

共刺激分子 B7-H3 在急性髓系白血病中的表达及生物学意义

吕鑫^{1,2}, 陈仕兵¹, 周倩¹, 范美英¹, 闫世彬¹, 仇红霞^{2*}

¹临沂市中心医院血液科, 山东 临沂 276400; ²南京医科大学第一附属医院老年血液科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:检测共刺激分子 B7-H3 在初诊急性髓系白血病(human acute myeloid leukemia, AML)患者中的表达,探讨其临床意义。方法:应用流式细胞术(FCM)检测 66 例初诊 AML 患者原始幼稚细胞群上 B7-H3 分子膜蛋白的表达,RT-PCR 技术检测 B7-H3 mRNA 产物的表达。分析 B7-H3 分子的表达与 AML 患者发病时年龄、性别、初诊时外周血白细胞计数以及染色体之间的关系,评估 B7-H3 分子的表达与患者的无进展生存期(progression-free survival, PFS)和总体生存期(overall survival, OS)之间的关系。结果:正常对照组 B7-H3 分子表达阴性。共刺激分子 B7-H3 在 66 例初诊 AML 患者中阳性表达率为 42%(28/66)。在不同性别、年龄和白细胞分组中, B7-H3 阳性率表达无统计学差异($P=0.924, 0.541, 0.310$);预后差染色体变异组的 B7-H3 分子的阳性表达率明显高于预后好及中等预后组($P<0.001$)。B7-H3 分子阳性组患者的 PFS(7.4 个月 vs. 15.2 个月)及 OS(9.8 个月 vs. 17.8 个月)均明显低于阴性组患者($P<0.05$)。此外,在 AML-M2 亚型中,预后差染色体变异组 B7-H3 分子的表达明显高于预后好及中等预后组($30.05\% \pm 23.10\%$ vs. $10.08\% \pm 7.07\%$, $P<0.001$), B7-H3 与骨髓白血病细胞 CD34 存在共表达,并且 CD34 阳性组的 B7-H3 分子表达明显高于 CD34 阴性组($20.90\% \pm 19.70\%$ vs. $9.63\% \pm 7.21\%$, $P=0.034$)。结论:共刺激分子 B7-H3 的表达对于 AML 患者的病情进展有一定影响, B7-H3 分子表达阳性的患者预后更差。B7-H3 对 AML 的预后判断和指导临床治疗具有重要意义。

[关键词] 共刺激分子; B7-H3; 急性髓系白血病; 预后

[中图分类号] R733.71

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)01-0054-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20180112

Expression of costimulatory molecule B7-H3 on human acute myeloid leukemia and its biological significance

Lü Xin^{1,2}, Chen Shibing¹, Zhou Qian¹, Fan Meiyang¹, Yan Shibin¹, Qiu Hongxia^{2*}

¹Department of Hematology, Linyi Center Hospital, Linyi 276400; ²Department of Geriatric Hematology, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To analyze the expression of costimulatory molecule B7-H3 in patients with acute myeloid leukemia (AML), and explore the clinical significance of the expression of B7-H3. **Methods:** The expression of B7-H3 protein was detected by flow cytometry (FCM) and the expression of B7-H3 mRNA was detected by RT-PCR. We analyzed the relationship between the expression of B7-H3 and some clinical factors. We evaluated the progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) between the B7-H3 positive group and the B7-H3 negative group. **Results:** The results demonstrated that B7-H3 was weakly expressed on bone marrow of AML patients, and RT-PCR also detected mRNA of B7-H3. No B7-H3 positive cells were detected in the normal human bone marrow. B7-H3 was detected in 28 of the 66 cases (42%). However, among 66 AML cases, no significantly higher frequency of B7-H3 positive cases was found in the male or female group ($P=0.924$). Neither was observed between patients who were older than 60 years and those less than 60 years ($P=0.541$). The B7-H3 positive expression was of no significant within the higher WBC subset ($\geq 30 \times 10^9/L$) ($P=0.310$). There was significant differences between favorable karyotype subset and unfavorable ones ($P<0.001$). There was also statistical difference in PFS (7.4 mon vs. 15.2 mon) and OS (9.8 mon vs. 17.8 mon) between the B7-H3 positive group and B7-H3 negative group, respectively ($P<0.05$). Furthermore, in the AML-M2 subtype, the expression of B7-H3 on the unfavorable karyotype group (8 cases) was higher than the favorable group (29 cases, $30.05\% \pm 23.10\%$ vs. $10.08\% \pm 7.07\%$, $P<0.001$). There was coexpression between B7-H3 and CD34 of blast cells. The expression of B7-H3 in the CD34 positive group was higher than that in the

[基金项目] 国家自然科学基金(81270652)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: qhx9805@126.com

negative group (20.90% ± 19.70% vs. 9.63% ± 7.21%, $P=0.034$). **Conclusion:** The expression of B7-H3 in AML has relationship with the expression of the karyotype. The B7-H3 positive patients have the worse prognostic. The research of B7-H3 may be a new prognostic marker and provide insights into the leukemogenesis of acute myeloid leukemia.

[Key words] costimulatory molecule; B7-H3; acute myeloid leukemia; poor prognosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(01):0054-0058]

共刺激信号分子参与了细胞免疫应答的全过程,决定免疫应答的类型,并对免疫应答过程进行了精确调控和适时终止免疫反应^[1]。B7-H3分子是B7共刺激分子家族的新成员,B7-H3 mRNA在人类组织中广泛表达,B7-H3分子能增加CD4⁺T细胞及CD8⁺CTL生成并选择性地诱导干扰素(IFN)- γ 分泌,也诱导一定数量的肿瘤坏死因子(TNF)- α ,初步体现出了一定的抗肿瘤活性^[2]。动物实验表明B7-H3分子对某些肿瘤消退有一定作用,但须联合其他的免疫刺激分子来进行肿瘤免疫治疗,其在肿瘤免疫中的作用已初露端倪,有待深入研究^[3-4]。

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一类起源于造血干细胞的恶性疾病。由于造血祖(干)细胞发生了进展性基因受损,这些遗传学的损害导致了正常造血细胞生长机制的失调,使白血病细胞在骨髓和外周血中积聚,最终占据优势,取代了正常造血^[5-6]。白血病细胞表面抗原表达不同于正常血细胞,常表现为抗原表达的免疫异质性,其显著特点就是抗原表达异常,而抗原表达的异常对于白血病的诊断及预后有着重要的影响,并且特异性的抗原对于白血病的诊断与治疗有着特殊的意义^[7-8]。

我们应用RT-PCR及流式细胞术检测了B7-H3分子在66例初发AML中的表达并分析了B7-H3分子的表达与各临床指标及预后的关系。

1 资料和方法

1.1 资料

2013年7月—2016年7月,连续收集了75例初诊AML患者的骨髓标本,标本来自于临沂市中心医院和南京医科大学第一附属医院老年血液科门诊及住院患者,有完整的病例资料及临床病理资料。其中急性粒细胞白血病未分化型(M1)6例,急性粒细胞白血病部分分化型(M2)44例,急性早幼粒细胞白血病(M3)9例,急性粒-单核细胞白血病(M4)6例,急性单核细胞白血病(M5)7例,红白血病

未分化型(M6)1例,急性微分化髓细胞白血病(M0)2例;因M3的生物学及治疗特殊性未纳入本次统计分析,纳入统计分析的AML病例为66例。其中男34例,女32例,年龄13~85岁,中位年龄49岁。所有病例同时做骨髓(M)、白血病免疫分型(I)和染色体(C)检查;AML按FAB^[9]标准诊断。对照组为10份人骨髓标本,均是检查结果正常的受检者。研究经过临沂市中心医院伦理委员会和南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准,并经患者知情同意。

1.2 方法

1.2.1 骨髓单个核细胞(MNC)分离

取肝素抗凝骨髓3~5 mL,经PBS稀释后,用Ficoll淋巴细胞分离液分离MNC,PBS洗涤2次后用于B7-H3检测。

1.2.2 流式细胞术(FCM)检测骨髓标本

取已经分离好的骨髓单个核细胞,或者骨髓标本经处理后,-80℃深低温保存,速融后做台盼兰实验,细胞活性大于90%,每份被测标本同时设小鼠IgG1同型对照。再行流式检测。其中,细胞表面B7-H3表达大于10%被认定为B7-H3阳性病例。

1.2.3 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测患者骨髓标本的B7-H3 mRNA表达

选择骨髓原、幼细胞大于90%的标本做分子生物学检测。用TRIzol抽提白血病标本的总RNA,按逆转录试剂盒操作流程将mRNA逆转录成cDNA,取1 μ L cDNA为模板,PCR上游引物5'-ACAGACCACTGTGCAGCCTTATTTTC-3',下游引物5'-GGCAGCAGGCA GGATGACTTA-3'。PCR条件为94℃变性30 s,62℃退火35 s,72℃延伸30 s,35个循环,72℃延伸10 min。RT-PCR产物由1.2%琼脂糖凝胶电泳分离,EB染色,摄片。

1.3 统计学方法

用SPSS 17.0版软件包进行分析,计量资料用均数或中位数表示;计数资料用频数和百分率表示,不同性别、年龄及临床病理指标组间B7-H3阳性表达率的比较采用卡方检验,log-rank法评估无进展生

存期 (progression-free survival, PFS) 和总生存期 (overall survival, OS), 并绘制生存曲线。所有统计学分析在5%的显著水平进行双侧检验。PFS的计算是指从达到完全缓解 (complete remission CR) 或部分缓解 (partial remission PR) 的末次化疗第1天到复发之日。OS的计算是指从诊断之日到死亡之日, 未死亡患者以最后一次随访日作为删失值, 末次随访日在2016年10月30日。

2 结果

2.1 B7-H3分子在AML患者骨髓标本的表达

B7-H3分子在不同类型AML患者的骨髓标本原始幼稚细胞群中均有不同程度的表达(图1)。在受检的66例AML患者中, 28例患者表达阳性, 阳性表达率为42%; 10例正常人骨髓标本中单个核细胞未见B7-H3分子阳性表达。

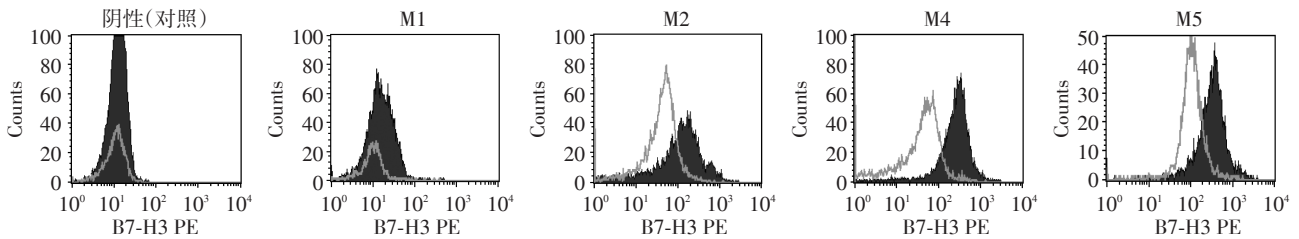
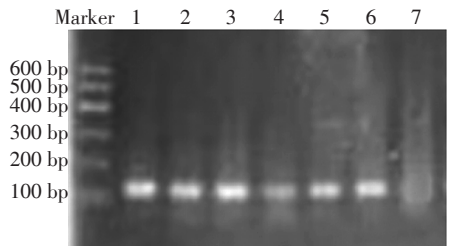


图1 FCM检测AML患者及对照者的B7-H3分子阳性表达

Figure 1 B7-H3 expression of blasts in AML patients and health donors were analyzed by FCM

2.2 AML患者骨髓标本B7-H3 mRNA的表达

将FCM检测到B7-H3分子阳性结果的AML患者骨髓标本提取RNA, 应用RT-PCR的方法可以扩增出129 bp的B7-H3 mRNA 特异性条带(图2)。RT-PCR的结果也证实了流式分析的结果: B7-H3分子的膜蛋白在AML患者白血病细胞表面有表达。



1: M1; 2: M2; 3: M2; 4: M4; 5: M5; 6: M2; 7: M2 阴性。

图2 RT-PCR检测B7-H3分子mRNA

Figure 2 Purified blasts from AML patients were analyzed at the mRNA level by PCR

2.3 B7-H3分子与AML各临床指标的关系

B7-H3阳性表达率在不同年龄、性别、外周血白细胞分组间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。预后差染色体变异组B7-H3分子的阳性表达率明显高于预后好及中等预后组($P < 0.001$, 表1)。

进一步分析AML部分分化型(AML-M2)中B7-H3的表达特点。M2共有44例, 占总病例数的66%, 其中B7-H3阳性表达者19例, 占43.1%。因AML-M2病例数较少, 我们只观察了B7-H3的表达与染色体核型及骨髓白血病细胞上免疫分子CD34

表1 B7-H3分子的表达与AML患者各个临床指标的关系

Table 1 The relationship of clinical characteristics and B7-H3 expression (n)

因素	B7-H3 阳性	B7-H3 阴性	P值
性别			0.924
男	18	16	
女	14	18	
年龄(岁)			0.541
<60	24	26	
≥60	8	8	
外周血白细胞			0.310
< 30×10 ⁹ 个/L	23	22	
≥30×10 ⁹ 个/L	12	9	
染色体			0.001
好及中等预后	16	23	
预后差	10	5	

表达之间的关系。能检测到染色体的M2共37例, 其中预后差染色体变异组(8例)的B7-H3分子表达率明显高于预后好及中等预后组(29例)(30.05% ± 23.10% vs. 10.08% ± 7.07%, $P < 0.001$)。另外, 我们分析了白血病细胞表面上B7-H3表达与CD34表达的关系, 发现骨髓白血病细胞表面有CD34与B7-H3共表达现象(图3), CD34阳性组(28例)的B7-H3分子表达率明显高于CD34阴性组(16例)(20.90% ± 19.70% vs. 9.63% ± 7.21%, $P = 0.034$)。

2.4 B7-H3分子的表达与患者的生存率

在66例AML患者中, 可随访到PFS的患者为43例。B7-H3阳性组(27/43例)的PFS为7.4个月,

B7-H3 阴性组(16/43 例)的 PFS 为 15.2 个月,两组间有显著差异($\chi^2=12.453, P < 0.001$, 图 4A)。

在 66 例 AML 患者中, B7-H3 阳性组(28/66 例)的 OS 为 9.8 个月, B7-H3 分子阴性组(38/66 例)的 OS 为 17.8 个月, 两组间有统计学差异($\chi^2=7.765, P < 0.05$, 图 4B)。

3 讨论

共刺激分子 B7-H3 是 B7/CD28 家族(免疫球蛋白超家族)的最新成员之一。近两年来,对 B7-H3 分子在人体肿瘤组织标本中的表达情况有了一些报道: Crispen 等^[10]发现肾细胞癌的透明细胞和脉管系

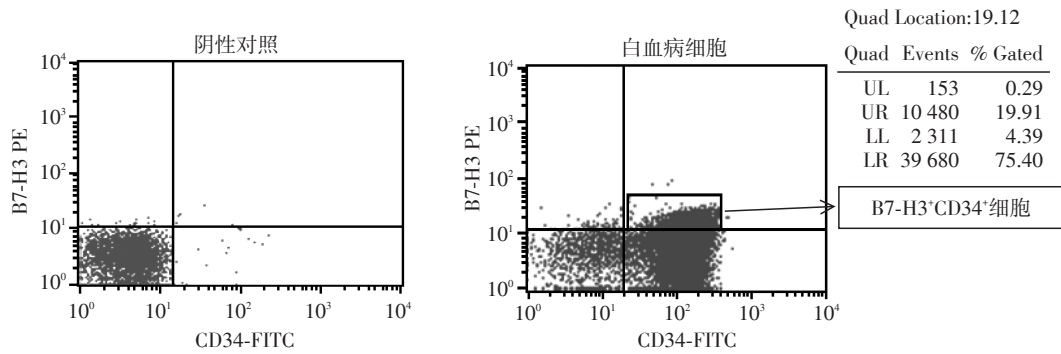


图3 M2亚型中B7-H3分子与骨髓白血病细胞CD34共表达
Figure 3 B7-H3 and CD34 coexpression in M2 subtype

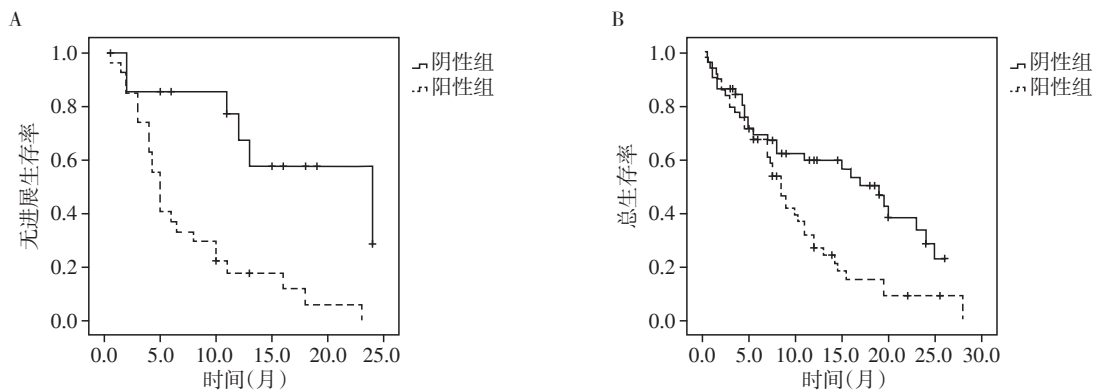


图4 B7-H3分子阳性组与阴性组PFS(A)和OS(B)比较
Figure 4 B7-H3 expression in relation to progression-free survival(A)and overall survival(B)

统 B7-H3 分子高表达明显增加患者的病死率,同样在前列腺癌患者 B7-H3 分子高表达者预后也较差。Lupu 等^[11]发现:前列腺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、膀胱上皮细胞癌和成神经细胞瘤的肿瘤细胞上有 B7-H3 分子的异常表达,并证实 B7-H3 分子的高表达与肿瘤疾病的进展有关。

我们的研究发现,在 AML 中,染色体核型预后差组的 B7-H3 分子阳性表达率明显高于预后好及中等预后组,这与骨髓染色体异常与急性髓系白血病预后之间的关系相一致。在急性白血病中染色体异常导致较差预后。另外,我们比较了 B7-H3 分子阳性组与 B7-H3 阴性组的 PFS 与 OS,结果显示 B7-H3 分子阳性患者的 PFS 与 OS 均明显低于 B7-H3 阴性组,此结论可佐证 B7-H3 分子阳性表达患者的疾

病进展较阴性患者快。B7-H3 分子阳性表达患者缓解时间短,生存期短,预后差。这一结论与 Crispen 等^[10]在人类肾透明细胞癌及 Lupu 等^[11]在结肠癌小鼠实验等方面的研究结果相一致。我们的病例数较少,以后将进一步随访并在体内及体外实验中探讨 B7-H3 及其相关配体的作用机制。

然而,也有学者在人类肿瘤组织与 B7-H3 分子的研究中得出与上述不同的结果。现有学者认为 B7-H3 分子是一个正性调控分子,有利于增加细胞因子的分泌,为细胞免疫应答提供正性信号,起共刺激作用^[12]。Wu 等^[13]发现胃癌细胞和胃腺瘤细胞膜和细胞浆中均见 B7-H3 分子阳性表达, B7-H3 分子的阳性表达与肿瘤浸润深度、组织类型、胃癌患者预后相关,生存期大于 5 年的胃癌患者 B7-H3 分

子的表达阳性率(74.5%),显著高于生存期小于2年的胃癌患者(43.1%)。结果提示B7-H3分子在肿瘤免疫中可能作为一种正性调节因子起作用,B7-H3分子与胃癌的预后具有相关性,由于该研究的样本量小,B7-H3分子是否可作为对胃癌预后的判断和术后个体化治疗选择的独立指标仍待进一步研究。

最新研究证实B7-H3分子在肿瘤的发展及肿瘤细胞免疫逃逸中发挥一定的作用,并对B7-H3分子在机体免疫调节中的具体作用机制进行了探讨,发现B7-H3在肿瘤中发挥作用可能与机体Treg细胞、PD-1及PD-L1等肿瘤抑制因子有一定关系^[14],但其相关配体及具体作用机制仍不明确。我们前期对B7-H3在部分急性白血病细胞株U937及K562上的表达及生物学意义进行了研究,发现应用抗体阻断B7-H3后白血病细胞株生长受到抑制^[15],这与本次研究结果是一致的。本次研究表明,B7-H3分子在部分AML患者白血病细胞上有阳性表达,B7-H3分子阳性患者的PFS及OS明显低于B7-H3分子阴性患者;B7-H3分子阳性表达患者疾病进展的危险度明显大于阴性患者;B7-H3分子阳性患者的生存期短,预后较差。目前尚无B7-H3与白血病细胞表面抗原表达的相关研究。有趣的是我们在M2亚型中的研究发现:B7-H3的表达与CD34表达存在一定相关性,这为进一步研究B7-H3在急性白血病中的作用机制提供思路,但由于M2亚型病例数较少,我们将进一步完善相关病例随访及细胞体内外试验,以求在B7-H3作用机制的研究上取得突破。综上,我们认为共刺激分子B7-H3对AML的预后判断和指导临床治疗具有重要的意义,并且可以预见B7-H3可能成为AML免疫治疗的新靶点,可能为AML免疫治疗提供更多思路。

[参考文献]

- [1] Zhang GB, Chen YJ, Shi Q, et al. Human recombinant B7-H3 expressed in *E. coli* enhances T lymphocyte proliferation and IL-10 secretion in vitro [J]. *Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai)*, 2004, 36(6): 430-436
- [2] Suh WK, Gajewska BU, Okada H, et al. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(9): 899-906
- [3] Hashiguchi M, Kobori H, Ritprajak P, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30): 10495-10500
- [4] Wang L, Fraser CC, Kikly K, et al. B7-H3 promotes acute and chronic allograft rejection [J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35(2): 428-438
- [5] Head DR. Revised classification of acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 1996, 10(11): 1826-1831
- [6] Rosenfeld C, Kantarjian H. Is myelodysplastic related acute myelogenous leukemia a distinct entity from de novo acute myelogenous leukemia? Potential for targeted therapies [J]. *Leuk Lymphoma*, 2001, 41(5/6): 493-500
- [7] Krampera M, Perbellini O, Vincenzi C, et al. Methodological approach to minimal residual disease detection by flow cytometry in adult B-lineage acute lymphoblastic leukemia [J]. *Haematologica*, 2006, 91(8): 1109-1112
- [8] Krampera M, Vitale A, Vincenzi C, et al. Outcome prediction by immunophenotypic minimal residual disease detection in adult T-cell acute lymphoblastic leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2003, 120(1): 74-79
- [9] Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. The French-American-British (FAB) co-operative group, Proposal for the classification of the myelodysplastic syndromes [J]. *Br J Haematol*, 1982, 51(7): 189-199
- [10] Crispen PL, Sheinin Y, Roth TJ, et al. Tumor cell and tumor vasculature expression of B7-H3 predict survival in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(16): 5150-5157
- [11] Lupu CM, Eisenbach C, Kuefner MA, et al. An orthotopic colon cancer model for studying the B7-H3 antitumor effect in vivo [J]. *J Gastrointest Surg*, 2006, 10(5): 635-645
- [12] Chambers CA, Allison JP. Costimulatory regulation of T cell function [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, 11(2): 203-210
- [13] Wu CP, Jiang JT, Tan M, et al. Relationship between co-stimulatory molecule B7-H3 expression and gastric carcinoma histology and prognosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(3): 457-459
- [14] Picarda E, Ohaegbulam KC, Zang X. Molecular pathways: targeting B7-H3 (CD276) for human cancer immunotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(14): 3425-3431
- [15] 吕鑫, 仇红霞, 居颂文, 等. B7H3分子在人髓系白血病细胞株U937和K562上的表达及生物学意义 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2010, 30(8): 1079-1081

[收稿日期] 2016-12-12