文章编号:1000-5404(2012)03-0261-04

论著

新基因 HA117 编码蛋白在儿童急性白血病中的表达及其临床意义

胡田田,徐酉华,沈亚莉,伍俞霓,郭改丽,王翠翠 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地)

[摘要] **目的** 探讨多药耐药新基因 HA117 编码蛋白在儿童急性白血病(acute leukemia, AL)患儿骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cells, BMMNC)中的表达及其临床意义。**方法** 将 67 例 AL 患儿分为初诊组、完全缓解组和未缓解组,10 例 ITP 患儿为对照组。应用免疫组织化学法检测 BMMNC 中 HA117 编码蛋白及 P-糖蛋白(P-gp)表达。**结果** HA117 编码蛋白在 AL 患儿中阳性表达率从低至高为:完全缓解组、初诊组、未缓解组,对照组呈阴性表达;初诊组中强阳性(+++)表达者其首次缓解(CR_1)率(16.67%)显著低于阴性表达组(94.74%)($P<0.01$)及中度表达组(87.50%)($P<0.05$);同一患儿中 HA117 编码蛋白表达与 P-gp 表达无相关性($\kappa=0.195$, $P>0.05$),两者均表达者 CR 率(30.00%)显著低于 $HA117^+/P\text{-}gp^-$、$HA117^-/P\text{-}gp^+$组(83.33%)($P<0.05$)及 $HA117^-/P\text{-}gp^-$组(94.44%)($P<0.01$)。**结论** HA117 编码蛋白的过表达与临床化疗耐药密切相关,是儿童 AL 预后的不利因素,且其耐药机制可能是独立的非 P-gp 介导的;HA117 编码蛋白与 P-gp 两者同时高表达提示预后不良。

[关键词] HA117 编码蛋白;急性白血病;多药耐药;P-糖蛋白
[中图法分类号] R733.71; R363.25; R730.43 [文献标志码] A

Expression of HA117 protein in bone marrow mononuclear cells in children with acute leukemia and its clinical significance

Hu Tiantian, Xu Youhua, Shen Yali, Wu Yuni, Guo Gaili, Wang Cuicui (Key Laboratory of Child Development and Disorders Cofounded by Chongqing and Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the expression of HA117 protein in bone marrow mononuclear cells (BMMNC) of children with acute leukemia (AL) and its clinical significance. **Methods** Sixty-seven AL children were divided into initial diagnosis group, complete remission group and non-remission group. Ten children with immune thrombocytopenia (ITP) served as a control group. Expression of HA117 protein and P-glycoprotein (P-gp) was detected with immunohistochemical methods. **Results** The HA117 protein was positively expressed in complete remission group, initial diagnosis group, non-remission group, and negatively expressed in control group. The first complete remission (CR_1) rate was significantly lower in initial diagnosis group and complete remission group or non-remission group than in control group (16.67% *vs* 94.74% and 87.50%, $P<0.01$ or $P<0.05$). No correlation was observed between the expressions of HA117 protein and P-gp in a same AL child (Kappa = 0.195, $P>0.05$). The CR rate of $HA117^+$ protein and $P\text{-}gp^+$ was significantly lower than that of $HA117^+/P\text{-}gp^-$ and $HA117^-/P\text{-}gp^+$ (30.00% *vs* 83.33% and 94.44%, $P<0.05$). **Conclusion** Over-expression of HA117 protein, which is closely correlated with clinical resistance to chemotherapy, is an unfavorable factor for the prognosis of AL children and its drug resistance may be mediated by the independent non P-gp. Over-expression of both HA117 protein and P-gp indicates a poor prognosis of AL children.

[**Key words**] HA117 protein; acute leukemia; multi-drug resistance; P-gp

Corresponding author: Xu Youhua, Tel:86-23-63638834, E-mail:xuyouhua054@hotmail.com

急性白血病是儿童时期最常见的恶性肿瘤,其治疗是以化疗为主的综合治疗。然而,多药耐药(multi-drug resistance, MDR)严重制约着儿童急性白血病化疗疗效,是造成化疗失败的主要原因。除 Mdr1 编码的 P-gp 高表达与白血病的多药耐药密切相关外,近年来还发现多种其他的多药耐药相关基因,其中,新基因

[通信作者] 徐酉华,电话:(023)63638834,E-mail:xuyouhua054@hotmail.com

HA117(基因库登录号 A Y210354)[1]是本课题组在多药耐药细胞株 HL-60/ATRA 中,运用抑制消减杂交及基因芯片技术发现的一种多药耐药新基因,该基因位于14号染色体上,是1条含有完整编码框长度为1 991 bp的基因序列。本课题组通过前期研究发现新基因 HA117 可能参与了儿童白血病的多药耐药[2]。本研究从蛋白水平探讨 HA117 编码蛋白在儿童急性白血病中的表达特点及其临床意义,并同时检测 AL 患儿骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cells, BMMNC)中 P-gp 的表达,明确 HA117 编码蛋白在儿童急性白血病耐药中的作用及其与 P-gp 表达的关系,以期为儿童急性白血病的治疗及预后评估提供新的线索。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2011年1-8月在重庆医科大学附属儿童医院血液科住院及门诊就诊患儿,共63例,骨髓标本67份。男性35例,女性28例,中位年龄6岁5个月(1个月28 d至15岁2个月)。以上病例均经临床、血象、骨髓象及免疫分型检测确诊。根据 MICM 综合分型(表1),分为急性淋巴细胞白血病标本48份($L_1$17例,$L_2$28例,$L_3$3例),急性非淋巴细胞白血病标本19份($M_1$2例,$M_2$7例,$M_3$5例,$M_5$4例,$M_7$1例)。

根据标本采集时期及 AL 患儿早期治疗反应评判标准,分为初诊组、完全缓解组和未缓解组,未缓解组指至少常规联合化疗1个疗程未达到缓解者。初诊组33例,其中22例接受治疗,10例放弃治疗,死亡1例;完全缓解组30例,其中3例收到初诊骨髓标本;未缓解组4例,其中有1例收到初诊骨髓标本。ALL 患儿采用 VDLD(长春新碱、柔红霉素、左旋门冬酰胺酶、地塞米松)方案诱导治疗;AML(除 M3)患儿采用柔红霉素、阿糖胞苷、依托泊苷(DAE)方案治疗,M3 采用全反式维甲酸(ATRA)联合柔红霉素(DNR)治疗。对照组10例,均为免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenic, ITP)患儿。

表1 67份标本 MICM 分型诊断和分组

骨髓标本	初诊组	完全缓解组	未缓解组	总计
ALL	24	22	2	48
AML	9	8	2	19
总计	33	30	4	67

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 HA117 多克隆抗体为本实验室保存;Mdr1 单克隆抗体购于美国 Biolegend 公司;即用型免疫组化 EliVision™ super 试剂盒购于福州迈新生物技术开发有限公司;DAB Kit 浓缩型 DAB 试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司;淋巴细胞分离液:天津灏洋生物制品科技有限公司产品。

1.2.2 标本处理 取骨髓液2 ml至肝素钠抗凝管中,生理盐水稀释2~3倍。Ficoll 淋巴细胞分离液(相对密度:1.077 g/ml)5 ml,2 000 r/min,离心20 min,分离出骨髓单个核细胞。调整细胞浓度为$(1\sim2)\times10^6$/ml制成悬浊液,均匀涂布于多聚赖氨酸包被的载玻片上,干燥后用4%多聚甲醛固定。存储于-20 ℃冰箱备用。

1.2.3 测定方法 取出备用玻片,室温下复温30 min。0.3% Triton X-100 渗透15 min,3%双氧水消除细胞内源性过氧化物酶,正常山羊血清封闭,滴加一抗4 ℃过夜,室温下复温30 min,二抗孵育,DAB 显色,苏木精染核,中性树胶封片观察。

1.3 结果判定标准

1.3.1 P-gp 阳性表达判断 典型的 P-gp 阳性表达为整个细胞膜为黄色或棕黄色。双盲法计数200个细胞,计算阳性细胞率,阳性细胞率≥10%作为 P-gp 阳性分界。

1.3.2 HA117 编码蛋白阳性表达判断 HA117 编码蛋白表达呈棕黄色或棕褐色为阳性;根据阳性细胞占全部细胞数的百分比,对 HA117 编码蛋白的表达水平进行分级:阳性细胞率<10%为阴性(-),10%~<25%为低度表达(+),25%~75%为中度表达(++),>75%为高度表达(+++);-~+为阴性表达,表示肿瘤细胞对该耐药基因介导的药物无耐药性,++~+++为阳性表达,表示肿瘤细胞对该耐药基因所介导的药物具有耐药性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件,样本率比较采用 χ^2 检验或 Fisher's 精确概率法;两独立样本的 t 检验;Kappa 检验判断两指标的关系。

2 结果

2.1 HA117 编码蛋白及 P-gp 在儿童急性白血病细胞中的表达

HA117 编码蛋白阳性产物在 AL 患儿 BMMNC 中主要定位在胞质和或胞膜,但在4例原始粒细胞白血病部分分化型(M2a)中 HA117 编码蛋白主要表达于胞核,见图1、2。图3显示 P-gp 主要表达定位于胞膜。

2.2 AL 患儿中 HA117 编码蛋白表达与化疗效果的关系

新基因 HA117 编码蛋白在 AL 患儿中的表达情况见表2,图4分别显示 HA117 蛋白呈中、强度表达。HA117 编码蛋白的表达在完全缓解组、初诊组、未缓解组依次递增,未缓解组阳性表达率(100.00%)显著高于初诊组(42.42%)及完全缓解组(16.67%)($P<0.05$, $P<0.01$),初诊组阳性表达率显著高于完全缓解组($\chi^2=4.95$, $P<0.05$),对照组中 HA117 编码蛋白呈阴性表达。

初诊组中,HA117 编码蛋白阳性表达14例,其中有11例接受治疗,首次缓解(CR_1)5例;阴性表达19例,11例接受治疗,$CR_1$10例,HA117 编码蛋白阳性组 CR_1率(45.46%)低于阴性组 CR_1率(90.91%),但两者比较其差异无统计学意义($P=0.063$)。14例呈阳性表达的患儿中有6例为强阳性(+++),呈强阳性表达的患儿其 CR_1率(16.67%)显著低于阴性(-~+)组(94.74%)及中度表达(++)组(87.50%),差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。

在 ALL 患儿中,初诊组与缓解组阳性表达率无显著差别($\chi^2=0.84$, $P>0.05$),AML 患儿初诊组 HA117 编码蛋白阳性表达率显著高于完全缓解组($P<0.05$)。

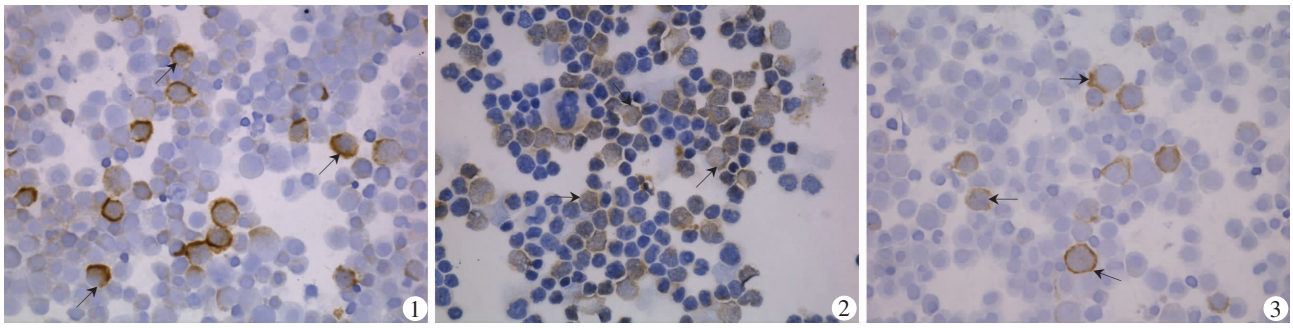


图 1　HA117 编码蛋白在 AL 患儿 BMMNC 中的表达　↑:细胞质和/或细胞膜　(S-P ×400)

图 2　HA117 编码蛋白在 AML-M2a 型白血病患儿 BMMNC 中的表达　↑:细胞核　(S-P ×400)

图 3　P-gp 在 AL 患儿 BMMNC 中的表达　↑:细胞膜　(S-P ×400)

表 2　儿童急性白血病 BMMNC 中 HA117 编码蛋白的表达(例数)

组别	阴性组		阳性组		合计
	−	+	++	+++	
初诊组	13	6	8	6	33
完全缓解组	17	8	5	0	30
未缓解组	0	0	2	2	4

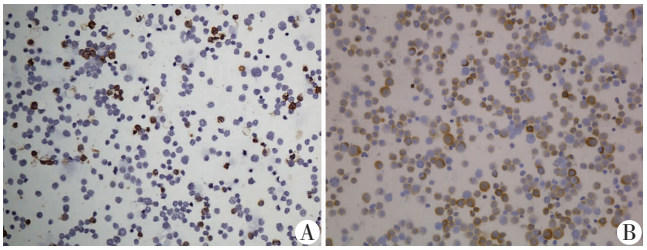


图 4　HA117 蛋白在 AL 患儿 BMMNC 中度(A)、强阳性(B)的表达　(S-P ×200)

2.3　初诊 AL 患儿 HA117 编码蛋白表达与临床特征的关系

HA117 编码蛋白的表达与性别、年龄、肝脾肿大程度、血清乳酸脱氢酶(LDH)水平,染色体是否异常,初诊时外周血白细胞绝对值计数,骨髓原始幼稚细胞比例,对泼尼松的反应均无相关性。初诊组中,AML 患儿 HA117 编码蛋白阳性表达率显著高于 ALL 患儿($P<0.05$);在 ALL 中,FAB 各亚型之间表达无差别($P>0.05$);因 AML 样本数量较少,故未进行 FAB 亚型间表达差异的统计。

2.4　AL 患儿中 HA117 编码蛋白表达与 P-gp 表达的关系

在 67 例 AL 患儿中,我们对其中 46 例同时进行了 P-gp 表达的检测,因样本量不足其余标本未进行检测。结果显示:在同一患儿中 HA117 编码蛋白与 P-gp 的表达情况如下:$HA117^+/P\text{-}gp^+$ 10 例、$HA117^-/P\text{-}gp^+$ 8 例、$HA117^+/P\text{-}gp^-$ 10 例、$HA117^-/P\text{-}gp^-$ 18 例,结果显示:HA117 编码蛋白与 P-gp 在同一患儿中的表达一致性较差($\kappa=0.195$, $P>0.05$)。10 例 $HA117^+/P\text{-}gp^+$ 患儿有 7 例未缓解,其缓解率(30.00%)显著低于 $HA117^+/P\text{-}gp^-$、$HA117^-/P\text{-}gp^+$ 组(83.33%)及 $HA117^-/P\text{-}gp^-$ 组(94.44%),差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。其中有 1 例患儿上述 2 种耐药蛋白均阴性,但是联合化疗 1 个疗程后,也未达到缓解。

3　讨论

MDR 是导致白血病化疗失败的主要原因,其产生是多因素、多机制综合作用的结果。本课题组在前期研究中对新基因 HA117 的耐药功能进行了探索,将 HA117 基因转染到白血病细胞株中,检测发现其对化疗药物的敏感性显著降低[1,3-4];通过构建重组腺病毒 Ad5-HAi5 沉默 HA117 基因表达后,检测到多种肿瘤细胞对化疗药物耐药性明显减弱或消失[5-6],证实新基因 HA117 的过表达可导致肿瘤细胞产生 MDR。车艳等[2]检测了 HA117 基因在儿童急性白血病 BMMNC 中的表达,结果显示 HA117 可能参与了白血病的多药耐药。

本研究从蛋白水平探讨了 HA117 编码蛋白在儿童急性白血病中的表达特点及其临床意义。研究结果显示:在 AL 患儿中,HA117 编码蛋白阳性表达率从高到低依次为:未缓解组,初诊组,完全缓解组。在初诊患儿中,HA117 编码蛋白阳性组的 CR_1 率低于阴性表达组,虽无统计学意义($P=0.063$),但趋势较明显,可能与部分患儿放弃治疗,导致参与治疗的患儿较少有关;HA117 编码蛋白强阳性表达组其 CR_1 率显著低于阴性组及中度表达组。综上所述,可推测新基因 HA117 编码蛋白的高表达与临床化疗耐药密切相关,是影响儿童白血病化疗疗效及临床缓解的因素之一。此外,我们发现,在初诊 AL 患儿中,AML 组 HA117 编码蛋白的阳性表达率显著高于 ALL 组,且 AML 患儿初诊组中该蛋白阳性表达率显著高于完全缓解组,而在 ALL 患儿中,初诊组与完全缓解组阳性表达率却无差别,推测新基因 HA117 可能在儿童急性髓系白血病细胞耐药的产生中发挥着更显著的作用,这与临床上

儿童 AML 缓解率低,难治复发率高相符,但因本组 AML 例数较少,尚需进一步研究证实。

P-gp 是公认的经典的多药耐药蛋白,在儿童急性白血病中,P-gp 的表达是独立的与复发及生存预后相关的不利参数[7]。本研究同时检测了 HA117 编码蛋白与 P-gp 在 AL 患儿 BMMNC 中的表达,在 $HA117^+/P\text{-}gp^+$ 组化疗疗效显著差于 $HA117^+/P\text{-}gp^-$、$HA117^-/P\text{-}gp^+$ 组及 $HA117^-/P\text{-}gp^-$ 组患儿,推测 2 种蛋白同时高表达预示着预后不良。在初诊组中,7 例 $HA117^+/P\text{-}gp^-$ 患儿中有 3 例未缓解,说明 P-gp 阴性的患者中 HA117 编码蛋白的表达可能是引起 MDR 产生的又一因素,且其耐药的产生可能是独立的非 P-gp 介导的。此外,其中有 1 例患儿上述 2 种耐药蛋白表达均阴性,但是联合化疗 1 个疗程后,也未达到缓解,推测可能存在其他的耐药途径。

本课题组前期对新基因 HA117 的耐药机制进行了初步探索,将 HA117 基因转染 K562、Jurkat 细胞株使其高表达后,未见有明显的药物外排泵功能[8]。且在本研究中发现,HA117 编码蛋白主要表达在胞质部位,而 P-gp 是一种膜表面糖蛋白[9-10],其耐药机制与细胞膜的药物转运有关[10-12],因此推测,新基因 HA117 的多药耐药功能可能不是遵循 mdr1 经典的药物外排泵机制。此外,已证实该基因编码的碱性蛋白含有 4 个与蛋白激酶磷酸化相关的功能位点,其功能结构域与新近发现的参与调控细胞凋亡的重要基序“PYRIN”同源[13-14],推测新基因 HA117 可能通过抑制细胞凋亡的途径使瘤细胞产生多药耐药性。我们还观察到在 4 例 M2a 型白血病患儿中,HA117 编码蛋白主要表达于胞核,其中有 2 例患儿联合化疗 1 个疗程后未缓解,因样本例数较少,需增加样本量,进一步研究蛋白表达部位与预后的关系,并明确在 M2a 型白血病中该蛋白是否存在特殊的耐药机制。

肿瘤细胞耐药是多基因参与的、涉及多种基因产物的复杂调控过程,新基因 HA117 的发现将会是对耐药相关基因谱的重要补充。关于 HA117 的研究也逐步深入[15-16],本研究从蛋白水平证实了新基因 HA117 参与了儿童急性白血病的多药耐药,是影响儿童白血病化疗疗效及临床缓解的因素之一,通过检测其表达可以了解患儿肿瘤细胞耐药情况,为儿童急性白血病的个体化用药及预后评估提供指导。同时,进一步研究新基因 HA117 介导的多药耐药形成机制,寻求有效的逆转策略,将会对儿童白血病的临床治疗产生积极影响。

参考文献:

[1] 郭玉霞, 罗庆, 徐酉华. 耐药相关新基因 HA117 的克隆及重组腺病毒制备[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(6): 641-644.

[2] 车艳, 徐酉华, 郑改焕, 等. 新基因 HA117 在儿童急性白血病中的表达及其临床意义[J]. 四川大学学报: 医学版, 2009, 40(5): 873-876.

[3] 郭玉霞, 金先庆, 罗庆, 等. 重组腺病毒 Adeasy-HA117 载体的构建及其在 K562 细胞的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2009, 44(3): 513-516.

[4] 郭玉霞, 金先庆, 罗庆, 等. 腺病毒介导的新基因 HA117 对 Jurkat 细胞多药耐药功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(16): 1556-1558.

[5] 郑改焕, 金先庆, 罗庆, 等. 新基因 HA117 最佳 siRNA 的筛选及重组腺病毒构建[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(7): 641-643.

[6] 郑改焕. 新基因 HA117 在肿瘤细胞株及裸鼠体内的耐药功能研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2009.

[7] Dhooge C, De-Moerloose B. Clinical significance of P-glycoprotein (P-gp) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. Results of a 6-year prospective study[J]. Adv Exp Med Biol, 1999, 457: 11-19.

[8] Zhao L, Jin X, Xu Y, *et al*. Functional study of the novel multidrug resistance gene HA117 and its comparison to multidrug resistance gene 1[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29: 98.

[9] Nooter K, Sonneveld P. Clinical relevance of P-glycoprotein expression in haematological malignancies[J]. Leuk Res, 1994, 18(4): 233-243.

[10] Zaman G J, Flens M J, van-Leusden M R, *et al*. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(19): 8822-8826.

[11] Abbaszadegan M R, Futscher B W, Klimecki W T, *et al*. Analysis of multidrug resistance-associated protein (MRP) messenger RNA in normal and malignant hematopoietic cells[J]. Cancer Res, 1994, 54(17): 4676-4679.

[12] 蔺涛. 肿瘤多药耐药的研究进展[J]. 海南医学, 2006, 17(12): 140-142.

[13] Manji G A, Wang L, Geddes B J, *et al*. PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B[J]. J Biol Chem, 2002, 277(13): 11570-11575.

[14] Wu G Q, Liao Y J, Qin Z Q, *et al*. PYRIN domain of NALP2 inhibits cell proliferation and tumor growth of human glioblastoma[J]. Plasmid, 2010, 64(1): 41-50.

[15] 陈建飞,金先庆,丁雄辉, 等. 新耐药基因 HA117 多克隆抗体的制备与鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(11): 1128-1131.

[16] 郑改焕, 金先庆, 郭玉霞, 等. 新基因 HA117 在淋巴瘤细胞中的耐药相关功能研究[J]. 肿瘤, 2009, 29(4): 315-318.

(**收稿**:2011-10-16;**修回**:2011-11-03)

(编辑 王 红)