DOI:10.16016/j.1000-5404.201601160

血清 uPA 蛋白水平与急性髓系白血病的预后有关

廖 君,王晓果,孔佩艳,张 曦,易 海,朱丽丹,刘 耀,张 诚,高 蕾 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军血液病中心)

[摘要] **目的** 探索尿激酶纤溶酶原激活物(urokinase type plasminogen activator, uPA)在急性髓系白血病(acute myeloid leukemia,AML)患者血清中的表达及与预后的关系。**方法** 采用酶联免疫吸附的方法检测 45 例初始治疗前 AML 患者及 10 例健康体检者血清 uPA 蛋白表达水平,分别对其中 25 例预后不良组、10 例预后良好组、10 例预后中等组患者及 10 例正常对照组血清 uPA 蛋白表达水平进行统计学分析比较。**结果** 初始治疗前 AML 患者血清 uPA 蛋白表达水平明显高于正常对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);预后不良组 AML 患者血清 uPA 蛋白表达水平明显高于预后良好组及预后中等组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** uPA 蛋白的表达与 AML 患者危险分层密切相关,监测 AML 患者血清 uPA 蛋白表达水平有助于早期判断 AML 患者的预后。

[关键词] 尿激酶纤溶酶原激活物;急性髓系白血病;预后
[中图法分类号] R341; R730.43; R733.71 [文献标志码] A

Serum urokinase type plasminogen activator is related to prognosis of acute myeloid leukemia

Liao Jun, Wang Xiaoguo, Kong Peiyan, Zhang Xi, Yi Hai, Zhu Lidan, Liu Yao, Zhang Cheng, Gao Lei (Center of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] Objective To determine the level of urokinase type plasminogen activator(uPA) in the serum of patients with acute myeloid leukemia(AML) and investigate its correlation with the prognosis of the disease. Methods Serum uPA protein level was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in 45 untreated AML patients (including 25 poor prognosis patients, 10 favorable prognosis patients and 10 moderate prognosis patients) and 10 healthy subjects, and the results were compared and analyzed among the groups. Results The serum level of uPA protein was significantly higher in AML patients than healthy subjects($P<0.05$). A significant increase of serum uPA levels was found in poor prognosis AML patients compared to other control groups($P<0.05$). Conclusion The serum level of uPA has a close relationship with the risk stratification of AML. Monitoring the serum uPA level is helpful for early prognostic prediction in newly diagnosed AML patients.

[**Key words**] urokinase type plasminogen activator; acute myeloid leukemia; prognosis

Supported by the Project of "Eleventh Five-year Plan" of National Key Technology R&D Program (2009BAI85B02). Corresponding author: Kong Peiyan, E-mail: peiyankong@163.com

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia,AML)是一类造血干/祖细胞的恶性克隆性疾病,是成人急性白血病中最常见的类型。随着新的治疗手段的发展,约有 80% 的 AML 患者能获得初治血液学完全缓解,余下的 20% 仍然是临床治疗的难题,其治疗反应与患者年龄、体能状态、染色体核型、白细胞计数、细胞遗传学异常等密切相关。有报道指出尿激酶纤溶酶原激活物(urokinase type plasminogen activator, uPA)蛋白在多种肿瘤患者血清中高表达,参与肿瘤的发生、发展、浸润转移、血管生成及化疗耐药等,导致肿瘤患者的不良

[基金项目] "十一五"国家科技支撑计划项目(2009BAI85B02)
[通信作者] 孔佩艳,E-mail:peiyankong@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160422.1533.019.html(2016-04-22)

预后[1-2]。在 AML 患者血清中,uPA 蛋白的表达水平也较正常对照组明显升高,该蛋白不仅参与了白血病细胞的髓外浸润转移,还与 AML 患者出血并发症的发生密切相关[3]。然而,uPA 蛋白与 AML 预后之间的关系至今仍不明确。本研究采用双抗体夹心 ELISA 方法检测初治 AML 患者血清 uPA 蛋白表达量,探讨 uPA 蛋白与预后不良 AML 的关系,希望为 AML 患者带来新的预后判断标志。

1 材料与方法

1.1 研究对象及分组

收集第三军医大学新桥医院全军血液病中心 2014 年 10 月至 2015 年 8 月住院的初诊 AML(非急性早幼粒细胞白血病)患者 45 例,年龄 14 ~66(39.68 ± 2.60)岁,包括男性 21 例、女性 24 例。其中 25 例为预后不良组(含 M1、M6 各 3 例,M2、M4 各 7 例,M5 5 例),10 例为预后中等组(含 M2 5 例,M4、M5 各 2 例,M6 1 例),10 例为预后良好组(含 M2 6 例,M4、M5 各 2 例)。记录其临床资料并收集其初始治疗前血清,另外从到本院体检的健康人群中(指血常规、肝肾功、电解质、血糖、血脂等均正常)选取 10 名志愿者,年龄 23 ~48(36.2 ±8.6)岁,男性 6 名、女性 4 名。所有研究对象均知情同意。对以上 45 例初诊的 AML 患者采用 MA、TA、TAE(M: 米托蒽醌,A: 阿糖胞苷,T: 吡柔比星,E: 依托泊苷)为主的方案化疗。初始化疗未缓解的患者,根据骨髓原始细胞下降比例(marrow blast decrease index,MBDI)继续选择原方案或者调整其它方案化疗,包括 FLAG 方案[FI:氟达拉滨,A:阿糖胞苷,G:粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor,G-CSF)],CEAG 方案(C:阿克拉霉素,E:依托泊苷,A:阿糖胞苷,G:G-CSF)。所有患者诊断及预后分层参照成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2011 年版)[4]和张之南主编的《血液病诊断及疗效标准》[5]。

1.2 主要试剂和仪器

Human uPA ELISA Kit 购自美国 RayBiotech 公司,酶标仪为美国 Thermo 公司生产的 Varioskan Flash 酶标仪。

1.3 标本采集与保存

采用非抗凝管抽取初治 AML 患者和健康志愿者外周静脉血 3 mL,室温放置 30 ~60 min 后,3000 r/min 离心 10 min,然后将血清分装入 0.5 mL Eppendorf 管中,-80 ℃低温冷冻备用。

1.4 检测方法

按照试剂盒说明书进行。分别设空白孔,标准品孔和样品孔。在 uPA 抗体包被板上合适的孔内加入稀释好的标准品及样品 100 μL,轻轻晃动混匀后 4 ℃过夜。弃去液体,甩干后加入洗涤液,振荡 30 s,甩去液体,重复 4 次。每孔加入酶标试剂 100 μL,轻晃混匀,37 ℃温育 30 min。弃去液体,甩干后加入洗涤液,振荡 30 s,甩去液体,重复 5 次。每孔依次加 100 μL 生物素化的抗体室温孵育 1 h。弃去液体,重复洗涤(同前)。每孔依次加 100 mL 链霉亲和素溶液,轻轻摇晃室温孵育 45 min。重复洗涤。加入底物试剂 100 μL 轻晃混匀,室温避光 30 min,取出酶标板,每孔加入终止液 50 μL,终止反应。上机检测,以空白孔调零,在 450 nm 波长下测量各孔 D(450)值。根据标准孔浓度和对应的 D(450)值计算标准回归方程,再根据样品的 D(450)值在回归方程上算出对应样品浓度。

1.5 统计学分析

统计学处理应用 SPSS 18.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两组间比较采用 t 检验,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 初始治疗前 AML 患者与健康对照组血清 uPA 蛋白表达

初始治疗前 AML 患者外周血血清 uPA 蛋白表达水平为(702.30 ± 52.00)pg/mL,健康对照组外周血血清 uPA 蛋白表达水平为(228.30 ± 28.03)pg/mL,二者比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 不同预后组 AML 患者初始治疗前血清 uPA 蛋白表达

预后不良组、预后中等组、预后良好组 AML 患者初始治疗前血清 uPA 蛋白水平分别为(938.80 ± 52.59)、(468.60 ± 64.45)、(344.80 ± 33.04)pg/mL;预后不良组 AML 患者血清 uPA 蛋白表达水平明显高于预后良好组及预后中等组,差异具有统计学意义($P<0.05$);预后中等组与预后良好组 AML 患者血清 uPA 蛋白水平差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

随着细胞毒药物、靶向治疗及造血干细胞移植术的发展,AML 临床疗效及总体生存率得到了明显提高,但难治性 AML 因其自身特点化疗耐药、完全缓解率低、并发症多、生存期短,仍然是临床治疗的难题,其中位生存期短于 1 年[6]。

uPA 是由成纤维细胞、单核细胞、中性粒细胞、肿瘤细胞等合成和分泌的一种丝氨酸蛋白水解酶,通过与其特异性受体 uPAR 结合而活化,参与许多病理生

理调节过程,包括创伤后组织修复、组织再生、血管生成、炎症及肿瘤的发生发展等。大量证据表明:uPA 在许多恶性肿瘤中高表达,其表达的上调与肿瘤细胞的增殖、粘附、迁移、侵袭、转移、肿瘤血管生成及化疗耐药等密切相关[2]。正因为其在实体肿瘤中广泛而肯定的作用,靶向 uPA 的治疗[7],包括 uPA 抗体、uPA 抑制剂及一些中药抗 uPA[8]的研究等也成为了当前研究的热点。近年来,uPA 蛋白的表达与血液系统疾病之间的关系也逐渐被认识。在复发及发生了远处转移的 AML 患者血清中,uPA 蛋白表达明显上调。uPA 蛋白在 AML 患者血清中的表达还与 FAB 分型有关,在单核细胞亚型(M4、M5)中表达最高[9],这一结论在本研究中得到了进一步证实。文献[10]报道,uPA 基因包含了一段与转录因子 RUNX/AML 家族相同的染色体 13 bp 回文结构,提示 uPA 可能与 AML 的发病有关。作为纤溶系统主要成分之一,uPA 蛋白一方面通过调节基底膜、细胞外基质降解,促进肿瘤细胞的黏附、髓外侵袭及转移,导致患者皮肤黏膜的浸润、肝脾淋巴结肿大、中枢神经系统受累等。另一方面,uPA 蛋白通过激活纤溶系统导致纤溶亢进,促进 AML 患者出血并发症的发生[4]。然而,uPA 蛋白与 AML 患者预后之间的关系至今仍不明确。

本课题组前期应用蛋白芯片技术对 AML 患者血清 507 种蛋白表达进行检测时发现,uPA 蛋白是预后良好组与预后不良组的差异表达分子[11]。为了进一步验证我们前期蛋白芯片结果及探索 uPA 蛋白表达与 AML 预后之间的关系,在本研究中,我们首先用 ELISA 法检测了收集的初治 AML 患者及健康体检者外周血血清 uPA 蛋白表达量,再对其中预后不良组、预后中等组、预后良好组 AML 患者血清 uPA 蛋白水平与正常对照组进行统计学分析,分组标准参照《成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2011 年版)》,结果提示 uPA 蛋白在 AML 患者血清中的表达明显高于正常对照组;uPA 蛋白在预后不良组 AML 患者血清中的表达明显高于预后良好组及预后中等组。本课题组提出了 uPA 蛋白表达与 AML 不良预后有关,为 AML 患者提供了新的预后判断标志,为个体化治疗选择提供可靠的方法和依据。但是,由于样本含量较少,失访率高,本研究尚有许多不足之处,我们只是初步验证了前期蛋白芯片结果,主要着眼于对现象的观察,而未对 uPA 蛋白导致 AML 患者不良预后的具体作用机制进行深入探讨。uPA 蛋白是否参与了 AML 患者的染色体突变、化疗耐药、疾病复发?

总之,在接下来的研究中,我们将扩大样本含量,延长随访时间,进一步验证 uPA 蛋白与 AML 预后之间的关系;我们将在细胞实验中深入探索 uPA 蛋白在难治性 AML 中的具体作用机制,为 AML 患者的诊疗提供新的思路。

参考文献:

[1] 李竹林, 朱明才, 董蒲江. 结肠癌中 vegf-d 和 upa 的表达与侵袭转移的关系[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(22): 2146 – 2149. DOI: 10.3321/j.issn: 1000-5404.2008.22.024

[2] Mekkawy A H, Pourgholami M H, Morris D L. Involvement of urokinase-type plasminogen activator system in cancer: an overview[J]. Med Res Rev, 2014, 34(5): 918 – 956. DOI: 10.1002/med.21308

[3] 刘宝芹, 邵雪斋, 方艳秋. 急性髓系白血病中 uPA 和 uPAR 的表达及意义[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(5): 891 – 892. DOI: 10.3969/j.issn.1007-4287.2011.05.045

[4] 中华医学会血液学分会. 成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2011 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(11): 804 – 807. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2011.11.021

[5] 卞寿庚. 急性髓系白血病[M]//张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007: 106 – 116.

[6] Ravandi F, Ritchie E K, Sayar H, *et al*. Vosaroxin plus cytarabine versus placebo plus cytarabine in patients with first relapsed or refractory acute myeloid leukaemia (VALOR): a randomised, controlled, double-blind, multinational, phase 3 study[J]. Lancet Oncol, 2015, 16(9): 1025 – 1036. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00201-6

[7] 廖君, 孔佩艳. 以尿激酶型纤溶酶原激活物系统为靶点治疗肿瘤的研究进展[J]. 中国药房, 2015, 26(14): 1880 – 1884. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.14.03

[8] 陈杰, 庞江琳, 覃燕梅, 等. 半边旗有效成分 5F 对人小细胞肺癌 NCIH446 细胞毒性、侵袭能力、运动能力及 MMP-9、uPA 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(4): 361 – 363.

[9] Scherrer A, Wohlwend A, Kruithof E K, *et al*. Plasminogen activation in human acute leukemias[J]. Br J Haematol, 1999, 105(4): 920 – 927. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1999.01432.x

[10] Kopf E, Miskin R. A RUNX/AML-binding motif residing in a novel 13-bp DNA palindrome may determine the expression of the proximal promoter of the human uPA gene[J]. J Thromb Haemost, 2005, 3(9): 2057 – 2064. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01510.x

[11] 朱丽丹, 孔佩艳, 张曦, 等. 蛋白芯片用于筛选急性髓系白血病患者血清标志物的初步研究[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(3): 110 – 115.

(**收稿**:2016-01-28;**修回**:2016-04-10)

(编辑 郭建秀)