

KIR2DS4基因及其变异体KIR1D对同胞全相合造血干细胞移植预后的影响

姚遥 吴小津 李晓莉 徐良静 刘彬 韩悦
唐晓文 傅铮铮 鲍晓晶 何军 吴德沛

Association of KIR2DS4 and its variant KIR1D with the outcome after HLA- identical sibling hematopoietic stem cell transplantation Yao Yao, Wu Xiaojin, Li Xiaoli, Xu Liangjing, Liu Bin, Han Yue, Tang Xiaowen, Fu Zhengzheng, Bao Xiaojing, He Jun, Wu Depei

Corresponding author: Wu Depei, Jiangsu Institute of Hematology, 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

杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (killer cell immunoglobulin like receptor, KIR)属于免疫球蛋白样超家族的一系列分子,存在于人NK细胞和部分T细胞表面。KIR包括抑制型(iKIR)和激活型受体(aKIR)^[1-2]。人KIR基因多态性十分丰富,目前发现的主要有15种KIR基因表达,AA和B/X两种单体型。2DS4基因是AA单体型唯一的激活性KIR基因,该基因可以在5号外显子缺失22 bp片段,产生变异体KIR1D,导致了框架移位,变异体的2DS4蛋白不能锚定在细胞膜上,从而导致激活性信号不能传递^[3]。之前报道认为供体单体型AA的移植预后较供体B/X单体型的差^[4],有研究报道变异体KIR1D与一些感染性或自身免疫性疾病相关,是否变异体KIR1D在移植后也起到一定作用?本研究我们选取了供体为AA单体型的患者为研究对象,初步探讨了KIR2DS4基因及其变异体KIR1D对同胞全相合造血干细胞移植预后的影响。

病例和方法

1. 研究对象:2005年10月至2014年4月在苏州大学附属第一医院行同胞全相合造血干细胞移植的267对供受者中,筛选出165例供者为AA单体型的患者,其中男91例,女74例,中位年龄39(8~62)岁。急性髓系白血病(AML)75例,急性淋巴细胞白血病(ALL)32例,慢性髓性白血病(CML)16例,重型再生障碍性贫血(SAA)17例,杂合性白

血病(HAL)1例,骨髓增生异常综合征(MDS)19例,浆细胞白血病1例,淋巴瘤白血病4例。

2. 移植抗宿主病(GVHD)预防方案:甲氨蝶呤(MTX)第1天15 mg/m²,第3天10 mg/m²,第6天10 mg/m²,第11天10 mg/m²;环孢素(CsA)3 mg·kg⁻¹·d⁻¹,-10 d起。

3. 随访时间:2005年10月至2014年4月,中位随访17.4(0.4~96.6)个月。

4. 标本收集:移植前收集5 ml供受者外周血用于KIR基因,移植后定期检查外周血或骨髓嵌合度STR。

5. KIR基因分型方法:采用序列特异性引物聚合酶链反应(PCR-SSP)进行基因分型。扩增条件:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,68℃退火30 s,72℃延伸90 s,30个循环。KIR单体型分型:①A单体型:以抑制性KIR(iKIR)为主,仅有唯一的激活性KIR为KIR2DS4,KIR2DS4可进一步分为KIR2DS4(full)和2DS4(del)两组亚型,两者可同时存在,A单体型根据2DS4是否存在变异体可进一步分为2DS4+1D+(杂合子)、2DS4+1D-(含2个2DS4等位基因)和2DS4-1D+(含2个KIR1D等位基因)3组;②B单体型:包含多种aKIR(KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS5、KIR3DS1)的不同组合。只要有B单体型存在,称为B/X单体型;如果有B单体型同时还存在KIR2DS4基因,称为AB单体型。

6. 嵌合状态检测:移植后造血重建起开始检测受者STR。用QIAGEN blood mini kit试剂盒提取样本基因组DNA,扩增15个STR位点及XY染色体上的1个Amlogenin标志物,对PCR产物进行毛细管电泳,由软件根据产物的荧光强度确定供受体的峰面积,然后计算供体峰面积占总面积的比例即STR,当嵌合率STR>95%时,称为完全嵌合状态^[5]。

7. 统计学处理:数据采用SPSS 17.0统计软件处理,率的比较采用卡方检验,数值资料的比较采用秩和检验。

结 果

1. KIR基因分型以及患者基本情况:165例KIR分型为AA的供者中,有91例为2DS4+1D-,58例为2DS4+1D+,16例为2DS4-1D+。在+30 d左右检测患者的KIR分型,除2例早期死亡外,其余患者均转换为供者KIR分型。根据供者KIR分型将对应的患者分为3组,分析3组患者的年龄、性别、血型、疾病类型、高危状态、预处理方案、干细胞来源等一般资料及移植方式,3组的构成比差异无统计学意义(*P*>

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.08.012

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

0.05)。

2. 2DS4 基因及其变异体 KIR1D 与植入: 163 例患者可评估植入, 粒系重建中位时间为 12(7~22)d, 2DS4+1D- 组粒系重建中位时间为 12(7~17)d, 2DS4+1D+ 组粒系重建中位时间为 12(10~22)d, 2DS4-1D+ 组粒系重建中位时间为 12(8~14)d, 3 组之间两两比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。血小板重建中位时间为 14(8~35)d, 2DS4+1D- 组血小板重建中位时间为 13.5(8~35)d, 2DS4+1D+ 组血小板重建中位时间为 14(10~33)d, 2DS4-1D+ 组血小板重建中位时间为 13.5(11~29)d, 3 组之间两两比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。在移植后 1 个月检测患者 STR, 均达到了完全嵌合状态。

3. 2DS4 基因及其变异体 KIR1D 与急性 GVHD 的关系: 164 例患者可以评估 aGVHD, 2DS4+1D+, 2DS4+1D- 和 2DS4-1D+ 组 100 d 内累计 II~IV 度 aGVHD 分别为 52.85%、8.88% 和 63.54%, 差异无统计学意义 ($P=0.087$)。3 组 100 d 内累计 III~IV 度 aGVHD 分别为 28.94%、14.44% 和 44.44%, 差异有统计学意义 ($P=0.016$)。多因素分析 2DS4-1D+ 单体型是 III~IV 度 aGVHD 的独立危险因素 ($HR=4.221$, 95% CI 1.470~12.124, $P=0.007$)。在可评估 cGVHD 的 141 例患者中, 累计 cGVHD 的发生率为 45.15%、38.61% 和 38.71% ($P=0.899$)。多因素分析未发现影响 cGVHD 的因素。

4. 2DS4 基因及其变异体 KIR1D 与复发、移植相关死亡率的关系: 随访期内有 33 例患者复发, 2DS4+1D-, 2DS4+1D+ 和 2DS4-1D+ 组 3 年累计复发率分别为 21.41%、35.06% 和 39.42% ($P=0.206$)。多因素分析疾病的危险状态是影响复发的独立危险因素 ($HR=8.902$, 95% CI 3.315~23.910, $P<0.001$)。随访期内 30 例患者为移植相关死亡, 3 组累计移植相关死亡率分别为 23.87%、26.71% 和 40.00%, 差异无统计学意义 ($P=0.556$)。

5. 2DS4 基因及其变异体 KIR1D 与生存的关系: 所有患者中位随访时间 17.4 个月, 在随访期内 51 例患者死亡, 3 年总生存 (OS) 率为 59.0%, 2DS4+1D-, 2DS4+1D+ 和 2DS4-1D+ 组 3 年 OS 率分别为 67.86%、49.51% 和 42.96%, 差异无统计学意义 ($P=0.184$)。单独观察 3 组 1 年内的 OS 率分别为 81.17%、80.25% 和 80.00%, 差异无统计学意义 ($P=0.986$)。1 年以后 3 组的 OS 率分别为 83.60%、61.69% 和 53.69%, 2DS4+1D- 组的生存明显优于其他两组, 差异有统计学意义 ($P=0.036$)。2DS4+1D-, 2DS4+1D+ 和 2DS4-1D+ 组的无病生存率分别为 58.45%、48.27% 和 31.25% ($P=0.105$)。在高危组患者中, 3 年无病生存率分别为 51.06%、34.01% 和 0, 差异有统计学意义 ($P=0.031$)。

讨 论

造血干细胞移植后 NK 细胞是最早重建的免疫细胞^[6]。其表面受体分子通过与靶细胞表面的 MHC-I 类分子结合传导激活或抑制性信号, 介导重要的免疫过程, 在移植早期免疫重建过程中起到重要作用。据报道, KIR2DS4 的配体种类较多, 包括经典的 HLA-A 类和 HLA-C 类分子, 还有某

些非 MHC-I 类分子, 具体作用机制尚不明确^[7-8]。之前我们研究组报道 KIRAA 单体型是我国重要的单体型, 一半以上的患者是 KIRAA 单体型^[9]。2DS4 是 KIRAA 单体型唯一的激活性受体, 而 KIR1D 是 2DS4 的变异体, KIR1D 在 KIRAA 单体型移植中是否起到一定作用, 目前尚未见大样本的报道。

我们选取了遗传背景相对单一的同胞全相合移植患者作为研究对象, 筛选出所有供者为 AA 单体型的患者, 移植后所有存活患者嵌合度都达到了完全嵌合, 我们对患者移植后 KIR 基因再次进行检测, 证实所有患者的 KIR 基因型均转变为供者的 KIR 基因型。因此供者 KIR 基因型对移植后 NK 细胞免疫起到一定作用。

之前报道激活性 KIR 与移植后植入、复发和生存均有关^[10-13]。本研究我们未发现 KIR2DS4 基因及其变异体与粒系和巨核系植入有关。有报道认为供体 aKIR 可能是影响 aGVHD 的重要标志^[12]。在 KIRAA 单型型的移植中, 我们发现 2DS4-1D+ 单体型是重度 aGVHD 的独立危险因素, 供者 2DS4-1D+ 可以提高 III~IV 度 aGVHD 的发生。一直都认为急性 GVHD 是 T 细胞介导的疾病, IFN- γ 的产生与 aGVHD 密切相关, 近年来报道认为 NK 细胞在 KIR 受者重建过程中调控着 IFN- γ 的产生^[14-15]。是否 KIR2DS4 基因及其变异体调控了移植早期 NK 细胞干扰素的分泌, 导致 3 组移植后 aGVHD 的发生, 有待进一步的体外实验证实。本研究我们未发现 AA 单型型的差异对慢性 GVHD 的影响。

我们虽然未发现 3 组移植后复发和移植相关死亡率的统计学差异, 但是我们明显可以看到 2D4-1D+ 组的复发率和移植相关死亡率要高很多, 可能 2DS4-1D+ 组患者病例数太少, 导致无统计学意义, 我们将扩大病例, 继续观察其对复发和移植相关死亡的影响。我们的研究也证实疾病的高危状态仍然是复发的独立因素。

有报道认为单体型 B 可以明显改善移植预后^[9,12,16], 但是也有相反的报道^[17]。因此我们认为 AA 单体型移植预后存在一定的异质性。我们的结果可以看到 2DS4+1D- 组的生存情况要好于其他两组, 2DS4-1D+ 组的生存情况最差, 特别是在高危组患者, 2DS4-1D+ 组所有高危患者均死于 GVHD 或复发。我们也发现 2DS4+1D- 组的 aGVHD 发生率比 2DS4+1D+ 高, 重度 aGVHD 并没有影响预后, 尤其是高危组的患者。因此我们猜测是否 2DS4+1D- 组高的 aGVHD 导致了 GVL 作用, 我们的结果中也显示 2DS4+1D- 组的复发最低, 但是由于病例数的原因导致差异无统计学意义。

综上所述, KIR2DS4 和其变异体 KIR1D 与同胞全相合移植预后密切相关, KIR1D 变异体的分类可能对选择更好的供者起到一定的作用。

参 考 文 献

- [1] Ivarsson MA, Michaëlsson J, Fauriat C. Activating killer cell Ig-like receptors in health and disease[J]. Front Immunol, 2014, 5: 184.

- [2] 马红京,尹晓林,郭坤元,等. 供者KIR和受者HLA遗传背景与血缘关系全相合造血干细胞移植预后的关系[J]. 中华血液学杂志, 2006, 27(2):91-94.
- [3] Zhuang YL, Zhu CF, Zhang Y, et al. Association of KIR2DS4 and its variant KIR1D with syphilis in a Chinese Han population [J]. Int J Immunogenet, 2012, 39(2): 114-118.
- [4] Symons HJ, Leffell MS, Rossiter ND, et al. Improved survival with inhibitory killer immunoglobulin receptor (KIR) gene mismatches and KIR haplotype B donors after nonmyeloablative, HLA- haploidentical bone marrow transplantation[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2010, 16(4): 533-542.
- [5] Terwey TH, Hemmati PG, Nagy M, et al. Comparison of chimerism and minimal residual disease monitoring for relapse prediction after allogeneic stem cell transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2014, 20(10):1522-1529.
- [6] Forcina A, Noviello M, Carbone MR, et al. Predicting the Clinical Outcome of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: The Long and Winding Road toward Validated Immune Biomarkers[J]. Front Immunol, 2013, 4:71.
- [7] Graef T, Moesta AK, Norman PJ, et al. KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A*11 while diminishing avidity for HLA-C [J]. J Exp Med, 2009, 206(11):2557-2572.
- [8] Goodridge JP, Burian A, Lee N, et al. HLA-F and MHC class I open conformers are ligands for NK cell Ig-like receptors[J]. J Immunol, 2013, 191(7):3553-3562.
- [9] Zhou H, Bao X, Wu X, et al. Donor selection for killer immunoglobulin-like receptors B haplotype of the centromeric motifs can improve the outcome after HLA- identical sibling hematopoietic stem cell transplantation[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2014, 20(1):98-105.
- [10] Wysoczanska B, Koscinska K, Mizia S, et al. Chimerism in children with primary immunodeficiencies is influenced by number of activating killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the donor and/or killer cell immunoglobulin-like receptor ligand mismatch [J]. Transplant Proc, 2013, 45 (9): 3366-3370.
- [11] Moretta A, Pende D, Locatelli F, et al. Activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors (KIR) in haploidentical haemopoietic stem cell transplantation to cure high-risk leukemias[J]. Clin Exp Immunol, 2009, 157(3):325-331.
- [12] Locatelli F, Moretta F, Brescia L, et al. Natural killer cells in the treatment of high-risk acute leukaemia [J]. Semin Immunol, 2014, 26(2):173-179.
- [13] Stringaris K, Adams S, Uribe M, et al. Donor KIR Genes 2DL5A, 2DS1 and 3DS1 are associated with a reduced rate of leukemia relapse after HLA- identical sibling stem cell transplantation for acute myeloid leukemia but not other hematologic malignancies [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2010, 16(9):1257-1264.
- [14] Foley B, Cooley S, Verneris MR, et al. NK cell education after allogeneic transplantation: dissociation between recovery of cytokine-producing and cytotoxic functions [J]. Blood, 2011, 118(10):2784-2792.
- [15] Della Chiesa M, Falco M, Bertaina A, et al. Human cytomegalovirus infection promotes rapid maturation of NK cells expressing activating killer Ig-like receptor in patients transplanted with NKG2C-/- umbilical cord blood [J]. J Immunol, 2014, 192(4): 1471-1479.
- [16] Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, et al. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia [J]. Blood, 2009, 113(3):726-732.
- [17] Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems [J]. Cell, 2006, 124(4):815-822.

(收稿日期:2014-11-28)

(本文编辑:董文革)

·读者·作者·编者·

作者投稿须知

1. 按本刊要求写作:登录《中华血液学杂志》网站(<http://www.hematoline.com>),参见首页作者服务中心栏中的“投稿须知”及“写作指导”栏目。

2. 作者注册:请打开本刊网站首页在线办公中的“在线投稿”即进入中华医学会网站(<http://www.cma.org.cn>)。在网站首页注册并申请为杂志作者(用户名和密码为您在中华医学会统一的登录信息,请牢记!忘记密码可通过电子信箱索取)。

3. 投稿:注册成功后进入“业务中心”。点击【远程稿件管理系统】,相应的功能即显示在下方。点击“作者投稿”,按要求填写内容,摘要在字数允许范围内尽可能详细,并上传原稿(点击“暂存”稿件进入【我的草稿】模块)。选择《中华血液学杂志》,并点击“投稿”。

4. 邮寄纸稿及介绍信:请在投稿平台上下载论文投送介绍信及授权书,签字盖章后连同原稿打印件(注明稿件编号)一并寄至本刊编辑部。

本刊编辑部