler相对定量软件计算目的基因的相对定量表达。

8. 统计学处理:应用SPSS 19.0软件进行统计分析,非正态分布数据以中位数(四分位距)表示,铁过载组与对照组采用Mann-Whitney U检验进行组间比较,祛铁治疗前后数据采用两相关样本的Wilcoxon检验进行组间比较;正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,铁过载组与对照组比较采用独立样本的t检验,祛铁治疗前后数据采用配对t检验进行比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 铁过载对较低危MDS患者铁代谢指标、EPO、Stat5、Treg细胞表达及红细胞生成的影响:与对照组相比,铁过载组SF、SI及EPO水平明显升高,TIBC、Stat5 mRNA相对定量、p-Stat5、Ret、HGB表达明显降低(P 值均 <0.05)。与对照组Treg细胞表达比较,铁过载组CD3⁺CD4⁺/CD3⁺比例升高,Foxp3 mRNA相对定量、CD3⁺CD4⁺CD25⁺/CD3⁺CD4⁺及CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD3⁺CD4⁺比例降低(P 值均 <0.05) (表1)。

2. 祛铁治疗后铁代谢指标、EPO、Stat5、Treg细胞表达及红细胞生成的变化:祛铁治疗后SF、SI、EPO较治疗前明显下降,TIBC、Stat5 mRNA相对定量、p-Stat5、Ret、HGB较前

升高(P 值均 <0.05)。Treg细胞表达比较,治疗后CD3⁺CD4⁺/CD3⁺比例较前降低,Foxp3 mRNA相对定量、CD3⁺CD4⁺CD25⁺/CD3⁺CD4⁺及CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD3⁺CD4⁺比例较前明显升高(P 值均 <0.05) (表2)。

讨 论

长期输血依赖的MDS患者会出现铁过载,而骨髓无效造血也会导致原发铁过载^[6]。本研究结果显示,在对照组非输血依赖的MDS患者中,SF也较正常参考值偏高,可能与低危/中危-1 MDS患者骨髓无效造血有关。铁过载组患者SF明显增高,但SI未同比例升高,可能与铁从巨噬细胞向血浆释放障碍有关。高铁浓度引起铁调素水平升高,可减少铁

表1 低危/中危-1骨髓增生异常综合征患者铁过载组和对照组铁代谢指标、EPO、Stat5、Treg细胞表达及红细胞生成比较[$\bar{x}\pm s$ 或 $M(Q)$]

组别	例数	SF ($\mu\text{g/L}$)	SI ($\mu\text{mol/L}$)	TIBC ($\mu\text{mol/L}$)	EPO (U/L)	Stat5 mRNA ($\times 10^{-3}$)	磷酸化Stat5 (ng/L)
铁过载组	22	4 382.53 \pm 67.26	39.84 \pm 9.83	33.58 \pm 6.74	4 454.58 \pm 66.74	1.70(1.23)	30.95 \pm 11.98
对照组	20	386.32 \pm 19.81	30.81 \pm 7.52	47.22 \pm 7.63	798.93 \pm 28.27	16.29(8.50)	167.54 \pm 52.08
统计量		255.568	3.316	-6.152	234.788	-4.998	-11.457
P 值		<0.001	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

组别	例数	Foxp3 mRNA ($\times 10^{-3}$)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ /CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	Ret ($\times 10^9/\text{L}$)	HGB (g/L)
铁过载组	22	0.85(0.40)	53.48 \pm 9.82	13.31 \pm 4.29	0.88 \pm 0.41	3.22 \pm 1.79	38.41 \pm 6.19
对照组	20	2.82(1.15)	42.91 \pm 5.31	23.51 \pm 5.75	3.03 \pm 0.86	17.51 \pm 4.79	59.61 \pm 7.74
统计量		-4.740	4.392	-6.555	-10.178	-13.040	-9.846
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:SF:血清铁蛋白;SI:血清铁;TIBC:总铁结合力;Ret:网织红细胞绝对计数;正常参考值范围:SF 22 ~ 322 $\mu\text{g/L}$,SI 12.5 ~ 32.2 $\mu\text{mol/L}$,TIBC 45 ~ 82 $\mu\text{mol/L}$,EPO 4.3 ~ 29.0 U/L,Ret (28.7 ~ 75.0) $\times 10^9/\text{L}$

表2 18例低危/中危-1骨髓增生异常综合征铁过载患者接受祛铁治疗前后铁代谢指标、EPO、Stat5、Treg细胞表达及红细胞生成比较[$\bar{x}\pm s$ 或 $M(Q)$]

组别	SF ($\mu\text{g/L}$)	SI ($\mu\text{mol/L}$)	TIBC ($\mu\text{mol/L}$)	EPO (U/L)	Stat5 mRNA ($\times 10^{-3}$)	磷酸化Stat5 (ng/L)
祛铁前	4 536.56 \pm 53.16	40.59 \pm 8.62	32.27 \pm 7.49	4 663.77 \pm 68.29	1.69(0.91)	29.82 \pm 12.37
祛铁后	2 853.32 \pm 47.66	31.96 \pm 7.83	40.62 \pm 8.17	2 624.87 \pm 51.23	4.50(1.49)	74.62 \pm 19.55
统计量	16.740	12.631	-9.544	11.477	-3.724	-14.514
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

组别	Foxp3 mRNA ($\times 10^{-3}$)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ /CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	Ret ($\times 10^9/\text{L}$)	HGB (g/L)
祛铁前	0.82(0.38)	54.35 \pm 9.84	12.80 \pm 4.50	0.85 \pm 0.39	2.86 \pm 1.69	36.17 \pm 6.01
祛铁后	1.64(0.67)	46.29 \pm 7.26	18.55 \pm 4.23	2.86 \pm 0.78	7.82 \pm 2.81	50.61 \pm 7.11
统计量	-3.726	6.532	-13.527	-17.751	-11.271	-7.962
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:SF:血清铁蛋白;SI:血清铁;TIBC:总铁结合力;Ret:网织红细胞绝对计数;正常参考值范围:SF 22 ~ 322 $\mu\text{g/L}$,SI 12.5 ~ 32.2 $\mu\text{mol/L}$,TIBC 45 ~ 82 $\mu\text{mol/L}$,EPO 4.3 ~ 29.0 U/L,Ret(28.7 ~ 75.0) $\times 10^9/\text{L}$

从巨噬细胞向血浆释放。继发性血色病造成转铁蛋白合成不足,可导致TIBC降低。祛铁治疗后TIBC较前升高。

EPO与EPO受体结合后可使受体胞内区的Stat5酪氨酸发生磷酸化而被激活,活化的胞内p-Stat5蛋白引发下游信号转导通路,使红细胞进一步增殖分化成熟^[7]。Stat5还作为祖红细胞表面Epo-R下游区抗凋亡信号子发挥抗凋亡作用,维持祖红细胞的生存^[8]。铁过载组患者EPO浓度明显升高,Stat5 mRNA和p-Stat5的表达却较对照组明显减少,表明铁过载可能导致了EPO抵抗,抑制了EPO-Stat5信号通路的表达。体内循环EPO水平升高,可能是对信号通路缺陷的一个补偿效应。过量铁促使线粒体内的蓄积铁(FtMt)高表达,FtMt可通过减少p-Stat5促进细胞凋亡,并将胞质内游离铁隔离至线粒体内干扰血红素合成^[9]。FtMt高表达时产生的病理效应,可能是导致Stat5减少的原因。祛铁治疗后,Stat5 mRNA和p-Stat5表达升高,可能与体内活性氧减少,线粒体内FtMt降低,减少了对Stat5的抑制有关。

激活的T细胞介导的免疫损伤是低危/中危-1 MDS重要发病机制之一。MDS患者自身T淋巴细胞在体外可以抑制红系祖细胞增殖,从骨髓细胞中移除T细胞则可以增强集落的形成^[10]。Treg细胞是抑制免疫反应的重要细胞。T细胞受体诱导CD25(IL-2受体 α 链)高表达,IL-2受体激活Stat5,Stat5与Foxp3启动子结合,诱导Foxp3表达。MDS早期Treg细胞不能有效归巢至骨髓去调节免疫反应^[11],可能是导致T细胞过度活化介导免疫损伤的原因之一。铁过载组CD3⁺CD4⁺/CD3⁺细胞比例升高,表明T细胞免疫失衡加重。Foxp3 mRNA及CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD3⁺CD4⁺表达较对照组下降,祛铁后较前升高,表明铁过载可能影响Foxp3的表达。CD3⁺CD4⁺CD25⁺/CD3⁺CD4⁺比例降低,显示CD25表达受抑制。Foxp3低表达可能受Stat5降低的影响。Treg细胞低表达加重活化T细胞造成的免疫损伤。

综上所述,祛铁治疗可上调Stat5 mRNA和p-Stat5的表达,部分恢复EPO-Stat5通路对红系造血的作用,增强红系造血的功能;同时诱导CD3⁺CD4⁺T细胞CD25和Foxp3表达,平衡免疫应答,减少T细胞介导的免疫损伤对红系造血的负面影响。

参考文献

[1] 宋陆茜,郑晴晴,肖超,等.骨髓增生异常综合征患者铁代谢参数异常和铁过载状况的研究[J].中华血液学杂志,2016,37

(10):903-907. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.10.018.

- [2] Guariglia R, Martorelli MC, Villani O, et al. Positive effects on hematopoiesis in patients with myelodysplastic syndrome receiving deferasirox as oral iron chelation therapy: a brief review[J]. Leuk Res, 2011, 35 (5): 566- 570. DOI: 10.1016/j.leukres.2010.11.027.
- [3] Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, et al. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells[J]. J Immunol, 2007, 178 (1):280-290.
- [4] 中华医学会血液学分会.骨髓增生异常综合征诊断与治疗中国专家共识(2014年版)[J].中华血液学杂志,2014,35(11):1042-1048. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.11.023.
- [5] 中华医学会血液学分会,中国医师协会血液科医师分会.铁过载诊断与治疗的中国专家共识[J].中华血液学杂志,2011,32(8):572-574. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2011.08.021.
- [6] 杨英,杨波,梁志鹏.铁代谢指标在骨髓增生异常综合征无效造血中的临床研究[J].中国实验血液学杂志,2013,21(4):948-952. DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2013.04.026.
- [7] Grebien F, Kerenyi MA, Kovacic B, et al. Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2 [J]. Blood, 2008, 111 (9):4511-4522. DOI: 10.1182/blood-2007-07-102848.
- [8] Rane SG, Reddy EP. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis [J]. Oncogene, 2002, 21 (21):3334- 3358. DOI: 10.1038/sj.onc.1205398.
- [9] Santambrogio P, Erba BG, Campanella A, et al. Over-expression of mitochondrial ferritin affects the JAK2/STAT5 pathway in K562 cells and causes mitochondrial iron accumulation [J]. Haematologica, 2011, 96 (10):1424- 1432. DOI: 10.3324/haematol.2011.042952.
- [10] Sloan EM, Mainwaring L, Fuhrer M, et al. Preferential suppression of trisomy 8 compared with normal hematopoietic cell growth by autologous lymphocytes in patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome [J]. Blood, 2005, 106 (3):841- 851. DOI: 10.1182/blood-2004-05-2017.
- [11] Kotsianidis I, Bouchliou I, Nakou E, et al. Kinetics, function and bone marrow trafficking of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndromes (MDS) [J]. Leukemia, 2009, 23(3):510-518. DOI: 10.1038/leu.2008.333.

(收稿日期:2017-11-01)

(本文编辑:刘爽)