

## 多发性骨髓瘤患者外周骨髓源抑制性细胞的初步研究

周林 祁双 严成 金慧敏 许洁 马莉 管俊 夏圣

**Myeloid-derived suppressor cells in peripheral blood of multiple myeloma** Zhou Lin, Qi Shuang, Yan Cheng, Jin Huimin, Xu Jie, Ma Li, Guan Jun, Xia Sheng

Corresponding author: Xia Sheng, Department of Immunology, Institute of Clinic Laboratory Diagnosis, School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China. Email: xiasheng1519@163.com

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种克隆性浆细胞异常增殖的最常见血液系统恶性肿瘤,年发病率约为4.3/10 000<sup>[1]</sup>。其临床症状主要表现为贫血、骨质破坏、肾损伤和高钙血症等,尤其好发于中老年人群。髓源抑制性细胞(myeloid derived suppressor cells, MDSC)是一群髓系来源的具有免疫抑制功能的异质性细胞群体,根据分化来源不同可分为粒细胞系 MDSC(PMN-MDSC)和单核细胞系 MDSC(M-MDSC),其表面标记分别为 CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup>和 CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD15<sup>-</sup><sup>[2]</sup>。近年来研究发现多种实体瘤患者外周血 MDSC 表达明显上调<sup>[3]</sup>,但其在 MM 中的表现尚不清楚。本研究我们采用流式细胞术检测 32 例 MM 患者和 20 名健康人外周血 PMN-MDSC 和 M-MDSC 表达,并用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 MDSC 相关细胞因子精氨酸酶 1( ARG1)、诱发型一氧化氮合酶(iNOS)和血管内皮生长因子(VEGF)基因 mRNA 表达水平,同时检测 MM 患者外周血滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)、调节性 T 细胞(Treg)、辅助性 T 细胞(Th)、细胞毒性 T 细胞(Tc)、自然杀伤细胞(NK)及 B 淋巴细胞的比例。

### 材料与方法

1. 病例:2014年1月至2015年7月于江苏省苏北人民医院诊断为 MM 的患者,其中男 21 例、女 11 例,中位年龄 64 (45~81)岁。ISS 分期: I 期 6 例, II 期 11 例, III 期 15 例。免

疫学分型: IgG 型 14 例, IgA 型 7 例, IgM 型 2 例, 游离轻链型  $\lambda$ 、 $\kappa$  型分别为 6、3 例。所有患者都符合国际骨髓瘤工作组(IMWG)诊断标准<sup>[4]</sup>。以 20 名健康体检者作为正常对照组,男 16 例、女 4 例,中位年龄 57(45~61)岁。

2. 主要设备与试剂:流式细胞分析仪(FACS Canto II)为美国 BD 公司产品,实时荧光定量 PCR 仪(CFX-96 real-time cycler)为美国 BIO-Rad 公司产品,梯度 PCR 仪为德国 Eppendorf 公司产品,普通 PCR 仪(ABI2720)、高速冷冻离心机为美国 Thermo Fisher 公司产品。抗人 CD14-PE、抗人 CD11b-FITC、抗人 CD15-APC、抗人 CD33-PE-Cyanine5 为美国 Ebioscience 公司产品,逆转录试剂 Hiscript Q RT SuperMix、实时荧光定量试剂 Cham Q SYBR QPCR Master Mix 为中国 Vazyme Biotech 公司产品。

3. 标本采集和制备:采集初诊 MM 患者和健康体检者外周静脉血 3 ml, EDTA-2K 抗凝,先进行全血细胞计数分析,然后取部分全血进行流式标记、检测分析,剩余全血标本以 2 862 $\times$ g 离心 10 min,分离上层血浆和下层血细胞,然后分别用 EP 管分装, -80  $^{\circ}$ C 冻存。全血细胞用于 qRT-PCR 检测,血浆用于常规生化指标检测。

4. 流式细胞术检测 MDSC 及淋巴细胞亚群:①MDSC 表面标记<sup>[5]</sup>: PMN-MDSC: CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>; M-MDSC: CD14<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD15<sup>-</sup>。②淋巴细胞亚群表面标记<sup>[6]</sup>: Tfh 细胞: CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>; Th 细胞: CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>; Tc 细胞: CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; B 细胞: CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>; NK 细胞: CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>; Treg 细胞: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>LOW/-</sup>。

5. qRT-PCR 检测外周全血细胞 ARG1、iNOS 和 VEGF 基因 mRNA 表达: TRizol 法提取外周全血细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA, 再用 qRT-PCR 检测相关基因相对表达量。引物设计参见文献<sup>[7]</sup>, 以  $\beta$ -actin 作为内参, 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成(表 1)。反应体系 10  $\mu$ l: SYBR Green 5  $\mu$ l, 上下游引物各 0.2  $\mu$ l, 双蒸水 4.1  $\mu$ l, cDNA 0.5  $\mu$ l。反应条件: 预变性 95  $^{\circ}$ C 30 s, 变性 95  $^{\circ}$ C 5 s, 退火 61  $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。mRNA 表达量采用相对定量分析法计算。

6. 统计学处理: 数据分析采用 SPSS 21.0 软件, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。统计学方法采用参数的非配对的独立样本  $t$  检验, 方差不齐则采用近似  $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 流式细胞术检测 MM 患者和正常对照组外周血 MDSC: MM 患者外周血 PMN-MDSC 比例高于正常对照组

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.06.016

基金项目: 国家自然科学基金(81172834、31428006、31570879)

作者单位: 江苏镇江 212013, 江苏大学医学院免疫学与免疫检验教研室, 江苏大学医学院医学检验研究所[周林(江苏省苏北人民医院检验科, 225001)、夏圣]; 扬州大学医学院(祁双); 江苏大学医学院免疫学与免疫检验教研室(严成、金慧敏、许洁); 江苏省苏北人民医院血液科(马莉、管俊)

通信作者: 夏圣, Email: xiasheng1519@163.com

[(65.72±12.10)%对(51.10±3.53)% , t=5.240, P<0.001] , M-MDSC 差异无统计学意义 [(0.49±0.31)%对(0.42±0.31)% , t=0.869, P=0.389]。

2. 流式细胞术检测MM患者和正常对照组外周血淋巴细胞亚群:MM患者外周血Tfh、Treg、Tc细胞比例高于正常对照组(P<0.001, P<0.001, P=0.004), Th/Tc细胞比值降低(P=0.024)。两组Th、NK和B淋巴细胞比例差异无统计学意义(P>0.05)。详见表2。

3. 外周全血细胞ARG1、iNOS和VEGF基因mRNA表达水平:MM患者外周全血细胞ARG1、iNOS、VEGF基因mRNA表达水平均高于正常对照组(P<0.001), 详见表3。

### 讨 论

MDSC是一群髓系来源的具有免疫抑制功能的异质性细胞群体,由造血祖细胞、未成熟的巨噬细胞、未成熟的粒细胞和未成熟树突状细胞等细胞组成。研究表明在炎症、肿瘤等病理条件可使其异常增殖<sup>[8]</sup>。已有的研究结果发现PMN-MDSC在MM患者骨髓中显著升高<sup>[5]</sup>,本研究结果与上述研究一致。目前,MDSC的定义仍存争议<sup>[9]</sup>。Wang等<sup>[10]</sup>研究发现MM患者M-MDSC显著升高且与疾病进展及疗效相关,本组MM患者外周血M-MDSC比例与正常对照组差异无统计学意义,可能与MDSC定义不同有关。

MDSC的免疫抑制功能主要通过抑制T细胞的增殖和活化、抑制NK细胞的天然杀伤作用、活化Th17细胞和Treg细胞等方式促进肿瘤的免疫耐受和免疫逃逸<sup>[11]</sup>。本研究结果表明,MM患者外周血T细胞亚群比例失调, Th细胞和Tc细胞的比值显著降低, Treg细胞比例显著升高。Tfh细胞是真正具有辅助B细胞活化功能的T细胞亚群<sup>[12]</sup>。本组MM患者外周血Tfh比例显著升高,但B淋巴细胞比例却只有轻度上升,造成这一现象的机制有待进一步研究。同

表3 多发性骨髓瘤(MM)患者和正常对照组外周全血细胞ARG1、iNOS和VEGF基因mRNA相对表达量( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	ARG1	iNOS	VEGF
MM组	32	1.76±0.03	2.12±0.09	1.63±0.10
正常对照组	20	1.21±0.12	1.47±0.23	1.27±0.07
t值		24.85	14.39	14.07
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:ARG1:精氨酸酶1;iNOS:诱发型一氧化氮合酶;VEGF:血管内皮生长因子

时,本组MM患者外周血NK细胞比例轻度下降,是否与MDSC有关还需研究,但以上免疫细胞变化进一步证明了在MM患者外周血中存在严重的细胞免疫功能的失调。

现有的研究认为,MDSC在多种实体瘤中实现免疫抑制的机制主要是通过释放ARG1、iNOS、VEGF、活性氧(ROS)以及释放IL-6、IL-10、TNF-β等细胞因子来抑制T细胞的增殖和活化<sup>[3, 13-14]</sup>。此外,MDSC还通过释放过氧亚硝酸盐来抑制Tc细胞的免疫功能<sup>[15]</sup>,但MM患者MDSC异常增殖及其免疫抑制机制仍未阐明。ARG1、iNOS和VEGF都是MDSC相关细胞因子<sup>[7, 11]</sup>,因此,本研究小组进一步研究了MM患者外周全血细胞ARG1、iNOS和VEGF基因mRNA表达。研究结果显示,MM患者外周全血细胞ARG1和iNOS基因mRNA表达水平显著升高。ARG1和iNOS的上调可导致L-精氨酸的消耗增加,从而引起T细胞的增殖功能受到抑制,而且其产物一氧化氮能够直接加快T细胞的凋亡<sup>[16]</sup>。因此,MM患者外周全血细胞ARG1和iNOS基因高表达不仅提示MDSC的上调,而且还提示在MM患者中也存在类似的T细胞增殖、活化功能受抑机制。

本研究结果还显示初诊MM患者外周全血细胞VEGF基因mRNA表达显著升高。以往研究表明,VEGF能够促进

表1 实时荧光定量PCR检测ARG1、iNOS和VEGF基因mRNA表达引物序列<sup>[7]</sup>

基因	引物序列(5'→3')		产物大小(bp)
	上游	下游	
ARG1	GTTTCTCAAGCAGACCAGCC	GCTCAAGTGCAGCAAAGAGA	149
iNOS	ATTCTGCTGCTTGCTGAGGT	TTCAAGACCAAATCCACCAG	138
VEGF	CACACAGGATGGCTTGAAGA	AGGGCAGAATCATCACGAAG	136
β-actin	CACGAACTACCTCAACTCC	CATACTCCTGCTTGCTGATC	265

注:ARG1:精氨酸酶1;iNOS:诱发型一氧化氮合酶;VEGF:血管内皮生长因子

表2 多发性骨髓瘤(MM)患者和正常对照组外周血淋巴细胞亚群检测结果( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	Tfh细胞 (%)	Treg细胞 (%)	Tc细胞 (%)	Th/Tc细胞比值	Th细胞 (%)	NK细胞 (%)	B细胞 (%)
MM组	32	6.33±1.61	10.81±2.18	38.36±8.10	1.05±0.59	37.76±13.41	17.07±3.21	10.20±1.77
正常对照组	20	3.59±0.49	7.50±1.62	31.51±7.83	1.39±0.45	39.35±8.67	18.01±3.32	9.87±1.75
t值		8.940	8.930	3.000	-2.332	-0.471	-1.010	0.647
P值		<0.001	<0.001	0.004	0.024	0.639	0.317	0.520

注:Tfh:滤泡辅助性T细胞;Treg:调节性T细胞;Th:辅助性T细胞;Tc:细胞毒性T细胞;NK:自然杀伤细胞

造血祖细胞(HPC)分化为 MDSC<sup>[11]</sup>。我们由此推测 VEGF 高表达可能促进了 MM 患者 MDSC 的增殖,但 VEGF 与其他免疫细胞之间的作用机制有待进一步研究。MM 患者 MDSC 与细胞因子 ARG1、iNOS、VEGF 变化的相关性也需要进一步研究证实。

### 参考文献

- [1] Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma [J]. Blood, 2008, 111(6):2962-2972. DOI: 10.1182/blood-2007-10-078022.
- [2] Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(3):162-74. DOI: 10.1038/nri2506.
- [3] Solito S, Marigo I, Pinton L, et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers [J]. Ann N Y Acad Sci, 2014, 1319:47-65. DOI: 10.1111/nyas.12469.
- [4] Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma [J]. Lancet Oncol, 2014, 15(12):e538-548. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5.
- [5] Ramachandran IR, Martner A, Pisklakova A, et al. Myeloid-derived suppressor cells regulate growth of multiple myeloma by inhibiting T cells in bone marrow [J]. J Immunol, 2013, 190(7):3815-3823. DOI: 10.4049/jimmunol.1203373.
- [6] Pallikkuth S, Parmigiani A, Silva SY, et al. Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine [J]. Blood, 2012, 120(5):985-993. DOI: 10.1182/blood-2011-12-396648.
- [7] Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells [J]. J Immunol, 2010, 185(4):2273-2284. DOI: 10.4049/jimmunol.1000901.
- [8] Trikha P, Carson WE 3rd. Signaling pathways involved in MDSC regulation [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1846(1):55-65. DOI: 10.1016/j.bbcan.2014.04.003.
- [9] Damuzzo V, Pinton L, Desantis G, et al. Complexity and challenges in defining myeloid-derived suppressor cells [J]. Cytometry B Clin Cytom, 2015, 88(2):77-91. DOI: 10.1002/cyto.b.21206.
- [10] Wang Z, Zhang L, Wang H, et al. Tumor-induced CD14+HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with tumor progression and outcome of therapy in multiple myeloma patients [J]. Cancer Immunol Immunother, 2015, 64(3):389-399. DOI: 10.1007/s00262-014-1646-4.
- [11] Malek E, de Lima M, Letterio JJ, et al. Myeloid-derived suppressor cells: the green light for myeloma immune escape [J]. Blood Rev, 2016, 30(5):341-348. DOI: 10.1016/j.blre.2016.04.002.
- [12] Mesquita D Jr, Cruvinel WM, Resende LS, et al. Follicular helper T cell in immunity and autoimmunity [J]. Braz J Med Biol Res, 2016, 49(5):e5209. DOI: 10.1590/1414-431X20165209.
- [13] Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(8):641-654. DOI: 10.1038/nri1668.
- [14] Rodriguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives [J]. Immunol Rev, 2008, 222:180-191. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00608.x.
- [15] Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer [J]. Nat Med, 2007, 13(7):828-835. DOI: 10.1038/nm1609.
- [16] Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function [J]. Trends Immunol, 2011, 32(1):19-25. DOI: 10.1016/j.it.2010.10.002.

(收稿日期:2016-12-09)

(本文编辑:徐茂强)

## “第一届血液临床思维大赛”来了

由中华医学会血液学分会、《中华血液学杂志》杂志社联合举办、北京协和药厂承办的“血液临床思维大赛”系列活动即将启动,我们向全体血液同仁发出邀请,邀请您关注并积极参与此项活动,组3人战队、展示血液医师风采,共克血液病。

赛事计划:2017年6~11月(6~9月分区赛,9~10月半决赛,11月决赛)。

报名方式:采取自主报名+邀请结合的形式(以自主报名为主)。

大赛环节及内容:①一眼阅片:结合病史进行骨髓、血细胞形态读片(必答题);②你追我赶:血常规、凝血八项、流式、CT、心电图、小病例等结果判读(抢答题);③见微知著:对疑难病例进行临床诊疗阐述及答辩(评审专家组打分)。

奖励计划:比赛设团队一、二、三等奖及最佳风采选手奖。

决赛奖金:一等奖(1队)3万元科研基金、二等奖(1队)2万元科研基金、三等奖(2队)1万元科研基金。最佳风采选手奖(4名)3000元图书基金。

题目征集:现同步面向全体血液医师征集各环节精彩竞赛题目。经大赛专家团审核,“一眼阅片”及“你追我赶”环节,题目一经采用可获赠2018年全年《中华血液学杂志》1套;“见微知著”环节,所采用病例均支持参加2018年全国血液学年会。

参赛报名及咨询请发邮件至 xylcswwds@163.com。