

PD-1/PD-L1及Treg细胞在JAK2 V617F阳性骨髓增殖性肿瘤中的表达及意义

成志勇¹, 张丽军², 付建珠¹, 刘芳³, 颜晓燕¹, 孙立娜¹, 孙雪珊¹, 王素云⁴

(1.保定市第一医院血液内科,河北保定 071000;2.承德医学院研究生院,河北承德 067000;3.保定市儿童医院病理科,河北保定 071000;4.河北省人民医院血液内科,河北石家庄 050000)

摘要:【目的】探讨程序性死亡受体-1(PD-1)、程序性死亡配体-1(PD-L1)及CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞(Treg)、CD4⁺/CD8⁺比值在JAK2 V617F突变阳性骨髓增殖性肿瘤(MPN)患者骨髓中的表达及临床意义。【方法】收集45例JAK2 V617F阳性的MPN患者,其中原发性血小板增多症(ET)17例、真性红细胞增多症(PV)13例、原发性骨髓纤维化(PMF)15例;包括初治组30例、治疗组15例。15例健康志愿者作为对照组。荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测突变型与野生型JAK2比值。免疫组化检测患者及对照骨髓病理切片p-JAK2、PD-1、PD-L1表达情况,流式细胞术检测Treg和淋巴细胞亚群在MPN患者及对照组外周血中的变化。【结果】初治组p-JAK2、PD-1、PD-L1及Treg表达水平明显高于治疗组及对照组(P 均 <0.05),而CD4⁺/CD8⁺比值明显低于治疗组及对照组(P 均 <0.05)。JAK2 V617F突变量与PD-1及PD-L1正相关,与CD4⁺/CD8⁺负相关($r=0.593, P<0.01$; $r=0.723, P<0.01$; $r=-0.771, P<0.01$)。【结论】p-JAK2、PD-1、PD-L1及Treg、CD4⁺/CD8⁺与JAK2 V617F共同参与了骨髓增殖性肿瘤发病。

关键词:骨髓增殖性肿瘤;JAK2 V617F;PD-1;PD-L1;调节性T细胞;CD4⁺/CD8⁺

中图分类号:R733 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2019)01-0098-06

Clinical Significance and Expression of PD-1/PD-L1 and Treg Cells in JAK2 V617F Positive Myeloproliferative Neoplasms

CHENG Zhi-yong¹, ZHANG Li-jun², FU Jian-zhu¹, LIU Fang³, YAN Xiao-yan¹, SUN Li-na¹,
SUN Xue-shan¹, WANG Su-yun⁴

Corresponding to: WANG Su-yun; E-mail: suyunwen@163.com

(1.Department of Hematology, The No.1 Hospital of Baoding, Baoding 071000, China; 2.Graduate School, Chengde Medical University, Chengde 067000, China; 3.Department of Pathology, Baoding Children's Hospital, Baoding 071000, China; 4. Department of Hematology, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050000, China)

Corresponding to: WANG Su-yun; E-mail: suyunwen@163.com

Abstract: 【Objective】To investigate the expression and clinical significance of programmed death-1 (PD-1), programmed death-ligand 1 (PD-L1) and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg) and CD4⁺/CD8⁺ ratios in JAK2 V617F mutation positive myeloproliferative neoplasms patients (MPN). 【Methods】45 cases of JAK2 V617F positive MPN patients were selected including 17 cases of essential thrombocythemia (ET), 13 cases of polycythemia vera (PV) and 15 cases of primary myelofibrosis (PMF). 30 cases of the newly diagnosed group and 15 cases of treatment group were from them. 15 cases of healthy volunteers were selected as control group. The ratio of mutant and wild type of JAK2 was

收稿日期:2018-04-24

基金项目:河北省科技计划项目(162777120D)

作者简介:成志勇,博士,E-mail:dzczy@sohu.com;王素云,通信作者,教授,研究方向:恶性血液病靶向治疗,E-mail:suyunwen@163.com

detected by fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR). The expression levels of p-JAK2, PD-1 and PD-L1 in pathological tissues of bone marrow were detected by immunohistochemistry. The changes of treg cells and lymphocyte subsets in peripheral blood of MPN patients and controls were detected by flow cytometry. 【Results】 The expression levels of p-JAK2, PD-1, PD-L1, and Treg in the newly diagnosed group were significantly higher than that of treatment group and control group ($P<0.05$), while the expression levels of $CD4^+/CD8^+$ ratio were significantly lower than treatment group and control group ($P<0.05$). JAK2 V617F mutation burden was positive correlation with PD-1 and PD-L1, and was negative correlation with $CD4^+/CD8^+$, the correlation coefficients were $r=0.593$, $P<0.01$; $r=0.723$, $P<0.01$; $r=-0.771$, $P<0.01$, respectively. 【Conclusion】 p-JAK2, PD-1, PD-L1, Treg, $CD4^+/CD8^+$ and JAK2 V617F were involved in the pathogenesis of myeloliferative neoplasms.

Key words: myeloproliferative neoplasms; JAK2 V617F; programmed death-1; programmed death-ligand 1; Treg; $CD4^+/CD8^+$

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(1):98-103]

程序性死亡受体-1 (programmed death-1, PD-1) 主要表达于活化的T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞表面,与细胞凋亡密切相关^[1]。程序性死亡配体-1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 是PD-1的配体,主要表达于抗原递呈细胞(APC)及肿瘤细胞^[2]。免疫应答过程中,肿瘤细胞及APC将肿瘤抗原递呈至T细胞后,可刺激其淋巴细胞表达PD-1,募集细胞内SHP-2磷酸酶,通过阻断抗凋亡因子Bcl-xL的表达,抑制T、B细胞增殖,传递免疫抑制信号,形成免疫抑制的微环境^[3]。同时肿瘤细胞表面的PD-L1表达水平也在PD-1与促炎症因子的诱导下上调,增强肿瘤细胞抗杀伤的能力,起到免疫负调控作用^[4]。在肿瘤患者的T淋巴细胞中,调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)所占比例明显升高,并抑制具有抗肿瘤活性效应的T淋巴细胞^[5]。PD-1/PD-L1信号通路在Treg细胞的生成过程中起诱导促进作用^[6]。研究表明,在多种恶性肿瘤中过度表达PD-L1和或PD-1,导致Treg活性增强,并与不良预后相关^[3-4]。在不同类型白血病、多发性骨髓瘤、淋巴瘤等恶性血液病患者中亦存在PD-1及PD-L1表达^[7-8],PD-1抑制剂nivolumab在经典型霍奇金淋巴瘤的治疗上已经取得成功^[2,7]。在髓系恶性肿瘤中,抗PD-1单克隆抗体协同去甲基化药物用于治疗急性髓系白血病和骨髓增生异常综合征^[9],具有良好疗效,而在骨髓增殖性肿瘤中目前尚未有相关报道。骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasms, MPN)是一系或多系

分化相对成熟的骨髓细胞克隆性增殖所致的一组肿瘤性疾病。在大部分真性红细胞增多症(polycythemia vera, PV)及半数原发性血小板增多症(essential thrombocythemia, ET)、原发性骨髓纤维化(primary myelofibrosis, PMF)患者存在JAK2 V617F突变。该突变导致酪氨酸激酶过度活化并持续激活JAK/STAT信号通路^[10]。本研究探讨了PD-1/PD-L1及 $CD4^+/CD8^+$ 比值、Treg在JAK2 V617F突变阳性MPN患者骨髓中的表达及其相互关系,为MPN靶向治疗及评价疗效提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料

选取2016年1月至2018年3月于保定市第一医院、河北省人民医院收治的45例JAK2 V617F突变阳性的MPN患者,其中男22例,女23例,年龄30~82岁,中位年龄55岁。其中ET 17例(男7例,女10例)、PV 13例(男7例,女6例)、PMF 15例(男8例,女7例);包括初治组30例(男14例,女16例)、治疗组15例(男8例,女7例)。对照组(健康志愿者)15例(男8例,女7例,中位年龄55岁)。其诊断均符合2016 WHO血液病诊断标准。所有患者均知情同意,研究方案均通过保定市第一医院伦理委员会批准(批准文号2012 0701)。

治疗组所用治疗方案:应用干扰素- $\alpha 2b$ (Interferon- $\alpha 2b$, IFN- $\alpha 2b$)皮下或肌肉注射,300

U/次, 3~7次/周, 至少应用6个月以上, 必要时应用羟基脲调整白细胞、血红蛋白及血小板数量。

1.2 主要试剂

p-JAK2、PD-1、PD-L1 抗体购自美国 Proteintech 生物技术有限公司; FITC 标记的 CD3、CD4、CD8 单抗, PE 标记的 CD25 单抗及 APC 标记的 Foxp3 单抗购自美国 BD 公司。血液基因组 DNA 提取试剂盒购自北京博迈德生化科技有限公司; 引物序列根据 NCBI 公布的相应基因序列设计并由北京赛百盛公司合成; TaqMan 购自 ABI 公司。

1.3 实时荧光定量 PCR

①采集新鲜骨髓液 4 mL, 肝素抗凝。②DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。③实时荧光定量 PCR 反应: 反应体系共 25 μ L。反应条件为 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min 一个循环, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环, 同时设标准品和空白对照。PCR 反应前 3~15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号, 调节基线至适宜处作为阈值, 各荧光信号到达所设定的阈值的循环数即为 Ct 值。根据标准品计算 JAK2 和 JAK2 V617F 的绝对拷贝数量。计算 JAK2 V617F/JAK2 比值。PCR 引物序列及探针如下: JAK2 上游引物: 5'-CAG CAA GTA TGA TGA GCA AGC TTT-3', 下游引物: 5'-TGA ACC AGA ATA TTC TCG TCT CCA C-3', MGB-Probe 5'-FAM-TCA CAA GCA TTT GGT TTT-MGB-3', JAK2 V617F 下游引物: 5'-CCA GAA TAT TCT CGT CTC CAC TGA A-3'。

1.4 免疫组织化学染色

组织蜡块 4 μ m 切片, 45 $^{\circ}$ C 烤片 3 h, 脱蜡, 蒸馏水冲洗 2 遍, 抗原修复后加 3% 过氧化氢, 阻断内源性过氧化氢酶的活性, PBS 冲洗 3 次, 加入一抗 (p-JAK2、VEGF、CD105, 工作浓度分别为 1:200、1:200、1:50、) 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 滴加 Elivision plus 试剂盒中试剂 A (增强剂)、试剂 B (酶标羊抗鼠/兔 IgG 聚合物), PBS 冲洗后, 加 DAB 显色, 以胞膜或胞浆或胞核中出现棕黄色颗粒为阳性判断标准, 苏木素复染, 0.1% 盐酸分化, 自来水冲洗, 切片经梯度酒精脱水干燥, 中性树胶封片。

免疫组化判定标准: 以细胞胞浆内出现棕色染色颗粒为阳性。选取 3 个高倍镜视野区域 ($\times 400$) 计数阳性细胞数占全部细胞的比例。

1.5 流式细胞术淋巴细胞亚群及 Treg 细胞检测

外周血单个核细胞中加入荧光素标记的单克隆抗体 CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3 和小鼠 IgG1-FITC 及小鼠 IgG2-PE 做为对照 (美国 BD 公司) 直接标记全血细胞, 溶血素溶解红细胞, PBS 洗涤 2 次, 流式细胞仪 (美国 BD 公司) 检测淋巴细胞, CellQuest 软件获取分析细胞进行分析, 计算 CD4⁺/CD8⁺ 比值及 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞。

1.6 统计学分析

所有数据用 SPSS 19.00 统计软件分析处理。免疫组化及淋巴细胞亚群数据各组之间比较, 其中 p-JAK2、CD 8% 方差齐, 故差异选用方差分析, 各组间两两比较选用 *q* 检验; 其余各检测指标经检验方差不齐, 故差异选用非参数检验 (Kruskal-Wallis 检验)。Pearson 线性相关分析 JAK2 V617F 突变量与 PD-1、PD-L1、CD4⁺/CD8⁺、Treg 细胞之间的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 JAK2 V617F 突变在患者中的表达情况

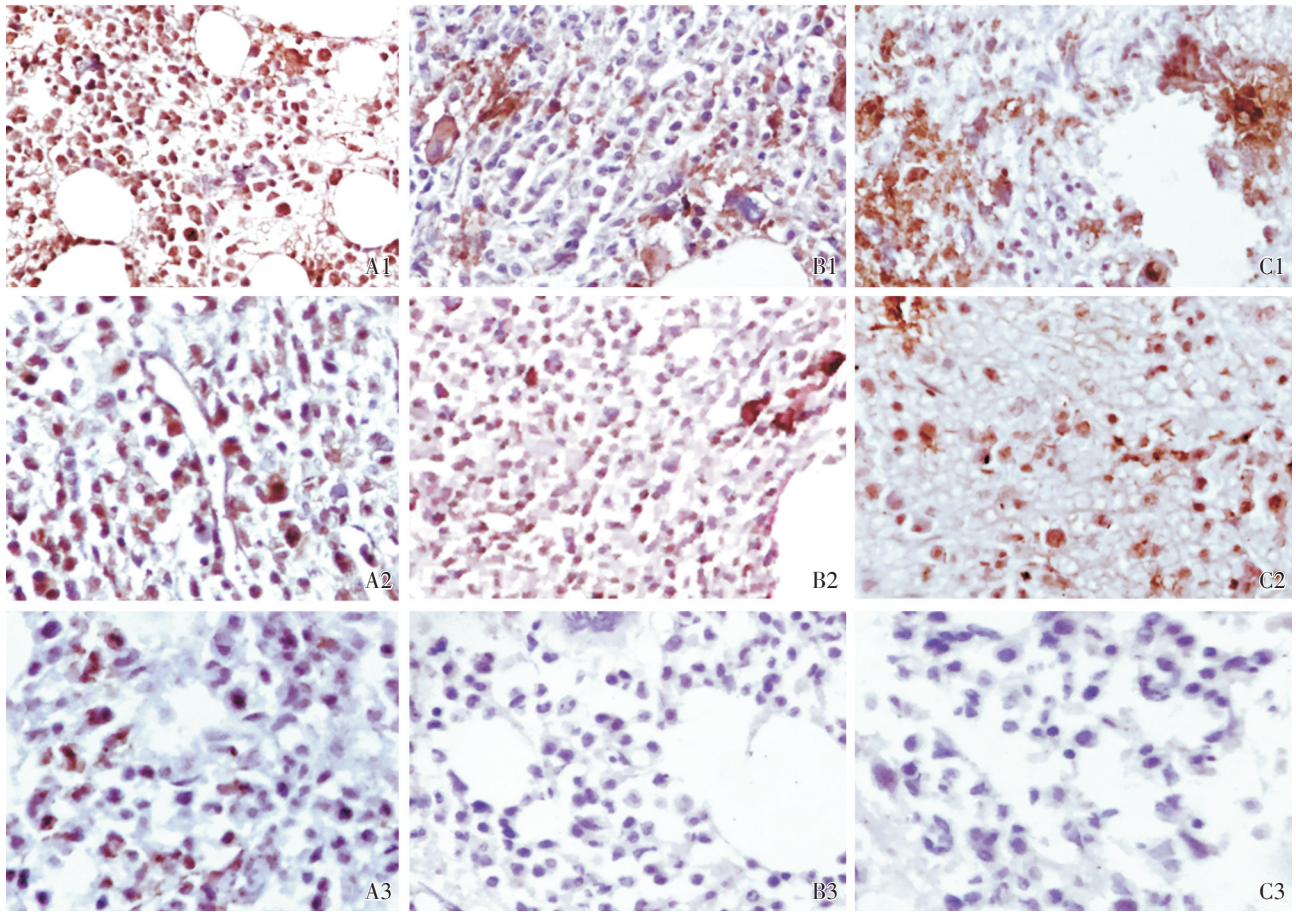
所有患者在初次治疗时均经定量 PCR 检测为 JAK2 V617F 突变阳性, 患者突变量在 30%~96% 之间。其中初治组 30 例, 突变量 (52 \pm 18)%, 干扰素治疗组 15 例, 突变量 (39 \pm 17)%, 前者明显高于后者, $P < 0.05$ 。对照组均未检测到 JAK2 V617F 突变。

2.2 免疫组织化学染色检测 p-JAK2、PD-1/PD-L1 在 MPN 患者中的表达水平

p-JAK2、PD-1、PD-L1 蛋白均表达于细胞膜及细胞质, 三者骨髓细胞中阳性率在初治组 (分别为 80 \pm 23、50 \pm 24、55 \pm 21) 中表达最高, 其次为治疗组 (分别为 58 \pm 18、26 \pm 16、31 \pm 16), 对照组 (分别为 41 \pm 13、6 \pm 3、5 \pm 4) 表达最低, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01 ; 图 1, 表 1)。

2.3 淋巴细胞亚群及 Treg 细胞在各组中的表达水平

初治组、治疗组和对照组淋巴细胞亚群结果显示: CD4⁺T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 初治组低于治疗组和对照组 (P 均 < 0.05), 治疗组低于对照组 ($P < 0.05$)。CD8⁺T 细胞初治组高于治疗组和对照组 (P 均 < 0.05), 治疗组高于对照组 ($P < 0.05$; 表 2)。



A: p-JAK2, B: PD-1, C: PD-L1; 1: newly diagnosed group; 2: treatment group; 3: control group. ×400.

图1 免疫组织化学染色检测 p-JAK2、PD-1、PD-L1 表达水平

Fig.1 Immunohistochemical staining analysis of the expression levels of p-JAK2, PD-1 and PD-L1 protein

表1 初治组、治疗组及对照组 JAK2 V617F 与 PD-1 及 PD-L1 表达结果

Table 1 The expression levels of JAK2 V617F and PD-1, PD-L1 in newly diagnosed group, treatment group and control group ($\bar{X} \pm S, \%$)

Groups	n	JAK2 V617F/JAK2	p-JAK2	PD-1	PD-L1
Newly diagnosed group	30	52 ± 18 ¹⁾²⁾	80 ± 23 ¹⁾²⁾	50 ± 24 ¹⁾²⁾	55 ± 21 ¹⁾²⁾
Treatment group	15	39 ± 17 ²⁾	58 ± 18 ²⁾	26 ± 16 ²⁾	31 ± 16 ²⁾
Control group	15	0	41 ± 13	6 ± 3	5 ± 4
		$\chi^2=35.91$	$F=20.45$	$\chi^2=36.33$	$\chi^2=39.81$
P		0.000	0.000	0.000	0.000

1) compared with the treatment group $P < 0.05$; 2) compared with the control group $P < 0.05$.

初治组、治疗组和对照组 Treg 细胞结果显示: 3 组之间均有统计学差异 ($P < 0.05$), 其中初治组 (14 ± 7)% 高于治疗组 (7 ± 4)% 和对照组 (1.78 ± 0.96)%, 治疗组高于对照组 (表 2)。

2.4 JAK2 V617F 突变量与 PD-1、PD-L1、CD4⁺CD8⁺、Treg 细胞相关分析

Pearson 线性相关分析显示初治 MPN 患者的 JAK2 V617F 突变量与 PD-1、PD-L1 正相关, 与

表2 各组外周血淋巴细胞亚群及 Treg 细胞检测结果

Table.2 Peripheral lymphocyte subsets and Treg cell test results

($\bar{X} \pm S, \%$)

Groups	n	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Treg
Newly diagnosed group	30	31 ± 10 ¹⁾²⁾	37 ± 12 ¹⁾²⁾	0.84 ± 0.18 ¹⁾²⁾	13.6 ± 7.3 ¹⁾²⁾
Treatment group	15	35 ± 11 ²⁾	31 ± 8 ²⁾	1.19 ± 0.39 ²⁾	6.7 ± 3.7 ²⁾
Control group	15	41 ± 15	28 ± 10	1.49 ± 0.42	1.8 ± 1.0
		$\chi^2=6.259$	$F=3.938$	$\chi^2=27.00$	$\chi^2=35.66$
P		0.044	0.025	0.000	0.000

1) compared with the treatment group $P < 0.05$; 2) compared with the control group $P < 0.05$.

CD4⁺/CD8⁺ 负相关 ($r=0.593, P < 0.01$; $r=0.723, P < 0.01$; $r=-0.771, P < 0.01$), 与 Treg 细胞比例无相关性 ($P > 0.05$)。PD-1 与 PD-L1 正相关 ($r=0.561, P < 0.01$), PD-L1 与 CD4⁺/CD8⁺ 比值负相关 ($r=-0.585, P < 0.01$), 而 PD-1、PD-L1 与 Treg 细胞比例均无明显相关性 ($P > 0.05$)。

3 讨论

JAK2 V617F 点突变为 Ph 染色体阴性 MPN 患者常见的基因突变, 该突变在缺少细胞因子情况下导致 JAK2 磷酸化, 从而诱发肿瘤^[10]。本研究所选 45 例患者 (包括初治组 30 例, 治疗组 15 例) 均为 JAK2 V617F 突变阳性。

PD-1 及 PD-L1 可表达于多种肿瘤表面的共抑制分子, 其与肿瘤的发生、发展密切相关。研究表明, 其在介导多种实体肿瘤细胞免疫逃逸中发挥重要作用。在多种白血病、骨髓瘤及淋巴瘤等恶性血液病中存在 PD-1 及 PD-L1 高表达^[7-9]。本研究显示, 在 MPN 患者骨髓系细胞中, 亦存在 PD-1 及 PD-L1 高表达, 同时与 JAK2 V617F 突变量正相关。

在人体免疫应答中, 肿瘤细胞及 APC 将肿瘤抗原递呈至 T 细胞后, 可刺激其淋巴细胞表面的 PD-1 的表达, 进而抑制 T、B 细胞增殖, 并传递免疫抑制信号, 形成免疫抑制的微环境^[1-3]。本研究显示, 除 PD-L1 表达于骨髓增殖性肿瘤细胞表面外, 在肿瘤细胞中同时存在 PD-1 高表达, 同时 PD-L1 与 PD-1 两者正相关。分析原因, 可能存在 PD-1 伴随 PD-L1 表达, 或可能与 PD-L1 相互结合, 亦传递抑制信号, 进而抑制骨髓内淋巴细胞活化, 形成免疫抑制微环境, 促进 MPN 细胞生长。

PD-1/PD-L1 通路协助肿瘤免疫逃逸的具体机制可能包括①诱导 T 细胞耐受; ②抑制 T 细胞增殖及活化; ③减少细胞因子的分泌; ④增强 Treg 细胞的功能; ⑤阻断抗原呈递过程^[11]。研究表明在多种肿瘤患者的 T 淋巴细胞中, Treg 细胞所占比例明显升高, 且具有抗肿瘤活性效应的 T 淋巴细胞受其抑制^[5]。此外, PD-1/PD-L1 信号通路在 Treg 细胞的生成过程中起诱导促进作用, 同时参与了 Treg 细胞的抑制功能^[12]。JAK-STAT 传导路径广泛参与 CD4⁺T 细胞的分化, 有研究表明在 TGF- β 和 IL-2 作用下通过 JAK-STAT 调控 Treg 细胞分化。同时 JAK-STAT 信号通路活化能够上调 PD-L1 的表达。转录因子 STAT 可直接结合到 PD-L1 的启动子区, 从而促进 PD-L1 的转录^[5]。本研究表明, 在初治 MPN 中存在 PD-1 及 PD-L1 高表达, 同时存在 CD4⁺/CD8⁺ 比例倒置及 Treg 细胞表达明显高于治疗组及对照组, PD-1 及 PD-L1 与 CD4⁺/CD8⁺ 比值均存在负相关, 虽然未检测到 JAK2 V617F 及 PD-1、PD-L1 与 Treg 细胞的相关性, 可能与标本量少有关。

干扰素在不同肿瘤中的其作用机制及与 PD-1/PD-L1 之间的相互关系尚不明确。在部分胃腺癌细胞中, 干扰素 γ 能够诱导 PD-L1 表达, 进而促进 T 细胞凋亡, 而阻断 PD-L1 可以逆转了上述效应^[13]。而在肺癌恶性胸腔积液中, 高表达 PD-L1 转基因细胞可显著抑制干扰素 γ 的分泌, 并诱导 CD8⁺T 细胞凋亡^[14]。在 MPN 患者中, 应用 IFN- α 2b 后, 约 80% 的患者可获得血液学反应, 能够减少 JAK2 V617F 突变量, 甚至部分患者能够达到分子生物学缓解^[15]。本研究结果显示, 在 JAK2 V617F 阳性 MPN 患者中, 应用 IFN- α 2b 后 JAK2 V617F 突变量明显减少, 同时 PD-1/PD-L1 及 Treg

细胞比例同样表达下调。

通过本研究,我们初步探讨了JAK2 V617F阳性MPN中PD-1/PD-L1及CD4⁺/CD8⁺比值、Treg细

胞比例与JAK2 V617F突变量的相互关系,为靶向MPN提供了理论依据。

参考文献

- [1] Meyer MA, DeNardo DG. Better together: B7S1 checkpoint blockade synergizes with anti-PD1 [J]. *Immunity*, 2018, 48(4): 621-623.
- [2] Hude I, Sasse S, Engert A, et al. The emerging role of immune checkpoint inhibition in malignant lymphoma [J]. *Haematologica*, 2017, 102(1): 30-42.
- [3] Kamata T, Suzuki A, Mise N, et al. Blockade of programmed death-1/programmed death ligand pathway enhances the antitumor immunity of human invariant natural killer T cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2016, 65(12): 1477-1489.
- [4] 黄韬,龙兆麟,吴世皓,等. PD-1/PD-L1在膀胱癌患者外周血T细胞和肿瘤细胞表达[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2017, 38(4): 628-631.
Huang T, Long ZL, Wu SH, et al. PD-1/PD-L1 expressed on T cell and bladder cancer cell [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2017, 38(4): 628-631.
- [5] Downs-Canner S, Berkey S, Delgoffe GM, et al. Suppressible IL-17A⁺ Foxp3⁺ and ex-Th17 IL-17A⁻ Foxp3⁺ Treg cells are a source of tumour-associated Treg cells [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14649.
- [6] Yi T, Li X, Yao S, et al. Host APCs augment in vivo expansion of donor natural regulatory T cells via B7H1/B7.1 in allogeneic recipients [J]. *J Immunol*, 2011, 186(5): 2739-2749.
- [7] Piantoni MJ, Liu Y, Bagchi S, et al. Immune checkpoint blockade for hematologic malignancies: a review [J]. *Stem Cell Investig*, 2017, 4: 32-52.
- [8] Hao C, Tian J, Liu H, et al. Efficacy and safety of anti-PD-1 and anti-PD-L1 combined with anti-CTLA-4 immunotherapy to advanced melanoma: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(26): e7325.
- [9] Yang H, Bueso-Ramos C, DiNardo C, et al. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents [J]. *Leukemia*, 2014, 28(6): 1280-1288.
- [10] 付建珠,徐倩,赵亚玲,等. 干扰素抑制JAK2 V617F阳性骨髓增殖性肿瘤血管新生的机制[J]. *中华医学杂志*, 2015, 95(46): 3727-3732.
Fu JZ, Xu Q, Zhao YL, et al. Anti-angiogenic effect of interferon on JAK2V617F positive myeloproliferative neoplasms and its anti-angiogenic mechanisms [J]. *Natl Med J China*, 2015, 95(46): 3727-3732.
- [11] Chen XF, Fosco D, Douglas E, et al. PD-1 regulates extrathymic regulatory T-cell differentiation [J]. *Eur J Immunol*, 2014, 44(9): 2603-2616.
- [12] Rodríguez JA. HLA-mediated tumor escape mechanisms that may impair immunotherapy clinical outcomes via T-cell activation [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(4): 4415-4427.
- [13] Chiu YM, Tsai CL, Kao JT, et al. and PD-L1 up-regulation promotes PD-1 T-cell apoptosis in gastric adenocarcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(4): 2069-2078.
- [14] 朱云霞,陈成,黄建安. PD-1分子在肺癌恶性胸腔积液CD8⁺T细胞上的表达及其生物学意义[J]. *肿瘤*, 2010, 30(9): 778-781.
Zhu YX, Chen C, Hang JA, et al. The expression of PD-1 on CD8⁺ T cells in malignant pleural effusion of lung cancer and its biological significance [J]. *Tumor*, 2010, 30(9): 778-781.
- [15] 赵亚玲,张丽军,付建珠,等. IFN- α 2b对JAK2 V617F突变的骨髓增殖性肿瘤COX-2表达及血管新生的影响[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2016, 47(4): 473-478.
Zhao YL, Zhang LJ, Fu JZ, et al. Effect of IFN- α 2b on COX-2 and angiogenesis in JAK2V617F mutation myeloproliferative neoplasms [J]. *J Sichuan Univ (Med Sci Ed)*, 2016, 47(4): 473-478.

(编辑 孙慧兰)