

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.13.010  
文章编号: 1005-8982 (2024) 13-0071-09

临床研究·论著

## 2型固有淋巴细胞及相关因子在多发性骨髓瘤患者中的研究\*

钟笛<sup>1</sup>, 陈双<sup>2</sup>, 骆婷婷<sup>2</sup>, 张瑞<sup>2</sup>

[新疆医科大学第一附属医院 1. 医学检验中心, 2 血液病中心(新疆维吾尔自治区血液病研究所), 新疆 乌鲁木齐 830054]

**摘要: 目的** 研究多发性骨髓瘤(MM)患者外周血中2型固有淋巴细胞(ILC2s)水平及相关因子表达的变化特点。**方法** 选取2021年1月—2022年6月在新疆医科大学第一附属医院60例初次诊断为MM的患者和40例健康人群为研究对象。流式细胞术检测ILC2s细胞比例及杀伤细胞凝集素样受体G1(KLRG1)的表达, 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测相关因子GATA-3、ST2、IL-5、IL-13、IL-7RB mRNA相对表达量。绘制受试者工作特征(ROC)曲线, 分析各指标对疗效的预测价值。**结果** 初诊MM患者的外周血单个核细胞中ILC2s细胞的比例、ILC2s细胞上KLRG1的表达及GATA-3、ST2、IL-5、IL-13 mRNA相对表达量较健康人群均上升( $P < 0.05$ ), 且ILC2s细胞比例与ILC2s细胞上KLRG1表达及GATA-3、ST2、IL-5、IL-13 mRNA呈正相关( $r = 0.831、0.748、0.737、0.702$ 和 $0.699$ , 均 $P < 0.05$ )。经过治疗后, 缓解组患者ILC2s细胞比例、KLRG1表达及GATA-3、ST2、IL-5、IL-13、IL-7RB mRNA相对表达量较未缓解组患者均下降( $P < 0.05$ )。缓解组患者治疗后ILC2s细胞比例、KLRG1阳性表达及GATA、IL-5、IL-13 mRNA相对表达量较治疗前均下降( $P < 0.05$ )。未缓解组患者治疗后ILC2s细胞比例及GATA-3、ST2、IL-5、IL-13 mRNA相对表达量较治疗前均上升( $P < 0.05$ )。ROC曲线分析结果显示, 治疗前ILC2s细胞上KLRG1表达、IL-13 mRNA及两者联合检测对疗效有较好的预测价值。**结论** ILC2s细胞参与MM疾病的免疫紊乱, 具有促肿瘤的作用, ILC2s细胞免疫紊乱可能是通过细胞相关效应分子发生改变引起的。

**关键词:** 多发性骨髓瘤; 二型固有淋巴细胞; 免疫紊乱

**中图分类号:** R733.3

**文献标识码:** A

## Study on type 2 innate lymphocytes and associated moleculars in multiple myeloma patients\*

Zhong Di<sup>1</sup>, Chen Shuang<sup>2</sup>, Luo Ting-ting<sup>2</sup>, Zhang Rui<sup>2</sup>

[1. Medical Laboratory Center, 2. Department of Hematology (Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute of Hematology), The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China]

**Abstract: Objective** To explore the changes in ILC2s and their associated moleculars in the peripheral blood of multiple myeloma (MM) patients. **Methods** This study included sixty MM patients and forty healthy controls. The proportion of ILC2s cells and the expression of KLRG1 on these cells were analyzed using flow cytometry, while the mRNA levels of GATA-3, ST2, IL-5, IL-13, and IL-7RB were quantified through PCR. **Results** In newly diagnosed MM patients, there was an increase in the proportion of ILC2s, KLRG1 expression on

收稿日期: 2024-01-06

\* 基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金青年科学基金(No: 2022D1C754)

[通信作者] 张瑞, E-mail: 645546916@qq.com

ILC2s, and the mRNA levels of GATA-3, ST2, IL-5, and IL-13 in PBMC ( $P < 0.05$ ). Additionally, the proportion of ILC2s cells showed a positive correlation with these associated molecules ( $r = 0.831, 0.748, 0.737, 0.702$ , and  $0.699$ ,  $P < 0.05$ ). Post-treatment, the remission group exhibited lower levels of ILC2s cells, KLRG1 expression on ILC2s, and mRNA levels of GATA-3, ST2, IL-5, and IL-13 compared to the non-remission group ( $P < 0.05$ ). Furthermore, these parameters decreased in the remission group post-treatment compared to pre-treatment ( $P < 0.05$ ). Conversely, in the non-remission group, the proportion of ILC2s cells and associated molecular levels significantly increased post-treatment ( $P < 0.05$ ). ROC curves demonstrated that pre-treatment levels of KLRG1 expression on ILC2s cells and IL-13 mRNA had significant predictive value for treatment efficacy. **Conclusion** ILC2s cells contribute to immune dysregulation in MM, promoting tumor growth. These cellular immune disorders may result from alterations in cell-associated effector molecules.

**Keywords:** multiple myeloma; type 2 innate lymphocytes; immune disorder

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是以骨髓内恶性浆细胞克隆性增殖为特征的疾病,目前是血液系统第二常见的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。免疫调节药物、蛋白酶体抑制剂及抗 CD38 抗体药物均用于治疗 MM 的方案。尽管患者预后有些改善,但 MM 仍然无法治愈,需要进一步研究疾病的发生和耐药性,尤其是肿瘤微环境和促进疾病进展的免疫逃逸机制<sup>[2-3]</sup>。固有淋巴细胞(innate lymphoid cells, ILCs)是新发现的先天性免疫细胞家族,参与机体免疫调节,包括病原体的抵抗、自身免疫性炎症反应及维持机体稳态<sup>[4]</sup>。ILCs 主要来源于天然淋巴祖细胞,其中 2 型固有淋巴细胞(group 2 innate lymphoid cells, ILC2s)是 ILCs 家族的一个子集。ILC2s 细胞接受白细胞介素-25 (Interleukin 25, IL-25)和 IL-33 的刺激,通过与 ILC2s 细胞表面膜受体白细胞介素-17 受体 B (interleukin 17 receptor B, IL-17RB) 和癌性抑制基因 2 (cancer suppressor gene 2, ST2)相结合,刺激 ILCs 产生 IL-13 和 IL-5,启动和介导 II 型免疫应答<sup>[5]</sup>。ILC2s 细胞是 Th2 型细胞因子 IL-13、IL-5 的主要来源,主要表达转录因子 GATA 结合蛋白 3 (GATA-bind-Ingprotein-3, GATA-3), IL-17RB 是 ILC2s 发育和维持稳态所必需的细胞表面受体<sup>[5]</sup>。最近研究表明,大多数 ILC2s 表达杀伤细胞凝集素样受体 G1 (killer cell lectin-like receptor G1, KLRG1), 其是 ILC2s 细胞成熟和活化的标志物, KLRG1<sup>+</sup>ILC2s 已被证实可分泌 IL-10, 而 KLRG1<sup>-</sup>ILC2s 不具备此功能<sup>[6]</sup>。在急性早幼粒细胞白血病中活化后的 ILC2s 通过分泌 IL-13, 激活单核细胞髓源性抑制细胞,抑制 T 细胞和 NK 细胞功能,影响白血病细胞的高效清除;采用全反式维甲酸治疗缓解后, ILC2s、IL-13 和髓源性抑制细胞水平恢复正常<sup>[7]</sup>。

MM 小鼠模型研究发现, ILC2s 可高表达 KLRG1, 且 KLRG1<sup>+</sup>ILC2s 比 KLRG1<sup>-</sup>ILC2s 产生更多的 IL-5、IL-6 及 IL-13<sup>[8]</sup>。MM 体外实验研究发现,经过泊马度胺治疗后可改善 ILC1s 产生  $\gamma$  干扰素的能力<sup>[9]</sup>。以上结果均表明在恶性血液疾病发生早期,已出现 ILCs 细胞功能失常,并且可能导致肿瘤细胞逃避免疫监视。而 ILC2s 及其相关因子在 MM 患者外周循环微环境中的变化特点,以及通过治疗后病情缓解的患者 ILC2s 细胞及相关因子是否得到纠正均尚未有研究。因此,本研究通过检测 ILC2s 和 KLRG1<sup>+</sup>ILC2s 细胞比例、转录因子、膜表面细胞因子受体及相关细胞因子,分析 ILC2s 在 MM 患者中的情况,探讨 ILC2 在 MM 疾病中发挥的免疫作用。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2021 年 1 月—2022 年 6 月在新疆医科大学第一附属医院 60 例初次诊断为 MM 的患者(参与研究前未接受任何化疗)为 MM 组,其中男性 32 例(53.3%),女性 28 例(46.7%);年龄 38~82 岁,中位年龄 61 岁。同时收集 40 例健康人群的外周血标本为对照组,其中男性 21 例(52.5%),女性 19 例(47.5%);年龄 34~78 岁,中位年龄 58 岁。两组患者性别、年龄等临床资料比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。纳入标准:①新诊断未经治疗;②骨髓形态学、细胞遗传学、临床检验及影像学诊断资料完整;③符合 2014 年国际骨髓瘤工作组 MM 诊断标准<sup>[10]</sup>。排除标准:①合并自身免疫性疾病;②合并其他肿瘤疾病;③有严重心、脏、肾等脏器功能异常;④有严重代谢或感染性疾病。本研究经医院医学伦理委员会批准(伦理审批号:K202012-51),患者

均同意参加本研究并签署知情同意书。

## 1.2 治疗方法与分组

60例初诊MM患者接受以硼替佐米为基础的初始诱导化疗1~2个周期,包括VD(硼替佐米、地塞米松)、VCD(硼替佐米、环磷酰胺、地塞米松)、RVD(来那度胺、硼替佐米、地塞米松),诱导治疗后进行疗效评估。所有患者未接受过造血干细胞移植。依据《中国多发性骨髓瘤诊治指南(2020年修订)》<sup>[11]</sup>的疗效评估标准,将严格意义的完全缓解、完全缓解、非常好的部分缓解及部分缓解患者共39例纳入缓解组,疾病稳定和疾病进展患者共21例纳入未缓解组。MM患者临床特征见表1。

表1 MM临床资料的基线特征 (n=60)

临床特征	例数	临床特征	例数
R-ISS分期		IgM λ型	4
I期	11	IgD型	2
II期	27	轻链κ型	3
III期	22	轻链λ型	2
DS分期		不分泌型	2
I期	10	双克隆型	1
II期	26	治疗方案	
III期	24	VD	21
分型		VCD	19
IgG κ型	16	CD	20
IgG λ型	13	治疗效果	
IgA κ型	8	缓解	39
IgA λ型	6	未缓解	21
IgM κ型	3		

## 1.3 主要试剂及仪器

荧光抗体 Lineage-APC (CD2、CD3、CD14、CD16、CD19、CD56、CD235a), CRTH2 (CD294) -PE/Cy7, CD127-Percep/Cy5.5, KLRG1-BV450 及 IgG-BV450 均购自美国 BD 公司。FACS-Canto II 流式细胞仪购自美国 BD 公司, Prime Script™ RT 逆转录试剂盒、SYBR Premix EX Taq™ 试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司,引物由上海生工生物工程股份有限公司设计和合成,PCR 扩增仪、紫外分光光度计均购自美国 Thermo Fisher 公司。

## 1.4 方法

**1.4.1 标本采集** 所有研究对象抽取 3~5 mL 的外周血,置于 EDTA 抗凝管中。用密度梯度离心法

分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。将 PBMC 分成 2 份,一份立即用于流式细胞术检测,另一份加入 1 mL TRIzol, -80 °C 下保存,提取总 RNA,用于实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测。

**1.4.2 流式细胞术检测 PBMC 中 ILC2s 细胞比例及其 KLRG1 表达** 将所有研究对象的 PBMC 浓度调整为  $1 \times 10^6$  个/L,置于 2 根流式管中,一管加入 CD45-FITC、Lineage-APC、CRTH2 (CD294) -PE/Cy7、CD127-Percep/Cy5.5 及 KLRG-BV450 各 5 μL,另一管加入 CD45-FITC、Lineage-APC、CRTH2 (CD294) -PE/Cy7、CD127-Percep/Cy5.5 和 IgG-BV450 各 5 μL。充分混匀后置于室温闭光孵育 15 min, PBS 洗涤 2 次后再次加入 PBS 重悬,用于流式细胞仪检测。SSC 和 CD45<sup>+</sup> 识别淋巴细胞,选取 Lin<sup>-</sup> 和 CD127<sup>+</sup> 的细胞,最后设 CRTH2<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> 门。Lin<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>CD294<sup>+</sup> 细胞为 ILC2s 细胞,分析 ILC2s 占 Lin<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup> 的比例。检测 KLRG1 在 ILC2s 上的表达(即占 ILC2s 的比例)。用 Kaluza 软件分析数据。

**1.4.3 qRT-PCR 检测 GATA-3、ST2、IL-5、IL-13、IL-7RB mRNA 相对表达量** 取 PBMC 悬液 0.5 mL,采用 TRIzol 法提取总 RNA,使用 Prime Script™ RT 逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA,反应体系: 5 × Prime Script™ Buffer 2 μL, Prime Script™ RT Enzyme Mix I 0.5 μL, Random 6 Primer 0.5 μL, Oligo dt 0.5 μL, 总 RNA 500 ng RNase free dH<sub>2</sub>O 加至 10 μL。逆转录反应条件: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。qRT-PCR 采用 SYBR Premix EX Taq™ 试剂盒,反应体系: cDNA 2 μL、2 × SYBR Premix Ex Taq™ 正反向引物各 10 μmol/L, ddH<sub>2</sub>O 10 μL。反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 72 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 72 °C 最终延伸 30 s, 循环 40 次。以 GAPDH 为内参,用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 GATA-3、ST2、IL-5、IL-13, IL-7RB mRNA 相对表达量。引物序列见表 2。

## 1.5 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 9.5 统计学软件。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,比较用 *t* 检验或配对 *t* 检验;相关性分析采用 Pearson 法;绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

表 2 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	长度/ bp
GATA-3	正向: 5'-CACCACCTACCCGCCCTACG-3'	118
	反向: 5'-GTTCACACACTCCCTGCCTTCTG-3'	
ST2	正向: 5'-CCAGAACGACGCCAAGGTGATAC-3'	116
	反向: 5'-AAGATGCTGGAGGGAGTCCTGAAG-3'	
IL-5	正向: 5'-GAGCTGCCTACCTGTATGCCATC-3'	109
	反向: 5'-TGAGTAGAAAGCAGTGCCAAGGTC-3'	
IL-13	正向: 5'-ACCACGGTCATTGCTCTCACTTG-3'	120
	反向: 5'-AGCGGAGCCTTCTGCTTCTGG-3'	
IL-17RB	正向: 5'-CCACAAACAGGCGTCCCTTTCC-3'	104
	反向: 5'-GCAGAGACAGCAGGAGGAGAGG-3'	
GADPH	正向: 5'-GCCAACTGCCAGCCTGTAGTG-3'	128
	反向: 5'-GTGGCACCTTCTGTGCTCCTG-3'	

## 2 结果

### 2.1 两组 ILC2s 和 KLRG1<sup>+</sup>ILC2s 细胞比例及细胞相关因子的比较

对照组与 MM 组外周血中的 ILC2s 在

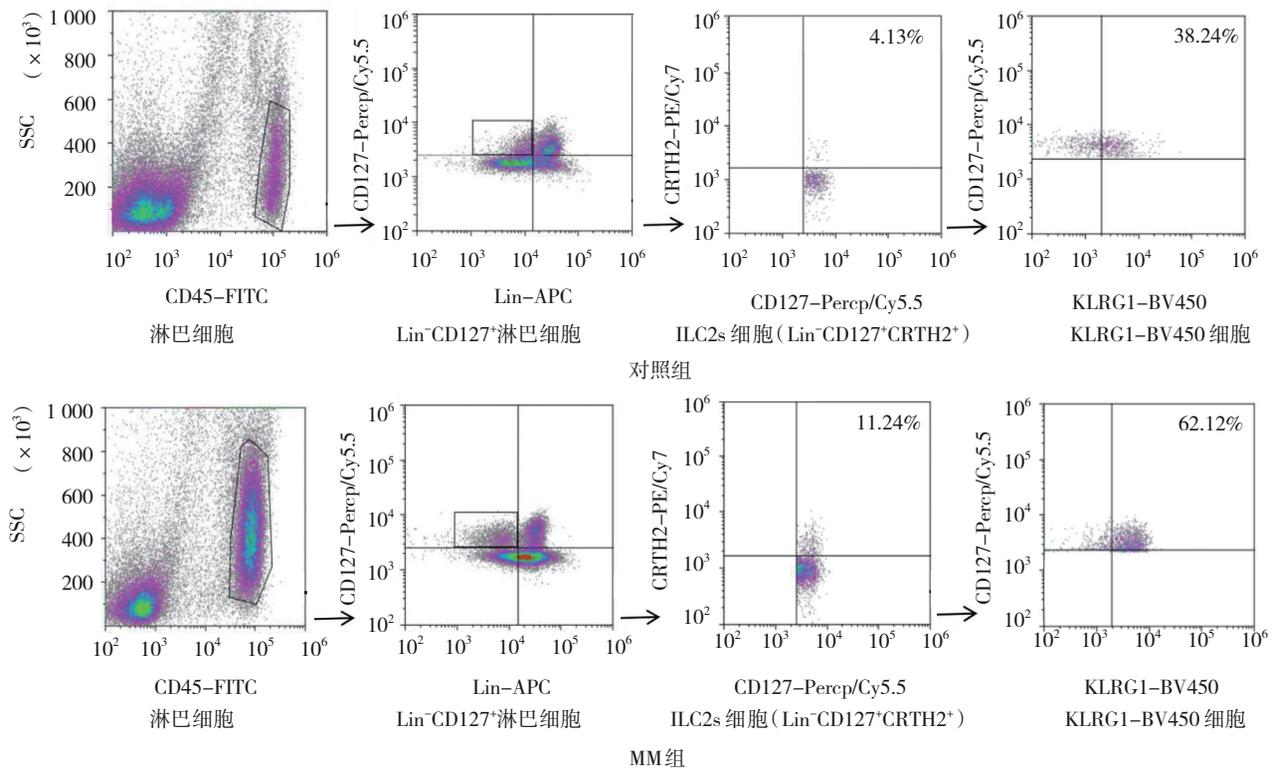


图 1 对照组与 MM 组的流式设门图和流式细胞图

Lin<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>、KLRG1<sup>+</sup>ILC2s 在 ILC2s 细胞中的比例, 以及 GATA-3、ST2、IL-13、IL-5 mRNA 相对表达量比较, 经 *t* 检验, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); MM 组 ILC2s 在 Lin<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>、KLRG1<sup>+</sup>ILC2s 在 ILC2s 细胞中的比例, 以及 GATA-3、ST2、IL-13、IL-5 mRNA 相对表达量均高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 对照组与 MM 组膜受体 IL-17RB mRNA 比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 1 和表 3。

### 2.2 两组治疗前后 ILC2s 和 KLRG1<sup>+</sup>ILC2s 细胞比例及细胞相关因子的比较

治疗后缓解组与未缓解组患者外周血中的 ILC2s 在 Lin<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>、KLRG1<sup>+</sup>ILC2s 在 ILC2s 细胞中的比例, 以及相关因子 GATA-3、ST2、IL-13、IL-5、IL-17RB mRNA 相对表达量比较, 经 *t* 检验, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 未缓解组患者 ILC2s 在 Lin<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>、KLRG1<sup>+</sup>ILC2s 在 ILC2s 细胞中的比例, 以及 GATA-3、ST2、IL-13、IL-5、IL-17RB mRNA 相对表达量均高于缓解组。见表 4 和图 2。

表 3 两组外周血中 ILC2s 及相关因子的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	ILC2s 在 Lin <sup>-</sup> CD127 <sup>+</sup> 中的比例/%	KLRG1 <sup>+</sup> ILC2s 在 ILC2s 中的比例/%	GATA-3 mRNA	ST2 mRNA	IL-13 mRNA	IL-5 mRNA	IL-17RB mRNA
对照组	40	4.49 ± 0.85	40.98 ± 6.39	0.93 ± 0.05	1.84 ± 0.36	1.49 ± 0.39	0.57 ± 0.13	1.52 ± 0.40
MM 组	60	10.36 ± 3.32	60.95 ± 15.66	1.28 ± 0.21	2.00 ± 0.27	1.90 ± 0.34	0.72 ± 0.11	1.63 ± 0.37
t 值		13.950	7.585	3.127	5.393	5.661	4.867	0.226
P 值		0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.001	0.164

表 4 两组外周血中 ILC2s 及相关因子的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	ILC2s 在 Lin <sup>-</sup> CD127 <sup>+</sup> 中的比例/%	KLRG1 <sup>+</sup> ILC2s 在 ILC2s 中的比例/%	GATA-3 mRNA	ST2 mRNA	IL-13 mRNA	IL-5 mRNA	IL-17RB mRNA
缓解组	39	6.46 ± 1.61	40.82 ± 11.68	1.14 ± 0.12	1.93 ± 0.39	1.55 ± 0.39	0.61 ± 0.19	1.71 ± 0.38
未缓解组	21	22.05 ± 4.94	74.69 ± 7.31	3.70 ± 0.65	2.63 ± 0.35	3.00 ± 0.99	1.24 ± 0.19	2.35 ± 0.25
t 值		13.450	11.870	13.970	5.143	6.173	8.778	5.494
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

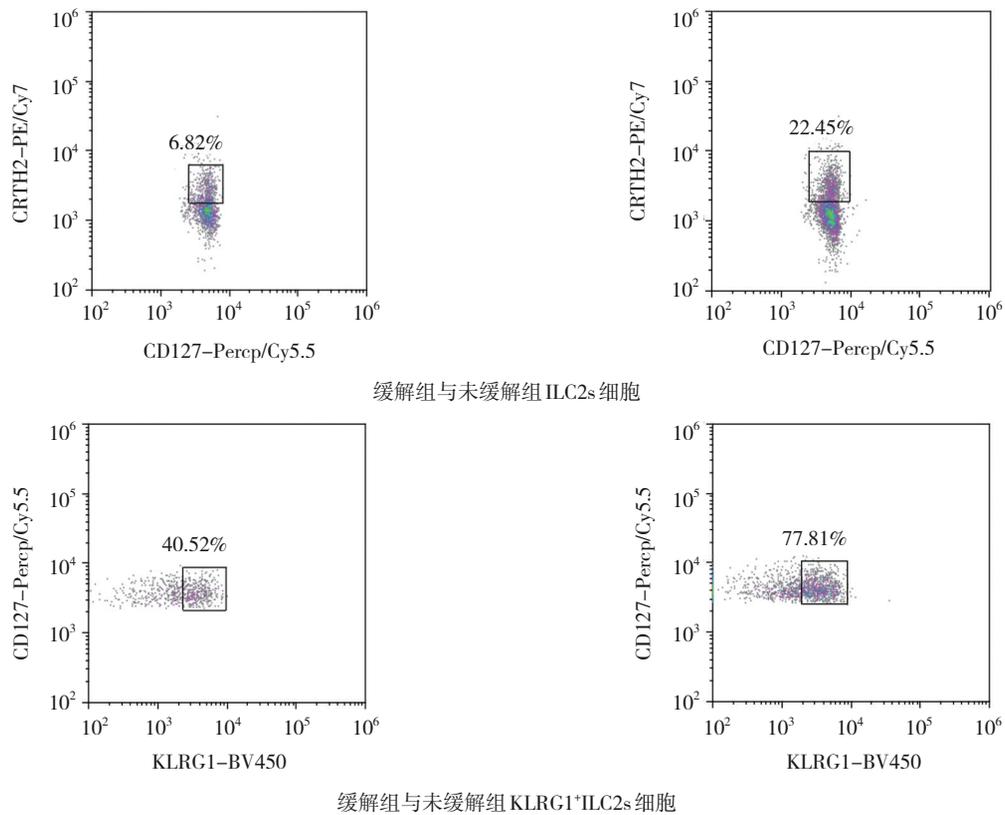


图 2 缓解组与未缓解组 ILC2s 和 KLRG1<sup>+</sup>ILC2s 流式细胞图

### 2.3 缓解组与未缓解组治疗前后 ILC2s 及细胞相关因子的比较

缓解组治疗前后 ST2、IL-17RB mRNA 相对表达量比较, 经 t 检验, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。缓解组治疗前后 ILC2s 在 Lin<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>、

KLRG1<sup>+</sup>ILC2s 在 ILC2s 细胞中的比例, 以及 GATA-3、IL-13、IL-5 mRNA 相对表达量比较, 经 t 检验, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 治疗后较治疗前均降低。见表 5。

治疗前后未缓解组 ILC2s 在 Lin<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>、

表 5 缓解组 MM 患者治疗前后 ILC2s 及细胞相关因子的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	ILC2s 在 Lin <sup>-</sup> CD127 <sup>+</sup> 中的比例/%	KLRG1 <sup>+</sup> ILC2s 在 ILC2s 中的比例/%	GATA-3 mRNA	ST2 mRNA	IL-13 mRNA	IL-5 mRNA	IL-17RB mRNA
治疗前	8.87 ± 2.69	55.29 ± 13.08	1.22 ± 0.19	1.92 ± 0.21	1.78 ± 0.31	0.78 ± 0.11	1.62 ± 0.40
治疗后	6.37 ± 1.54	40.82 ± 11.69	1.15 ± 0.12	1.93 ± 0.39	1.55 ± 0.39	0.51 ± 0.20	1.73 ± 0.38
t 值	4.678	5.143	2.056	0.086	2.879	2.707	0.759
P 值	0.000	0.000	0.043	0.931	0.005	0.008	0.058

KLRG1<sup>+</sup>ILC2s 在 ILC2s 细胞中的比例,以及 GATA-3、ST2、IL-13、IL-5、IL-17RB mRNA 相对表达量比较,经 t 检验,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 治疗后较治疗前均升高。见表 6。

表 6 未缓解组 MM 患者治疗前后 ILC2s 及细胞相关因子的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	ILC2s 在 Lin <sup>-</sup> CD127 <sup>+</sup> 中的比例/%	KLRG1 <sup>+</sup> ILC2s 在 ILC2s 中的比例/%	GATA-3 mRNA	ST2 mRNA	IL-13 mRNA	IL-5 mRNA	IL-17RB mRNA
治疗前	13.02 ± 2.72	70.99 ± 6.31	1.41 ± 0.20	1.86 ± 0.32	2.15 ± 0.26	0.68 ± 0.10	1.50 ± 0.37
治疗后	22.05 ± 4.95	77.55 ± 7.99	3.70 ± 0.65	2.73 ± 0.35	2.99 ± 0.31	1.24 ± 0.19	2.35 ± 0.25
t 值	7.155	2.205	15.390	4.397	3.756	9.463	8.433
P 值	0.000	0.041	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

#### 2.4 治疗前后 ILCs 细胞与细胞相关因子的相关性分析

相关性分析结果显示,治疗前缓解组患者 KLRG1<sup>+</sup>ILC2s 细胞比例、GATA-3 mRNA、ST2 mRNA、IL-13 mRNA、IL-5 mRNA 与 ILC2s 细胞比例均呈正相关 ( $r = 0.831、0.748、0.737、0.702$  和  $0.699$ , 均  $P = 0.000$ )。治疗后缓解组患者 KLRG1<sup>+</sup>ILC2s 细胞比例、GATA-3 mRNA、ST2 mRNA、IL-13 mRNA、IL-5 mRNA、IL-17RB mRNA 与 ILC2s 细胞比例均呈正相关 ( $r = 0.860、0.622、0.648、0.751、0.696$  和  $0.495$ , 均  $P = 0.001$ ); 未缓解组 KLRG1<sup>+</sup>ILC2s 细胞比例、GATA-3 mRNA、ST2

mRNA、IL-13 mRNA、IL-5 mRNA、IL-17RB mRNA 与 ILC2s 细胞比例均呈正相关 ( $r = 0.730、0.823、0.668、0.738、0.612$  和  $0.629$ ,  $P = 0.000、0.000、0.004、0.000、0.003$  和  $0.002$ )。

#### 2.5 MM 患者治疗前外周血中 ILC2s 细胞比例与相关因子水平预测疗效的价值

ROC 曲线分析结果显示,治疗前外周血 ILC2s 在 KLRG1<sup>+</sup>ILC2s 细胞中的比例及 GATA-3、ST2、IL-13、IL-5 mRNA,以及联合指标具有一定的疗效预测价值,其中 KLRG1<sup>+</sup>ILC2s 细胞比例、IL-13 mRNA 水平及两者联合指标具有很好的预测价值(见表 7 和图 3)。IL-17RB mRNA 无预测价值。

表 7 MM 患者治疗前外周血中 ILC2s 细胞比例与相关因子水平预测疗效的效能分析

指标	最佳截断值	曲线下面积	95% CI		敏感性/%	95% CI		特异性/%	95% CI	
			下限	上限		下限	上限		下限	上限
ILC2s	9.687	0.877	0.840	0.925	79.21	0.697	0.830	85.05	0.807	0.907
KLRG1 <sup>+</sup> ILC2s	58.872	0.933	0.917	0.992	87.06	0.812	0.901	86.41	0.803	0.923
GATA-3 mRNA	1.028	0.758	0.732	0.842	63.53	0.609	0.723	58.97	0.476	0.678
ST2 mRNA	1.988	0.736	0.714	0.826	55.61	0.479	0.678	74.36	0.569	0.898
IL-13 mRNA	2.035	0.929	0.897	0.971	86.64	0.790	0.963	82.35	0.768	0.914
IL-5 mRNA	0.771	0.856	0.751	0.958	75.42	0.667	0.812	83.05	0.795	0.924

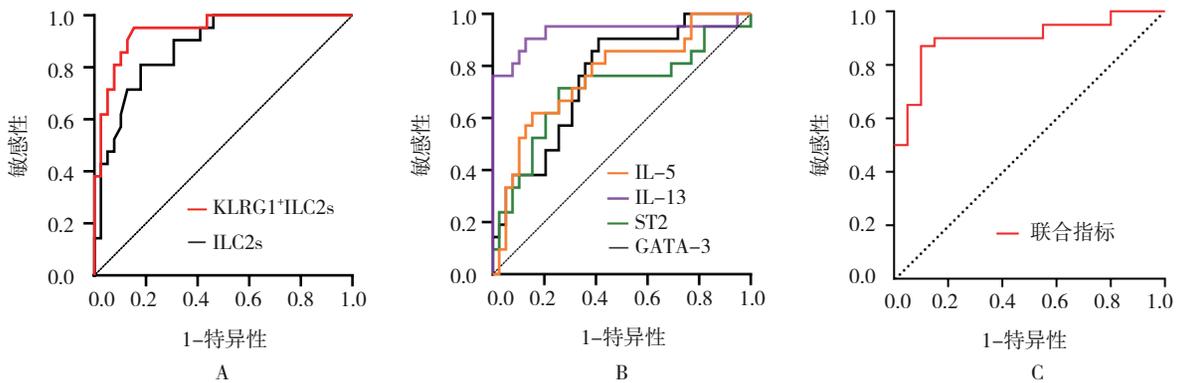


图3 MM患者细胞水平和相关分子预测疗效的ROC曲线; A: ILC2s和KLRG1<sup>+</sup>ILC2s细胞比例预测疗效的ROC曲线; B: GATA-3、ST2、IL-13、IL-5 mRNA预测疗效的ROC曲线; C: KLRG1<sup>+</sup>ILC2s细胞比例、IL-13 mRNA联合预测疗效的ROC曲线。

图3 MM患者细胞水平和相关分子预测疗效的ROC曲线

### 3 讨论

MM发病机制复杂,涉及MM肿瘤细胞与其微环境的相互作用,主要是由于免疫监视功能丧失,以及促进疾病进展和对治疗抵抗的免疫微环境紊乱<sup>[2]</sup>。MM患者的免疫细胞(T细胞、NK细胞)失调可能在疾病进展中起关键作用。ILCs是固有免疫细胞,具有适应性CD4<sup>+</sup>Th细胞亚群的功能特征,为许多免疫介导疾病(包括癌症)的病原体提供了第一道防线,并在很大程度上导致一些肿瘤疾病中的II型炎症反应<sup>[12]</sup>。有研究表明,ILC2s在组织中发挥的免疫效应功能最为显著,并且ILC2s是产生II型细胞因子的重要来源<sup>[13]</sup>。关于ILC2s的转录因子,GATA-3敲除小鼠的实验表明,该因子对ILC2s分化至关重要,也可作为区别于其他ILCs细胞的标志物<sup>[14]</sup>。ILC2s是目前已知的唯一受IL-33刺激的ILCs亚群,在IL-33刺激的作用下,ILC2s细胞扩增,并且在肿瘤的进展中,IL-33可通过与膜受体ST2结合直接驱使ILC2s活化与增殖,目前ST2可作为肿瘤免疫治疗的靶点<sup>[15]</sup>。在肺癌<sup>[16]</sup>、肝细胞癌等<sup>[17]</sup>疾病中,ILC2s的促肿瘤活性主要归因于IL-33驱动下使之产生IL-13和IL-5,从而发挥作用,其中ILC2s是IL-5的主要产生者。有研究表明,IL-5可促进MM肿瘤细胞增殖,并且与疾病进展相关<sup>[18]</sup>。II型炎症细胞因子IL-13具有促肿瘤功能,因为其直接与肿瘤细胞上高亲和力受体结合,促进信号传导介导生物学效应,如肿瘤增殖、细胞存活、细胞黏附和转移<sup>[19]</sup>。预后较差MM患者的IL-13水平较高,IL-13在促进MM肿瘤细胞增殖中

发挥作用,IL-13驱动骨髓间充质干细胞黏附分子的上调,加强MM和骨髓基质细胞之间的细胞-细胞相互作用,也可能参与MM进展的其他机制,如耐药性和免疫逃避<sup>[20]</sup>。

在实体肿瘤研究中,ILC2s通过募集和激活髓源性抑制细胞等免疫抑制细胞促进乳腺癌<sup>[9]</sup>和肺癌<sup>[21]</sup>的发生,ILC2s可能是评估肿瘤预后的重要预测因子,也是继免疫治疗耐药性后的新的治疗靶点。血液系统疾病研究中,急性早幼粒细胞白血病患者的外周血中ILC2s增加,ILC2s在免疫抑制的模型复制中起到核心作用<sup>[7]</sup>;在小鼠皮下淋巴瘤模型中,IL-33的持续诱导ILC2s的扩增,伴随CXCR2配体的产生,促进淋巴瘤细胞凋亡,从而抑制肿瘤进展,ILC2s具有抗肿瘤作用<sup>[22]</sup>。这些研究数据表明,ILC2s细胞既具有促肿瘤免疫作用,也具有抗肿瘤活性。对肿瘤这两种相反的作用取决于ILC2s在不同疾病情况下细胞活性发生变化、表面成熟标志物发生改变、分泌细胞因子水平改变等情况。在意义未明的单克隆免疫球蛋白血症患者中,骨髓中ILC2s细胞数量减少,而外周血循环中的ILC2s增加,并且ILC2s显示出产生IL-13的能力,此现象在冒烟型MM未见发现,研究认为在单克隆免疫球蛋白疾病发生过程中,ILCs细胞是免疫微环境中最早富集的免疫细胞亚群之一<sup>[9]</sup>。人们对ILC2s在MM患者中的研究甚少,并且治疗对ILC2s细胞和相关因子影响特点未见研究。

本研究分析MM患者外周血微环境中ILC2s细胞及相关因子的表达水平,结果发现MM患者ILC2s水平及相关因子KLRG1表达水平、转录因子

GATA-3、膜表面受体 ST2 及 II 型细胞因子 IL-13、IL-5 的表达都上升,并与 ILC2s 呈正相关。说明在 MM 疾病发生时,骨髓浆细胞恶性克隆增殖,ILC2s 表达上升,抗肿瘤作用减弱,机体偏向 Th2 免疫应答,促进肿瘤的免疫逃逸。ILC2s 的免疫表型和功能也发生改变,ILC2s 细胞上成熟标志物 KLRG1 表达增强,促肿瘤细胞因子 IL-13、IL-5 生成增加,与 IL-33 结合的膜受体 ST2 活性增强。还有研究也发现<sup>[8]</sup>,MM 疾病存在的情况下,ILC2s 表达较高水平的 KLRG1,与本研究结果一致。这些数据都说明,MM 疾病的发生与 ILC2s 的活性改变、表型变化及成熟标志物增加有关。

本研究进一步动态监测了 MM 患者治疗前后细胞及相关因子水平,缓解组患者 ILC2s 和相关因子的水平有所扭转,ILC2s 细胞水平及细胞抗肿瘤免疫应答功能有所恢复,药物治疗可能恢复 ILC2s 部分抗肿瘤功能,使 ILC2s 在患者机体内主要表现为抑制肿瘤的优势活化状态,II 型细胞因子分泌减少,影响肿瘤的生长环境,有助于清除肿瘤细胞。另一方面治疗效果较差的未缓解患者 ILC2s 细胞水平与治疗前相比明显增加,此时 ILC2s 使机体逃避免疫监视的能力持续加强,促进肿瘤进展;转录因子 GATA-3、表面受体 ST2 和 IL-17RB、细胞因子 IL-13 和 IL-5 水平上升并且与 ILC2s 细胞水平呈正相关,这些都提示 ILC2s 活性上调,可通过分泌大量的 IL-13 和 IL-5 发挥促肿瘤免疫作用,并且与药物耐药性有关系。因此 ILC2s 与相关因子可作为临床评估 MM 治疗疗效的指标。本研究结果显示,治疗前 ILC2s 及相关因子可以预测 MM 疗效,且 ILC2s 细胞上 KLRG1 表达、IL-13 mRNA 及两者联合检测对疗效有较好的预测价值,可满足临床对肿瘤治疗效果的评估,具有较高的临床运用价值。

综上所述,本研究初步表明了 ILC2s 细胞比例及活性改变与 MM 疾病发病有着密切关系,ILC2s 功能紊乱可能是 MM 发生、发展的重要机制之一,ILC2s 及其相关的细胞因子参与到 MM 的免疫逃逸中,抑制机体的抗肿瘤免疫。早期监测 ILC2s 细胞比例及相关因子的表达可辅助临床预测疗效。

#### 参 考 文 献 :

[1] SOEKOJO C Y, CHNG W J. The evolution of immune

dysfunction in multiple myeloma[J]. *Eur J Haematol*, 2022, 109(5): 415-424.

- [2] DHODAPKAR M V. The immune system in multiple myeloma and precursor states: lessons and implications for immunotherapy and interception[J]. *Am J Hematol*, 2023, 98 Suppl 2(Suppl 2): S4-S12.
- [3] RUSSELL B M, AVIGAN D E. Immune dysregulation in multiple myeloma: the current and future role of cell-based immunotherapy[J]. *Int J Hematol*, 2023, 117(5): 652-659.
- [4] MAGGI E, VENEZIANI I, MORETTA L, et al. Group 2 innate lymphoid cells: a double-edged sword in cancer? [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(11): 3452.
- [5] GURRAM R K, ZHU J F. Orchestration between ILC2s and Th2 cells in shaping type 2 immune responses[J]. *Cell Mol Immunol*, 2019, 16(3): 225-235.
- [6] GOLEBSKI K, LAYHADI J A, SAHINER U, et al. Induction of IL-10-producing type 2 innate lymphoid cells by allergen immunotherapy is associated with clinical response[J]. *Immunity*, 2021, 54(2): 291-307.e7.
- [7] TRABANELLI S, CHEVALIER M F, MARTINEZ-USATORRE A, et al. Tumour-derived PGD2 and Nkp30-B7H6 engagement drives an immunosuppressive ILC2-MDSC axis[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 593.
- [8] GUILLEREY C, STANNARD K, CHEN J, et al. Systemic administration of IL-33 induces a population of circulating KLRG1<sup>hi</sup> type 2 innate lymphoid cells and inhibits type 1 innate immunity against multiple myeloma[J]. *Immunol Cell Biol*, 2021, 99(1): 65-83.
- [9] KINI BAILUR J, MEHTA S, ZHANG L, et al. Changes in bone marrow innate lymphoid cell subsets in monoclonal gammopathy: target for IMiD therapy[J]. *Blood Adv*, 2017, 1(25): 2343-2347.
- [10] RAJKUMAR S V, DIMOPOULOS M A, PALUMBO A, et al. International myeloma working group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(12): e538-e548.
- [11] 中国医师协会血液科医师分会,中华医学会血液学分会,中国医师协会多发性骨髓瘤专业委员会.中国多发性骨髓瘤诊治指南(2020年修订)[J].*中华内科杂志*, 2020, 59(5): 341-346.
- [12] ZHU J F. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production[J]. *Cytokine*, 2015, 75(1): 14-24.
- [13] MOMIUCHI Y, MOTOMURA Y, SUGA E, et al. Group 2 innate lymphoid cells in bone marrow regulate osteoclastogenesis in a reciprocal manner via *RANKL*, GM-CSF and IL-13[J]. *Int Immunol*, 2021, 33(11): 573-585.
- [14] HOYLER T, KLOSE C S N, SOUABNI A, et al. The transcription factor GATA-3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells[J]. *Immunity*, 2012, 37(4): 634-648.
- [15] TOPCZEWSKA P M, ROMPE Z A, JAKOB M O, et al. ILC2 require cell-intrinsic ST2 signals to promote type 2 immune

- responses[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1130933.
- [16] WU Y M, YAN Y L, SU Z L, et al. Enhanced circulating ILC2s and MDSCs may contribute to ensure maintenance of Th2 predominant in patients with lung cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(6): 4374-4381.
- [17] XU X Y, YE L Y, ZHANG Q, et al. Group-2 innate lymphoid cells promote HCC progression through CXCL2-Neutrophil-Induced immunosuppression[J]. *Hepatology*, 2021, 74(5): 2526-2543.
- [18] ROBAK P, WĘGŁOWSKA E, DRÓŹDŹ I, et al. Cytokine and chemokine profile in patients with multiple myeloma treated with bortezomib[J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 1835836.
- [19] ZHAO N, ZHU W W, WANG J, et al. Group 2 innate lymphoid cells promote TNBC lung metastasis via the IL-13-MDSC axis in a murine tumor model[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99: 107924.
- [20] VISRAM A, DASARI S, ANDERSON E, et al. Relapsed multiple myeloma demonstrates distinct patterns of immune microenvironment and malignant cell-mediated immunosuppression[J]. *Blood Cancer J*, 2021, 11(3): 45.
- [21] BAHHAR I, EŞ Z, KÖSE O, et al. The IL-25/ILC2 axis promotes lung cancer with a concomitant accumulation of immune-suppressive cells in tumors in humans and mice[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1244437.
- [22] KIM J, KIM W, MOON U J, et al. Intratumorally establishing type 2 innate lymphoid cells blocks tumor growth[J]. *J Immunol*, 2016, 196(5): 2410-2423.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 钟笛, 陈双, 骆婷婷, 等. 2 型固有淋巴细胞及相关因子在多发骨髓瘤患者中的研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(13): 71-79.

Cite this article as: ZHONG D, CHEN S, LUO T T, et al. Study on type 2 innate lymphocytes and associated moleculars in multiple myeloma patients[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(13): 71-79.