

网络出版时间: 2019-3-22 16:46 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190321.1437.024.html>

◇ 临床医学研究 ◇

## 儿童急性淋巴细胞白血病中 SOCS3 通过 STAT3 信号通路调节 Treg 细胞表达

黄玲玲 王宁玲 吴正玉 刘亢亢 储金华 杨林海

**摘要** 目的 探讨儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)细胞因子信号转导抑制因子-3(SOCS3)的表达水平对调节性T细胞(Treg细胞)表达水平的影响。方法 选取45例初治的ALL患儿作为初诊组,13例健康儿童作为正常对照组。采用荧光定量聚合酶链式反应(PCR)法对实验对象外周血单个核细胞中信号转导与转录激活子-3(STAT3)mRNA、SOCS3 mRNA的表达水平进行测定,采用流式细胞术对Treg细胞的表达水平进行测定。结果 ① ALL患儿初诊组在SOCS3 mRNA表达水平明显低于正常对照组( $P < 0.05$ );而STAT3 mRNA表达水平明显高于正常对照组( $P < 0.05$ );② ALL患儿初诊组Treg细胞的表达水平高于正常对照组( $P < 0.05$ );③ ALL患儿初诊组中STAT3的表达水平与Treg细胞的表达水平呈正相关( $r = 0.751, P < 0.05$ ) SOCS3的表达水平与STAT3、Treg细胞的表达水平均呈负相关(STAT:  $r = -0.61, P < 0.05$ ; Treg:  $r = -0.558, P < 0.05$ )。结论 ALL患儿初诊组中SOCS3的低表达引起STAT3的活化增加,进而提高了Treg细胞的表达水平,通过调控SOCS3表达水平的方法可能为ALL的肿瘤免疫治疗提供新的研究思路。

**关键词** 急性淋巴细胞白血病;细胞因子信号转导抑制因子-3;调节性T细胞;信号转导与转录激活子-3

中图分类号 R 725.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)03-0458-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.024

近年来随着对急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)发生机制的深入研究,国内外学者<sup>[1-2]</sup>发现CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>调节性T细胞高表达导致的免疫抑制与ALL细胞恶性克隆相关,调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)与儿童ALL之间存在密切关系,控制ALL患者体内Treg细胞的数量和功能可以提高ALL患者的抗肿瘤免疫能力及白血病微小病变残留的清除能力。细胞因子

信号转导抑制因子3(suppressor of cytokine signaling 3, SOCS3)能够通过抑制Janus 蛋白质酪氨酸激酶/信号转导因子和转录激活子3(janus protein tyrosine/signal transducer and activator of transcription 3, JAK/STAT3)信号的行为间接参与到调控T淋巴细胞分化、成熟的过程,在调控体内Treg细胞表达中起到关键作用<sup>[3-4]</sup>。该研究测定儿童ALL中SOCS3与Treg细胞表达水平的关系,探讨SOCS3在儿童ALL疾病状态和危险度评估、肿瘤免疫以及靶向治疗中的应用。

### 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 研究对象:2015年1~12月在安徽医科大学第二附属医院儿科血液病区住院的新诊断ALL患儿。纳入标准:符合细胞形态学、免疫分型、遗传学及分子生物学诊断标准的ALL,入组年龄1个月~18岁,中位年龄5.8岁,排除以下情况:成熟B急性淋巴细胞白血病、混合表型的急性白血病、免疫缺陷性疾病、第二肿瘤、非初治的ALL。依据初治时疾病危险度将患儿分组,共分为低危(low risk, LR)、中危(moderate risk, MR)和高危(high risk, HR)3组,化疗方案采用中国儿童ALL多中心治疗研究方案(急性淋巴细胞白血病-2015方案),该化疗方案包括三个阶段,分别为诱导缓解化疗、巩固化疗治疗、维持化疗治疗。儿童ALL染色体核型异常并形成融合基因包括TEL-AML基因、BCR/ABL基因、POX基因、MLL基因等。最终确定入组ALL病例45例,其中女性患者22例,男性患者23例,患儿年龄为8个月~14岁,中位年龄为5.8岁,入组患儿的相关临床特点见表1。同时设置正常对照组,正常对照组选择13名健康儿童,其中女孩7例,男孩6例,正常对照组儿童年龄3~14岁,中位年龄5.8岁。两组年龄、性别差异均无统计学意义( $P < 0.05$ )。所有确诊ALL的入组患儿和正常对照组健康儿童资料中均留存废弃标本用于科学研究知情同意书,该知情同意书由其监护人签署。

2018-12-10 接收

基金项目:安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2012A168)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院儿科,合肥 230601

作者简介:黄玲玲,女,硕士研究生,副主任医师;

王宁玲,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: zwnl126.com

表1 45例 ALL 患儿的临床特点

临床特点	临床指标
性别(男/女)	23/22
中位年龄(岁)	5.8(8~14)
≤10	38例
>10	7例
白细胞中位值(×10 <sup>9</sup> /L)	21.95(0.86~704.06)
≤50	29例
>50	16例
血红蛋白中位值(g/L)	70(39~121)
血小板中位值(×10 <sup>9</sup> /L)	42(8~544)
铁蛋白中位值(ng/ml)	274(14.9~3718)
乳酸脱氢酶中位值(U/L)	534(143~2854)
骨髓原始幼稚细胞中位值(%)	82.0(44.0~96.4)
B系急性淋巴细胞白血病	42例
T系急性淋巴细胞白血病	3例
低危组 ALL	16例
中危组 ALL	20例
高危组 ALL	9例
融合基因	
TEL/AML 基因	6例
BCR/ABL 基因	4例
POX 基因	1例
MLL 基因	1例

**1.2 外周血单个核细胞和 RNA 的提取** 用无菌乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)抗凝管留取 ALL 患儿和正常儿童外周血 3 ml,加入 Ficoll 分离液(天津生物科技有限公司),按照说明提取外周血单个核细胞。按照 TRIzol 法(美国 Invitrogen 公司)提取 RNA,提取后的 RNA 溶于 10 μl DEPC 水中,微量光度计测定所有 RNA 样本 A260/A280 为 1.8~2.0。

**1.3 荧光定量 PCR 反应** 以 Oligo d(T) 为引物(美国 Invitrogen 公司),按照逆转录试剂(美国 Themero Scientific 公司)说明书进行 cDNA 合成;按照 SYBR-Green 试剂(美国 Themero Scientific 公司)说明书进行荧光定量 PCR 反应。SOCS3 前引物序列:5'-CAGCTCCAAGAGCGAGTACCA-3'; SOCS3 后引物序列:5'-AGAAGCCGCTCTCCTGCAG-3'; STAT3 前引物序列:5'-AGGAGGAGGCATTCGGAAA-3'; STAT3 后引物序列:5'-AGCGCCTGGGTCAGCTT-3'; 内参基因 GADPH 前引物序列:5'-AATG-GAAATCCCATCACCATCT-3'; GADPH 后引物序列:5'-CGCCCCACTTGATTTTGG-3'。

**1.4 流式细胞术测定 Treg 细胞水平** 采用全血直接计数法以 CD4-异硫氰酸荧光素(FITC)设门,固定、破膜,别藻青蛋白(APC)标记的 FOXP3 抗体染色 30 min 检测 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>T 淋巴细胞比例。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件进行统计

分析 检测结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,经方差齐性检验后,采用 *t* 检验比较二组间差异,*P* < 0.05 为差异有统计学意义;采用  $\Delta\Delta CT$  测定 STAT3 和 SOCS3 的相对表达含量;采用线性相关分析比较 ALL 患儿 SOCS3、STAT3、Treg 细胞水平相关关系。

**2 结果**

**2.1 ALL 患儿初诊时 SOCS3 mRNA 表达水平**

测定 45 例初诊组 ALL 患儿初诊时 SOCS3 mRNA 水平和正常对照组 13 例健康儿童的 SOCS3 mRNA 水平,测定数据显示两组 SOCS3 mRNA 相对表达量分别为(0.62 ± 1.04)和(4.25 ± 2.37)。该结果表明,初诊组患儿在初诊时 SOCS3 mRNA 的表达水平明显低于正常对照组,差异有统计学意义(*t* = 9.759, *P* < 0.05)。

**2.2 ALL 患儿初诊时 STAT3 mRNA 表达水平**

测定 45 例初诊组 ALL 患儿初诊时和正常对照组 13 例正常儿童的 STAT3 mRNA 水平,STAT3 mRNA 相对表达量分别为(3.11 ± 1.17)和(0.87 ± 0.14),初诊组患儿在初诊时 STAT3 mRNA 表达水平是增高的,与正常对照组比较,差异有统计学意义(*t* = 12.54, *P* < 0.05)。

**2.3 ALL 患儿初诊时 Treg 细胞水平**

用流式细胞术检测了初诊组 45 例 ALL 患儿初诊时和 13 例正常对照组儿童的 Treg 细胞表达水平,见图 1。对比数据结果可以看出,ALL 患儿初诊 Treg 细胞水平增高,与对照组差异有统计学意义(*t* = -9.163, *P* < 0.05),见表 2。

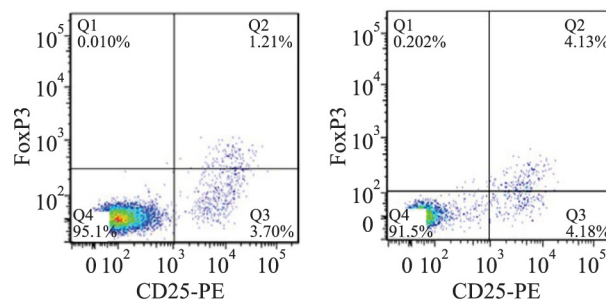


图1 初诊组 ALL 患儿与正常对照组儿童 Treg 细胞表达水平

表2 初诊组 ALL 患儿与正常对照组儿童 Treg 细胞表达水平

分组	n	Treg 细胞表达水平	P 值
正常对照	13	5.22 ± 0.49	<0.05
初诊 ALL	45	8.05 ± 1.33	>0.05
LR	16	8.96 ± 2.20	
IR	20	7.98 ± 1.26	
HR	9	8.40 ± 2.11	

**2.4 ALL 患儿初诊时 SOCS3、STAT3、Treg 细胞表达相关性** 初诊组 ALL 患儿 STAT3 的表达水平与 Treg 细胞表达水平呈正相关性( Treg:  $r=0.751$  ,  $P<0.05$ ) ,而 SOCS3 的表达水平分别与 STAT3、Treg 细胞表达水平均呈负相关性( STAT3:  $r=-0.61$  ,  $P<0.05$ ; Treg:  $r=-0.558$  ,  $P<0.05$ ) ,见图 2。

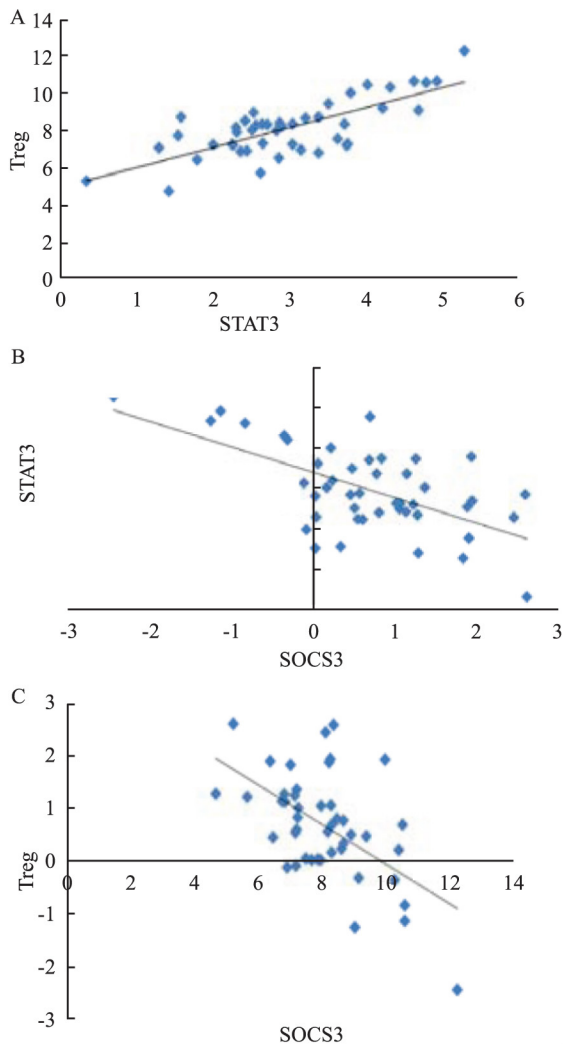


图2 初诊组 ALL 患儿 STAT3、SOCS3、Treg 细胞表达水平相关关系散点图

A: STAT3 表达水平与 Treg 细胞水平相关关系散点图; B: SOCS3 表达水平与 STAT3 表达水平相关关系散点图; C: SOCS3 表达水平与 Treg 细胞水平相关关系散点图

**3 讨论**

Treg 细胞作为免疫抑制性细胞 ,在血液系统恶性肿瘤的发生、发展中起到重要作用<sup>[5-6]</sup> ,Treg 细胞在血液系统肿瘤患者中表达水平增高、Treg 细胞数量增加以及 Treg 细胞在肿瘤患者中功能增强都有利于肿瘤发展及生长 ,从而影响疾病的进展及进程。

对于 Treg 细胞表达水平与儿童 ALL 之间存在的关系 ,以往的研究<sup>[1-7]</sup>表明在儿童 ALL 中存在 Treg 细胞表达水平增高的现象 ,本研究通过测定 45 例 ALL 患儿和正常对照组儿童 Treg 细胞表达水平 ,结果同样证实儿童 ALL 中 Treg 细胞表达水平增高 ,然而引起 ALL 患儿 Treg 细胞表达水平增高的机制目前尚不清楚。

随着对 Treg 细胞表达调节机制的深入研究 ,STAT3 在调节 Treg 细胞表达中起到了重要的作用<sup>[8]</sup> ,STAT3 与 CD4<sup>+</sup>T 细胞上白介素-6 受体结合 ,上调叉头蛋白-3 的表达 ,促进了 Treg 细胞的活化。由此推论如果抑制了 STAT3 的表达 ,则可以直接或间接抑制 Treg 细胞的活化<sup>[9]</sup>。为探讨在儿童 ALL 中 STAT3 与 Treg 细胞表达水平的关系 ,本研究同时测定了儿童 ALL 中 STAT3 表达水平 ,结果显示儿童 ALL 中 STAT3、Treg 细胞水平明显增高 ,提示在儿童 ALL 中 STAT3 的异常表达可能是导致 Treg 细胞水平增高的原因之一。

SOCS3 是 SOCS 家族中的重要一员 ,是负性调控 JAK/STAT3 信号通路中重要的一种分子 ,在某些类型白血病中发现 SOCS3 存在低表达的现象 ,SOCS3 低表达可导致 STAT3 的持续磷酸化<sup>[10-11]</sup>。课题组前期曾探讨儿童急性淋巴细胞白血病 SOCS3 的表达水平与 ALL 临床特点和 ALL 早期治疗反应的相关性 ,相关数据可以证实: 儿童 ALL 中存在 SOCS3 表达下调的现象 ,但 SOCS3 在疾病诱导缓解后能够恢复正常表达<sup>[11]</sup>。为了探讨在儿童 ALL 中 SOCS3 和 STAT3 两者的关系 ,本研究同时测定了急 ALL 患儿中 SOCS3 的表达水平 ,结果表明 SOCS3 的表达水平在 ALL 儿童中明显降低 ,提示在儿童 ALL 中 SOCS3 负性调节 STAT3 的表达 ,SOCS3 的低表达导致 STAT3 的持续活化 ,从而引起 Treg 细胞的高表达。SOCS3 对 Treg 细胞的调节作用 ,为白血病的免疫治疗提供了新思路。

近年来 SOCS3 得到了学者们广泛关注及深入研究 ,其作为可能的抑癌基因参与了各种肿瘤的发生、发展和转移 ,参与了肿瘤的进展及病程<sup>[12-14]</sup> ,课题组前期研究<sup>[11]</sup>揭示了 SOCS3 与儿童 ALL 发生、发展密切相关 ,SOCS3 在 ALL 儿童中的低表达可以导致 ALL 中 STAT3 的持续活化 ,因此监测 ALL 患者中 SOCS3 水平可以了解疾病状态并可以评价危险度<sup>[10-11]</sup>。然而儿童 ALL 中 SOCS3 低表达的机制目前尚不清楚 ,SOCS3 的低表达与儿童 ALL 长期无事件生存的关系以及 STAT3 的持续活化引起的

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Treg 细胞表达增高的具体作用机制还有待进一步研究。有学者在关于肝癌的研究<sup>[15]</sup>表明 SOCS3 基因的甲基化可以引起 SOCS3 的低表达,接下来本研究计划测定 SOCS3 基因甲基化水平,进一步探究 SOCS3 低表达的分子机制,同时继续跟踪随访入组研究对象的长期无事件生存情况。

### 参考文献

- [1] Shenghui Z, Yixiang H, Jianbo W, et al. Elevated frequencies of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia [J]. *Int J cancer*, 2011, 129(6): 1373–81.
- [2] Oleinika K, Nibbs R J, Graham G J, et al. Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression [J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 171(1): 36–45.
- [3] Vainchenkr W, Constantinescu S N. JAK/STAT signaling in hematological malignancies [J]. *Oncogene*, 2013, 32(21): 2601–13.
- [4] Lee, Y K, Mukasa R, Hatton R D, et al. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells [J]. *Curr opin immunol*, 2009, 21(3): 274–80.
- [5] Yang W, Xu Y. Clinical significance of Treg cell frequency in acute myeloid leukemia [J]. *Int J Hematol* 2013 98(5): 558–62.
- [6] Bhattacharya K, Chandra S, Mandal C. Critical stoichiometric ratio of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> responder T cells influence immunosuppression in patients with B-cell acute leukaemia [J]. *Immunology* 2014, 142(1): 124–39.
- [7] 吴琼, 王小中. 急性白血病患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞检测及其对细胞凋亡的作用 [J]. *实验与检验医学*, 2017, 35(3): 304–7.
- [8] Siveen K S, Sikka S, Surana R, et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors [J]. *Biochim Biophys Acta* 2014, 1845(2): 136–54.
- [9] Beyer M, Schultze J L. Regulatory T cells in cancer [J]. *Blood*, 2006, 108(3): 804–11.
- [10] Al-Jamal H A, Jusoh S A, Yong A C, et al. Silencing of suppressor of cytokine signaling-3 due to methylation results in phosphorylation of STAT3 in imatinib resistant BCR-ABL positive chronic myeloid leukemia cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(11): 4555–61.
- [11] 吴正玉, 王宁玲, 刘亢亢, 等. 儿童急性淋巴细胞白血病 SOCS3 mRNA 的表达水平与临床特点、早期治疗反应的相关性 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2017, 25(5): 1367–72.
- [12] Lin Y C, Lin C K, Tsai Y H, et al. Adenovirus-mediated SOCS3 gene transfer inhibits the growth and enhances the radiosensitivity of human non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncol Rep* 2010, 24(6): 1605–12.
- [13] Babon J J, Kershaw N J, Murphy J M, et al. Suppression of cytokine signaling by SOCS3: characterization of the mode of inhibition and the basis of its specificity [J]. *Immunity* 2012, 36(2): 239–50.
- [14] Lee J H, Kim C, Sethi G, et al. Brassinin inhibits STAT3 signaling pathway through modulation of PIAS-3 and SOCS-3 expression and sensitizes human lung cancer xenograft in nude mice to paclitaxel [J]. *Oncotarget* 2015, 6(8): 6386–405.
- [15] Zhang X, You Q, Zhang X, et al. SOCS3 methylation predicts a poor prognosis in HBV infection-related hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9): 22662–75.

## SOCS3 regulates Treg cell expression via STAT3 signaling pathway in childhood with acute lymphoblastic leukemia

Huang Lingling, Wang Ningling, Wu Zhengyu, et al

(Dept of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230601)

**Abstract Objective** To investigate the role of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in the expression of Treg cells in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Methods** Forty-five children with ALL and thirteen age-matched healthy children were selected, then the expression levels of SOCS3 mRNA, signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) mRNA were measured by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Meanwhile, the proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory Treg cells was analyzed by flow cytometry. **Results** ① Compared with normal control group, the expression level of SOCS3 in ALL patients was obviously weakened ( $P < 0.05$ ), while that of STAT3 in ALL patients was significantly elevated ( $P < 0.05$ ). ② The proportion of Treg cells significantly increased in ALL compared with normal control group. ③ A positive correlation ( $r = 0.751, P < 0.05$ ) between STAT3 expression levels and proportion of Treg cells was observed in ALL patients, while the expression level of SOCS3 in ALL patients was negatively correlated with that of STAT3 and Treg cells ( $r = -0.61, P < 0.05$ ). **Conclusion** Silencing of SOCS3 in pediatric ALL increases the expression of Treg cells by activating STAT3 signaling pathway, which may provide a new way for immune therapy via improving the expression level of SOCS3 in pediatric ALL patients.

**Key words** acute lymphoblastic leukemia; suppressor of cytokine signaling 3; regulatory T cells; signal transducers and activators of transcription 3