论著

文章编号:1000-5404(2010)10-1034-04

Wnt5a基因在急性髓细胞白血病病例中的表达分析

赵 宸,杨宗林,司维柯,邓 刚,牛长春,袁 媛,李招权,潘 静 (400038 重庆,第三军医大学医学检验系临床血液学教研室)

[摘要] **目的** 检测Wnt5a基因在良性血液病、急性髓细胞白血病及缓解病例骨髓中的表达情况,探讨Wnt5a在急性髓细胞白血病发生中的作用。**方法** RT-PCR方法检测18例良性血液病病例,30例急性髓细胞白血病初诊病例和25例缓解病例骨髓中Wnt5a mRNA的表达情况;免疫细胞化学法检测对应骨髓中Wnt5a蛋白的表达情况。**结果** Wnt5a mRNA在良性血液病、急性髓细胞白血病病例和缓解病例中的阳性表达率分别为88.9%(16/18)、30%(9/30)和68.0%(17/25),半定量值分别为(0.382 6±0.190 8)、(0.104 1±0.059 0)和(0.260 6±0.146 6)。统计学分析Wnt5a mRNA在初诊病例中的表达明显低于缓解病例($P<0.05$),缓解病例与良性血液病之间无明显差异($P>0.05$);Wnt5a蛋白在良性血液病中阳性表达,在急性髓细胞白血病初诊病例中低表达或表达缺失,在缓解病例中表达恢复。**结论** Wnt5a基因在急性髓细胞白血病初诊病例中表达缺失而在治疗缓解病例中表达恢复,提示急性髓系白血病的发生可能与Wnt5a基因表达缺失或下调有关,Wnt5a可以作为一个髓系白血病诊断、指导治疗和疗效评价的指标。

[关键词] Wnt5a;基因表达;急性髓细胞白血病;血液病

[中图法分类号] R733.71; R730.43; R394.2 **[文献标志码]** A

Expression of Wnt5a gene in myeloblastic leukemia

Zhao Chen, Yang Zonglin, Si Weike, Deng Gang, Niu Changchun, Yuan Yuan, Li Zhaoquan, Pan Jing (Department of Clinical Hematology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To detect the expression of Wnt5a gene in the bone marrow of benign hematologic diseases, acute myeloblastic leukemia, and in complete remission (CR), and investigate the role of Wnt5a in the pathogenesis of myeloblastic leukemia. **Methods** The expression of Wnt5a gene was detected with semi-quantitative RT-PCR in 18 cases of benign hematologic disease, 30 cases of acute myeloblastic leukemia (AML) and 25 cases of acute myeloblastic leukemia who were in CR. The expression of Wnt5a protein was analyzed by immunocytochemical staining in some benign, AML and CR samples. **Results** The positive rate and expression level of Wnt5a mRNA, respectively, were 30% and (0.104 1±0.059 0) for AML patients, which are lower than 68.0% and (0.260 6±0.146 6) for CR patients ($P<0.05$), and also 88.9% and (0.382 6±0.190 8) in benign diseases. Wnt5a protein was decreased or missed in AML patients, but it was positively expressed in CR cases and benign cases. **Conclusion** The expression of Wnt5a gene is decreased in AML patients but restored in AML-CR cases, and there is no statistical difference between benign and CR. Our results indicate that AML may be correlated with down-regulation or loss of Wnt5a expression. Wnt5a gene might be used as a marker for diagnosis and target of therapy in myeloblastic leukemia.

[Key words] Wnt5a; acute myeloblastic leukemia; gene expression

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30973386) and the Natural Science Foundation Project of Chongqing (CSTC2009BA5057).
Corresponding author: Si Weike, Tel: 86-23-68752312, E-mail: weikesi@yahoo.com.cn

Wnt蛋白是一类富含半胱氨酸的分泌性糖蛋白家族[1],已发现至少19种WNT基因家族成员,现有研究表明,该通路包括多个成员且其序列和信号转导方式高度保守[2]。Wnt信号通路分为经典通路和非经典通路,在细胞分化成熟和肿瘤发生中表现出不同的作用,WNT5a是其家族成员之一,在非经典通路Wnt/Ca^{2+}中表现出拮抗经典通路作用的功能[3]。Wnt5a在不同的肿瘤中的表达和功能报道不一,在乳腺癌、黑色素瘤、鳞状细胞癌中表达上调,推测其在此类肿瘤的发生和迁移中有重要作用,而在肝细胞癌、胰腺癌等肿瘤中Wnt5a表达下调,可能发挥抑癌基因样作用,血液系统中存在大量与Wnt信号通路相关的作用机制,但其机制尚未完全阐明[4,5]。Wnt5a表达情况及作用机制在急性髓细胞白血病中的研究报道较少,本研究调查了如缺铁性贫血(iron deficiency anemia,IDA)、特发

[基金项目] 国家自然科学基金(30973386);重庆市自然科学基金重点项目(CSTC2009BA5057)

[通信作者] 司维柯,电话:(023)68752312,E-mail:weikesi@yahoo.com.cn

性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura,ITP)等良性血液病、急性髓系白血病病例(M_1 ~ M_6)和急性髓系白血病治疗缓解病例中 Wnt5a 基因及蛋白的表达情况,探讨 Wnt5a 基因表达水平与急性髓细胞白血病发生的关系,为进一步研究其在白血病发生、发展中的作用以及临床应用奠定基础。

1　资料与方法

1.1　材料

1.1.1　标本来源　　第三军医大学西南医院及新桥医院血液科 2007 年 8 月至 2009 年 10 月收治的良性血液病病例骨髓 18 例,9 例 IDA,9 例 ITP:男性 7 例,女性 11 例,年龄 35 ~ 61 岁,平均 42.1 岁;急性髓系白血病初诊病例骨髓 30 例:男性 18 例,女性 12 例,年龄 8 ~ 72 岁,平均 37.4 岁;急性髓系白血病缓解病例 25 例,男性 15 例,女性 10 例,年龄 16 ~ 65 岁,平均 35.5 岁,骨髓采集前均征得患者和家属的同意,病例诊断由实验室根据 MICM 分型标准最终确诊。

1.1.2　主要试剂和仪器　　氯化氨红细胞裂解液(139.6 mmol/L 氯化铵,16.96 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷),Trizol(Invitrogen 公司),RT-PCR 试剂盒(Toyobo 公司),人淋巴细胞分离液(TBD 公司),PCR 仪(Bio-Rad 公司),紫外光凝胶成像分析仪(半定量均值的计算使用 Quantity One 光密度测量软件,Bio-Rad 公司),兔抗人 Wnt5a 蛋白多克隆抗体(SATA CRUZ BIOTECHNOLOGY 公司),免疫组化染色试剂盒 S-P 9001(中杉金桥公司)。

1.2　方法

1.2.1　白血病病例骨髓的收集与单个核细胞的分离　　无菌条件下进行骨髓穿刺,抽取新鲜骨髓 2 ml,加入 6 ml 氯化氨红细胞裂解液,颠倒混匀后室温放置 5 min,待红细胞破坏完全,高速离心 1 min,弃上清,加入 2 ml PBS 重悬单个核细胞,在另一离心管中加入 4 ml 的人淋巴细胞分离液,将上述单个核细胞悬液缓慢加在分离液上,注意保持界面清晰,2 000 r/min 离心 15 min,取分层液与血浆交接部位浑浊灰白色区域即为分离出的骨髓单个核细胞。

1.2.2　总 RNA 的提取　　用 TRIZOL 法提取骨髓细胞总 RNA,DEPC 处理的无菌纯水重悬 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 在 260 nm 及 280 nm 处的光密度值,计算 $D(260)/D(280)$ 鉴定其纯度,作甲醛变性凝胶电泳,检测 RNA 完整性。

1.2.3　RT-PCR 及产物鉴定　　逆转录反应体系 20 μl,包括 DEPC 处理无 RNA 酶的无菌纯水 10.5 μl,109 μmol/L Oligo $(DT)_{20}$1 μl,上述提取的 RNA 1 μl,5 × RT Buffer 4 μl,10 mmol/L dNTP 2 μl,40 U/μl RNAase 抑制剂 0.5 μl,100 U/L 逆转录酶 1 μl,按说明书操作逆转录合成 cDNA。以 PCR 检测产物中 Wnt5a 基因的表达情况,Wnt5a 引物序列:上游 5′-TGTGGTTTA-ATGGTGCCTGA-3′,下游 5′-TTCGTCGTGCTCAAGGTATG-3′,扩增产物为 243 bp。反应条件:总体积 25 μl,5 × 反应缓冲液,dNTP10 mmol/L,cDNA 模板 1 μl。扩增条件为:94 ℃预变性 5 min 后,94 ℃变性 30 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 35 个循环,72 ℃延伸 7 min。同时以看家基因 GAPDH 为内对照。扩增产物于 1.6% 琼脂糖凝胶上用电泳分离,每孔点样量 20 μl,凝胶成像分析仪(Bio-Rad 公司)采集图片,Quantity one 软件(Bio-Rad 公司)分析病例标本中 Wnt5a 与 GAPDH cDNA 的 PCR 产物的光密度值(INT × mm^2 值),Wnt5a mRNA 表达的半定量值计算公式为:Wnt5a 半定量值 = INT × mm^2(Wnt5a)/INT × mm^2(GAPDH)。

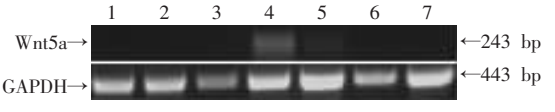
1.2.4　免疫细胞化学染色检测 Wnt5a 蛋白在细胞中的表达情况　　细胞涂片经 95% 甲醇固定,滴加 3% H_2O_2 去离子水孵育 10 min,10% 的羊血清封闭 15 min,加入一抗覆盖细胞(一抗按 1∶100 稀释,阴性对照覆盖 PBS),于湿盒中 4 ℃过夜,用 PBS 冲洗 5 次,每次 3 min。滴加生物素标记二抗,37 ℃孵育 15 min,用 PBS 冲洗 5 次,每次 3 min。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵蛋白,37 ℃孵育 15 min,PBS 冲洗 5 次,每次 3 min。滴加现配 DAB 显色液,孵育 5 ~ 10 min。苏木精复染细胞核。

1.3　统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行 χ^2 检验和 t 检验。

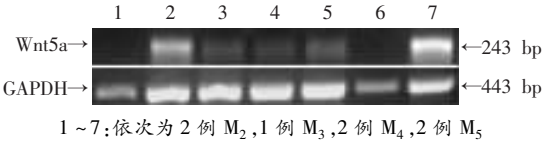
2　结果

本组实验从 Wnt5a mRNA 和 Wnt5a 蛋白在良性血液病、急性髓细胞白血病初诊病例和缓解病例中的表达情况来观察 Wnt5a 在白血病中的变化情况。Wnt5a mRNA 的阳性表达率以及半定量均值,在良性血液病中分别为 88.9%(16/18)和(0.382 6 ± 0.190 8),在髓系白血病初诊病例中分别为 42.9%(9/30)和(0.104 1 ± 0.059 0),治疗缓解病例中分别为 68.0%(17/25)和(0.260 6 ± 0.146 6);3 个组别的 Wnt5a 阳性表达率经两两对比分析(χ^2 检验),初诊病例与治疗缓解病例间差异显著($P = 0.005$),而缓解病例与良性血液病病例之间未见明显差异($P = 0.153$);Wnt5a 半定量均值经 ANOVA 检验分析,初诊病例与治疗缓解病例间有显著差异($P = 0.000$),而缓解病例与良性血液病病例之间差异不显著($P = 0.088$)。据此可知,在良性血液病和急性髓细胞白血病缓解病例中,Wnt5a 表达的阳性率和半定量均值均明显高于急性髓细胞白血病初诊病例(图 1 ~ 3),而前两者之间并无明显区别。免疫细胞化学染色显示,Wnt5a 蛋白在良性血液病和急性髓系白血病治疗缓解病例的髓系幼稚细胞中呈阳性表达,且主要分布于胞浆中,而在急性髓系白血病初诊病例骨髓的原始及幼稚细胞中为阴性表达(图 4)。



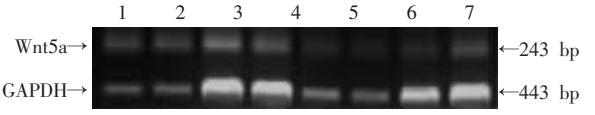
1 ~ 7:依次为 1 例 M_2,1 例 M_3,2 例 M_4,2 例 M_5,1 例 M_6

图 1　RT-PCR 检测 Wnt5a 在初诊急性髓系白血病病例中 mRNA 的表达



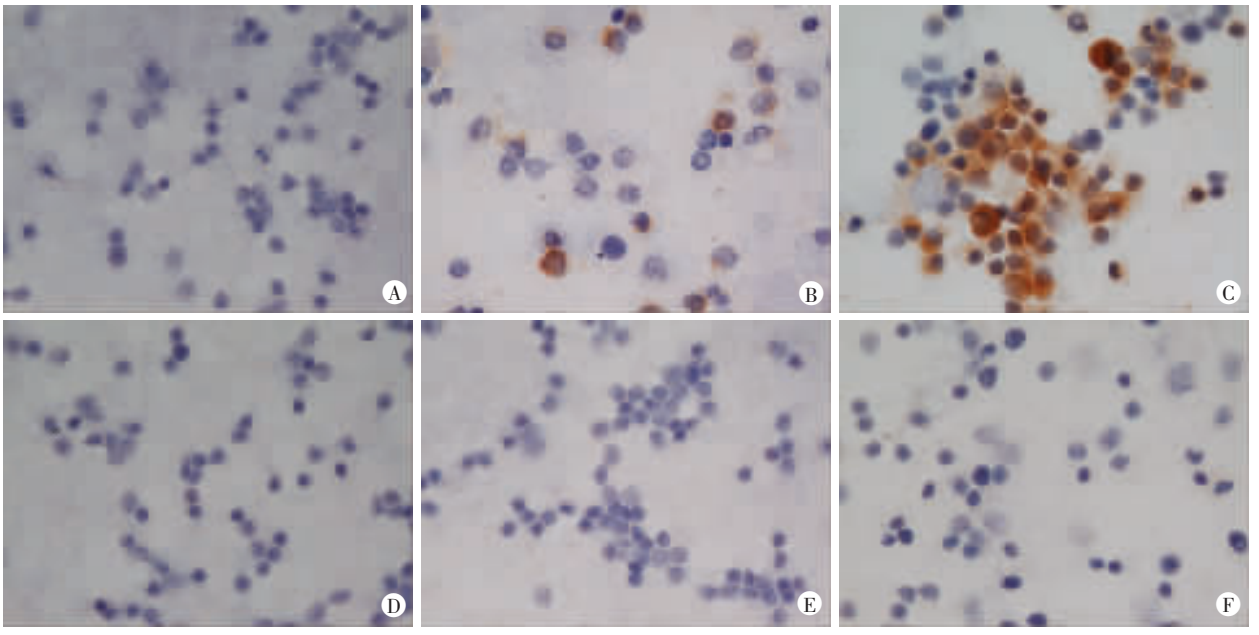
1 ~ 7:依次为 2 例 M_2,1 例 M_3,2 例 M_4,2 例 M_5

图 2　RT-PCR 检测 Wnt5a 在急性髓系白血病缓解病例中 mRNA 的表达



1 ~ 8:依次为 4 例 IDA,4 例 ITP

图 3　RT-PCR 检测 Wnt5a 在良性血液病病例中 mRNA 的表达



A、D:分别为髓系白血病初诊病例及阴性对照;B、E:分别为髓系白血病缓解病例及阴性对照;C、F:分别为良性血液病及阴性对照

图4 免疫细胞化学染色检测 Wnt5a 蛋白在髓系白血病初诊病例、缓解病例及良性血液病病例骨髓标本中的表达 (S-P ×400)

3 讨论

Wnt5a 基因已发现在多种肿瘤组织中表达上调,如原发性胃癌、脑胶质瘤、肺非小细胞癌、前列腺癌、头颈部鳞癌;而在某些肿瘤中则表达下调或缺失,如在黑色素瘤、乳腺癌、甲状腺肿瘤、子宫内膜癌[5-7]等,可见 Wnt5a 在不同肿瘤中表达可能行使不同功能,具体机制有待进一步研究。现有研究中 Wnt5a 与血液肿瘤的关系报道较少。我们前期研究发现 Wnt5a 在淋巴细胞白血病中表达下调,与 Roman 等[8,9]报道一致,并且 Wnt5a 可抑制 K562 细胞增殖,提示可能发挥抑癌因子的作用[10]。近来 Thiago 等[11]发现 Wnt5a 促进白血病细胞株 Nalm-16 存活,显示 Wnt5a 在白血病中的作用不一,值得深入研究。现有研究多集中在淋巴细胞白血病或细胞株的研究,而 Wnt5a 与髓细胞白血病的关系及其作用机制少见报道。在我国急性髓细胞白血病发病率为急性淋巴细胞白血病的 3.66 倍,其中 AML-M_2 比例最高,AML-M_4 的发病率有上升趋势[12,13],故研究 Wnt5a 与急性髓细胞白血病的关系,进一步探讨其机制具有重要意义。

本实验检测了急性髓细胞白血病初诊病例、缓解病例和良性血液病病例骨髓中的 Wnt5a 基因及蛋白的表达变化情况。结果显示,Wnt5a 在 mRNA 水平与蛋白水平的表达情况一致,在缓解病例中 Wnt5a 表达阳性率和半定量值均高于初诊病例,而与良性血液病例无明显区别。在急性髓系白血病的发病与转归过程中,Wnt5a 表达先降低再恢复,这一变化规律有可能成为辅助判断治疗效果及方案调整的指标之一[14]。此外,实验结果提示 Wnt5a 基因可能具有抑癌基因的功能,其表达下调或缺失可能与白血病的发生、发展有关,Wnt5a 基因在良性血液病(缺铁性贫血、特发性血小板减少性紫癜等)病例中呈阳性表达,而在急性髓系白血病病例中表达缺失或降低,可能与造血功能异常、白血病细胞恶性增殖有关。

现已发现 Wnt5a 表达降低与急性髓细胞白血病之间关系密切,但二者之间具体的定量关系以及 Wnt5a 表达下调的机制还有待进一步研究。已有研究表明,启动子异常甲基化对细胞周期调节、凋亡和 DNA 修复途径均有影响,该机制有可能在继发白血病的形成中发生作用[15]。此外,Wnt5a 与血液系统疾病恶性程度间的关系及疾病的进展情况还有待深入观察,值得进一步探讨是否对疾病预后的判断有一定帮助[16]。

本研究探讨了 Wnt5a 在急性髓细胞白血病不同病程的表达变化,提示 Wnt5a 可能为白血病的诊断和预后判断提供新的标志物,也可能成为治疗的分子靶点,为治疗方案的选择调整以及疗效评价的提供新的指标。

志谢 感谢第三军医大学新桥医院血液科与西南医院血液科在病例收集和标本采集方面给予的大力支持

参考文献:

[1] 邓刚, 司维柯, 潘静, 等. Wnt5a 基因在淋巴细胞系恶性肿瘤中的表达分析[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(19): 1832-1835.

[2] Nelson W J, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways[J]. Science, 2004, 303(5663): 1483-1487.

[3] Moon R T, Brown J D, Torres M. WNTs modulate cell fate and behav-

ior during vertebrate development[J]. Trends Genet, 1997, 13(4): 157 - 162.
[4] 刘晓红, 周航波, 马恒辉, 等. 肝细胞肝癌中 Wnt5a、β-catenin 和 E-cadherin 蛋白的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2007, 23(4): 400 - 403.
[5] Iozzo R V, Eichstetter I, Danielson K G. Aberrant expression of the growth factor Wnt-5A in human malignancy[J]. Cancer Res, 1995, 55(16): 3495 - 3499.
[6] Huang C L, Liu D, Nakano J, *et al*. Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(34): 8765 - 8773.
[7] Kremenevskaja N, von-Wasielewski R, Rao A S, *et al*. Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma [J]. Oncogene, 2005, 24(13): 2144 - 2154.
[8] Roman-Gomez J, Cordeu L, Agirre X, *et al*. Epigenetic regulation of Wnt-signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood, 2007, 109(8): 3462 - 3469.
[9] Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Cordeu L, *et al*. Wnt5a, a putative tumour suppressor of lymphoid malignancies, is inactivated by aberrant methylation in acute lymphoblastic leukaemia[J]. Eur J Cancer, 2007, 43(18): 2736 - 2746.
[10] 袁媛, 李招权, 司维柯, 等. Wnt5a 与髓细胞白血病发生关系的研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(21): 2056 - 2059.
[11] Thiago L S, Costa E S, Lopes D V, *et al*. The Wnt signaling pathway regulates Nalm-16 b-cell precursor acute lymphoblastic leukemic cell line survival and etoposide resistance[J]. Biomed Pharmacother, 2010, 64(1): 63 - 72.
[12] 上海市中美联合白血病协作组. 上海市成人急性白血病 572 例世界卫生组织分型的临床研究[J]. 中华血液学杂志, 2007, 28(7): 444 - 448.
[13] Wakui M, Kuriyama K, Miyazaki Y, *et al*. Diagnosis of acute myeloid leukemia according to the WHO classification in the Japan Adult Leukemia Study Group AML-97 protocol[J]. Int J Hematol, 2008, 87(2): 144 - 151.
[14] 曾智杰, 欧阳文婷, 孙艳虹, 等. 胸苷激酶 1 在白血病患者化疗过程中的临床意义探讨[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(1): 28 - 30.
[15] Jiang Y, Dunbar A, Gondek L P, *et al*. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML[J]. Blood, 2009, 113(6): 1315 - 1325.
[16] Rodrigues P C, Oliveira S N, Viana M B, *et al*. Prognostic significance of WT1 gene expression in pediatric acute myeloid leukemia [J]. Pediatr Blood Cancer. 2007, 49(2): 133 - 138.

(**收稿**:2009-12-24;**修回**:2010-03-18)
(编辑 汪勤俭)

(上接 1027 页)

2 结果

219 个周期共复苏胚胎 539 枚胚胎,存活 448 枚,胚胎复苏存活率为 83.1%,胚胎移植 219 个周期,移植胚胎(2.42 ± 0.31)枚,移植胚胎 448 枚,种植 113 枚,种植率 25.2%(113/448),移植后妊娠 94 例,妊娠率为 42.9%(94/219)。提前 18 h 复苏组种植率为 24.5%(52/212),临床妊娠率为 40.8%(42/103)。提前 2 h 复苏组种植率为 25.8%(61/236),临床妊娠率为 44.8%(52/116),两组间有差异,但无统计学意义($P>0.05$)。提前 18 h 复苏优胚组与提前 2 h 复苏优胚组在种植率(26.5% *vs* 30.6%)、患者年龄[(30.1 ± 3.7)岁 *vs*(30.7 ± 2.9)岁]、移植日子宫内膜厚度[(10.1 ± 1.1)mm *vs*(9.8 ± 1.9)mm]方面的差异不显著($P>0.05$),两组妊娠率的差异(43.7% *vs* 56.0%)显著($P<0.05$)。

提前 18 h 复苏非优胚组与提前 2 h 复苏非优胚组在种植率(21.3% *vs* 18.0%)、患者年龄[(31.2 ± 4.6)岁 *vs*(31.0 ± 3.9)岁]、移植日子宫内膜厚度[(9.9 ± 1.2)mm *vs*(9.8 ± 1.7)mm]方面的差异不显著($P>0.05$),两组妊娠率的差异(34.4% *vs* 24.4%)显著($P<0.05$)。

3 讨论

冷冻胚胎复苏移植是辅助生殖技术中较成熟的一项技术,可以充分利用新鲜移植后剩余的大量胚胎,提高了体外受精-胚胎移植的累积妊娠率,且不需要反复促排卵,减轻了患者的痛苦并节约了大量的资金。很多研究表明,患者年龄、胚胎冷冻前状况及复苏存活率是影响冷冻胚胎复苏移植结局的主要因素[4-6],也有学者认为延长复苏后体外培养时间,观察胚胎是否继续分裂并进行移植胚胎选择,可有助于进一步提高冷冻胚胎移植后妊娠率[7],但是在实际操作中这并不是十分适用。在本次研究中通过数据对比,可以看到将冷冻胚胎移植前 18 h 复苏与移植前 2 h 复苏所产生的种植率及临床妊娠率的差别并无统计学意义。而根据胚胎冷冻时的分裂状态,设定不同的移植前体外培养时间,所获得的种植率与临床妊娠率的差异有统计学意义。因此可以考虑移植时胚胎与子宫内膜的同步性应该是影响冷冻胚胎复苏移植妊娠率的另一主要因素[1]。因此建议当胚胎冷冻时卵裂球≥6,胚胎复苏应在移植前约 2 h 进行;若胚胎冷冻时卵裂球 <6,胚胎复苏应在移植前约 18 h 进行,使其有时间分裂至 6 ~ 8 细胞,达到胚胎第 3 天正常分裂状态,有利于胚胎与子宫内膜的一致,从而提高妊娠率。

参考文献:

[1] 李媛. 人类辅助生殖实验技术[M]. 北京:科学出版社, 2008: 139 - 140.
[2] 马学工,党小红,纪冰. 胚胎冷冻复苏移植技术的临床应用[J]. 青海医药杂志, 2008, 38(1): 41 - 42.
[3] 苗本郁,周灿权,方丛,等. 自然周期冷冻胚胎解冻移植临床分析[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2005, 26(5): 573 - 577.
[4] 李路,孙晓溪,陈军玲,等. 影响冷冻胚胎移植妊娠率相关因素分析[J]. 生殖与避孕, 2004, 24(4): 218 - 221.
[5] 余兰,王树玉,贾婵维,等. 冷冻胚胎解冻复苏的影响因素[J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14(8): 90 - 91.
[6] 何畏,俞炽阳,王凤英,等. 适当的降调节在体外受精-胚胎移植长方案治疗中的价值[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(21): 2081 - 2083.
[7] 李志强,李艳,田之莹,等. 胚胎复苏后体外孵育时间对妊娠结局的影响[J]. 中国医疗前沿,2008, 3(2): 29 - 30.

(**收稿**:2010-04-12;**修回**:2010-04-20)
(编辑 栾 嘉)