

白细胞介素-33通过激活 p38 MAPK 信号调节儿童急性髓系白血病细胞中 IL-4 的表达

王一倩¹, 朱泽钰², 侯寒漪³, 罗焕敏⁴, 虞红娇¹ (1. 广州医科大学生命科学学院, 广东广州 511436; 2. 广州医科大学金城检验学院, 广东广州 511436; 3. 广州医科大学第二临床学院, 广东广州 511436; 4. 广州医科大学第三临床学院, 广东广州 511436)

摘要: 目的: 探究急性髓系白血病 (AML) 细胞如何通过白细胞介素-33 (IL-33) 影响骨髓 (BM) 微环境, 从而促进其生存的机制。方法: 通过酶联免疫吸附测定或细胞计数微珠阵列试剂盒测量 IL-33、IL-4 的表达水平。通过免疫印迹定量磷酸化的 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK)、p38 和 GAPDH 的表达。使用流式细胞仪通过凋亡评估细胞存活信号。通过实时定量荧光 PCR 测量 IL-4、Actb mRNA 的表达; 结果: 在诊断出的 AML 患者中, 血清 IL-33 水平与 IL-4 水平相关; 从体外实验中检测到, IL-33 诱导的 BM 和外周血 (PB) 样品中 IL-4 水平升高; IL-33 以 p38 MAPK 依赖的方式增加了白血病细胞中 IL-4 的表达。结论: 为 IL-33 信号传导在 AML 发生过程中的关键作用提供了证据。

关键词: 急性髓系白血病; 白细胞介素-33; 白细胞介素-4; P38 丝裂原活化蛋白激酶通路

急性髓细胞性白血病 (Acute Myeloid Leukemia, AML) 是一种遗传异质性克隆恶性肿瘤, 其特征是反复发生染色体重排, 最终导致骨髓祖细胞在骨髓 (Bone Marrow, BM) 和外周血 (Peripheral Blood, PB) 中积累^[1]。尽管近年来儿童 AML 的治疗有所进步, 不到 65% 的患者在初次诱导缓解治疗后的 3 年内仍能够存活^[2]。但开发新的替代方法对更有效地治疗 AML 仍至关重要。肿瘤微环境能够通过保护癌细胞免受抗癌药和环境压力的影响^[3-4]。白血病细胞和 BM 微环境之间的相互作用关系一直是探究 AML 发展机制的研究热点。

IL-33 是一种来自 IL-1 家族的细胞因子, 可调节宿主防御, 免疫调节和炎症反应^[5]。在表达慢性髓样白血病 (CML) 的 BCR-ABL 中, IL-33 信号传导可通过促进耐药性促进细胞存活, 并且促进细胞因子的分泌^[15]。表达融合基因 Cbfb-MYH11 的原代小鼠 AML 细胞高度表达 IL-33 的受体, 即白介素 1 受体样 1 (interleukin-1 receptor like 1, IL1RL1)。随后发现, 向 AML 患者白血病细胞中加入 IL-33 能够有效抑制凋亡, 激活 P38 丝裂原活化蛋白激酶通路 (p38 MAPK), 并增加 IL-4 和 IL-6 mRNA 水平^[6-8]。本实验以儿童 AML 白血病细胞为模型, 探讨 AML 患者细胞中 IL-4 的表达水平是否受 IL-33 的调节。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 2020 年 4~12 月在广州市妇女儿童医疗中心 (伦理编号: 2020-39500) 确诊的 AML 患者。采集初诊儿童 AML 患者或者健康供者 (HD) 的血清样本 (1~2 ml), BM (2~3 ml) 和 PB (2~3 ml) 来自新诊断的儿童 AML 患者和 HD。采用单个核细胞分离液分离出单个核细胞 (Mononuclear Cell, MNC)。

1.2 细胞培养

白血病细胞培养液为 RPMI-1640 和含体积分数为 10% 的 FBS, 于 37℃、体积分数为 5% CO₂ 的培养箱中培养, 在倒置显微镜下观察细胞生长状况。

1.3 酶联免疫吸附测定

根据产品说明书分别测定 AML 初诊患者和 HD 对照组的血清 IL-33 的水平。将样品与辣根过氧化物酶 (HRP) 缀

合的抗体一起温育, 然后添加 HRP 底物 TMB 导致显色。在过氧化物酶的催化作用下, TMB 变成蓝色, 并使用酶标仪在 450 nm 下测量每个孔的吸光度, 确定样品的特定浓度。

1.4 流式细胞仪珠阵列

将 50 μl 上清液与 50 μl 捕获珠在室温下孵育 1 h, 然后将混合物与 50 μl 藻红蛋白 (Phycoerythrin, PE) 检测试剂在室温下孵育 2 h。然后将混合物用 1 ml BD CBA 洗涤缓冲液洗涤 1 次, 以 200 g 沉淀 5 min, 重悬于 300 μl 洗涤缓冲液中。最后通过 Beckman Coulter 流式仪获取数据, 使用 FCAP Array Software 3.0 进行分析。

1.5 Western Blot 蛋白免疫印迹

将细胞沉淀重悬于已加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液中, 并在冰上孵育 20 min, 随后在 4℃ 以 13000 rpm 离心 30 min, 并收集上清液。采用 BCA 法测定蛋白浓度, 调节浓度至同一含量。采用 SDS-PAGE 进行凝胶电泳, 再转移到 PVDF 膜上, 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h, 然后 TBST 洗 2 次。过夜孵育一抗 (1:1000), Washing buffer 洗 3 次后, 室温孵育 1 h 二抗 (1:5000), Washing buffer 洗 3 次后, 采用 ECL 显影。

1.6 实时荧光定量 PCR

将细胞用冰冷的 PBS 洗 2 次后, 加入总 RNA 提取试剂, 室温裂解 10 min, 然后加入等体积的氯仿, 剧烈振荡 30 s 后, 室温静置 15 min, 然后以 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液转移到新的离心管中。加入 500 μl 冷的异丙醇溶液, 上下振荡 1 min 后室温静置 10 min。高速 12 000 r/min 离心 10 min, 白色沉淀即为总 RNA。采用 cDNA 合成试剂盒获取反转录产物, 得到的 cDNA 产物采用 SYBR 荧光定量 PCR 试剂盒扩增检测基因的相对表达水平, 引物序列为: IL-4 (正向引物: 5'-CACAACTGAGAAGGAAACCTTCTG-3', 反向引物 5'-CTCTCTCATGATCGTCTTTAGCCTTTC-3'); Actb (正向引物: 5'-GGATGCAGAAGGAGATCACTG-3', 反向引物: 5'-CGATCCACACGGAGTACTTG-3')^[9-10]。

1.7 统计学分析

研究中的数据采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据采用 Graphpad Prim 8 软件进行作图和统计分析。两组间比较采用 Student's t

*基金项目: 广东省教育厅青年创新人才项目 (2019KQNCX114)。

-test, 三组以上数据采用 one-way ANOVA, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 初诊 AML 患者的血清 IL-4 浓度与 IL-33 浓度呈负相关

使用表达 Cbfb-MYH11 融合基因的敲入小鼠的 AML 细胞, 与未处理的 AML 细胞相比, IL-33 处理可提高 IL-4 mRNA 表达水平, 表明 IL-33 / IL1RL1 通路可能通过诱导 IL-4 的表达来调节白血病细胞活性。为了进一步检查 AML 中 IL-33 和 IL-4 之间的关系, 测量了来自新诊断的 AML 患者 IL-33、IL-4 的血清浓度。结果表明, 血清 IL-4 水平与基线水平的 IL-33 水平呈负相关 ($r = -0.640$, $P = 0.046$) (见图 1)。为了进一步评估 IL-4 水平与患者预后之间的关系, 将来收集患者的临床随访研究非常重要。

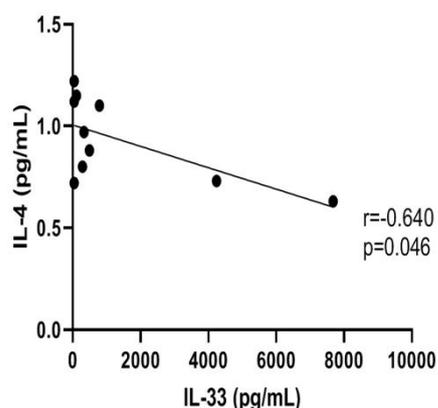


图 1 IL-4 水平与 AML 血清中的 IL-33 水平呈负相关

2.2 IL-33 调控原代 AML 细胞中 IL-4 的产生

IL-33 可以刺激人肥大细胞中 Th1, Th2 细胞因子和趋化因子的产生, 从而促进炎症反应^[11]。为了确定 IL-33 是否调节 AML 患者样本中的 IL-4 表达, 用 IL-33 或与 IL-33 阻断抗体联合处理原代 BM 和 PB MNC 细胞, 并在 72 h 后检查 IL-4 的 mRNA 表达。结果发现, 与未处理的细胞相比, IL-33 的加入显著诱导了 IL-4 mRNA 的表达。IL-33 阻断抗体的加入消除了 BM 和 PB 样品中 IL-33 引起的 IL-4 基因转录的增加 (见图 2A-B)。为了确定 IL-33 是否介导 IL-4 的分泌, 测量了上述处理后上清液中 IL-4 的水平。根据 CBA 结果, 与未处理的细胞相比, IL-33 显著增加了 BM 和 PB 细胞中 IL-4 的分泌, 而 IL-33 阻断抗体的加入则显著降低了由 IL-33 诱导的 IL-4 的水平 (见图 2C)。这些结果表明, AML 细胞分泌的 IL-4 受 IL-33 调节, 揭示了由 IL-33 / IL1RL1 途径调节的抗凋亡机制。

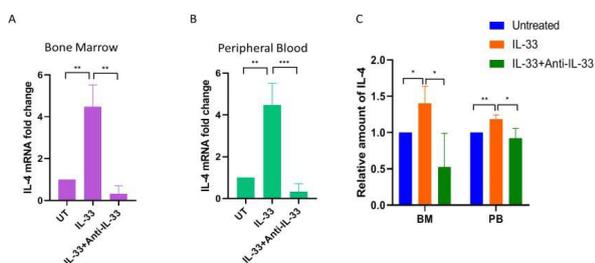


图 2 IL-33 诱导原代 AML BM 和 PB 细胞中 IL-4 mRNA 表达。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2.3 在临床 AML 样本中 IL-33 通过 p38 MAPK 促进 IL-4 表达

既往工作表明, IL-33 通过激活 p38 MAPK 通路及抑制 AML 的凋亡, 同时诱导的 IL-6 表达和分泌。本实验中, 将使用 p38 MAPK 途径的特异性抑制剂 SB203580 (SB) 来检查 p38 MAPK 是否磷酸化调节 AML 临床样本中 IL-4 的产生。将特定浓度的外源 IL-33 单独或联合 SB 加入培养中的 AML 患者的 BM 和 PB 细胞中。72 h 后发现, 与对照组相比, IL-33 的治疗诱导了 p38 MAPK 的磷酸化, 加入 SB 后 p38 MAPK 的磷酸化显著降低 (见图 3A-B)。通过进行 CBA 检测上述处理组上清液中的 IL-4 水平发现, 与未经处理的细胞相比, 经 IL-33 处理的细胞中 IL-4 水平显著升高, 而在 BM 和 PB 细胞中, 与单独使用 IL-33 处理相比, SB 处理显著降低了 IL-4 分泌水平。此外, 通过进行 qRT-PCR 发现, SB 处理可减轻 BM 样品中由 IL-33 处理引起的 IL-4 mRNA 表达增加 (见图 3C)。结果表明, p38 MAPK 信号传导是 AML 临床样本中 IL-33 诱导的 IL-4 水平的重要途径。

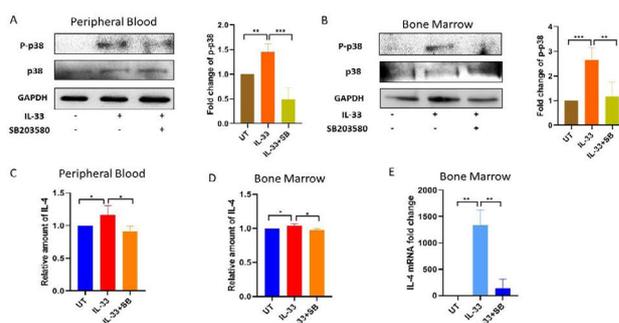


图 3 IL-33 通过激活 p38 MAPK 信号促进 IL-4 的表达。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

3 讨论

AML 约占儿童白血病的 20%, 总生存率约为 65~70%。尽管在过去十年中出现了新的治疗方法, 但 AML 仍与不良预后密切相关。因此, 开发针对 AML 的新替代疗法非常重要。在 AML 中, 在于骨髓中各种类型的细胞因子对帮助 AML 细胞存活和耐药性起着非常重要的作用, 包括 IL-10、IL-1 β 、TNF- α ^[12-14]。作为 IL-1 细胞因子家族的新成员, IL-33 已被证明能通过白介素受体相关激酶 M (IRAK-M) 磷酸化作用以及结合激活脯氨酰顺反异构酶 (PIN1) 促进树突状细胞 (DC) 活化^[15]。相关研究表明, AML 患者的血清中 IL-33 水平相对于正常人显著升高。IL-33 同时促进原代小鼠 AML 细胞中 IL-4 mRNA 的表达。为进一步探讨 IL-33 介导的 AML 生存率的机制, 探究血清中 IL-4 和 IL-33 水平之间的关系以及外源性 IL-33 治疗是否调节 AML 患者 BM 及 PB 样本 IL-4 表达。

研究发现新诊断的 AML 患者血清 IL-33 水平与 IL-4 水平降低有关。由于获取患者样品的数量有限, 只能推测 IL-4 的基线浓度与患者血清 IL-33 呈中等程度的负相关。因此, 分析大量患者样本以证实我们的假设十分必要。通过进行 CBA, 结果显示 IL-33 导致原代 AML 细胞 IL-4 基因表达以及分泌显著增加。重要的是, p38 MAPK 抑制剂可部分消除 IL-33 诱导的 IL-4 水平的升高。这些数据表明 IL-33 通过激活 p38 MAPK 途径诱导 IL-4 表达。IL-4 被证明可以通过激活 STAT6 和磷酸化 NF- κ B 来抑制慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)

高龄孕妇超声筛查胎儿缺陷影响因素分析

孙颀 (淮安市妇幼保健院超声科, 江苏淮安 223000)

摘要: 目的: 探讨高龄孕妇胎儿缺陷发生的一般情况及其危险因素。方法: 选取2018年10月~2019年11月行产前超声筛查发现存在胎儿缺陷的60例高龄孕妇作为研究组, 并选取同期行产前超声筛查的60例正常高龄孕妇作为对照组, 收集两组孕妇暴露资料, 利用 χ^2 检验和Logistics回归分析筛选胎儿缺陷相关危险因素。结果: 胎儿神经系统缺陷、颜面部缺陷、心脏缺陷、泌尿生殖系统缺陷分别位居胎儿缺陷前4位; 单因素分析妊娠年龄、产次、异常生育史、畸形家族史、孕期精神刺激、孕期用药史和TORCH感染是高龄孕妇胎儿缺陷发生的影响因素($P < 0.05$); 经多因素Logistics回归分析发现, 年龄(≥ 40 岁)、多产次、异常生育史、畸形家族史、孕期精神刺激、孕期用药史、TORCH感染是高龄孕妇胎儿缺陷发生的危险因素($P < 0.05$)。结论: 在临床实践中应针对性地对高龄女性妊娠实施科学化管理, 以提高本地区出生人口素质。

关键词: 高龄孕妇; 超声筛查; 胎儿缺陷; 影响因素

对于正在积极备孕的家庭来说, 他们都期待着能有一个健康可爱的宝宝。超声检查在产检中起着十分重要的作用。超声检查是筛查胎儿缺陷的主要措施之一。在《孕前及孕期保健指南》中胎儿行超声筛查的时机和指征规定为: 妊娠早期行普通超声检查和11~13+6周胎儿颈项透明层(NT)检查, 这对正常妊娠的孕妇而言是必查项目, 而对于高危妊娠孕妇, 妊娠早期的超声筛查是必查项目。在人们对生殖安全和健康追求不断提高的今天, 很多医院都已将妊娠早期超声胎儿缺陷筛查作为必查项目, 以降低胎儿缺陷漏诊率及新生儿出生缺陷率, 降低无意义妊娠(晚期诊断为缺陷终止妊娠)对孕妇及家人身心健康的影响。本研究探讨了高龄孕妇超声筛查胎儿缺陷的影响因素。现报道如下:

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年10月~2019年11月于我院行产前超声筛查发现存在胎儿缺陷的60例高龄孕妇作为研究组, 并选取同期行产前超声筛查的60例正常高龄孕妇作为对照组。收集两组孕妇的年龄、文化程度、产次、异常生育史、烟草暴露史、有无感冒、并发症、TORCH感染及抗生素使用等资料。

1.2 超声筛查方法

利用探头按照胎儿颅骨、颅内结构、面颈部、脊柱、心脏、胸廓、腹部、四肢、胎盘、脐部血流、羊水等顺序进行全面系统检查, 存在疑问影像, 报上级医师检查、审核, 保证影

细胞凋亡。

综上所述, 本研究提供了IL-33可能通过调节IL-4表达来调节白血病细胞存活的证据。更重要的是, p38 MAPK可能确实在AML中通过IL-33/IL1RL1轴调节IL-4表达和分泌中起关键作用。

参考文献

- [1]Estey, E. and H. Dohner, Acute myeloid leukaemia[J]. Lancet, 2006, 368(9550): 1894-907.
- [2]Gamis, A.S., et al. Gemtuzumab ozogamicin in children and adolescents with de novo acute myeloid leukemia improves event-free survival by reducing relapse risk: results from the randomized phase III Children's Oncology Group trial AAML0531[J]. J Clin Oncol, 2014, 32(27): 3021-3032.
- [3]Roma-Rodriguez, C., et al. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(4).
- [4]Behrmann, L. J. Wellbrock, and W. Fiedler, Acute Myeloid Leukemia and the Bone Marrow Niche—Take a Closer Look[J]. Front Oncol, 2018(8): 444.
- [5]Schmitz, J. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines[J]. Immunity, 2005, 23(5): 479-490.
- [6]Wang Y. Interleukin-33 Promotes Cell Survival via p38 MAPK-Mediated Interleukin-6 Gene Expression and Release in Pediatric AML[J]. Front Immunol, 2020(11): 595053.
- [7]Wang Y. IL1RL1 is dynamically expressed on Cbfb-MYH11(+) leukemia stem cells and promotes cell survival[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 1729.
- [8]Wang Y. IL-33/IL1RL1 axis regulates cell survival through the p38 MAPK pathway in acute myeloid leukemia[J]. Leuk Res, 2020(96): 106409.
- [9]Poniewierska-Baran, A. Human rhabdomyosarcoma cells express functional pituitary and gonadal sex hormone receptors: Therapeutic implications[J]. Int J Oncol, 2016, 48(5): 1815-1824.
- [10]Al-Daghri, N. M. Increased IL-4 mRNA expression and poly-aromatic hydrocarbon concentrations from children with asthma[J]. BMC Pediatr, 2014(14): 17.
- [11]Parveen, S. IL-33 mediated amplification of allergic response in human mast cells[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2019, 39(4): 359-367.
- [12]Binder, S. M., Luciano, J. Horejs-Hoek, The cytokine network in acute myeloid leukemia (AML): A focus on pro- and anti-inflammatory mediators[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2018(43): 8-15.
- [13]Reikvam, H. The cytokine-mediated crosstalk between primary human acute myeloid cells and mesenchymal stem cells alters the local cytokine network and the global gene expression profile of the mesenchymal cells[J]. Stem Cell Res, 2015, 15(3): 530-541.
- [14]Sanchez-Correa, B. Cytokine profiles in acute myeloid leukemia patients at diagnosis: survival is inversely correlated with IL-6 and directly correlated with IL-10 levels[J]. Cytokine, 2013, 61(3): 885-891.
- [15]Nechama, M. The IL-33-PIN1-IRAK-M axis is critical for type 2 immunity in IL-33-induced allergic airway inflammation[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 1603.