

PTEN、BMI-1、CIP2A、ALOX-5、TWIST-1 及 PML 基因在慢性粒细胞白血病各分期表达差异

钱 伟 杨明珍 夏雷鸣 郭婷婷 赵雨辰 谢研研

摘要 目的 探讨 PTEN、BMI-1、CIP2A、ALOX-5、TWIST-1 及 PML 基因在慢性粒细胞白血病(CML)患者疾病进展过程中的临床意义,同时初步评价 Sokal 积分在分子生物学水平预后效力。方法 运用实时定量 PCR 法分别测定 107 例骨髓标本[CML 慢性期(CP)患者 64 例,进展期患者 23 例,对照组 20 例]GAPDH、PTEN、BMI-1、CIP2A、ALOX-5、TWIST-1 及 PML 基因相对表达量。分析 CP、进展期包括加速期(AP)及急变期(BP)患者骨髓中上述基因表达水平差异。结果 BMI-1、CIP2A 及 TWIST-1 基因在 AP/BP 组表达明显增高,与 CP 组相比差异有统计学意义($t = -4.576$ 、 -5.096 、 -2.714 $P < 0.05$)。按 Sokal 积分进行危险度分层后,上述基因在各组间差异无统计学意义。结论 BMI-1、CIP2A 及 TWIST-1 基因在 CML 进展过程中明显增高,提示与疾病进展有关。Sokal 预后系统结合相关分子生物学指标评价预后或许是今后发展的方向。

关键词 慢性粒细胞性白血病;Sokal 积分;预后基因;荧光定量 PCR

中图分类号 R 557+.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)11-1641-06

虽然酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors,TKI)的使用对慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia,CML)的治疗起到了划时代的意义,但部分患者出现的耐药和对药物的依赖仍是不可回避的现实问题。有研究^[1]显示超过 80% 的 CML 急变期患者存在除 Ph 染色体以外的遗传学异常,其中 CIP2A 及 BMI-1 基因与疾病进展有关,TWIST-1 基因的高表达者往往提示 TKI 耐药,而针对 ALOX-5 及 PML 基因(表达产物)的治疗能够有效抑制 CML 干细胞增殖可能,从而有效的控制原发病的复发。该试验通过检测不同疾病时期的 PTEN、BMI-1、CIP2A、ALOX-5、TWIST-1 及 PML 基因相对表达量,评价各基因与疾病进展间的联系及与 Sokal 预后积分间的相关性。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集安徽医科大学第一附属医院血液科 2011 年 9 月~2013 年 9 月接诊 CML 患者骨髓 107 例,其中初治慢性期(chronic phase,CP)患者

2014-05-18 接收

基金项目:安徽省科技厅自然科学基金(编号:11010402168)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院血液内科,合肥 230022

作者简介:钱 伟,男,硕士研究生;

杨明珍,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: yang-mz89@163.com

pathological types of colorectal polyps. **Methods** 30 cases of hyperplastic polyps, 30 cases of colorectal adenomas (15 cases of high level intraepithelial neoplasia, 15 cases of low level intraepithelial neoplasia), 30 cases of colon cancer and 15 cases of normal colonic mucosa were enrolled in this study. Expressions levels of 5-LOX and PlGF were analyzed by immunohistochemical method and serum activities SOD and MDA were evaluated by ELISA assays. **Results** Expressions of 5-LOX and PlGF in hyperplastic polyp, different levels of intraepithelial neoplasia and colorectal cancer were significantly higher than those of normal colon mucosa tissue ($P < 0.05$). Compared with hyperplastic polyp, expression differences in low level intraepithelial neoplasia, high level intraepithelial neoplasia and colorectal cancer expression were statistically significant. Serum activity of SOD in low level intraepithelial neoplasia, high level intraepithelial neoplasia and colorectal cancer was significantly lower than that in normal colon mucosa tissue ($P < 0.05$), while the MDA activity was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Expressions of 5-LOX and PlGF are significantly enhanced at an increasing trend in the process of malignant transformation of colorectal adenomas, which may be an early molecular event.

Key words colorectal polyps; 5-lipoxygenase; placental growth factor

64 例,男 39 例,女 25 例,年龄 15 ~ 72 (45.70 ± 15.93) 岁。进展期患者 23 例,其中加速期 (accelerated phase, AP) 18 例,急变期 (blastic phase, BP) 5 例;男 15 例,女 8 例;年龄 21 ~ 68 (50.13 ± 16.87) 岁。以上病例均符合文献^[2]报道诊断标准。对照组为非血液系统恶性肿瘤患者骨髓 20 例,其中男 11 例,女 9 例,年龄 21 ~ 73 (37.60 ± 14.36) 岁。

1.2 试剂与仪器 Ficoll 淋巴细胞分离液 (天津川页生化制品有限公司); TRIzol (美国 Invitrogen 公司); 引物 (上海生工生物工程有限公司合成); 逆转录试剂盒 (加拿大 Fermentas 公司); SYBR Green PCR Power Master 试剂盒及 7300 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

1.3 引物 以 GAPDH 为内参照,通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查找 GAPDH、PTEN、BMI-1、CIP2A、ALOX-5、TWIST-1 及 PML 基因全序列,使用 Primer premier 5.0 引物设计软件分别设计其特异性引物。所设计的引物经 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对合格。设计后送上海生工生物工程有限公司合成,见表 1。

表 1 相关基因引物碱基序列

基因	引物序列 (5' → 3')	产物大小 (bp)
GAPDH	F: ATGGAATCCCATCACCATCTT R: CGCCCCACITGATTITGG	61
PTEN	F: ATTCTCTCAATTCAGGACCCA R: GGTTTCCTCTGCTCTGCTATGA	185
BMI-1	F: ATTCCCTCCACCTCTTCTTGTT R: GCTGGGCTGTGCTGCTT	111
CIP2A	F: GAACAGATAAGAAAAGATTGAGCATT R: CGACCTTCTAATTGTGCTTTT	71
ALOX-5	F: TCAGCGTGTCCAGAATGG R: GCAAGTGTTCGGCTCTCT	94
TWIST-1	F: GTCCGCAGTCTTACGAGGAG R: GCTTGAGGGTCTGAATCTTGCT	156
PML	F: CGCCCTGGATAACCTCTTTT R: CTCGCACTCAAAGCACCAGA	127

1.4 实验方法

1.4.1 RNA 提取 抽取 EDTA 抗凝的骨髓液 5 ml,用淋巴细胞分离液分离单个核细胞 ($5 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$) /L 后加 TRIzol 试剂 1 ml,混匀后按氯仿法提取总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 含量及纯度。

1.4.2 逆转录反应 总 RNA 取 Oligo (dT) 法逆转录成 cDNA,具体操作详见 Fermentas 公司逆转录试剂盒说明书。

1.4.3 实时荧光 PCR SYBR Green 反应体系共 25 μ l。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 15 min,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min 40 个循环,设空白对照,计算检测基因 mRNA 的相对表达量,每组重复 3 次取均值。扩增完毕后进行融解曲线分析,反应结束后,仪器会自动绘制标准曲线及融解曲线图。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。因各基因扩增效率限制,采用 Pfaffl 法计算基因相对表达量。采用独立样本 t 检验分析各基因在实验组与对照组及 CP 组与 AP/BP 组间差异,采用单因素方差分析评价各基因与 Sokal 积分间相关性。

2 结果

2.1 实时定量 PCR GAPDH、PTEN、BMI-1、CIP2A、ALOX-5、TWIST-1 及 PML 基因标准曲线斜率分别为 -3.432 0、-3.626 6、-3.089 9、-3.962 7、-3.333 3、-3.987 5 和 -2.714 0,扩增效率分别为 0.956 0、0.886 9、1.106 9、0.787 9、0.995 3、0.778 4 和 1.335 9。经过 ABI 7300 荧光定量 PCR 仪产生的数据,以融解曲线加以描述,见图 1 ~ 7。

2.2 实验组与对照组各基因的表达 经检测上述基因在实验组和对照组中均有表达。因本实验相对定量数据采用 Pfaffl 法计算,该算法假定对照组为基线 (即人为设定为 1),实验组表达量即为对照组的倍数。单样本 t 检验结果显示,仅 PTEN 基因在对照组与实验组间差异无统计学意义,剩余基因在不同组间差异有统计学意义,见表 2。

2.3 CP 患者与进展期患者各基因的表达 经检测上述基因在实验组患者中均有表达。其中,PTEN、ALOX-5 及 PML 基因在 CP 组与 AP/BP 组间表达差异无统计学意义 ($P = 0.136, 0.499, 0.435$); BMI-1、CIP2A 及 TWIST-1 基因在 AP/BP 组表达明显增高,与 CP 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 3。

表 2 各基因在 CML 不同时期的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PTEN	BMI-1	CIP2A	ALOX-5	TWIST-1	PML
对照	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
实验	0.650 ± 0.532	0.776 ± 0.565	1.078 ± 0.377	1.089 ± 0.159	1.704 ± 1.241	1.534 ± 1.809
t/P 值	0.169 (0.869)	2.489 (0.020)	-6.651 (0.001)	2.839 (0.090)	2.895 (0.080)	2.914 (0.007)

表3 各基因在 CML 不同时期的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

分期	PTEN	BMI-1	CIP2A	ALOX-5	Twist-1	PML
CP	0.643 $\pm$ 0.672	0.538 $\pm$ 0.541	0.613 $\pm$ 0.390	1.094 $\pm$ 0.139	1.472 $\pm$ 1.121	1.777 $\pm$ 1.493
进展期	0.672 $\pm$ 0.663	0.972 $\pm$ 0.923	1.662 $\pm$ 0.834	1.051 $\pm$ 1.990	2.754 $\pm$ 1.557	1.392 $\pm$ 0.583
t/P 值	-1.57(0.136)	-4.57(0.010)	-5.09(0.001)	0.68(0.499)	-2.71(0.010)	-0.79(0.435)

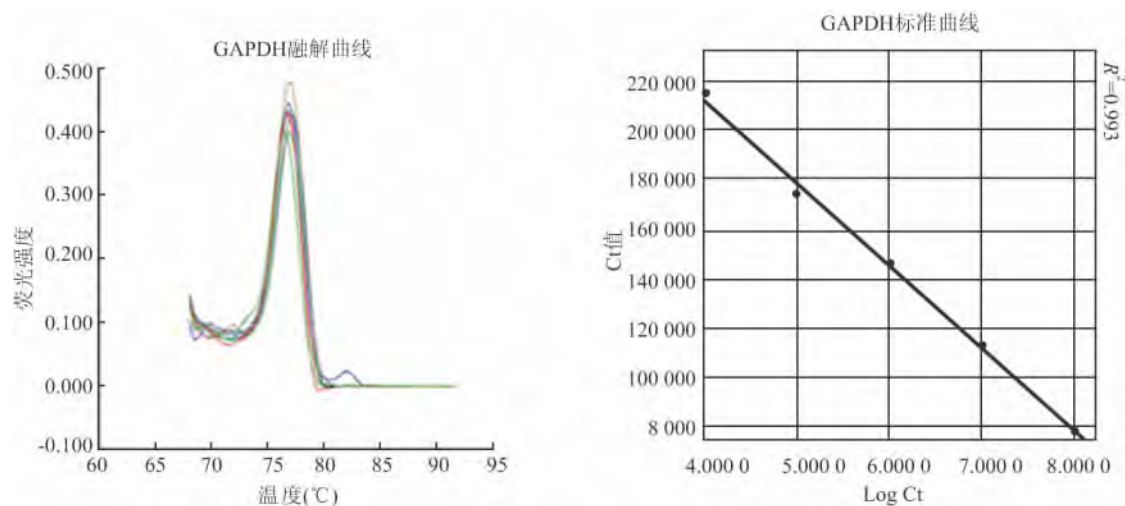


图1 GAPDH 基因实时定量 PCR 反应融解曲线及标准曲线

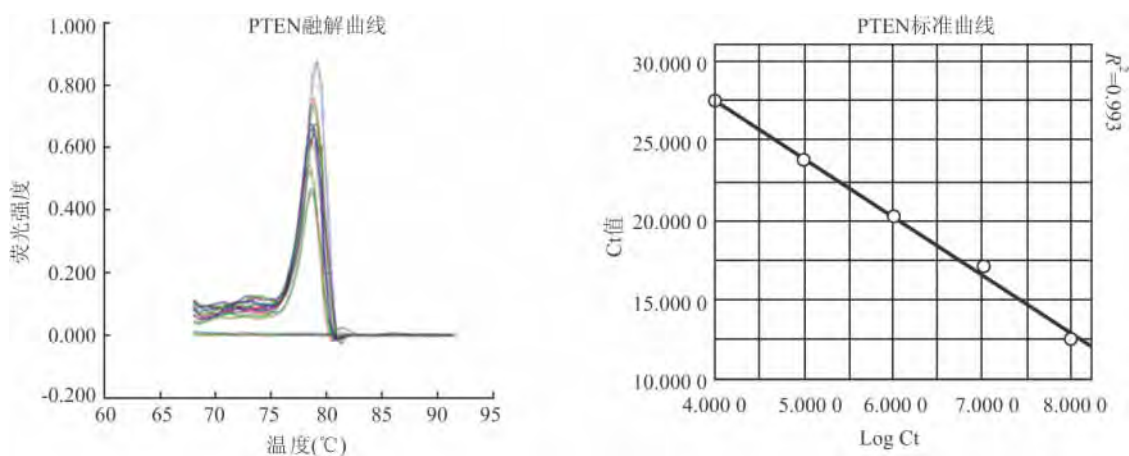


图2 PTEN 基因实时定量 PCR 反应融解曲线及标准曲线

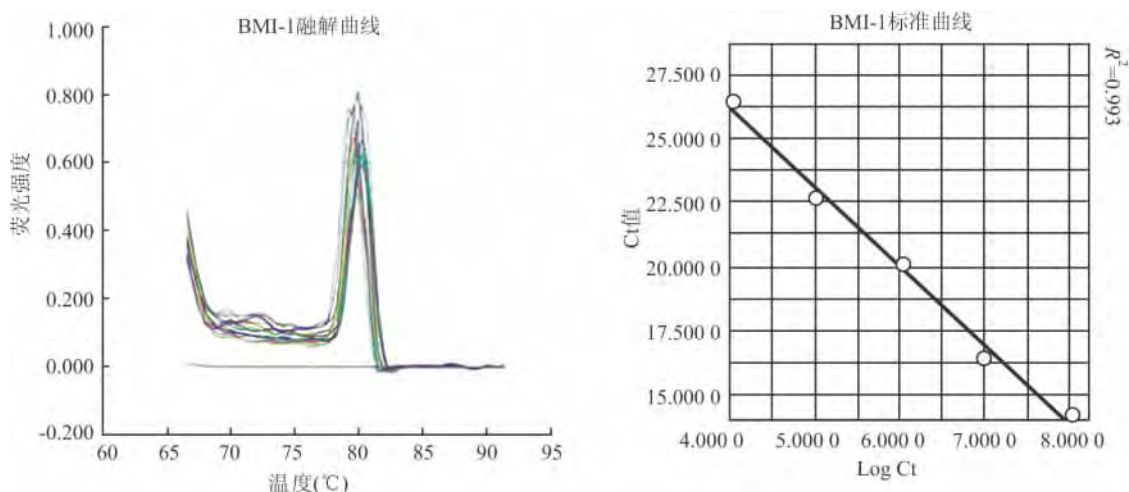


图3 BMI-1 基因实时定量 PCR 反应融解曲线及标准曲线

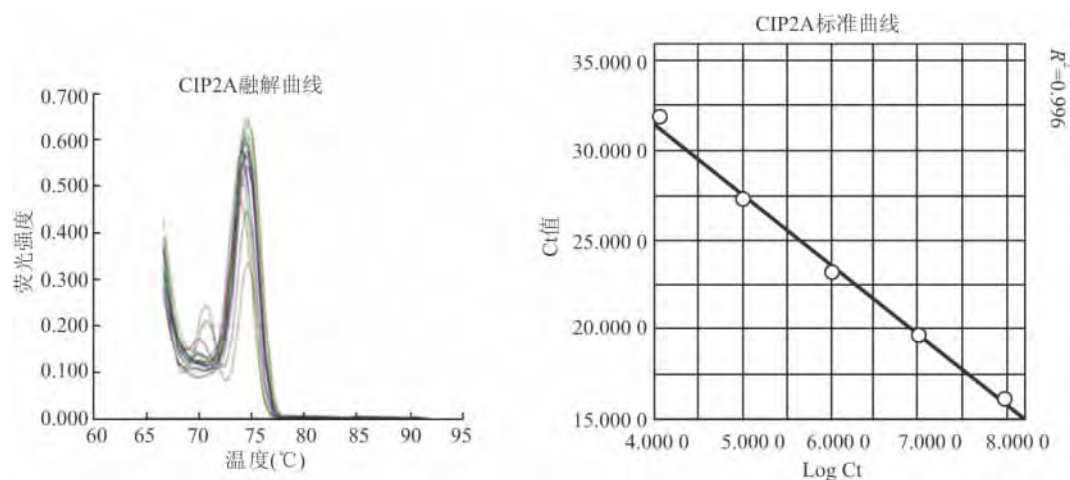


图4 CIP2A 基因实时定量 PCR 反应融解曲线及标准曲线

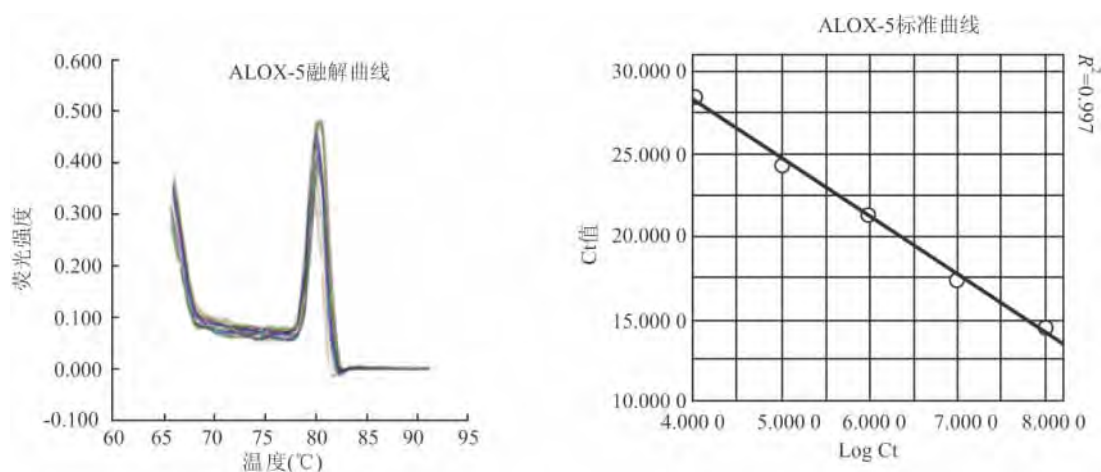


图5 ALOX-5 基因实时定量 PCR 反应融解曲线及标准曲线

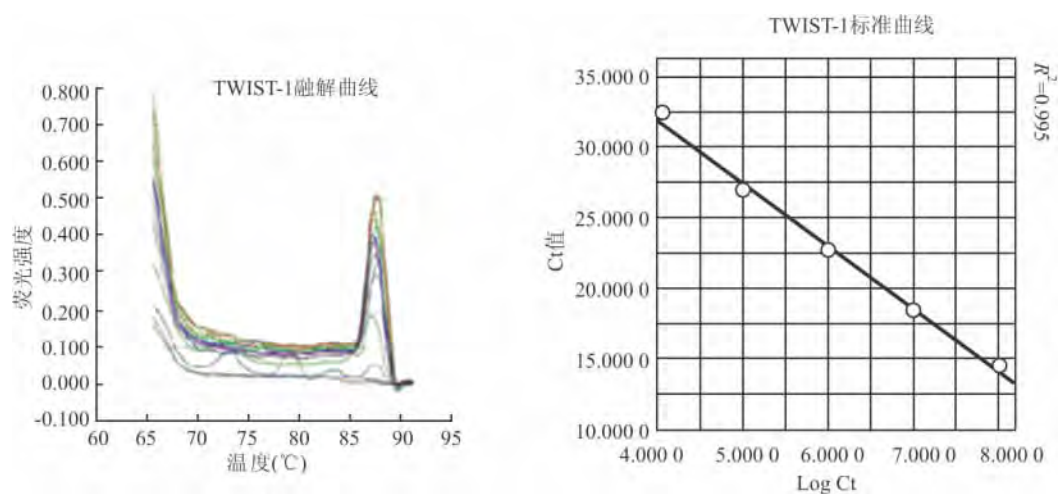


图6 TWIST-1 基因实时定量 PCR 反应融解曲线及标准曲线

2.4 CML 患者中各基因表达量与 Sokal 分组之间的关系 将 CML 患者按照 Sokal 积分系统进行分组后发现,高、中、低危组(低危组 19 例,中危组 33 例,

高危组 12 例)间各基因表达量差异无统计学意义,见表 4。

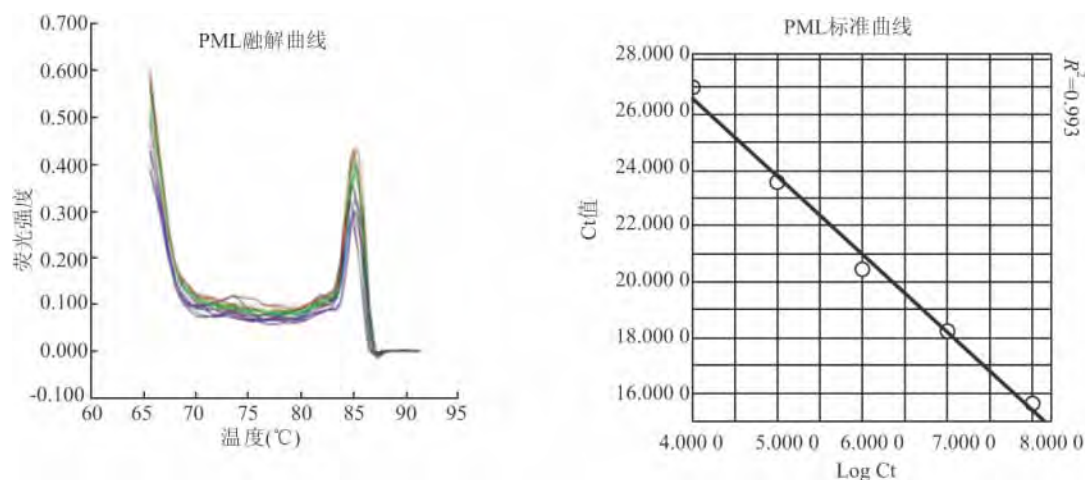


图7 PML 基因实时定量 PCR 反应融解曲线及标准曲线

表4 各基因在不同 Sokal 危险度水平相对表达量($\bar{x} \pm s$)

项目	相对表达量	F 值	P 值
PTEN		0.376	0.691
低危	0.912 ± 0.422		
中危	1.091 ± 0.603		
高危	0.913 ± 0.490		
BMI-1		0.138	0.872
低危	1.203 ± 0.562		
中危	1.282 ± 0.611		
高危	1.391 ± 0.532		
CIP2A		0.694	0.510
低危	0.654 ± 0.493		
中危	0.454 ± 0.337		
高危	0.483 ± 0.287		
ALOX-5		0.013	0.987
低危	1.082 ± 0.101		
中危	1.092 ± 0.170		
高危	1.094 ± 0.121		
TWIST-1		0.263	0.771
低危	1.428 ± 1.159		
中危	1.762 ± 1.312		
高危	1.955 ± 1.331		
PML		0.765	0.477
低危	1.652 ± 1.074		
中危	1.951 ± 1.619		
高危	1.834 ± 1.172		

3 讨论

现已公认 BCR/ABL 融合基因在 CML 发生、发展过程中起到了主导作用。由此机制研制的 TKI 可过特异性阻断 BCR/ABL 阳性细胞中 ATP 在 ABL 酪氨酸激酶催化部位上的结合位点,使酪氨酸残基不能磷酸化,从而抑制细胞的增殖^[3]。尽管 TKI 具有良好的临床疗效和耐受性,但仍然存在一些问题:对存在 T315I 耐药突变的患者一代 TKI 无效,并且 TKI 无法清除 CML 干细胞及微小残留细胞。因而,

有学者提出在 CML 发生机制中可能有其他基因协同参与^[4]。尤以 PTEN、BMI-1、CIP2A、ALOX-5、TWIST-1 及 PML 等基因研究比较深入,且在 CML 发病过程中的作用亦比较肯定。但这些基因表达量之间是否存在某种联系及与 CML 进展是否存在关联,并且这些基因的表达与目前较为认同的 Sokal 预后系统之间是否相关,国内外研究鲜见。

有研究者发现在 CML 小鼠模型中,PTEN 基因由 BCR-ABL 诱导下调,PTEN 缺失导致 CML 的进展^[5-6]。此外过量表达的 PTEN 基因可以延缓 CML 的进展,延长白血病小鼠的生存期。Merkerova et al^[1]发现在 CML 进展期患者中 BMI-1 基因高表达,且发现这种高表达抑制了 BAD 等促凋亡基因的表达,从而参与 CML 进展的过程。而 Mohty et al^[7]则通过研究发现 CML 进展期患者 CD34⁺ 细胞及总的外周血单核细胞的 BMI-1 的 RNA 水平明显高于 CP 患者,再次验证了 BMI1 对 CML 预后具有重要价值。CIP2A 是 PP2A 抑制剂, Lucas et al^[8]发现从患者诊断 CML 开始,随后很快进入 BP 的患者与进展患者之间在 CIP2A 蛋白水平上有显著差异,很快进入 BP 的明显高于进展缓慢者,表明其 PP2A 功能受到抑制。而 CIP2A 敲除后导致蛋白磷酸酶 2 (PP2A) 活性上调,同时伴有 BCR-ABL1 酪氨酸激酶活性下调。Lucas et al^[8]还发现高表达 CIP2A 患者 21 个月出现疾病进展的概率为 100%,并且 CIP2A 表达水平与 Sokal 值之间没有关联,说明高表达 CIP2A 是独立的急变生物学指标。Chen et al^[9]认为 ALOX-5 缺失后会引致白血病干细胞功能的损害,而对正常造血干细胞则没有影响,最终导致白血病干细胞耗竭而不能诱发慢性粒细胞白血病。Cosset et al^[10]发现

TKI 耐药的患者 TWIST-1 基因表达量明显高于治疗有效者,从而证实 TWIST-1 在初治时水平以及疾病进展中水平对于预测疾病治疗的评估有较大意义并且稳定,特别是用于预测对 TKI 是否敏感。Ito et al^[11]发现慢粒患者骨髓中有极少数白血病起始细胞(LICs),这些细胞对治疗的反应迟钝往往成为疾病复发的根源。而 PML 基因对于维持 LICs 处于静止状态起到了关键作用。

通过对上述 6 种基因表达量的检测,发现 PTEN 在无疾病进展的初治患者体内表达量较正常者相当,而其他 5 种基因则有显著性差异,这与相关文献^[4]报道结论一致。进一步分析显示,BMI-1、CIP2A 及 TWIST-1 基因在 CML 进展过程中明显增高,提示与疾病进展有关。此外,TWIST-1 基因作为 TKI 耐药预测的重要指标在初治 CP 患者中分布较为离散,预示着该组患者 TKI 治疗后可能会出现疗效上的差异。此外,将各基因按 Sokal 积分分层后分析发现不同组间均未发现显著性差异。虽目前仅据此结果尚不能肯定 Sokal 积分预后效力不佳,但通过该实验数据的分析及临床实践中出现的诸如按照 Sokal 积分分层的患者表现出与预期不符的这种现象,Sokal 积分能否良好的进行疾病预后,这一观点仍需大量实验验证。而此种不足的原因可能就与 Sokal 积分计算过程中未考虑相关分子生物学指标有关。

参考文献

[1] Merkerova M, Bruchova H, Kracmarova A, et al. Bmi-1 over-ex-

pression plays a secondary role in chronic myeloid leukemia transformation[J]. *Leuk Lymphoma*, 2007, 48(4): 793-801.

[2] 张之南,沈 悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007: 271.

[3] Branford S T, Hughes. Detection of BCR-ABL mutations and resistance to imatinib mesylate[J]. *Methods Mol Med*, 2006, 125: 93-106.

[4] Hamad A, Sahli Z, Mouteirik M, et al. Emerging therapeutic strategies for targeting chronic myeloid leukemia stem cells[J]. *Stem Cells Int*, 2013: 724360.

[5] Peng C, Chen Y, Li D, et al. Role of PTEN in leukemia stem cells [J]. *Oncotarget*, 2010, 1(2): 156-60.

[6] Peng C, Chen Y, Yang Z, et al. PTEN is a tumor suppressor in CML stem cells and BCR-ABL-induced leukemias in mice [J]. *Blood*, 2010, 115(3): 626-35.

[7] Mohty M, Yong A S, Szydlo R M, et al. The polycomb group BMI1 gene is a molecular marker for predicting prognosis of chronic myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2007, 110(1): 380-3.

[8] Lucas C M, Harris R J, Giannoudis A, et al. Cancerous inhibitor of PP2A (CIP2A) at diagnosis of chronic myeloid leukemia is a critical determinant of disease progression [J]. *Blood*, 2011, 117(24): 6660-8.

[9] Chen Y, Hu Y, Zhang H, et al. Loss of the Alox5 gene impairs leukemia stem cells and prevents chronic myeloid leukemia [J]. *Nat Genet*, 2009, 41(7): 783-92.

[10] Cosset E, Hamdan G, Jeanpierre S, et al. Deregulation of TWIST-1 in the CD34+ compartment represents a novel prognostic factor in chronic myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2011, 117(5): 1673-6.

[11] Ito K, Bernardi R, Morotti A, et al. PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells [J]. *Nature*, 2008, 453(7198): 1072-8.

Expressions of PTEN , BMI-1 , CIP2A , ALOX-5 , TWIST-1 and PML genes in chronic myelogenous leukemia

Qian Wei ,Yang Mingzhen ,Xia Leiming ,et al

(Dept of Hematology ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022)

Abstract Objective To detect clinical significance of PTEN , BMI-1 , CIP2A , ALOX-5 , TWIST-1 and PML genes. in different phases of chronic myelogenous leukemia(CML) and evaluate the effect of prognosis of Sokal preliminarily. **Methods** The expression levels of GAPDH , PTEN , BMI-1 , CIP2A , ALOX-5 , TWIST-1 and PML were detected in 107 bone marrow samples (64 chronic phase patients 23 accelerated and blastic phase patients , 20 normals) by RT-PCR. The differences of expressions of these genes in different phases of CML were analyzed. **Results** Expressions of BMI-1 ,CIP2A and TWIST-1 in AP/BP were significantly higher than those in CP($t = -4.576, -5.096, -2.714, P < 0.05$). These patients were analyzed by Sokal ,the statistical differences between these genes and groups were not significant. **Conclusion** The increased expressions of BMI-1 ,CIP2A and TWIST-1 maybe account partly for blast crisis of CML. The sokal contains molecular biological index may find direction in the future.

Key words chronic myelogenous leukemia; Sokal; prognostic gene; RT-PCR