

Tim-3在急性髓系白血病患者NK细胞上的表达特征及其临床意义

马金凤¹ 李彩霞² 吴德沛² 孙忠亮¹ 颜春龙¹

¹济宁市第一人民医院 272000; ²江苏省血液研究所、苏州大学附属第一人民医院 215006

通信作者:颜春龙, Email:yclky2012@126.com

【摘要】 目的 探讨负性共刺激分子Tim-3在初诊急性髓系白血病(AML)患者外周血自然杀伤细胞(NK细胞)表面的表达特征及其临床意义。方法 采集2013年6月至2014年6月苏州大学附属第一医院血液内科收治的未经任何临床措施干预的39例AML患者外周血及28名健康志愿者的外周血,采用CD3⁻、CD56⁺、Tim-3⁺为标志,经免疫荧光标记和流式细胞术检测Tim-3在AML患者外周血NK细胞上的表达。结果 初诊AML患者外周血NK细胞占淋巴细胞比例为(5.74±5.31)%,较正常对照组的(12.55±6.33)%显著下降($t=4.596, P<0.001$);初诊AML患者外周血NK细胞上Tim-3的表达水平为(42.67±19.08)%,较正常对照组的(60.99±20.69)%显著下降($t=3.781, P<0.001$)。AML患者外周血NK细胞比例与其染色体核型相关($t=2.915, P<0.05$);Tim-3在AML患者NK细胞表达水平与患者诱导缓解率、危险分层相关(P 值均 <0.05)。结论 AML患者外周血中NK细胞比例及Tim-3表达水平明显下降, Tim-3在AML患者外周血NK细胞上表达下调与AML的预后相关。

【关键词】 白血病,髓样,急性; Tim-3分子; NK细胞

基金项目:国家自然科学基金(81470346)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.09.009

Expression of Tim-3 on natural killer cells in patients with acute myeloid leukemia and its clinical significance

Ma Jinfeng¹, Li Caixia², Wu Depai², Sun Zhongliang¹, Yan Chunlong¹

¹Jining No.1 People's Hospital, Jining 272000, China; ²Jiangsu Institute of Hematology, the First Affiliated Hospital University, Suzhou 215006, China

Corresponding author: Yan Chunlong, Email:yclky2012@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression characteristics of Tim-3 on natural killer (NK) cells of peripheral blood in patients with acute myeloid leukemia (AML) and its clinical significance. **Methods** Peripheral blood was obtained from 39 patients with newly diagnosed AML before intervention, with peripheral blood from 28 cases of healthy volunteers collected as normal control. Using CD3, CD56 and Tim-3 as markers, expression levels of Tim-3 on the peripheral blood NK cells were detected by immune fluorescence labeling and flow cytometry. **Results** The ratio of the peripheral blood CD3⁻CD56⁺ NK cells in newly diagnosed AML patients (5.74±5.31)% decreased significantly, compared with the normal control (12.55±6.33)% ($t=4.596, P<0.001$). Tim-3 expression on the peripheral blood NK cells in newly diagnosed AML patients (42.67±19.08)% decreased significantly, compared with the normal control group (60.99±20.69)% ($t=3.781, P<0.001$). CD3⁻CD56⁺ NK cell ratio of peripheral blood in AML patients was significantly correlated with Chromosome karyotype ($t=2.915, P<0.005$). Expression level of Tim-3 on NK cells in the peripheral blood of AML patients had significant correlation with ratio of CR and NCCN high risk group ($P<0.05$). **Conclusion** The rate of NK cells in peripheral blood and the expression level of Tim-3 on NK cells in AML patients decreased significantly. The lower expression level of Tim-3 on NK cells correlate with prognosis of AML.

【Key words】 Leukemia, myeloid, acute; Tim-3; Natural killer cell

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81470346)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.09.009

研究证实, T细胞免疫球蛋白黏蛋白分子3 (T cell immunoglobulin mucin-3, Tim-3)、PD-1、CTLA-4等负性共刺激分子在介导肿瘤逃逸机制中扮演了关键角色^[1]。近年, Tim-3作为T细胞免疫球蛋白黏蛋白分子家族中一员^[2], 参与肿瘤逃逸的机制成为研究的热点。负性共刺激分子Tim-3通过向肿瘤浸润组织中T细胞提供抑制性信号, 导致T细胞功能耗竭, 成为肿瘤生长微环境中重要的免疫抑制分子之一^[3-4]。由于肿瘤细胞本身缺乏自身特异性抗原且下调HLA分子使得T淋巴细胞发挥作用受到限制。自然杀伤细胞(NK细胞)无需MHC-II分子致敏即可直接杀伤靶细胞, 因此NK细胞在机体抗肿瘤机制中可能承担更重要的角色。关于Tim-3在急性白血病患者外周血NK细胞上的表达及作用机制研究甚少。本研究采用免疫荧光标记、流式细胞术的方法检测分析Tim-3在急性髓系白血病(AML)患者外周血NK细胞上的表达特征及其临床意义, 以期了解Tim-3参与的白血病细胞免疫逃逸机制中NK细胞的作用。

病例与方法

1. 病例: 收集2013年6月至2014年6月在苏州大学附属第一医院血液内科经骨髓细胞形态学、免疫学、细胞遗传学、分子学(MICM)新确诊且未经任何治疗的AML患者39例(除外急性早幼粒细胞白血病), 男20例, 女19例, 年龄14~65岁, 以与患者年龄、性别相匹配的28名同期健康志愿者作为健康对照。AML的诊断符合2011年《成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南》^[5], 并排除自身免疫性疾病、HIV、HBV等感染性疾病或同时患有其他肿瘤的患者。

2. 材料与试剂: 采集患者在治疗干预前或健康对照者的新鲜外周血2 ml, 肝素抗凝。PE-Cy5标记的鼠抗人单克隆抗体CD3(克隆号: UCHT1)、FITC标记的鼠抗人单克隆抗体CD56(克隆号: HIM3-4)、PE标记的鼠抗人单克隆抗体Tim-3(克隆号: ICRF44)、IgG同型对照均购自美国Biolegend公司; 红细胞裂解液、流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司。

3. 流式细胞术检测 AML患者外周血NK细胞比例及Tim-3在NK细胞上的表达: 每份样本加入50 μ l外周血。分别加入荧光标记的抗CD3、抗CD56和抗Tim-3抗体, 4 $^{\circ}$ C避光染色20 min。每管

加入红细胞裂解液150 μ l, 室温裂解10 min, 加入1 ml含0.5% FCS的PBS洗涤1次, 再加入1 ml含0.5% FCS的PBS洗涤1次, 最后加入0.4 ml PBS, 经Beckman Coulter流式细胞仪检测分析, CD3/SSC设门识别淋巴细胞, 分析NK细胞比例及Tim-3在NK细胞的表达。

4. 统计学处理: 采用Flowjo软件分析所有流式数据。采用SPSS 17.0软件进行统计学分析, 计量资料若呈正态分布用 $\bar{x}\pm s$ 表示。计量资料多组间比较若符合正态分布, 用一维方差分析; 若不符合正态分布, 用Mann-Whitney U检验; 随机设计组的比较使用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 患者的临床资料: 39例AML患者中, 男21例, 女23例, 年龄(39.40 \pm 12.89)岁。FAB分型: M₀3例, M₁4例, M₂11例, M₃7例, M₄8例, M₅3例, 未能分型3例。根据2013年美国国立综合癌症网络(NCCN)指南基于细胞遗传学和分子生物学特性, 将所有患者分为低危组和中高危组, 低危组患者12例, 中高危组患者27例。所有患者均采用标准剂量诱导化疗, 25例首疗程诱导化疗达到完全缓解(CR₁), 14例首疗程诱导化疗获得部分缓解(PR)或未缓解(NR)。

2. AML患者外周血NK细胞比例: AML患者外周血CD3⁺CD56⁺NK细胞占淋巴细胞的比例为(5.74 \pm 5.31)%, 较健康志愿者的(12.55 \pm 6.33)%显著降低, 差异有统计学意义($t = 4.596, P < 0.001$)。流式细胞术分析中所有CD56⁺NK细胞均来自CD3⁺淋巴细胞。

3. AML患者外周血NK细胞表面Tim-3的表达水平: AML患者外周血CD3⁺CD56⁺NK细胞上Tim-3的表达水平为(42.67 \pm 19.08)%, 较健康志愿者的(60.99 \pm 20.69)%显著降低, 差异有统计学意义($t = 3.781, P < 0.001$)。

4. AML患者外周血NK细胞上Tim-3的表达水平与临床特征间相关性: 统计学分析显示, AML患者外周血NK细胞比例与患者首疗程诱导治疗疗效、NCCN危险度分层均无明显相关性($P > 0.05$), 而与是否伴有染色体复杂核型及有无DNMT3A突变显著相关($P < 0.05$)(表1)。

Tim-3在AML患者外周血NK细胞的表达水平

表1 急性髓系白血病患者外周血NK细胞比例与临床特征、预后的关系(% , $\bar{x}\pm s$)

| 临床特征 | 例数 | NK细胞比例 | t值 | P值 |
|-------------|----|-------------|-------|-------|
| 性别 | | | 1.998 | 0.052 |
| 男 | 20 | 4.48±3.67 | | |
| 女 | 19 | 7.66±4.06 | | |
| 年龄(岁) | | | 0.565 | 0.383 |
| <50 | 25 | 7.71±5.65 | | |
| ≥50 | 14 | 5.97±3.50 | | |
| 首次诱导治疗疗效 | | | 0.271 | 0.787 |
| CR | 25 | 6.23±4.50 | | |
| PR/NR | 14 | 5.76±3.91 | | |
| 复发 | | | 0.013 | 0.990 |
| 是 | 3 | 6.02±2.05 | | |
| 否 | 36 | 6.07±5.76 | | |
| 染色体核型 | | | 2.915 | 0.006 |
| 预后良好、中等 | 26 | 10.04±6.51 | | |
| 复杂异常 | 13 | 4.83±2.83 | | |
| 危险分层 | | | 2.026 | 0.231 |
| 低危组 | 12 | 6.18±6.34 | | |
| 中高危组 | 27 | 5.75±2.56 | | |
| 伴AML1-ETO | | | 0.641 | 0.526 |
| 是 | 7 | 7.97±5.08 | | |
| 否 | 32 | 6.11±5.58 | | |
| 伴CBFβ-MYH11 | | | 0.494 | 0.624 |
| 是 | 3 | 4.50±3.50 | | |
| 否 | 36 | 6.16±3.69 | | |
| 伴IKZF1-IK6 | | | 1.150 | 0.256 |
| 是 | 4 | 2.51±1.66 | | |
| 否 | 35 | 6.67±4.57 | | |
| 伴CEBPA突变 | | | 0.647 | 0.522 |
| 是 | 8 | 5.11±2.98 | | |
| 否 | 31 | 6.67±4.57 | | |
| 伴FLT3-ITD突变 | | | 1.112 | 0.273 |
| 是 | 4 | 3.19±1.78 | | |
| 否 | 35 | 6.71±4.25 | | |
| 伴DNMT3A突变 | | | 2.460 | 0.018 |
| 是 | 2 | 15.95±11.10 | | |
| 否 | 37 | 5.83±3.40 | | |

注:CR:完全缓解;PR:部分缓解;NR:未缓解

与目前我院能够检测的多种融合基因、突变基因及染色体核型等因素均无明显相关性($P > 0.05$),而与患者的首疗程诱导治疗疗效及NCCN危险度分层显著相关($P < 0.05$)(表2)。

讨 论

Tim-3是肿瘤诱导的多种病理条件下免疫抑制网络的主要成员之一,在肿瘤的发生发展及肿瘤逃逸过程中发挥重要作用。我们课题组证实 Tim-3

表2 Tim-3在急性髓系白血病患者外周血NK细胞的表达水平与临床特征、预后的关系(% , $\bar{x}\pm s$)

| 临床特征 | 例数 | Tim-3表达水平 | t值 | P值 |
|-------------|----|--------------|-------|-------|
| 性别 | | | 0.070 | 0.117 |
| 男 | 20 | 49.03±20.22 | | |
| 女 | 19 | 39.11±17.98 | | |
| 年龄(岁) | | | 3.794 | 0.963 |
| <50 | 25 | 44.23±16.44 | | |
| ≥50 | 14 | 44.54±21.01 | | |
| 首次诱导疗效 | | | 0.096 | 0.050 |
| CR | 25 | 42.77±23.8 | | |
| PR/NR | 14 | 32.82±20.13 | | |
| 复发 | | | 5.340 | 0.734 |
| 是 | 3 | 37.54±20.61 | | |
| 否 | 36 | 27.90±18.58 | | |
| 染色体核型 | | | 0.238 | 0.700 |
| 预后良好、中等 | 26 | 38.14±21.27 | | |
| 复杂异常 | 13 | 35.52±23.29 | | |
| 危险分层 | | | 2.137 | 0.025 |
| 低危组 | 12 | 43.57±19.60 | | |
| 中高危组 | 27 | 33.85±23.33 | | |
| 伴AML1-ETO | | | 1.779 | 0.083 |
| 是 | 7 | 58.14±23.95 | | |
| 否 | 32 | 42.57±18.41 | | |
| 伴CBFβ-MYH11 | | | 0.530 | 0.590 |
| 是 | 3 | 45.50±20.00 | | |
| 否 | 36 | 38.84±22.66 | | |
| 伴IKZF1-IK6 | | | 0.279 | 0.782 |
| 是 | 4 | 47.153±14.23 | | |
| 否 | 35 | 44.26±20.13 | | |
| 伴CEBPA突变 | | | 1.270 | 0.212 |
| 是 | 8 | 52.25±13.18 | | |
| 否 | 31 | 42.44±20.65 | | |
| 伴FLT3-ITD突变 | | | 0.083 | 0.930 |
| 是 | 4 | 43.67±26.96 | | |
| 否 | 35 | 44.53±19.13 | | |
| 伴DNMT3A突变 | | | 1.015 | 0.317 |
| 是 | 2 | 30.75±11.80 | | |
| 否 | 37 | 45.40±19.78 | | |

注:CR:完全缓解;PR:部分缓解;NR:未缓解

介导肺癌细胞的免疫逃逸^[6]。Tim-3在树突状细胞(DC细胞)表达上调可增强DC细胞抗感染能力^[7-8]。另外Tim-3表达上调可能是白血病干细胞的标志^[9]。近年有研究报道,正常人外周血NK细胞上Tim-3呈组成性表达约70%,但呈不均一性,并认为Tim-3是NK细胞活化并发挥功能的标志^[10-11]。由此看出, Tim-3既可参与负性免疫调控机制参与免疫耐受又可作为正性分子增强免疫监视作用。

我们首先检测了28名健康志愿者及39例经骨

髓MICM分型确诊的初治AML患者外周血NK细胞百分比。28名健康志愿者外周血NK细胞比例为(12.55±6.33)%,而在AML患者外周血中NK细胞比例仅占(5.74±5.31)%($P < 0.001$)。我们进一步检测健康志愿者及AML患者外周血NK细胞上Tim-3的表达水平。与Ndhlovu等^[12]的检测结果(70%)相似,我们检测的健康志愿者外周血NK细胞上Tim-3表达水平为(60.99±20.69)%,AML患者NK细胞上Tim-3的表达水平较健康志愿者明显下调[(42.67±19.08)%],差异有统计学意义($P < 0.001$)。为了解何种因素下调了AML患者NK细胞上Tim-3的表达及如何影响AML发生发展,我们进一步分析了NK细胞比例及NK细胞上Tim-3表达水平与患者的诊断时临床特征和疾病缓解率、染色体核型、基因突变等预后相关因素的相关性。我们发现:伴有染色体核型复杂异常AML患者的NK细胞比例较预后良好或正常核型者下降;低危组患者外周血NK细胞上Tim-3表达较中高危组患者明显升高;NK细胞上高表达Tim-3患者诱导化疗缓解率明显高于低表达组;伴有不良预后FLT3-ITD突变较伴AML1-ETO、CBF β -MYH11较好预后突变患者NK细胞上Tim-3表达水平下降。因此,NK细胞上Tim-3表达水平下降与患者较差的临床预后相关。Tim-3是NK细胞发育成熟以及发挥功能标志,AML细胞可能通过下调NK细胞上Tim-3表达,抑制NK细胞分泌IFN- γ 等细胞因子、增殖活性及细胞毒性作用^[12]。有实验研究显示,在AML细胞系中存在Gal-9表达^[9,12]。Tim-3可能通过与白血病细胞上Gal-9相结合增强Tim-3⁺NK细胞分泌IFN- γ 能力以及NK细胞杀伤靶细胞作用。然而,我们的研究证实AML患者NK细胞上Tim-3表达下调,由此NK细胞发挥杀伤白血病细胞作用受到限制,促使了AML细胞的免疫逃逸。近期有研究者报道Tim-3⁺NK细胞具有更强的免疫功能,但Tim-3与Gal-9相互作用可能抑制了NK细胞杀伤靶细胞效应^[10]。我们团队亦研究证明Tim-3可能参与造血干细胞移植后移植物抗宿主病的免疫调节,并与GVHD严重程度呈正相关^[13]。

综上所述, Tim-3在AML患者中NK细胞上表达下调,与患者不良预后相关。NK细胞上Tim-3下调可能导致其功能降低,促使导致了白血病细胞的免疫逃逸,但其确切的功能和机制需要进一步深入研究,以期明确Tim-3在AML的发病机制中的作用,为AML患者的细胞免疫治疗提供新靶点。

参考文献

- [1] Norde WJ, Hobo W, van der Voort R, et al. Coinhibitory molecules in hematologic malignancies: targets for therapeutic intervention[J]. Blood, 2012, 120(4):728-736. DOI: 10.1182/blood-2012-02-412510.
- [2] Freeman GJ, Casanovas JM, Umetsu DT, et al. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity[J]. Immunol Rev, 2010, 235(1): 172-189. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2010.00903.x.
- [3] 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.
- [4] Melero I, Hervas-Stubb S, Glennie M, et al. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(2): 95-106.
- [5] 中华医学会血液学分会. 成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2011年版)[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(11): 804-807. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2011.11.021.
- [6] Gao X, Zhu Y, Li G, et al. TIM-3 expression characterizes regulatory T cells in tumor tissues and is associated with lung cancer progression[J]. PLoS One, 2012, 7(2):e30676. DOI: 10.1371/journal.pone.0030676.
- [7] Dardalhon V, Anderson AC, Karman J, et al. Tim-3/galectin-9 pathway: regulation of Th1 immunity through promotion of CD11b+Ly-6G+ myeloid cells[J]. Immunol, 2010, 185(3): 1383-1392. DOI: 10.4049/jimmunol.0903275.
- [8] Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L, et al. Proceptor Tim-3 expressed on innate immune cells recaptor Tim-3 expressed on innate immune cells[J]. Science, 2007, 318(5853):1141-1143.
- [9] 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.
- [10] Gleason MK, Lenvik TR, McCullar V, et al. Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9[J]. Blood, 2012, 119(13):3064-3072. DOI: 10.1182/blood-2011-06-360321.
- [11] da Silva IP, Gallois A, Jimenez-Baranda S, et al. Reversal of NK-cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade[J]. Cancer Immunol Res, 2014, 2(5):410-422. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0171.
- [12] Ndhlovu LC, Lopez-Vergès S, Barbour JD, et al. Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity[J]. Blood, 2012, 119(16):3734-3743. DOI: 10.1182/blood-2011-11-392951.
- [13] 李晓莉, 姚遥, 杨冰玉, 等. Tim-3 mRNA在异基因造血干细胞移植后急性移植抗宿主病中的作用[J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(6): 469-473. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.06.006.

(收稿日期:2019-01-19)

(本文编辑:王叶青)