

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.03.005

· 基础研究 ·

Toll 样受体 7 及 9 在慢性粒细胞白血病患者浆细胞样树突状细胞内的表达

段丽芳,张连生,岳玲玲,柴晔,曾鹏云,吴重阳,李莉娟(兰州大学第二医院血液科,甘肃兰州 730030)

[摘要] **目的:**研究 Toll 样受体 7(Toll-like receptor 7, *TLR7*) mRNA 及 *TLR9* mRNA 在慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)患者外周血浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cell, pDC)内的表达及 pDC 分泌干扰素- α (interferon- α , IFN- α)的能力。**方法:**收集兰州大学第二医院血液科 2010 年 11 月至 2011 年 7 月间收治的 30 例 CML 患者(初诊未治组 15 例,缓解组 15 例)和体检中心的 15 例健康对照者,运用免疫磁珠法分选外周血 pDC,利用 real time-PCR 检测 pDC 内 *TLR7* 及 *TLR9* mRNA 表达水平。CpG ODN 2216 刺激 pDC 24 h 后,ELISA 检测上清液中 IFN- α 水平。**结果:**初诊组 CML 患者外周血 pDC 内 *TLR7* mRNA 表达水平显著低于缓解组[(0.34 ± 0.11) vs (0.93 ± 0.21), $P < 0.05$],初诊 CML 患者 *TLR9* mRNA 表达水平显著低于缓解组[(0.44 ± 0.15) vs (0.94 ± 0.18), $P < 0.05$]。CpG ODN 2216 刺激后,初诊组 pDC 产生的 IFN- α 明显低于缓解组及健康对照组[(408.61 ± 77.11) vs (611.39 ± 84.86), (651.67 ± 93.39) ng/L, $P < 0.05$]。**结论:**CML 患者 pDC 内 *TLR7* 和 *TLR9* mRNA 明显降低可能是 pDC 功能缺陷的主要原因,提示 *TLR7* 和 *TLR9* 可能参与 CML 的发病。

[关键词] 慢性粒细胞白血病;浆细胞样树突状细胞;Toll 样受体 7;Toll 样受体 9

[中图分类号] R733.7;R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)03-0257-04

Expression of Toll-like receptor 7 and 9 in peripheral blood plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic myeloid leukemia

DUAN Li-fang, ZHANG Lian-sheng, YUE Ling-ling, CHAI Ye, ZENG Peng-yun, WU Chong-yang, LI Li-juan(Department of Hematology, Second Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of Toll-like receptor 7 (*TLR7*) mRNA and *TLR9* mRNA in the peripheral blood plasmacytoid dendritic cells (pDCs) of patients with chronic myeloid leukemia (CML), and the interferon- α (IFN- α) secretion by pDCs. **Methods:** pDCs were sorted by immune magnetic beads of the patients with CML ($n = 30$, including 15 CML untreated and 15 CML remission) from the Department of Hematology of Second Affiliated Hospital of Lanzhou University from November 2010 to July 2011 and healthy controls ($n = 15$) from Physical Examination Center. The mRNA expressions of *TLR7* and *TLR9* in pDCs were measured with real time-PCR; pDCs were stimulated by CpG ODN 2216 for 24 h, and IFN- α in the supernatant was measured using ELISA. **Results:** The mRNA expression of *TLR7* was significantly reduced in the untreated CML group (0.34 ± 0.11) than that in the remission CML group (0.93 ± 0.21, $P < 0.05$) and the healthy control group ($P < 0.05$); The mRNA expression of *TLR9* was significantly reduced in the untreated CML group (0.44 ± 0.15) than that in the remission group (0.94 ± 0.18, $P < 0.05$) and the healthy control group ($P < 0.05$); IFN- α production of pDCs was significantly reduced in the untreated CML group than that in the remission group and the healthy control group ([408.61 ± 77.11] vs [611.39 ± 84.86], [651.67 ± 93.39] ng/L, $P < 0.05$). **Conclusion:** The mRNA expressions of *TLR7* and *TLR9* are significantly reduced in CML patients, which may be the main reason of function defects of pDCs, indicating that *TLR7* and *TLR9* may be involved in the pathogenesis of CML.

[Key words] chronic myeloid leukemia; plasmacytoid dendritic cell; toll-like receptor 7; toll-like receptor 9

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(3): 257-260]

[基金项目] 甘肃省科技支撑计划资助项目(No. 0804NKCA115)。Project supported by the Science and Technology supporting Program of Gansu Province (No. 0804NKCA115)

[作者简介] 段丽芳(1986-),女,甘肃省兰州市人,硕士生,主要从事肿瘤生物免疫治疗方面的研究。E-mail: livina_2007@126.com

[通信作者] 张连生(ZHANG Lian-sheng, corresponding author), E-mail: zls2170@yahoo.com

[网络出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120529.1633.004.html

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是造血干细胞的恶性增殖性疾病,由于患者体内微小残留病灶的存在,生物免疫治疗已成为目前治疗 CML 的研究热点。浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cell, pDC)是体内最主要产生干扰素- α (interferon- α , IFN- α)的细胞,在病毒、细菌等刺激后可产生大量 IFN- α , pDC 在连接固有免疫和适应性免疫中发挥着重要作用^[1]。IFN- α 对 CML 有确定疗效,且对部分患者可达治愈的效果。Toll 样受体 7(Toll-like receptor 7, TLR7)和 TLR9 是 pDC 内重要的模式识别受体, pDC 通过 TLR7、TLR9 的激活进一步分泌 IFN- α , 激活 NK 细胞、B 细胞、T 细胞,发挥强大的免疫应答^[2]。已有研究^[3]证实, CML 患者体内 pDC 存在数量及功能缺陷,但对 pDC 内 TLR7、TLR9 表达水平尚未见报道。本实验通过分离 CML 患者外周血 pDC,检测其 TLR7、TLR9 mRNA 的表达水平及其分泌 IFN- α 的能力,寻找 pDC 功能缺陷的可能原因,为以 pDC 为基础的靶向免疫治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人淋巴细胞分离液 Ficoll-hypaque 购自北京 Solarbio 化学试剂公司, CpG ODN 2216(5'-GGGG-GACGATCGTCGGGGG-3')由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。鼠抗人 BDCA-4 免疫磁珠购自德国美天旎生物技术公司, CD123、BDCA-2 单抗为荷兰 Hycult 公司产品, IFN- α ELISA 试剂盒为美国 R&D 公司产品, real time-PCR 试剂盒购自大连 TaKaRa 公司产品。

1.2 引物设计与合成

根据 GeneBank 人 TLR7 mRNA 序列(NM-016562.3)、人 TLR9 mRNA 序列(NM-017442.3),利用 ABI 公司的 Primer Express V2.0 软件设计引物,由大连 TaKaRa 公司合成,详见表 1。

1.3 研究对象

15 例初诊未治和 15 例缓解期 CML 患者均来自兰州大学第二医院血液科(2010 年 11 月至 2011 年 7 月),诊断和分期均符合张之南主编的 2007 年第 3 版《血液学诊断及疗效标准》,且无其他自身免疫性疾病、炎症性疾病。患者年龄 18~63 岁,平均年龄为(45±15)岁,男性 16 例、女性 14 例。15 名健康志愿者均来自兰州大学第二附属医院体检中心,年龄 20~65 岁,平均(43±12)岁,男 6 例、女 9 例,无其他炎症及自身免疫性疾病。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequence

Gene	Size (bp)	Forward and reverse primer
TLR7	195	Forward 5'-TTCAACCAGACCTCTACATTCCATT-3'
		Reverse 5'-GCAGTCCACGATCACATGGTT-3'
TLR9	97	Forward 5'-CCGTGACAATTACCTGGCCCTTC-3'
		Reverse 5'-CAGGGCCTTCAGCTGGTTTC-3'
β -actin	101	Forward 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3'
		Reverse 5'-CTAAGTCATAGTCCGCTAGAAGCA-3'

1.4 外周血单个核细胞及 pDC 的分离

采集 CML 患者外周血 20 ml(40 U/ml 肝素抗凝),等体积 PBS 稀释,加 Ficoll 行密度梯度离心,收集单个核细胞用 PBS 液洗涤 3 次,用 RPMI 1640 调整细胞密度至 $1 \times 10^9/L$,用 BDCA-4 标记的免疫磁珠分选 pDC,流式细胞仪检测其纯度为 92%,锥虫蓝染色检测细胞存活率为 90%。

1.5 ELISA 法测定 pDC 分泌 IFN- α 水平

人工合成的 CpG ODN 2216 因模拟了 PAMP 的结构,而被作为刺激剂。取 48 孔培养板,将常规分离的 pDC($1 \times 10^6/L$)和 CpG ODN 2216($1 \mu\text{mol}/L$)共孵育,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液调整细胞密度,使每孔的终体积为 500 μl ,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱培养 24 h,收集培养上清液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存,用 ELISA 试剂盒检测 IFN- α 含量。

1.6 Real-time PCR 法检测 pDC 内 TLR7、TLR9 mRNA 的表达

采用 TRIzol 法提取各组 pDC 总 RNA,经紫外分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度,所有样品 D_{260}/D_{280} 比值均在 1.8 左右。按 Prime Script RT 试剂盒的步骤以其为模板,严格按照说明书要求反转录合成 cDNA。按 cDNA 试剂盒说明书提示的步骤进行扩增。PCR 反应体系 25 μl , SYBR Premix Ex Taqtm II 12.5 μl , 上下游引物(10 $\mu\text{mol}/L$)各 1 μl , cDNA 2 μl , dH_2O (灭菌蒸馏水)8.5 μl 。扩增条件:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共 40 个循环。目的基因表达采用相对定量法表示: ΔCT 值指每个样本 CT 值减去相应 β -actin CT 值, $\Delta\Delta\text{CT}$ 值为实验组与正常对照组 ΔCT 之差,实验结果用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 表示目的基因表达倍数,其意义为目的基因与正常对照组的倍比差异。

1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.0 软件,应用 t 检验分析组间差异, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示

差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CML 患者 pDC 分泌 IFN- α 的能力

初诊组 CML 患者外周血 pDC 经 CpG ODN 2216 刺激后,上清液中 IFN- α 水平明显低于缓解组、正常对照组 [(408.61 \pm 77.11) ng/L vs (611.39 \pm 84.86) ng/L、(651.67 \pm 93.39) ng/L, $P < 0.05$],但缓解组与对照组相比差异无统计学意义 ($P = 0.203$)。

2.2 CML 患者外周血 pDC 内 TLR7、TLR9 mRNA 的表达

用 ABI7500 定量 PCR 仪对初诊组 CML、缓解组 CML 患者和正常对照组志愿者外周血 pDC 内 TLR7、TLR9 mRNA 表达情况进行检测(图 1),通过溶解曲线分析证明无非特异性引物扩增和引物二聚体。

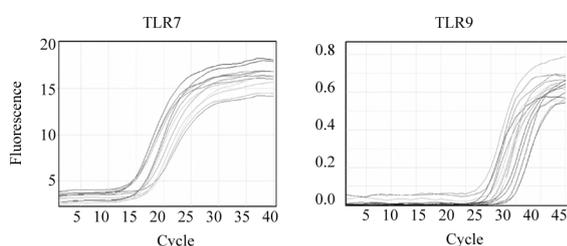


图 1 TLR7 mRNA 和 TLR9 mRNA 的扩增曲线

Fig. 1 Amplification curves of the mRNA expression of TLR7 and TLR9

表 2 CML 患者及健康对照 pDC 内 TLR7 mRNA、TLR9 mRNA 的表达

Tab. 2 TLR7 and TLR9 mRNA expressions in pDC of CML patients and control volunteers

Group	TLR7 mRNA	TLR9 mRNA
Untreated CML	0.34 \pm 0.11	0.44 \pm 0.15* Δ
Remission CML	0.93 \pm 0.21	0.94 \pm 0.18
Healthy control	1	1

* $P < 0.05$ vs healthy control group; $\Delta P < 0.05$ vs remission CML group

实验结果表明,CML 患者和正常人外周血 pDC 中均有 TLR7、TLR9 mRNA 的表达,初诊组 CML 患者外周血 pDC 内 TLR7 mRNA 的表达水平明显低于缓解组 CML 患者 [(0.34 \pm 0.11) vs (0.93 \pm 0.21), $P < 0.05$],缓解组略低于健康对照组,但差异无统

计学意义 ($P = 0.27$)。初诊组 CML 患者外周血 pDC 内 TLR9 mRNA 的表达水平明显低于缓解组 CML 患者 [(0.44 \pm 0.15) vs (0.94 \pm 0.18), $P < 0.05$],缓解组 TLR9 mRNA 的表达水平略低于健康对照组,但差异无统计学意义 ($P = 0.299$)。

3 讨论

目前研究^[3]已经证实,DC 疫苗并不能体现预想的强大的抗肿瘤免疫,pDC 有潜在的应用价值。TLR7 和 TLR9 是 pDC 内重要的模式识别受体,TLR7 识别单链 RNA,TLR9 识别细菌 DNA,均通过 MyD88 经典的信号转导途径^[4],进一步促进 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、IFN- α 、IFN- β 和 IFN- γ 等细胞因子的释放,激活固有免疫应答^[5-6];同时上调 MHC I 类分子及共刺激分子的表达,调节 T 细胞向 Th1 分化并增强 NK 细胞的杀伤活性,发挥抗肿瘤的作用,同时调节获得性免疫应答^[7-8]。此外,TLR7 和 TLR9 还可以通过活化 TRAF6 和 IRF-7 介导 IFN- α 的分泌,并通过肿瘤抑制因子如 VEGF- β 或 IL-10 保护 DC^[9],促进 T 细胞存活,从而提高疫苗的效果;还可以调节 Treg 的形成,参与免疫调节作用^[10]。如 TLR 低表达或功能减弱,可能导致对病原体的易感和特异性免疫能力减弱^[11]。

国内外大量研究^[12-13]证实,活动期系统性红斑狼疮患者 pDC 高表达 TLR7,而对 TLR9 的表达存在争议。有研究^[14-16]提出,TLR9 缺陷型狼疮鼠加速发生狼疮性肾炎,病死率增高;而 TLR7 缺陷型狼疮鼠临床表型得到改善。研究^[17]发现,慢性乙型肝炎患者外周血 pDC 内的 TLR7、TLR9 表达减少,提出其可能是 pDC 功能缺陷的主要原因。国外研究^[3]证实,初诊 CML 患者外周血中 pDC 数量和功能均严重缺陷,但对 pDC 功能缺陷的原因未进行进一步研究。笔者课题组^[18]提出,IFN- α 治疗 CML 的机制之一就是恢复 pDC 的功能;后续研究^[19]证实,黄芪多糖可以提高 CML 患者 pDC 的活性,推测可能与上调 pDC 内 TLR9 表达有关。因此,通过检测 pDC 内 TLR7、TLR9 的表达状况,探讨 pDC 功能缺陷的原因,对于通过刺激 pDC 克服 CML 细胞介导的免疫抑制效应,改善内部微环境,启动固有免疫和适应性免疫,从而增强抗 CML 效应非常重要。

本实验结果显示,CpG ODN 不能增加初诊未治 CML 患者 pDC 分泌 IFN- α 的水平,但可以增加缓解组 pDC 分泌 IFN- α 的水平,提示初诊未治 CML 患者体内 pDC 功能明显下降,经治疗病情缓解后,pDC 功能得到恢复,该结果与国外研究相一致^[3]。CML

患者 pDC 数量及功能缺陷,产生的内源性 IFN- α 不足,造成 T 细胞、B 细胞、NK 细胞及 DC 不能发挥正常的免疫功能,引起机体造血系统、免疫系统、骨髓微环境发生紊乱、造血干细胞分化失控,导致恶性克隆的产生并增殖,可能是 CML 的发病机制之一。

人工合成的 CpG ODN 是包含未甲基化的 CpG 基序的寡核苷酸,因模拟了病原相关分子模式的结构,可诱导 pDC 释放 IFN- α 而被作为刺激剂^[20]。实验同时表明,初诊未治 CML 患者外周血 pDC 内 TLR7、TLR9 mRNA 表达水平较缓解期患者及正常对照均明显降低,缓解期患者 TLR7、TLR9 表达水平与正常对照相比无明显差异,与 pDC 变化趋势一致。结果提示,TLR7、TLR9 可能是 pDC 分泌 IFN- α 能力下降的原因之一,有望通过提高 TLR7、TLR9 水平,使产生 IFN- α 的转录通路得以恢复,重建其产生 IFN- α 的能力,提高 DC 抗原提呈能力及 CTL、NK 细胞杀伤能力,从而控制疾病处于缓解状态。对于 CML 患者体内 pDC 中 TLR7、TLR9 表达减少的可能机制,考虑可能与其下游的转录信号如 MyD88、IRAK、TRAF6、NF- κ B 抑制性蛋白激酶、NK- κ B 及 IRF 有关,需后续实验来证实。

本研究首次观察了 CML 患者外周血 pDC 内 TLR7、TLR9 表达情况,认为 CML 患者 pDC 的 TLR7、TLR9 减少可能是 pDC 功能缺陷,即血浆中 IFN- α 水平低的主要原因。研究结果为 CML 免疫发病机制提供新的实验依据,为靶向性 pDC 的免疫生物治疗提供了新思路。

[参 考 文 献]

- [1] Liu YJ. IPC: professional type I interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors [J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23(1): 275-306.
- [2] Puig M, Toshi KW, Schramm LM, et al. TLR9 and TLR7 agonists mediate distinct type I IFN responses in humol/Lans and nonhumol/Lan primates *in vitro* and *in vivo* [J]. *Leukoc Biol*, 2012, 91(1): 147-158.
- [3] Mohty M, Jourdan E, Mami NB, et al. Imatinib and plasmacytoid dendritic cell function in patients with chronic myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2004, 103(12): 4666-4668.
- [4] Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008, 19(1): 3-19.
- [5] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity [J]. *Cell*, 2006, 124(4): 783-801.
- [6] Uematsu S, Akira S. Toll-like receptor and innate immunity [J]. *Seikagaku*, 2007, 79(8): 769-776.
- [7] Wagner H. New vistas on TLR9 activation [J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(10): 2814-2816.
- [8] Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, et al. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists [J]. *Nat Med*, 2007, 13(5): 552-559.
- [9] Konno H, Yamamoto T, Yamazaki K, et al. TRAF6 establishes innate immune responses by activating NF-kappaB and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA [J]. *PLoS One*, 2009, 4(5): 5671-5674.
- [10] Matesic D, Lenert A, Lenert P. Modulating toll-like receptor 7 and 9 responses as therapy for allergy and autoimmunity [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2012, 12(1): 8-17.
- [11] Saitoh S, Miyake K. Regulatory molecules required for nucleotide-sensing Toll-like receptors [J]. *Immunol Rev*, 2009, 227(1): 32-43.
- [12] 白梅,袁定芬,汪年松. TLR7 及 TLR9 在 SLE 患者外周血单个核细胞内的表达 [J]. *Chin J Lepr Skin Dis*, 2011, 27(8): 542-545.
- [13] Komatsuda A, Wakui H, Iwamoto K, et al. Up-regulated expression of Toll-like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 152(3): 482-487.
- [14] Santiago-Raber ML, Dunand-Sauthier I, Wu T, et al. Critical role of TLR7 in the acceleration of systemic lupus erythematosus in TLR9-deficient mice [J]. *Autoimmun*, 2010, 34(4): 339-348.
- [15] Christensen SR, Shupe J, Nickerson K, et al. Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus [J]. *Immunity*, 2006, 25(3): 417-428.
- [16] Wu X, Peng SL. Toll-like receptor 9 signaling protects against murine lupus [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(1): 336-342.
- [17] Xu N, Yao HP, Sun Z, et al. Toll-like receptor 7 and 9 expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis B and related hepatocellular carcinoma [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(2): 239-244.
- [18] 吴重阳,柴晔,宋飞雪,等. 干扰素 α 治疗慢性粒细胞白血病患者浆细胞样树突状细胞变化的观察 [J]. *中华血液学杂志*, 2009, 30(7): 482-484.
- [19] 刘立明,张连生. 黄芪多糖体外对慢性粒细胞白血病患者治疗前后浆细胞样树突状细胞功能及成熟的影响 [J]. *中华血液学杂志*, 2010, 31(11): 740-743.
- [20] Vollmer J, Krieg AM. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(3): 195-204.

[收稿日期] 2012-02-01 [修回日期] 2012-04-25

[本文编辑] 韩丹