

· 临床研究 ·

儿童急性淋巴细胞性白血病细胞内 IL-6 IFN- γ 水平变化及其临床意义

阴怀清¹, 乔振华², 朱镭², 张丽², 苏丽萍², 鹿育晋²

(1. 山西医科大学第一医院儿科, 山西 太原 030001; 2. 山西医科大学第二医院血液科, 山西 太原 030001)

[摘要] **目的** 了解急性淋巴细胞性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)在不同病期单个核细胞内白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)水平变化规律,并探讨不同病期 ALL 患儿 IL-6 与 IFN- γ 之间相关关系,以期为临床开展细胞因子等细胞生物学方法治疗白血病提供一定依据。**方法** 采用流式细胞仪活细胞直接/间接免疫荧光法测定 42 例 ALL 患者初发期及缓解期静脉血经培养和刺激后单个核细胞内 IL-6 及 IFN- γ 的表达水平。20 例健康儿童作为正常对照。**结果** ①ALL 患儿初发期其静脉血单个核细胞内 IL-6 表达水平为 81.74 ± 9.31 ,较正常对照组的 5.67 ± 0.96 明显升高($P < 0.01$),而静脉血单个核细胞内 IFN- γ 表达水平为 1.31 ± 0.32 ,较正常对照组的 1.46 ± 0.49 有所下降($P < 0.01$);经化疗获得缓解后,ALL 患者静脉血单个核细胞内 IL-6 表达水平为 27.52 ± 3.40 ,较初发期明显降低($P < 0.01$),但仍较正常对照组升高($P < 0.01$),而静脉血单个核细胞内 IFN- γ 表达水平为 1.97 ± 0.72 ,较初发期明显升高($P < 0.01$),且较正常对照组也明显升高, ($P < 0.01$)。②ALL 患儿不同病期静脉血单个核细胞内 IL-6 与 IFN- γ 表达呈明显的负相关($r = -0.476$, $P < 0.05$)。**结论** ALL 患儿静脉血单个核细胞内 IL-6 水平与其病情是否缓解有着密切的关系,ALL 治疗中单个核细胞内 IL-6 水平下降表示 ALL 可能获得缓解。当 ALL 患者经化疗获得缓解时,IFN- γ 的水平增高,但二者相互作用机制及其与 ALL 患者所处病期的因果关系还有待进一步阐明。

[中国当代儿科杂志,2006,8(6):461-463]

[关键词] 急性淋巴细胞性白血病;白细胞介素-6; γ 干扰素;儿童

[中图分类号] R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)06-0461-03

Levels of intracellular IL-6 and IFN- γ in children with acute lymphoblastic leukemia

YIN Huai-Qing, QIAO Zhen-Hua, ZHU Lei, ZHANG Li, SU Li-Ping, LU Yu-Jin. Department of Pediatrics, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China (Email: yhg0351@163.com)

Abstract: Objective To study the changes of intracellular interleukin-6 (IL-6) and interferon- γ (IFN- γ) expressions in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) at different stages, and to examine the correlation between IL-6 and IFN- γ in ALL children. **Methods** The levels of intracellular IL-6 and IFN- γ in venous blood lymphocytes were detected by flow cytometry in 42 children with ALL at diagnosis and at remission stage. Twenty healthy children were used as the controls. **Results** The intracellular IL-6 level in ALL children at diagnosis was 81.74 ± 9.31 , which was much higher than that in the Control group (5.67 ± 0.96) ($P < 0.01$). The intracellular IFN- γ level in ALL children (1.31 ± 0.32) was significantly lower than that in the Control group (1.46 ± 0.49) ($P < 0.01$). However, the intracellular IL-6 level (27.52 ± 3.40) decreased remarkably in ALL patients at remission stage ($P < 0.01$), but was still higher than that in the Control group ($P < 0.01$). In contrast, the intracellular IFN- γ level (1.97 ± 0.72) increased noticeably in ALL patients at remission stage, which was higher than that at diagnosis and the Control group ($P < 0.01$). A negative correlation was found between the intracellular IL-6 and the IFN- γ levels in ALL patients ($r = -0.476$, $P < 0.05$). **Conclusions** Intracellular IL-6 and IFN- γ levels may be used as the markers for monitoring the response to treatment in ALL patients. There is a negative correlation between intracellular IL-6 and IFN- γ levels in ALL children.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8 (6):461-463]

Key words: Acute lymphoblastic leukemia; Interleukin-6; Interferon- γ ; Child

近年来各种细胞因子与白血病的关系成为许多学者研究的热点^[1],且已有一些细胞因子成功地应

用于肿瘤及白血病的临床治疗。为了探讨作为造血调控因子之一的 IL-6 及具有肿瘤细胞增殖抑制作

[收稿日期]2006-06-15;[修回日期]2006-08-18

[基金项目]山西省教育厅基金资助(200216),太原市科委攻关基金资助(0404023)

[作者简介]阴怀清,男,博士,教授。主攻方向:小儿血液病的临床及实验研究。

用的 IFN- γ 在急性淋巴细胞性白血病发生发展中的作用和意义,我们选择了 42 例 ALL 患者,通过流式细胞仪测定其不同病期静脉血单个核细胞内 IL-6 及 IFN- γ 的表达水平,以探索其变化规律,并期望为临床开展细胞因子等细胞生物学方法治疗白血病提供一定依据。

1 资料和方法

1.1 对象

本组 42 例急性淋巴细胞性白血病(ALL)患者为我科 2002 年 3 月至 2005 年 3 月收住入院的住院患者(部分病例来自山西省儿童医院血液科及山西医科大学第二医院血液科),其中男性 27 例,女性 15 例,年龄在 2~14 岁(中位年龄 8.5 岁)。全部病例为初次发病(其中 T-ALL 11 例, B-ALL 31 例),诊断标准参阅文献^[2],全部入选患者在初发期及骨髓缓解后 1 周内均须除外合并感染。

正常对照组:20 例,男 13 例,女 7 例,年龄 6~12 岁(中位年龄 9.3 岁),系来我院进行正常体检的儿童。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞仪检测 ALL 患者静脉血单个核细胞内 IL-6 及 IFN- γ 水平 采集外周血 0.5~1 mL(肝素抗凝)+1 mL 1640 培养液于 24 孔培养板,调整单个核细胞数为 1×10^6 (每孔 1 mL,培养板紫外线消毒 4 h),取 1 mL PBMNC 加入 1 μ L 离子霉素(0.1 mg/mL)、6 μ L PMA 及 0.7 μ L Golgistop 培养 4 h(CO₂ 培养箱),取出后先离心(1 200 r/min, 5 min)后破红(加溶血素 1 mL),弃上清,加 100 μ L 染色缓冲液 + CD45 抗体 15 min RT dark,加 500 μ L Cytofix/Cytoperm 破膜固定 20 min RT dark,再加 500 μ L ~1 mL Perm/wash $\times$ 10 min RT dark,然后加 100 μ L Perm/wash 悬浮,分别加入鼠抗人 IL-6(PE)、IFN- γ (FITC)及 IgG 阴性对照,避光室温下静置 30 min 后加 1 mL Perm/wash 离心,再加 500 μ L 2% 多聚甲醛 PBS,最后上流式细胞仪(Coulter, USA)检测,每份标本分析 10 000 个细胞,用随机 ELITE 软件进行分析。

1.2.2 免疫表型测定 应用美国 Coulter 公司 ELITE ESR 型流式细胞仪,采用 CD45-PC5 和侧向散射光(SSC)设门,直标三标法进行免疫表型检测。所有试剂由 Coulter IMMUNOTECH 公司提供,三标试剂为 CD45-APC + 单标试剂组合之直标试剂。淋系 $\geq 30\%$ 为阳性,细胞内 $\geq 10\%$ 为阳性。

1.2.3 染色体核型分析 染色体标本的制备采用骨髓细胞直接法和/或短期培养法,显带分析采用

改良的 RGH 法^[3],平均每例分析细胞数 10~20 个,核型分析根据《人类细胞遗传学国际命名体制[ISCN]》^[4]的规定加以描述。

1.2.4 统计学分析 全部数据由 SPSS 10.0 软件进行统计学分析处理。

2 结果

2.1 ALL 患者不同病期静脉血单个核细胞内 IL-6 及 IFN- γ 表达水平比较

表 1 显示,ALL 患儿在初发期其静脉血单个核细胞内 IL-6 表达水平较正常对照组明显升高($P < 0.01$),而静脉血淋巴细胞内 IFN- γ 表达水平较正常对照组有所下降($P < 0.01$);但经化疗获得缓解后,ALL 患者静脉血单个核细胞内 IL-6 表达水平较初发期明显降低($P < 0.01$),却仍较正常对照组升高($P < 0.01$),而静脉血单个核细胞内 IFN- γ 表达水平较初发期明显升高($P < 0.01$),且较正常对照组也明显升高($P < 0.01$)。

2.2 ALL 患儿不同病期静脉血单个核细胞内 IL-6 及 IFN- γ 表达水平相关性

ALL 患者在不同病期静脉血单个核细胞内 IL-6 与 IFN- γ 表达呈明显的负相关关系($r = -0.476$, $P < 0.05$),即初发期 ALL 患者静脉血淋巴细胞内 IL-6 表达较正常对照组明显升高,而单个核细胞内 IFN- γ 表达较正常对照降低;在缓解期时,ALL 患者静脉血单个核细胞内 IL-6 表达明显下降,而 IFN- γ 表达则反而升高。

表 1 ALL 患儿不同病期淋巴细胞内 IL-6 及 IFN- γ 表达水平比较(平均荧光强度) ($\bar{x} \pm s$)

	<i>n</i>	IL-6	IFN- γ
对照组	20	5.67 $\pm$ 0.96	1.46 $\pm$ 0.49
初发期	42	81.74 $\pm$ 9.31 ^a	1.31 $\pm$ 0.32 ^a
缓解期	36	27.52 $\pm$ 3.40 ^{a,b}	1.97 $\pm$ 0.72 ^{a,b}
<i>F</i>		1 835.5	57.7
<i>P</i>		<0.01	<0.01

a 与对照组比较 $P < 0.01$; b 与初发期比较 $P < 0.01$

3 讨论

白细胞介素-6(IL-6)是一种具有包括造血调控等多种生物学功能的调控因子,它参与机体多种组织细胞生长、分化和功能调节,包括免疫活性细胞、造血细胞、肝细胞、神经细胞、心肌细胞、成骨和破骨细胞等,也是机体免疫-神经-内分泌调节网络的主要分子。

Lotem 等^[5]认为 IL-6 是细胞凋亡抑制因子,它

可抑制 TGF- β 1、某些细胞毒化合物及野生型 p53 诱导的 AML 白血病细胞的凋亡。Hirano 等^[6]观察到在 IL-6 依赖的细胞株中,IL-6 表现出更明确的抗凋亡效应,即细胞在撤去 IL-6 后大量凋亡,他们推测认为 IL-6 的抗凋亡机制可能为 JAK-STATS 通路激活后诱导 bcl-XL 表达,高水平表达外源性 bcl-2 基因能抑制 IL-6 饥饿的 B9 骨髓瘤细胞凋亡。Kozawa 等^[7]用 ELISA 及 Western blot 方法研究证实 bFGF 能刺激成骨细胞样细胞系 MC3T3-E1 释放 VEGF 和合成 IL-6。他们认为在成骨细胞中白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)通过 JAK2/STAT3 通路作用来提高 bFGF 刺激的 IL-6 的合成。Isomoto 等^[8]最近研究证实 IL-6 通过抑制 STAT3 信号系统的瀑布效应可下调骨髓细胞白血病-1 基因的转录。

本研究结果表明,ALL 患儿静脉血单个核细胞内 IL-6 水平与其病情是否缓解有着密切的关系,ALL 治疗中单个核细胞内 IL-6 水平下降表示 ALL 可能获得缓解。Bruserud 等^[9]曾研究急性白血病患者化疗后白细胞减少期合并细菌感染时血清 IL-6 及 P-选择素水平,他们发现急性白血病患者化疗前血清 IL-6 浓度明显高于健康对照组,且当 ALL 患者接受化疗后外周血白细胞计数降低时,其血清 IL-6 水平并无明显变化;而当患者继发细菌感染时,其血清 IL-6 水平明显升高,患者经抗生素治疗感染控制时,则其血清 IL-6 水平又降至原有水平,显示 IL-6 作为一种造血调控因子对 ALL 患者是否存在感染及感染的控制与否有一定价值。

IFN- γ 已被许多学者所证实是细胞增殖的一种负性调节因子,它具有抑制肿瘤细胞增殖、诱导 NK 细胞杀伤作用及增强 LAK 细胞活性等抗肿瘤作用,且临床上已用于许多肿瘤性疾病的治疗。Hayakawa 等^[10]及 Street 等^[11]的研究认为 IFN- γ 可单独或通过 NK 细胞作用产生 α -半乳糖基神经酰胺(α -galactosylceramide, α -Galcer)来发挥其抗肿瘤转移作用,IFN- γ 也具有独立的控制肿瘤发生、生长及转移的作用。Hayakawa 等^[12]最近应用细胞培养及 ELISA 等方法研究证实 IFN- γ 是通过 α -Galcer 而发挥其抗肿瘤效应,从而进一步介导抑制了肿瘤组织血管的生成。我们首次应用流式细胞术的方法对 42 例急性淋巴细胞性白血病患者初发期及缓解期静脉血单个核细胞内 IL-6 及 IFN- γ 水平进行了检测,结果显示,ALL 患儿初发期静脉血单个核细胞内 IL-6 水平明显较对照组及缓解期升高,而细胞内 IFN- γ 水平则在缓解期较初发期增高。同时我们发现在 ALL 病程中,患者静脉血单个核细胞内 IL-6 水平与 IFN-

γ 水平呈明显的负相关关系。

本研究结果提示 IL-6 及 IFN- γ 可能参与儿童急性白血病的发病,白血病患者血清 IL-6, IFN- γ 水平变化可作为监测其治疗反应的一种手段。但二者相互作用机制及其与 ALL 患者所处病期的因果关系还有待进一步阐明。由于 ALL 患者初发期单个核细胞内 IFN- γ 水平较低,我们建议对 ALL 初诊患者在给予化疗的同时,加用 IFN- γ 辅助治疗,发挥 IFN- γ 抗肿瘤效应,可提高 ALL 患儿的化疗疗效,使其缓解期及无病生存期延长。

[参 考 文 献]

- [1] Panteli KE, Hatzimichael EC, Bouranta PK, Katsaraki A, Seferiadis K, Stebbing J, Bourantas KL. Serum interleukin (IL)-1, IL-2, sIL-2Ra, IL-6 and thrombopoietin levels in patients with chronic myeloproliferative diseases [J]. Br J Haematol, 2005, 130 (5): 709-715.
- [2] 张之南,沈悌.血液病诊断及疗效标准[M].第2版.北京:科学出版社,1998,168-194.
- [3] 薛永权,过宇.介绍一种改良的骨髓细胞染色体热变性姬姆萨 R 显带法[J].中华医学检验杂志,1986,9(4):247-249.
- [4] Mitel man F, ISCN (1995). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature[M]. Basel: Karger, 1995.
- [5] Lotem J, Sachs L. Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes[J]. Leukemia, 1996, 10(6): 925-931.
- [6] Hirano T, Nakajima K, Hibi M. Signaling mechanism through gp130: a model of the cytokine system[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 1997, 8(4): 241-252.
- [7] Kozawa O, Otsuka T, Uematsu T. Leukemia inhibitory factor enhances bFGF-induced IL-6 synthesis in osteoblasts: involvement of JAK2/STAT3 [J]. Cell Signal, 2002, 14(4): 311-315.
- [8] Isomoto H, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Guicciardi ME, Frank DA, et al. Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells [J]. Hepatology, 2005, 42 (6): 1329-1338.
- [9] Bruserud O, Akselen PE, Bergheim J, Nesthus I. Serum concentrations of E-selectin, P-selectin, ICAM-1 and interleukin-6 in acute leukemia patients with chemotherapy-induced leukopenia and bacterial infections[J]. Br J Haematol, 1995, 91(2): 394-402.
- [10] Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Smyth MJ, Kaer LV. Critical contribution of IFN- γ and NK cells, but not perforin-mediated cytotoxicity, to anti-metastatic effect of α -galactosylceramide [J]. Eur J Immunol, 2001, 31(6): 1720-1727.
- [11] Street SEA, Crentney E, Smyth MJ. Perforin and interferon- γ activities independently control tumor initiation, growth and metastasis[J]. Blood, 2001, 97(1): 192-197.
- [12] Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Smyth MJ, Kaer LV, Okumura K, et al. IFN- γ -mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, α -galactosylceramide [J]. Blood, 2002, 100(5): 1728-1733.

(本文编辑:吉耕中)