

## 慢性粒细胞白血病患者杀伤细胞免疫球蛋白样受体基因多态性的研究

董瑞萍,杜海林,戴宇东\*

(南京红十字血液中心研究室,江苏 南京 210003)

**[摘要]** 目的:了解慢性粒细胞白血病(CML)患者杀伤细胞免疫球蛋白样受体(killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR)基因型及单倍型,为探讨 KIR 在慢性粒细胞白血病中发挥的作用奠定基础。方法:采用 PCR-SSP 方法对 84 例慢性粒细胞白血病患者进行 KIR 基因分型。结果:框架基因 2DL4、3DL2、3DL3 及 3DP1 存在于所有个体中,其他较为高频的基因依次为 2DL1、2DL3、2DP1 及 3DL1,表型频率均> 80%。CML 患者的 KIR2DL2 和 KIR2DS2 表型频率较健康人有所降低,但除 2DL5B(OR = 0.208,  $P < 0.05$ )外,分析的所有基因在 CML 患者和健康人间的分布均不具有显著差异。结论:基因 KIR2DL5B 可能与 CML 之间存在相关性。

**[关键词]** 慢性粒细胞白血病;KIR 基因;多态性

**[中图分类号]** R733.72

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)04-490-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20130414

## Polymorphism of human killer cell immunoglobulin-like receptor in patients with chronic myelogenous leukemia

Dong Ruiping, Du Hailin, Dai Yudong\*

(Department of Research, Nanjing Red Cross Blood Center, Nanjing 210003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype in patients with chronic myelogenous leukemia (CML). **Methods:** The sequence specific primer polymerase chain reaction (SSP-PCR) was employed to identify the KIR genes and pseudogenes in 84 CML patients. **Results:** The most frequent genotypes were KIR frame genes, including 2DL4, 3DL2, 3DL3 and 3DP1 (100%), followed by 2DL1, 2DL3, 2DP1 and 3DL1 (all above 80%). The frequencies of 2DL2 and 2DS2 in CML patients were lower than those in the control group, but there were no statistically difference between the two groups except 2DL5B (OR = 0.208,  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** KIR 2DL5B may be associated with CML.

**[Key words]** CML; KIR gene; polymorphism

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(4): 490-493]

慢性粒细胞白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) 是一种起源于造血干细胞的血液系统恶性疾病,在美国及英国的发病率均位列白血病的第 2 位。亚洲以印度发病率最高,我国相关资料统计结果显示该病的发病率居于白血病的第 3 位,男性发病率略多于女性。CML 病因目前尚不明确,有研究表明其发病因素与化学物质、电离辐射、遗传因子有明显

关系,是多种危险因素共同作用的结果<sup>[1]</sup>。

近年来,随着自然杀伤(natural killer, NK)细胞相关功能研究的不断深入,研究者们试图探索出 NK 细胞在白血病的发生、发展中所发挥的作用。目前认为, NK 细胞的功能由其表面多种受体的综合作用来实现,其中比较重要的一类受体是杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR), 是主要表达于 NK 细胞和部分 T 细胞表面的免疫球蛋白样超家族成员<sup>[2]</sup>。已知的 16 个 KIR 基因包括: 7 个抑制性基因 (2DL1-3、2DL5、3DL1-3)、6 个活化性基因 (2DS1-5、3DS1)、1 个同时具有活化和抑制功能的基因 (2DL4) 以及 2 个编码

**[基金项目]** “十一五”南京市医学科技发展重大项目 (200713); “十二五”南京市医学科技发展重大项目 (201205)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: yudongdai@gmail.com

无功能性 KIR 受体的假基因(2DP1、3DP1)<sup>[3-4]</sup>。不同的 KIR 基因组合有一定的规律性,从而形成 KIR 基因特定的单体型。Shilling 等<sup>[5]</sup>对这些单体型进行了归纳,将它们分为 A 型和 B 型两类。A 型较稳定,只含有一种活化性基因 2DS4,且多数情况下该活化性基因处于失活状态,在 NK 细胞表面并无表达;B 型相较于 A 型则含有其他一些活化性基因。通过对比慢性粒细胞白血病患者与健康者 KIR 基因多态性的差异,研究者们发现两组人群在某些基因的分布上存在显著性差异,这提示 KIR 在 CML 的发生过程中可能起到了一定的作用<sup>[6-8]</sup>。然而,这些研究数据之间具有较大差异,结果不具有统一性,并不能代表不同地区的实际情况。因此,本研究通过对江苏地区 84 例 CML 患者进行 KIR 基因分型,了解江苏地区 CML 患者 KIR 基因的分布特征,以利于进一步探讨 KIR 与 CML 之间的关联性。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

病例组选取 2003 年 7 月~2010 年 3 月间,经南京军区总医院、南京市鼓楼医院及江苏省中医院确诊为 CML 的患者 84 例,男 58 例,女 26 例,年龄 17~58(40.66)岁。对照组为南京红十字血液中心保存的 300 例江苏地区非亲缘关系汉族健康个体标本,其中男 158 例,女 142 例,年龄 26~70(42.53)岁。

### 1.2 方法

DNA 提取采用 Qiamp Mini Kit (QIAGEN 公司,德国),操作方法依据试剂盒操作说明书进行。KIR 基因分型试剂盒为(美国)Invitrogen 公司产品,可扩增的片断包括:2DL1、2DL2、2DL3、2DL4、2DL5A、2DL5B、2DS1、2DS2、2DS3、2DS4 \* 001/002、2DS4 \* 003-006、2DS5、3DL1、3DL2、3DL3、3DS1、2DP1、3DP1\*001/002/004、3DP1\*003,操作按说明书进行。Taq DNA 聚合酶为美国 Fermentas 公司产品。

个体基因型可分为 AA、AB 和 BB 型 3 类,AA 型只含有 2DS4 一种活化性基因,含有 B 单型型的个体需含有 2DS4 以外的任何一种或多种活化性基因,AB 与 BB 型的区别主要在于前者含有包括 2DS4 基因在内的多个活化性基因,而后者含有除 2DS4 以外的活化性 KIR 基因。

### 1.3 统计学方法

KIR 表型频率 ( $f$ )=KIR 基因出现次数/总观察人数。数据分析采用 SPSS13.0 软件包,应用  $\chi^2$  检验比较组间 KIR 频率差别,最终结果以优势比(OR

值)、95%置信区间(CI)及  $P$  值列出。

## 2 结果

分型结果显示,框架基因 2DL4、3DL2、3DL3 及 3DP1 存在于所有个体中,其中 3DP1 又被细分为 3DP1 \* 001/002/004、3DP1 \* 003,CML 组中所有个体均含有 3DP1 \* 003,14.29%同时含有 3DP1 \* 001/002/004,而对照组中 99%的个体含有 3DP1 \* 003,11%同时含有 3DP1 \* 001/002/004,仅有 1%的个体只含有 3DP1 \* 001/002/004。其他较为高频的基因依次为 2DL1、2DL3、2DP1、3DL1 及 2DS4,表型频率均 > 80%,2DL5B 表型频率最低,CML 组和对照组分别为 2.38%和 7.00%(表 1)。对两组人群进行基因型分类,对照组和 CML 组的 AA 型人数分别为 158 和 47 例,两组中各有 1 例为无活化性受体基因型。对照组和 CML 组均表现为含有抑制性基因型(AA 组)的人数略多于活化性基因型的人数(AB 组和 BB 之和)。

对 3 个框架基因 2DL4、3DL2、3DL3 以外的所

表 1 CML 患者与对照组 KIR 基因及其表型分布频率  
Table 1 Frequencies of KIR genes and KIR genotypes in CML patients and controls [ $f$  (%)]

类型	对照( $n=300$ )	CML( $n=84$ )
KIR gene		
2DL1	297 (99.00)	84 (100.00)
2DL2	52 (17.33)	12 (14.29)
2DL3	297 (99.00)	84 (100.00)
2DL4	300 (100.00)	84 (100.00)
2DL5A	103 (34.33)	30 (35.71)
2DL5B	21 (7.00)	2 (2.38)
2DS1	113 (37.67)	31 (36.90)
2DS2	54 (18.00)	12 (14.29)
2DS3	43 (14.33)	11 (13.10)
2DS4*001/002	245 (81.67)	69 (82.14)
2DS4*003-006	119 (39.67)	31 (36.90)
2DS5	83 (27.67)	25 (29.76)
3DL1	290 (96.67)	79 (94.05)
3DL2	300 (100.00)	84 (100.00)
3DL3	300 (100.00)	84 (100.00)
3DS1	104 (34.67)	30 (35.71)
2DP1	297 (99.00)	84 (100.00)
3DP1*001/002/004	36 (12.00)	12 (14.29)
3DP1*003	297 (99.00)	84 (100.00)
KIR genotype		
AA	157 (52.33)	46 (54.76)
AA( no activating )	1 (0.33)	1 (1.19)
AB	132 (44.00)	33 (39.28)
BB	10 (3.33)	4 (4.76)

有 KIR 基因和 3 种基因型进行逻辑回归分析 (表 2)。除了 2DL5B 外分析的所有基因在 CML 组和对照组间的分布均不具有显著差异。CML 组的 2DL5B 基因分布低于对照组, 差异具有统计学意义 ( $OR = 0.208, P < 0.05$ )。两组在抑制性基因型(AA 组)和活化性基因型(AB 组及 BB 组)方面的差异同样不具有统计学意义。

表 2 CML 患者 KIR 基因及其表型频率逻辑回归分析结果  
Table 2 Statistical associations of KIR genes and KIR genotypes between CML patients and controls

基因	OR	95%CI	P
KIR gene			
2DL1	-	-	0.358
2DL2	0.795	0.403~1.568	0.508
2DL3	-	-	0.358
2DL5A	1.062	0.641~1.762	0.814
2DL5B	0.208	0.054~0.798	0.022
2DS1	0.968	0.586~1.597	0.898
2DS2	0.759	0.386~1.494	0.425
2DS3	0.901	0.442~1.834	0.773
2DS4*001/002	1.033	0.550~1.940	0.920
2DS4*003-006	0.890	0.540~1.466	0.646
2DS5	1.108	0.651~1.885	0.706
3DL1	0.545	0.184~1.615	0.273
3DS1	1.047	0.631~1.736	0.859
2DP1	-	-	0.358
3DP1*001/002/004	1.222	0.605~2.467	0.576
3DP1*003	-	-	0.358
KIR genotype			
AA	1.102	0.678~1.792	0.693
AA( no activating )	3.602	0.266~48.695	0.334
AB	0.824	0.503~1.349	0.440
BB	1.450	0.446~4.716	0.537

### 3 讨论

NK 细胞的杀伤活性与机体对恶性血液病细胞的免疫杀伤和免疫逃逸密切相关<sup>[6,9-10]</sup>。近年来随着对其分子生物学基础方面研究的深入, 人们逐渐认识到 NK 细胞的功能是由其表面多种受体的综合作用来实现的。KIR 是近年来发现的一类细胞表面糖蛋白受体, 主要表达于 NK 细胞和部分 T 细胞表面, 基因定位于人类染色体 19q13.4 的白细胞受体基因群(leukocyte receptor complex, LRC)内, 编码的 KIR 结构和功能具有高度多样性。KIR 在功能上分为抑制性和活化性两种受体, 正常情况下, 抑制性 KIR 受体占主导地位。KIR 的配体是表达于所有有核细胞表面的 HLA- I 类分子, 而目前已知人类 KIR 的配

体大部分是 HLA-C 类分子<sup>[11-13]</sup>。正常情况下, NK 细胞识别自身细胞后产生抑制性信号, 阻止 NK 细胞活化及细胞毒 T 细胞的溶细胞作用, 从而耐受自身组织, 但是在肿瘤细胞或是在畸变的细胞中, 这些细胞表面 HLA 分子表达下调或缺失, NK 细胞不能识别该 HLA 分子, 进而活化杀伤靶细胞, 即 NK 细胞的“丢失自我”假说<sup>[14]</sup>。

随着 KIR 相关研究的深入, 人们发现无论是抗病毒免疫、自身免疫性疾病以及癌症的发生发展都与 KIR 存在着一定的联系<sup>[15-17]</sup>。不同的 KIR 基因与不同的疾病存在着关联性, 如 KIR2DS2 与自身免疫疾病<sup>[18]</sup>、KIR2DS1 与银屑病<sup>[19]</sup>等。在对恶性血液病患者 KIR 基因多态性的研究中, 学者们也取得了一些成果。Verheyden 等<sup>[6]</sup>证实, 比利时高加索人中白血病患者 KIR2DL2 和 KIR2DS2 的基因表达显著增加, 这种趋势 CML、急性髓细胞白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 及急性淋巴细胞白血病 (ALL) 患者中均有所体现。但这一结果却与 Middleton 等<sup>[7]</sup>在土耳其 CML 患者中的研究结果相反, 导致这一矛盾结果的原因尚不清楚。陈阿梅等<sup>[20]</sup>的研究报告显示 2DL1 与 CML 呈明显的负相关, 其他易感的基因还包括 3DS1、2DL5 和 3DL1, 但这一趋势与本研究结果并不一致。本研究中 CML 患者 KIR2DL2 和 KIR2DS2 的表型频率较对照组有所降低, 与 Middleton 等的结果相似, 但本研究中的差异并不具有统计学意义。一致的结果还体现在了 AA 基因型的分布上, CML 患者中 AA 型的分布频率较对照组略有增加, 然而两份结果均不具有显著差异。另有 1 份国内的研究报告指出<sup>[8]</sup>, 在对陕西地区收治的 CML 患者进行 KIR 多态性研究时发现, 患者组的 KIR2DS4 基因表型频率较对照组显著增加, 但这一趋势在本研究中未能得到印证。导致本研究与国内两项研究产生差异的原因还需进一步探讨。本研究发现 KIR2DL5B 的分布在两组之间具有显著性差异, 这一结果提示该基因可能与 CML 之间存在着某种联系, 但还需进一步加以研究证实。目前, 已知 KIR2DL5B 的功能是作为 NK 细胞上的抑制性受体, 通过与与其他受体的相互配合, 共同发挥调控作用。而有关 KIR2DL5B 功能的详细研究比较少见, 其相应配体也尚不明确。

Middleton 等<sup>[7]</sup>在文中提到临床应用甲磺酸伊马替尼(抗肿瘤药)治疗 CML 取得了一定的疗效, 该药物发挥作用的其中一条途径是活化 NK 细胞, 这也提示了 NK 细胞的杀伤活性在治疗 CML 方面具有

一定的作用。近期 Marin 等<sup>[21]</sup>研究结果进一步显示,对于采用伊马替尼作为治疗慢性粒细胞白血病的一线药物的新发患者来说,KIR2DS1 的存在具有重要意义。由于对 NK 细胞活性的调节不是单个 KIR 基因作用的结果,而是抑制性受体基因和活化性受体基因共同作用的结果,因此,对个体 KIR 基因的研究应注重抑制性 KIR 和活化性 KIR 间的平衡以及最终表达于个体细胞表面的 KIR 单体型。此外,某一 KIR 的活化还与其相应配体有关,对于个体 NK 细胞活性的研究应综合考虑 KIR 及其配体 HLA-I 类分子间的相互作用,这样将更有利于探讨 KIR 在慢性粒细胞白血病中所发挥的作用。

#### [参考文献]

- [1] 张茂宏.实用血液病学[M]. 济南:山东科学技术出版社,1990:302-303
- [2] Lopez Botet M,Bellon T,Liano M,et al. Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules[J]. Hum Immunol,2000,61(1):7-17
- [3] McQueen KL,Parham P. Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells[J]. Curr Opin Immunol,2002,14(5):615-621
- [4] Trowsdale J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes[J]. Immunity,2001,15(3):363-374
- [5] Shilling HG,Guethlein LA,Cheng NW,et al. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype [J]. Immunol,2002,168(5):2307-2315
- [6] Verheyden S,Bernier M,Demanet C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia[J]. Leukemia,2004,18(12):2002-2007
- [7] Middleton D,Diler AS,Meenagh A,et al. Killer immunoglobulin-like receptors (KIR2DL2 and/or KIR2DS2) in presence of their ligand (HLA-C1 group) protect against chronic myeloid leukaemia [J]. Tissue Antigens,2009,73(6):553-560
- [8] Zhang Y,Wang B,Ye SH,et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene polymorphisms in patients with leukemia:possible association with susceptibility to the disease[J]. Leuk Res,2010,34(1):55-58
- [9] Epling-Burnette PK,Painter JS,Chaurasia P,et al. Dysregulated NK receptor expression in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes [J]. Blood,2004,103(9):3431-3439
- [10] Costello RT,Sivori S,Marcenaro E,et al. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia [J]. Blood,2002,99(10):3661-3667
- [11] Verheyden S,Schots R,Duquet W,et al. A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation [J]. Leukemia,2005,19(8):1446-1451
- [12] Mandelboim O,Reyburn HT,Sheu EG,et al. The binding site of NK receptors on HLA-C molecules[J]. Immunity,1997,6(3):341-350
- [13] Boyington JC,Sun PD. A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptor[J]. Mol Immunol,2002,38(14):1007-1021
- [14] Ljunggren HG,Karre K. In search of the missing self: MHC molecules and NK cell recognition[J]. Immunol Today,1990,11(7):237-244
- [15] Khakoo SI,Thio CL,Martin MP,et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection[J]. Science,2004,305(5685):872-874
- [16] Nelson GW,Martin MP,Gladman D,et al. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease:hierarchy of protection susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis [J]. Immunol,2004,173(7):4273-4276
- [17] Naumova E,Mihaylova A,Stoitchkov K,et al. Genetic polymorphism of NK receptors and their ligands in melanoma patients:prevalence of inhibitory over activating signals [J]. Cancer Immunol Immunother,2005,54(2):172-178
- [18] Yen JH,Moore BE,Nakajima T,et al. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis [J]. Exp Med,2001,193(10):1159-1168
- [19] Suzuki Y,Hamamoto Y,Ogasawara Y,et al. Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris [J]. Invest Dermatol,2004,122(5):1133-1136
- [20] 陈阿梅,郭晓明,闫文璞,等. 白血病患者的杀伤细胞免疫球蛋白样受体基因多态性研究 [J]. 中国实验血液学,2007,15(1):35-38
- [21] Marin D,Gabriel IH,Ahmad S,et al. KIR2DS1 genotype predicts for complete cytogenetic response and survival in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib[J]. Leukemia. 2012,26(2):296-302

[收稿日期] 2012-12-25