

Tim-3在急性白血病患者原代细胞中的表达及其与临床特征的相关性

徐良静 徐金格 李晓莉 刘彬 姚遥 刘红 王蓉娴
朱明清 沈文红 陈苏宁 吴小津 吴德沛

Expression of Tim-3 in acute leukemia cells and its clinical significance

Xu Liangjing, Xu Jingge, Li Xiaoli, Liu Bin, Yao Yao, Liu Hong, Wang Rongxian, Zhu Mingqing, Shen Wenhong, Chen Suning, Wu Xiaojin, Wu Depei

Corresponding author: Wu Depei, Jiangsu Institute of Hematology, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Collaborative Innovation Center of Hematology, Soochow University, Key Laboratory of Thrombosis and Hemostasis of Ministry of Health, Suzhou 215006, China. Email: wudepei@medmail.com.cn

T细胞免疫球蛋白黏蛋白结构域分子3(Tim-3)是近年来备受关注的的一个重要的负性共刺激分子,是Tim基因家族成员之一,基因定位于人类染色体5q33.2,编码I型膜蛋白。以往认为Tim-3仅表达于T细胞,调控Th1细胞功能^[1-2]。近年的研究显示,Tim-3也表达于肿瘤细胞,可能成为肿瘤的标志物。Kikushige等^[3]报道大多数急性髓系白血病(AML)患者的白血病干细胞表面高表达Tim-3,在白血病小鼠移植模型中,鼠抗人Tim-3单抗可发挥细胞毒作用清除AML干细胞。我们用流式细胞术(FCM)分析了Tim-3在成人急性白血病原始及幼稚细胞的表达规律并探讨其与临床特征的关系。

病例与方法

1. 病例:101例急性白血病患者为2015年1月至2015年8月我院血液内科住院及门诊患者。初治AML 54例(M₀ 1例、M₁ 8例、M₂ 13例、M₃ 14例、M₄ 12例、M₅ 5例、M₆ 1例);急性淋巴细胞白血病(ALL)28例(B-ALL 24例、T-ALL 4例);急性混合细胞白血病(HAL)2例(为髓系和T淋系混合表达);骨髓增生异常综合征(MDS)转AML 17例。男49例,女

52例,中位年龄42(18~72)岁。本研究获我院伦理委员会批准,上述标本采集均经患者家属知情同意后实施。

2. 诊断标准:所有患者均进行细胞形态学、免疫学、细胞遗传学和分子生物学检查,采用FAB法进行分型;免疫分型参考我国诊断标准^[4]和欧洲白血病免疫学分型协作组(EGIL)抗原积分系统^[5];根据NCCN成人AML(非M₃)诊疗指南^[6]将初治AML患者分为预后良好、预后中等、预后不良组。根据中国成人ALL诊断与治疗专家共识(ISSN,2012年)^[4]将ALL患者分成标危组和高危组。

3. 采用直接免疫荧光FCM进行白血病细胞免疫表型及Tim-3检测:取肝素抗凝骨髓2 ml,每管控制细胞数在(5~10)×10⁵,所用单抗包括髓系:CD13、CD33、CD14、CD117;T淋巴细胞系:CD2、CD7、CD3、CD4、CD8;B淋巴细胞系:CD10、CD19、CD20;干/祖细胞标志HLA-DR、CD34;胞质抗原CD3、CD79a、MPO。通过CD45/SSC设门识别幼稚细胞,分析并计算幼稚细胞群体各白血病相关抗原阳性率及Tim-3阳性细胞比率。细胞膜抗原阳性细胞百分率≥20%(CD34≥10%)为阳性,胞质抗原阳性细胞百分率≥10%为阳性。所有白血病免疫分型单抗及流式细胞仪均购自美国Beckman-Coulter公司,APC标记抗Tim-3抗体及纯品购自美国BD公司。

4. 45种白血病相关的融合基因及WT1、EVI1基因检测:45种融合基因检测采用白血病相关融合基因检测试剂盒(上海源奇生物有限公司产品)。WT1和EVI1基因检测采用实时荧光定量RT-PCR方法,以ABL作为内参。引物序列:WT1上游引物:5'-AGAATACACACGCACGGTGTCT-3';下游引物:5'-GAGCCGACCGTACAAGAGTC-3';探针:5'-FAM-CTCCAGGCACACGTCGCACATCCTG-TAMRA-3'。EVI1上游引物:5'-ACCCACTCCTTTCTTTATGGACC-3';下游引物:5'-TGATCAGGCAGTTGGAATTGTG-3';探针:5'-FAM-TGAGGCCTTCTCCAGGATTCTTGTTCAC-TAMRA-3'。ABL上游引物:5'-GATACGAAGGGAGGGTGTACCA-3';下游引物:5'-CTCGCCAGGGTGTGAA-3';探针:5'-FAM-TGCTTCTGATGGCAAGCTCTACGTCTCCT-TAMRA-3'。检测结果以WT1基因或EVI1基因拷贝数/ABL基因拷贝数×10 000表示。

5. 染色体核型及基因突变检测:骨髓细胞染色体标本采用直接法和24 h培养法制备。应用R带技术进行染色体显带。根据《人类细胞遗传学国际命名体制(ISSN,2005年)》

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.06.015

基金项目:江苏省科教兴卫工程-临床医学中心(ZX201102);江苏省血液病临床医学研究中心(江苏省科技厅生命健康专项-BL2012005);国家临床重点专科建设项目;国家高技术研究发展计划(836计划)课题(2012AA02A505);江苏省“333”人才计划(BRA2015497)

作者单位:215006 苏州大学附属第一医院,江苏省血液研究所,卫生部血栓与止血重点实验室,血液学协同创新中心

通信作者:吴德沛,Email:wudepei@medmail.com.cn

描述核型;PCR产物纯化后进行正、反向测序(由上海欲晶生物科技有限公司协助完成),分析各个基因外显子序列的突变情况。

6. 统计学处理:采用SPSS20.0软件进行统计学分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,方差齐性检验采用Levene检验,双尾 t 检验用于两组独立样本之间的比较,多重独立样本之间的比较采用方差分析法(one-way ANOVA)。相关性分析采用Correlation检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 患者细胞遗传学和分子生物学特征:101例急性白血病患者染色体核型结果:inv(16) 1例,t(8;21) 5例,t(15;17) 14例,孤立的+8 2例,t(9;22) 8例,t(3;3) 1例,t(7;22) 2例,t(5;9) 1例,t(1;19) 1例,复杂核型(≥ 3 种)12例,其余为正常核型。基因突变结果:NPM1突变6例,FLT3-ITD突变5例,C-kit突变2例,其中3例为NPM1突变合并FLT3-ITD突变。在40例初治AML(除外 M_3)患者中预后良好组6例,预后中等组19例,预后不良组15例。28例ALL患者中标危组17例,高危组11例。根据多重PCR结果,AML-ETO阳性7例,CBF β -MYH11阳性7例,BCR-ABL阳性10例,E2A-PBX1阳性3例,DEK-NUP214阳性1例,WT1基因表达水平 ≥ 150 有53例,EVI1基因表达水平 ≥ 150 有10例。

2. Tim-3在急性白血病细胞中的表达特点:对54例初治AML患者、28例ALL患者、2例HAL患者、17例MDS转AML患者,采用流式细胞术检测Tim-3在白血病细胞中的表达水平。结果显示,14例 M_3 患者Tim-3在白血病细胞中表达水平为(2.12 \pm 1.57)%。87例急性白血病(除 M_3)患者表达水平为(47.03 \pm 29.55)%。其中初治AML组、t-AML组、ALL组、HAL组Tim-3表达水平分别为(56.16 \pm 29.75)%、(53.19 \pm 26.33)%、(30.21 \pm 20.77)%、(22.50 \pm 2.12)%,与ALL组相比,AML组Tim-3在白血病细胞中表达较高,差异有统计学意义($P=0.002$)。而初治AML组与t-AML组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。而HAL组例数较少,未统计。40例非 M_3 初治AML各亚型Tim-3的表达水平见表1。其中 M_4 组与其他FAB分型组比较显著升高,差异有统计学意义($P=0.003$)。AML预后良好、预后中等、预后不良组Tim-3在白血病细胞中的表达水平分别为(77.67 \pm 17.16)%、(51.42 \pm 31.03)%、(35.33 \pm 28.89)%,差异有统计学意义($P=0.038$)。组间比较中,预后良好组明显高于预后中等组($P=0.008$)和预后不良组($P=0.042$)。28例ALL患者中,T-ALL Tim-3的表达水平为(35.75 \pm 7.46)%,B-ALL为(29.29 \pm 22.20)%,差异无统计学意义($P > 0.05$)。ALL标危组、高危组Tim-3表达水平分别为(26.00 \pm 16.74)%和(36.73 \pm 25.29)%,高危组较标危组表达高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3. Tim-3表达与临床特征的相关性:将Tim-3在白血病细胞中的表达水平和白血病免疫表型抗原表达行相关性分析, Tim-3与CD13表达呈正相关(AML中 $r=0.33, P=0.018$; ALL中 $r=0.56, P=0.003$),与CD34表达呈正相关(AML中

表1 40例非 M_3 初治急性髓系白血病各亚型Tim-3在白血病细胞中的表达水平(%、 $\bar{x}\pm s$)

FAB分型	例数	Tim-3表达水平
M_0	1	19.00
M_1	8	33.50 \pm 32.90
M_2	13	57.54 \pm 28.29
M_4	12	81.83 \pm 12.33
M_5	5	61.40 \pm 31.89
M_6	1	69.00

$r=0.51, P=0.001$; ALL中 $r=0.48, P=0.009$)。而与CD33、CD14、CD7、CD10、CD19等其他免疫表型无明显相关性($P > 0.05$)。与急性白血病患者特殊染色体、基因突变、45种融合基因、WT1定量、EVI1定量也无明显相关性($P > 0.05$)。无论在AML组还是在ALL组,患者的性别、年龄、骨髓原始细胞比例、有无髓外浸润、有无出血、初诊时WBC对Tim-3表达水平无明显影响(P 值均 > 0.05)。但在初治ALL患者中,LDH高表达组较低表达组Tim-3表达水平高[以500 U/L为界,分别为(37.93 \pm 20.94)%和(21.31 \pm 17.28)%],差异有统计学意义($P=0.030$)。

讨 论

Tim-3在2002年被发现,作为重要的细胞免疫负调控因子,主要表达于Th1细胞、树突细胞、单核细胞和巨噬细胞上^[7]。Tim-3与其配体galectin-9结合,直接参与T细胞耗竭,使T细胞分泌IFN- γ 的能力下降,促使T细胞表达其他免疫负调控分子,造成免疫负调节为主的肿瘤微环境,从而导致机体对肿瘤细胞的免疫反应降低,肿瘤持续生长^[8-10]。通过不同的机制介导肿瘤微环境中的免疫抑制,参与肿瘤的发生、发展、播散和转移。近期研究显示, Tim-3可以异位表达于非造血细胞肿瘤细胞,特别是原发性癌细胞,包括黑色素瘤、脂肪肉瘤、非小细胞肺癌、宫颈癌等^[11-14]。国外学者发现, Tim-3在白血病干细胞中高表达, Kikushige等^[3,15]应用抗人Tim-3的鼠IgG2 α 抗体,可以阻止白血病细胞在小鼠体内的重建却不会损伤正常人造血干细胞。对于Tim-3是否在白血病原代细胞表达尚未见报道,我们在研究中发现Tim-3在非 M_3 急性白血病的原始幼稚细胞中表达,初治AML组和MDS转AML组表达均高于ALL组,但初治AML与MDS转AML组差异无统计学意义。

近年来国外学者发现,在结肠癌和膀胱癌患者中, Tim-3高表达与肿瘤的发展和病理分期相关^[16-17]。大量研究发现,在非小细胞肺癌、宫颈癌、结肠癌和膀胱癌患者中, Tim-3⁺患者较Tim-3⁻患者生存时间更短^[13-14,16-17]。但是我们的研究结果与之不同,根据NCCN分级,我们发现Tim-3在初治AML白血病细胞中的表达预后良好组较中等和不良组表达水平高,而预后中等与不良组之间差异无统计学意义。在初治ALL患者中标危组和高危组Tim-3表达差异无统计学意义。

Anderson等^[18]及Ando等^[19]发现,表达于髓系细胞上的

Tim-3活化可增强肿瘤坏死因子 α (TNF- α)生成和分泌,有证据表明TNF- α 这种促炎性反应在恶性肿瘤患者的机体免疫反应中发挥抗肿瘤作用。但详细的机制不清楚,有待进一步研究。

我们进一步分析Tim-3表达与临床特征的关系,通过相关性分析发现, Tim-3在白血病细胞中的表达水平与CD13、CD34表达呈正相关,而与其他免疫表型无明显相关性。提示Tim-3表达于较前体的幼稚细胞。同时我们发现在ALL患者中,LDH水平越高, Tim-3在白血病细胞中的表达水平相对也高,可能与ALL患者体内肿瘤负荷的大小有关。而初诊时的LDH水平与初治AML的Tim-3表达并无明显相关性。在本组患者中,没有发现Tim-3在原始幼稚细胞的表达与急性白血病患者性别、年龄、骨髓原始细胞比例存在相关性。同时我们也分析了患者染色体、基因突变、45种常见融合基因、WT1和EVII1表达等,没有发现Tim-3与特殊染色体和基因存在相关性,可能与我们样本量仍偏少有关。由于随访时间偏短,没有对患者的生存和复发情况进行统计分析,我们将继续扩增标本,延长随访期,进一步分析Tim-3的表达与预后的关系。

综上所述,我们的研究结果显示Tim-3表达于非M₃型急性初治白血病中,主要是高表达于AML,与CD13、CD34等急性白血病的标志物存在一定的相关性,可能是白血病的一种标志物,其意义有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] Freeman GJ, Casanovas JM, Umetsu DT, et al. TIM genes: a family of cell surface phosphatidyserine receptors that regulate innate and adaptive immunity[J]. *Immunol Rev*, 2010, 235(1): 172-189. doi: 10.1111/j.0105-2896.2010.00903.x.
- [2] Zhu C, Anderson AC, Schubart A, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(12):1245-1252. doi: 10.1038/ni1271.
- [3] Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, et al. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(6):708-717. doi: 10.1016/j.stem.2010.11.014.
- [4] 中华医学会血液学分会,中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会. 中国成人急性淋巴细胞白血病诊断与治疗专家共识[J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(9):789-792. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2012.09.028.
- [5] Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)[J]. *Leukemia*, 1995, 9(10):1783-1786.
- [6] O'Donnell MR, Abboud CN, Altman J, et al. Acute myeloid leukemia[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2012, 10(8):984-1021.
- [7] Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease[J]. *Nature*, 2002, 415(6871):536-541. doi: 10.1038/415536a.
- [8] Huang X, Bai X, Cao Y, et al. Lymphoma endothelium preferentially expresses Tim-3 and facilitates the progression of lymphoma by mediating immune evasion[J]. *J Exp Med*, 2010, 207(3): 505-520. doi: 10.1084/jem.20090397.
- [9] Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, et al. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity[J]. *J Exp Med*, 2010, 207(10):2187-2194. doi: 10.1084/jem.20100643.
- [10] Cedeno-Laurent F, Dimitroff CJ. Galectins and their ligands: negative regulators of anti-tumor immunity[J]. *Glycoconj J*, 2012, 29(8-9):619-625. doi: 10.1007/s10719-012-9379-0.
- [11] Li H, Zhou X, Ran Q, et al. Parapharyngeal liposarcoma: a case report[J]. *Diagn Pathol*, 2013, 8:42. doi: 10.1186/1746-1596-8-42.
- [12] Wiener Z, Kohalmi B, Poczta P, et al. TIM-3 is expressed in melanoma cells and is upregulated in TGF-beta stimulated mast cells[J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(4):906-914. doi: 10.1038/sj.jid.5700616.
- [13] Zhuang X, Zhang X, Xia X, et al. Ectopic expression of TIM-3 in lung cancers: a potential independent prognostic factor for patients with NSCLC[J]. *Am J Clin Pathol*, 2012, 137(6):978-985. doi: 10.1309/AJCP9Q6OVLVSHTMY.
- [14] Cao Y, Zhou X, Huang X, et al. Tim-3 expression in cervical cancer promotes tumor metastasis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53834. doi: 10.1371/journal.pone.0053834.
- [15] Kikushige Y, Miyamoto T. TIM-3 as a novel therapeutic target for eradicating acute myelogenous leukemia stem cells[J]. *Int J Hematol*, 2013, 98(6):627-633. doi: 10.1007/s12185-013-1433-6.
- [16] Zhou E, Huang Q, Wang J, et al. Up-regulation of Tim-3 is associated with poor prognosis of patients with colon cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(7):8018-8027.
- [17] Yang M, Yu Q, Liu J, et al. T-cell immunoglobulin mucin-3 expression in bladder urothelial carcinoma: Clinicopathologic correlations and association with survival[J]. *J Surg Oncol*, 2015, 112(4):430-435. doi: 10.1002/jso.24012.
- [18] Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L, et al. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells[J]. *Science*, 2007, 318(5853):1141-1143. doi: 10.1126/science.1148536.
- [19] Ando K, Ohmori T, Inoue F, et al. Enhancement of sensitivity to tumor necrosis factor alpha in non-small cell lung cancer cells with acquired resistance to gefitinib[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(24 Pt 1):8872-8879.

(收稿日期:2015-11-03)

(本文编辑:王叶青)