

• 论 著 •

血液病患者信号转导及转录激活子 5 和叉头状转录因子 3 的表达*

张 健, 吴良银, 江金群, 何凤屏[△]

(广东韶关粤北人民医院检验科, 广东韶关 512025)

摘 要:目的 观察恶性血液病患者外周血中单个核细胞磷酸化 STAT5 及 Foxp3 的表达水平及其相关性。方法 采用蛋白磷酸化流式细胞术分别检测 45 例急性白血病患者(AL)、23 例慢性白血病(CL)、29 例骨髓增生异常综合征(MDS)、20 例重型再生障碍性贫血(SAA)及 38 例对照组外周血单个核细胞磷酸化 STAT5(P-STAT5)及 Foxp3 阳性细胞的百分率。结果 P-STAT5 表达 AL 组(2.29 ± 0.79)%、CL 组(2.45 ± 0.88)%、MDS 组(2.21 ± 0.75)% 都较对照组(0.54 ± 0.15)% 增高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), SAA 组 P-STAT5 表达(0.43 ± 0.17)% 较对照组降低, 差异无统计学意义($P > 0.05$); Foxp3 表达 AL 组(3.86 ± 1.13)%、CL 组(3.60 ± 1.10)%、MDS 组(4.01 ± 1.19)% 高于对照组(0.89 ± 0.38)%, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), SAA 组 Foxp3 表达(0.57 ± 0.21)% 较对照组降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。AL、CL、MDS、SAA 各组 P-STAT5 与 Foxp3 表达水平都呈正相关($P < 0.05$)。结论 STAT5 及 Foxp3 可能共同参与了 AL、CL、MDS、SAA 这几类恶性血液病的发生过程, 同时测定可以提供有临床意义的实验依据。

关键词:信号转导及转录激活子 5; 叉头状转录因子 3; 磷酸化流式细胞术; 血液病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.12.025

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)12-1695-03

Expressions of STAT5 and Foxp3 in patients with hematological disease*

Zhang jian, Wu Liangyin, Jiang Jinqun, He Fengping[△]

(Department of Clinical Laboratory, North Guangdong People's Hospital, Shaoguan, Guangdong 512025, China)

Abstract: Objective To observe the expressions and its correlation of P-STAT5 and Foxp3 in peripheral blood mononuclear cells of patients with hematologic malignancies. **Methods** The percentage of P-STAT5 and Foxp3 positive cells in the peripheral blood were tested in 45 cases of patients with acute leukemia (AL), 23 cases of chronic leukemia (CL), 29 cases of myelodysplastic syndrome (MDS), 20 cases of severe aplastic anemia (SAA) and 38 controls by using phospho-flow cytometry. **Results** The percentage of P-STAT5 of AL patients group (2.29 ± 0.79)%, CL (2.45 ± 0.88)% and MDS (2.21 ± 0.75)% were higher than control group (0.54 ± 0.15)%, statistically significant difference ($P < 0.05$); The percentage of P-STAT5 of SAA group (0.43 ± 0.17)% reduced than the control group, no statistically significant difference ($P > 0.05$). The percentage of Foxp3 of patients group with AL (3.86 ± 1.13)%, CL (3.60 ± 1.10)%, MDS (4.01 ± 1.19)% were higher than that of control group (0.89 ± 0.38)%, statistically significant difference ($P < 0.05$); The percentage of Foxp3 of SAA group (0.57 ± 0.21)% reduced than the control group, difference has statistically significant ($P < 0.05$). The expression level of P-STAT5 and Foxp3 in AL, CL, MDS and SAA were respectively positive correlation ($P < 0.05$). **Conclusion** STAT5 and Foxp3 may jointly participate in the process of the occurrence of AL, CL, MDS and SAA, detect them can provide experimental basis for clinical significance at the same time detection.

Key words: signal transducer and activator of transcription 5; forkhead transcription factor 3; phospho-flow cytometry; hematological disease

STAT 即信号转导及转录激活因子, 是胞质内潜在的转录因子, 为 Janus 蛋白酪氨酸激酶(JAK)的重要底物。JAK/STAT 途径中的 JAK2/STAT 是与细胞增殖相关的信号转导途径, 其紊乱致使 STAT 家族中的 STAT5 磷酸化(P-STAT5)后转移至细胞核, 促进细胞增殖基因转录导致多种实体瘤的发生, 而血液病学的相关研究较少。JAK2/STAT 途径并不是孤立的, 而是与细胞内其他信号转导途径相互作用, 形成一个复杂的信号网络。调节性 T 细胞(Treg)通过直接接触抑制、分泌抑制性因子等途径抑制其他免疫细胞, 在机体的免疫自稳、肿瘤免疫多种病理过程中均发挥重要作用。Foxp3 即叉头状/翅膀状螺旋转录因子 3 作为 Treg 细胞特异性转录分子, 能增强 Treg 细胞的免疫抑制功能, 下调机体抗肿瘤免疫应答。目

前有基础研究提示, STAT5 可能参与 Treg 转录因子 Foxp3 的表达与调控, 但尚未见临床应用方面的研究报道。本研究选取了 117 例恶性血液病患者及 38 例健康成年人, 采用蛋白磷酸化流式细胞术(FCM)进行细胞内染色, 检测外周血中单个核细胞内表达的 P-STAT5 和 Foxp3 分子, 在单细胞水平分析两种分子表达, 以期定量明确恶性血液病患者中 P-STAT5 和 Foxp3 表达情况, 并进一步探索二者的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2013 年 4 月至 2014 年 9 月间住院收治的 117 例具有恶性血液病性质的患者作为研究对象, 其中急性白血病患者(AL)组 45 例, 患者年龄 19~67 岁, 平均 43.4 岁, 男性 21 例, 女性 24 例; 慢性白血病(CL)组 23 例, 男性 12 例,

* 基金项目: 韶关市医药卫生科研计划(Y13157)。 作者简介: 张健, 男, 主管技师, 主要从事血液学研究。 [△] 通讯作者, E-mail: fengphe@hotmail.com。

女性 11 例,年龄 20~69 岁,平均 43.8 岁;骨髓增生异常综合征(MDS)组 29 例,年龄为 17~65 岁,平均 42.5 岁,男性 14 例,女性 15 例;重型再生障碍性贫血(SAA)组 20 例,患者年龄 17~64 岁,平均 40.8 岁,男性 9 例,女性 11 例。所有患者化疗前均经骨髓穿刺病理检查且结合组织化学染色和 FCM 免疫表型分析,诊断均按照张之南主编的《血液病诊断及疗效标准》中相关血液病之国内诊疗标准确诊。对照组选自同期健康体检者 38 例,男 18 例,女 20 例,年龄 18~66 岁,平均 43.5 岁。

1.2 仪器与试剂 人淋巴细胞分离液,购自上海华精高科技有 限 公 司。PE 标 记 鼠 抗 人 PY(694)P-STAT5 抗 体、APC 标 记 的 抗 人 CD25 抗 体、FITC 标 记 的 抗 人 CD4 抗 体 及 各 抗 体 的 同 型 对 照 购 自 美 国 BD 公 司。PE 标 记 的 抗 人 Foxp3 单 抗 及 其 同 型 对 照 购 自 美 国 eBioscience 公 司。Perfix-p 试 剂 盒 (含 固 定 剂、溶 血 剂 和 透 膜 剂),购 自 美 国 贝 克 曼 公 司。流 式 细 胞 仪 (BD FACS Calibur)为 美 国 BD 公 司 产 品。

1.3 方法 肝素抗凝管采集外周血 2 mL 用淋巴细胞分离液提取单个核细胞,调整细胞密度至 1×10^7 /mL。吸取单细胞悬液 100 μ L 于标记好的试管中,加入固定液 100 μ L,分别振荡摇匀,于室温中孵育 10 min。各管加入 500 μ L 细胞裂解液,充分混匀,放入 37 $^{\circ}$ C 水浴箱孵育 15 min。每管加入 1 mL 冷的洗涤液(PBS,2~6 $^{\circ}$ C),离心 4 min(2 000 r/min)后弃上清再加入 1 mL 90%甲醇于冰上破膜 30 min,离心后倒掉上清,加入 100 μ L 冷洗涤液重悬细胞。膜表面抗体与胞内抗体一起孵育染色,P-STAT5 实验管加入 PE-CY7 标记鼠抗人 P-STAT5,对照管加入 PE-CY7 标记 MS IGG1 各 20 μ L。FOXP3 实验管加入 PE 标记的鼠抗人 Foxp3 抗体、FITC 标记的鼠抗人 CD4 抗体、APC 标记的鼠抗人 CD25 抗体,FOXP3 对照管加入 PE 标记小鼠 IgG2a 单抗、FITC 标记小鼠 IgG2a、APC 标记小鼠 IgG2a 各 20 μ L,所有管孵育 30 min 后洗涤,离心后弃掉上清液,分别加入 500 μ L 细胞重悬液。上机,各管收集 10 000 个细胞,检测后保存数据,结果分析应用 CellQuest 软件,分别计算各自阳性细胞百分率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,对正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;两组计量均数比较用独立样本 *t* 检验,部分计量资料相关性分析采用单因素线性相关分析。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 恶性血液病各组及对照组 P-STAT5、Foxp3 的表达水平 外周血单个核细胞 P-STAT5 表达较对照组 AL 患者组(*t*=3.59,*P*<0.05)、CL 组(*t*=4.12,*P*<0.05)、MDS 组(*t*=3.20,*P*<0.05)均增高;Foxp3 表达较对照组 AL 患者组(*t*=4.97,*P*<0.05)、CL 组(*t*=4.50,*P*<0.05)、MDS 组(*t*=6.33,*P*<0.05)也都增高,SAA 患者组较对照组降低,差异具有统计学意义(*t*=-1.94,*P*<0.05)。见表 1。

表 1 各组 P-STAT5、Foxp3 的表达水平			
组别	<i>n</i>	P-STAT5(%)	Foxp3(%)
AL 组	45	2.29±0.79*	3.86±1.13*
CL 组	23	2.45±0.88*	3.60±1.10*
MDS 组	29	2.21±0.75*	4.01±1.19*
SAA 组	20	0.43±0.17	0.57±0.21*
对照组	38	0.54±0.15	0.89±0.38

* :*P*<0.05,与对照组比较。

2.2 各组 P-STAT5 与 Foxp3 相关性分析 单因素线性相关性分析,结果 AL(*r*=0.80,*P*<0.05)、CL(*r*=0.69,*P*<0.05)、MDS(*r*=0.73,*P*<0.05)、SAA (*r*=0.65,*P*<0.05),显示恶性血液病各组 P-STAT5 与 Foxp3 表达水平都呈正相关。

3 讨 论

恶性血液病的发生是一个复杂过程,从造血干、祖细胞到成熟血细胞形成的每个环节都有造血微环境调控因子的调节。调控因子与细胞膜上受体结合,启动调控信号向核内转导,引起某些调控基因转录增强或抑制,最终导致细胞增殖、分化的变化,已证实 JAK2/STAT5 途径在血细胞发生的调控中起着重要作用^[1]。恶性血液病发病与转归不仅与造血细胞异常有关,同时与免疫异常有关,Treg 和调控基因 Foxp3 是近年来关于机体免疫状态的研究热点。最近有研究推测^[2],STAT5 可能在转录因子 Foxp3 表达及调控等方面发挥重要作用,由此选择 AL、CL、MDS、SAA 这 4 种相对较常见且都具有恶性转归的血液疾病,分析 STAT5 和 Foxp3 两种分子表达,旨在探明两者与疾病的关系。

JAK/STAT 途径是多数细胞因子的传导途径,其中 JAK2 与造血关系最为密切,STAT5 是 JAK2 最主要的下游信号蛋白。Tam 等^[3]研究数据表明,STAT5 在急性髓系白血病生成和白血病干细胞自我更新中发挥重要作用,认为针对异常激活的 STAT5 或重组下游信号通路可能是一个有前途的治疗选择。Heltemes-Harris 等^[4]揭示 STAT5 的异常激活是启动急性淋巴细胞白血病的关键因素。在 45 例急性白血病患者外周血中检测的 P-STAT5 (2.29±0.79)% 明显高于对照组 (0.54±0.15)%,这与国外研究者得出的结论基本吻合。同样在 CL、MDS 中也发现 STAT5 表达水平较对照组高,差异都具有统计学意义(*P*<0.05),与国外学者的结果较一致^[5-6],国内刘炳楠等^[7]也发现 STAT5 在 MDS 患者骨髓细胞中表达明显增高。以上结果显示 AL、CL、MDS 的发生可能都与磷酸化的 STAT5 表达增多有关,在发病时都存在 JAK2/STAT5 信号通路的异常激活。本研究在 20 例 SAA 患者中测得的 P-STAT5 (0.43±0.17)% 低于对照组 (0.54±0.15)%,但差异无统计学意义(*P*>0.05)。分析结果如下:(1)SAA 的发生可能并不存在 STAT5 的磷酸化;(2)病例数少,统计学上的误差不能排除;(3)患者和对照组两组 P-STAT5 表达都较低,实验本身存在的非特异性染色对结果的干扰被放大,或实验技术有待于调整及改进。目前无论是国外还是国内有关 STAT5 在 SAA 中表达的研究,都暂未见相关报道,研究者作了初步的尝试,但还需扩大样本例数进一步研究证实。

机体的抗肿瘤免疫 Treg 发挥重要作用,通常将表达 Foxp3 作为 Treg 的一个标志,更为重要的是,Foxp3 在 Treg 的发育和功能维持中发挥“总开关”的作用,因此对 Foxp3 表达水平的监测具有重要意义。Memarian 等^[8]研究数据揭示在急性髓系白血病中 Treg 比例升高,且与疾病进展有明显相关性;蒋黎敏等^[9]发现急性淋巴细胞白血病患者 Foxp3 mRNA 水平和 Treg 比例显著增高,且可作为患儿预后和复发的指标;Rojas 等^[10]发现慢性粒细胞白血病患者外周 Treg 细胞比例升高,经化疗后 Treg 比例可下降;吴小建等^[11]根据他们的研究认为 MDS 患者 Foxp3 基因表达水平随预后危险级别的升高而升高,提示免疫异常是 MDS 疾病发生、发展的一个促进因素。本研究在 AL、MDS、CL 这 3 种相当于血液系统肿瘤的病例中观察到 Foxp3 表达水平较对照组高,与国内外的研究结

果基本一致,进一步证实 Foxp3 水平的升高,导致机体抗肿瘤免疫功能降低,可能是血液系统肿瘤发生发展的重要因素。另外 Treg 数量升高导致机体抗肿瘤免疫作用减弱,不仅可以很好的解释为什么恶性血液病患者机体免疫力低、预后差,还说明 Treg 可成为治疗血液肿瘤的一个新靶点。再生障碍性贫血(AA)患者存在 CD4⁺ T 淋巴细胞亚群失衡、Th1 细胞数量异常及功能亢进。Moon 等^[12]研究发现,AA 患者外周血和骨髓中 Treg 数量明显低于健康人,并且与 AA 发病及疗效具有相关性。研究者选择了 AA 中病程最为恶劣的 SAA 病例 20 例进行观察,发现较对照组其 Foxp3 表达水平降低,推测正是因其低水平而导致免疫抑制功能减弱,致使自身免疫性 T 细胞活化增强而使自身免疫应答增强,破坏造血细胞生成而引起骨髓造血功能衰竭乃至停滞。

尽管以往诸多研究对 STAT5 和 Foxp3 的表达及其在致病过程中的作用进行了大量探索,但尚未见将两者结合运用蛋白磷酸化流式细胞术进行定量相关性分析的先例。目前,蛋白磷酸化流式细胞分析技术的应用为揭示病理的信号通路提供了一种可靠的方法^[13]。本研究将 STAT5 和 Foxp3 在 AL、CL、MDS、SAA 的表达量分别作了相关性分析,结果都显示两者呈正相关关系,这对于这几类恶性血液病的临床诊断与治疗具有重要的潜在意义,同时进一步证实了 STAT5 的激活或抑制致 Foxp3 表达改变而致病的机制^[2]。至于 STAT5 是通过何种机制调节 Foxp3 的,是进一步深入研究的方向,但现在至少有理由相信,类似 STAT5 和 Foxp3 调节剂等新型药物的研制将会在恶性血液病的分子水平治疗方面取得新的进展。

参考文献

- [1] Lim J, Jeong SJ, Koh W, et al. JAK2/STAT5 signaling pathway mediates Bojungbangdocktang enhanced hematopoiesis[J]. *Phytother Res*, 2011, 25(3): 329-337.
- [2] Ogawa C, Tone Y, Tsuda M, et al. TGF-beta-mediated Foxp3 gene expression is cooperatively regulated by Stat5, Creb, and AP-1 through CNS2[J]. *J Immunol*, 2014, 192(1): 475-483.
- [3] Tam WF, Hahnel PS, Schuler A, et al. STAT5 is crucial to maintain leukemic stem cells in acute myelogenous leukemias induced

by MOZ-TIF2[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(1): 373-384.

- [4] Heltemes-Harris LM, Willette MJ, Ramsey LB, et al. Ebf1 or Pax5 haploinsufficiency synergizes with STAT5 activation to initiate acute lymphoblastic leukemia[J]. *J Exp Med*, 2011, 208(6): 1135-1149.
- [5] Theodorou M, Speletas M, Mamara A, et al. Identification of a STAT5 target gene, Dpf3, provides novel insights in chronic lymphocytic leukemia[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): 76155.
- [6] Warsch W, Grundschober E, Berger A, et al. STAT5 triggers BCR-ABL1 mutation by mediating ROS production in chronic myeloid leukaemia[J]. *Oncotarget*, 2012, 3(12): 1669-1687.
- [7] 刘炳楠,付蓉,王化泉,等.骨髓增生异常综合征患者骨髓 CD34⁺ CD38⁻ CD123⁺ 细胞内 STAT5 磷酸化水平变化[J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(6): 480-483.
- [8] Memarian A, Nourizadeh M, Masoumi F, et al. Upregulation of CD200 is associated with Foxp3⁺ regulatory T cell expansion and disease progression in acute myeloid leukemia[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(1): 531-542.
- [9] 蒋黎敏,徐翀,傅启华.骨髓中 CD4⁺ CD25^(high) Foxp3⁺ 调节性 T 细胞与儿童急性 B 淋巴细胞白血病的关联性研究[J]. *检验医学*, 2012, 27(7): 601-605.
- [10] Rojas JM, Wang L, Owen S, et al. Naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T-regulatory cells are increased in chronic myeloid leukemia patients not in complete cytogenetic remission and can be immunosuppressive[J]. *Exp Hematol*, 2010, 38(12): 1209-1218.
- [11] 吴小建,黄芳媚,王勇.骨髓增生异常综合征患者 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞、调控基因 FOXP3 的表达及意义[J]. *实用临床医学*, 2010, 11(1): 5-7.
- [12] Moon HW, Kim BH, Park CM, et al. CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ regulatory T-cells in hematologic diseases[J]. *Korean J Lab Med*, 2011, 31(4): 231-237.
- [13] 李华梅,曾意茹,陈福雄,等.磷酸特异化流式细胞术检测骨髓白血病细胞磷酸化信号蛋白的实验研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2011, 19(5): 1176-1179.

(收稿日期:2015-02-15)

(上接第 1694 页)

参考文献

- [1] 刘达庄,朱俊,朱自严,等.免疫性输血反应的调查及预防研究[J]. *中国输血杂志*, 2002, 15(3): 159-161.
- [2] 池泉,郭永健,田兆嵩.红细胞血型抗体与输血安全[J]. *中国输血杂志*, 2008, 21(8): 649-654.
- [3] 中华人民共和国卫生部医政司.全国临床检验操作规程[M]. 3 版.南京:东南大学出版社,2006:260-261.
- [4] 蒋丽华,韦海春,黎海澜.妇幼医院开展不规则抗体筛查的价值和意义[J]. *现代中西医结合杂志*, 2010, 19(16): 2037-2039.
- [5] 黄金环,梁义安,周先果.献血者不规则抗体分析[J]. *中国输血杂志*, 2011, 24(6): 516-517.
- [6] 杨慧,赵建萍.有妊娠史女性患者的不规则抗体筛查[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(6): 1450-1451.

- [7] 杰夫·丹尼尔.人类血型[M].北京:科学出版社,2007:172-173.
- [8] 赵玉河,高冀辉,王吉寿,等.微柱凝胶实验检测受血者不规则抗体分析[J]. *临床血液学杂志:输血与检验版*, 2007, 4(1): 30-31.
- [9] 高峰.输血与输血技术[M].北京:人民卫生出版社,2003:68-93.
- [10] 杨世明,张红丽,张勇萍,等.自身免疫性溶血性贫血患者的血清学特性检测分析[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(8): 834-835.
- [11] 杨珊.165 例患者不规则抗体筛选结果分析及临床意义[J]. *检验医学与临床*, 2010, 7(17): 1864-1865.
- [12] 姚文.交叉配血及安全输血的探讨[J]. *检验医学与临床*, 2010, 7(22): 2532-2533.
- [13] 夏荣,兰炯采.重视红细胞输注无效,提高临床输血效果[J]. *中国输血杂志*, 2008, 21(1): 5-8.

(收稿日期:2015-04-10)