恶性肿瘤的诊断与治疗 文章编号：0253-3626（2011）05-0527-04

发育相关基因在儿童急性淋巴细胞白血病中的表达及意义

龙 娟[1]，邓山鹰[2]，涂植光[1]，邹 琳[3]

（1. 重庆医科大学教育部临床检验诊断学重点实验室，重庆 400016；2. 四川大学华西医院实验医学科，成都 610041；
3. 重庆医科大学附属儿童医院临床分子医学中心，重庆 400014）

【摘 要】目的：探讨发育相关基因在儿童急性淋巴细胞白血病（Acute lymphoblastic leukemia, ALL）患者中的表达及其与临床特征的关系。方法：采用实时荧光定量 RT-PCR 方法检测 125 例初发 ALL 患儿（ALL 组）骨髓样本中 Notch1、Wnt3a 和 β-catenin 的 mRNA 表达量，并与临床特征进行相关分析。对照组（Normal control，NC）为 20 例非恶性血液病且骨髓正常患儿。结果：Notch1、Wnt3a 和 β-catenin 的 mRNA 在 ALL 患儿和对照组患儿骨髓中均有表达。与对照组相比，ALL 组中 Notch1 mRNA 表达水平均明显降低（$P<0.05$），β-catenin mRNA 表达水平明显增高（$P<0.05$），而 Wnt3a 的表达与对照组相比无统计学差异（$P>0.05$）。Notch1 的表达在 T 淋巴细胞白血病组高于对照组（$P<0.05$），而在 B 淋巴细胞白血病组则低于对照组（$P<0.05$）；此外，β-catenin 的表达与患儿高危年龄（<1 岁或 >10 岁）及外周血高白细胞数（$\geq 50\times10^9$ 个/L）等临床特征相关（$P<0.05$），与性别、FAB（Franch-American-Britain，FAB）分型、免疫分型及临床危险分级无关（$P>0.05$）。结论：儿童 ALL 患者中 Notch1 和 β-catenin 的表达异常，提示其可能与儿童 ALL 的发生发展存在密切的关系；β-catenin 基因的高表达可能提示预后不良。Notch1 和 β-catenin 基因检测，有望成为 ALL 诊断和治疗的新靶点。

【关键词】Notch1；Wnt3a；β-catenin；急性淋巴细胞白血病；儿童

【中国图书分类法分类号】R725.5 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-03

The expression and significance of developmental related genes in childhood acute lymphoblastic leukemia

LONG Juan, DENG Shan-ying[2], TU Zhi-guang[1], ZOU Lin[3]

(1. Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of the Education Ministry; 2. Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University; 3. Center of Clinical Molecular Medicine, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expressions of developmental related genes and their relationship with clinical features and prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Methods*: The mRNA expressions of Notch1, Wnt3a and β-catenin genes were detected by quantitative real-time RT-PCR in bone marrow mononuclear cells from 125 patients with newly diagnosed childhood ALL (ALL group), and analyzed the correlation to clinical characteristics (age, gender, WBC count, FAB classification, immunophenotype and clinical risk stratification). Twenty sex-and age-matched patients without malignant hematological diseases enrolled in this study as the control group. *Results*: The mRNA expressions of Notch1, Wnt3a and β-catenin were detected in all the bone marrow samples of childhood ALLs and control patients. Compared with the control group, mRNA expressions of Notch1 gene were remarkably lower ($P<0.05$), but the expressions of β-catenin gene were much higher ($P<0.05$) in ALL group. However, expressions of Wnt3a mRNA had no significant difference between ALL and control group ($P>0.05$). The expressions of Notch1 gene were higher in T-ALL than control group ($P<0.05$), and were lower in B-ALL than control group ($P<0.05$). In addition, the high expressions of β-catenin gene were significantly associated with age (<1 or >10 years) and higher leukocyte count ($\geq 50\times10^9$/L) ($P<0.05$), and were not associated with either of gender, FAB classification, immunophenotype and clinical risk stratification ($P>0.05$). *Conclusion*: The abnormal expressions of Notch1 and β-catenin in childhood ALL might play an important role in the pathogenesis of childhood ALL. The high expressions of β-catenin gene might be associated with poor prognosis in childhood ALL. Examination of Notch1 and β-catenin mRNA might be a new target for diagnosis and treatment of childhood ALL.

【Key word】Notch1; Wnt3a; β-catenin; acute lymphoblastic leukemia; child

作者介绍：龙 娟（1984-），女，硕士，
研究方向：儿童白血病预后与机制研究。

通信作者：邹 琳，女，研究员，Email: zoulin_74@ yahoo.com.cn。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：90919013，30871103）；重庆市自然科学基金资助项目（编号：2008BB5072，2010BA5008）。

白血病是儿童最常见的肿瘤性疾病，其中急性淋巴细胞白血病（Acute lymphoblastic leukemia，ALL）占儿童白血病的75%以上，严重威胁着儿童的健康[1]。近年来随着对白血病的深入研究和化疗方案的改进，儿童 ALL 5 年无病生存率可达70%~80%，但仍有部分患儿对化疗不敏感。因此更准确地早期诊断和评估预后，对制定个体化化疗方案具有重要意义。

近年来研究表明 Notch 信号通路在细胞发育、增殖、分化、凋亡及肿瘤发生等病理生理过程中起重要作用[2,3]。Notch 信号通路，尤其 Notch1 蛋白的表达与白血病、淋巴瘤的发病密切相关[4,5]。此外，Wnt/β-catenin 信号转导途径异常与白血病细胞异常增殖有关，β-catenin 是其中重要的信号传递因子[6]，可能与 ALL 进展有一定联系。这些发育相关基因在实体瘤中的报道较多，而在儿童急性白血病方面，目前国内报道甚少。因此，我们采用实时荧光定量 PCR 方法检测了 Notch1、Wnt3a 和 β-catenin 在 125 例初诊 ALL 患儿的表达，旨在初步研究它们在儿童白血病发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

病人样本来源于重庆医科大学附属儿童医院血液科 2008 年 1 月-2010 年 1 月收治的 125 例初诊 ALL 患儿，其中男 70 例，女 55 例，年龄 1 月~15 岁，平均年龄 5.9 岁，其年龄、性别构成比与实际患病比例一致[1]。所有患者均为首次发病未经治疗，并且均经过骨髓细胞形态学、免疫学、遗传学和分子生物学等检查确诊，符合 MICM（Morphology-immunology-cytogenetics-molecular）诊断标准[7]，且幼稚细胞比例≥90%。同时调查临床相关资料。收集骨髓单个核细胞，-80℃保存备用。以非恶性血液病患儿骨髓 20 例作为对照（Normal control，NC）组，男 12 例，女 8 例，年龄 1 月 ~11 岁，平均年龄 5.2 岁，其中特发性血小板减少性紫癜 12 例，缺铁性贫血 7 例，感染性疾病 1 例。RNA 提取 Trizol 试剂和SYBR Green 荧光定量 RT-PCR 试剂盒均为 Takara 公司产品；PCR 引物由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 骨髓单个核细胞的分离 患者于初诊时无菌操作抽取骨髓 2 ml，EDTA-Na_2 抗凝。抗凝骨髓加入等量的 Hank's 液，采用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离单个核细胞。

1.2.2 荧光定量 RT-PCR 实时荧光定量 RT-PCR 检测 Notch1、Wnt3a 和 β-catenin mRNA 表达。以 Trizol 试剂提取总 RNA，用核酸分析仪检测含量，$OD_{260\,nm/280\,nm}$ 比值均在 1.8~2.0。各标本 1 μg 总 RNA 分别逆转录合成 cDNA，采用 SYBR Green Ⅰ 荧光染料实时定量 PCR 方法检测 Notch1、Wnt3a 和 β-catenin mRNA 的表达，以 GAPDH 作为内参基因。引物序列分别为 Notch1：上游引物：5'-AAACAAGTGAAAGCATATGGGT-3'，下游引物：5'-CCTGAAACAAAGATTCATGATT-3'；Wnt3a：上游引物：5'-CCACGCCATTGCCTCAG-3'，下游引物：5'-CACCATCCCACCAAACTCG-3'；β-catenin：上游引物：5'-CGAGGACTCAATACCATTCC-3'，下游引物：5'-AGCCGTTTCTTGTAGTCCTG-3'；GAPDH：上游引物：5'-CATGAGAAGTATGAC-AACAGCCT-3'，下游引物：5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3'。反应在 Gene-Rotor 6000 荧光定量 PCR 仪上进行。PCR 反应总体系为 25 μl，其中包括 cDNA 2 μl，SYBR mix 12.5 μl，10 pmol/L 的上下游引物各 1 μl，去离子水补足至 25 μl。反应条件为：预变性 94℃，1 min →变性 94℃，10 s；退火 56℃，20 s；延伸 72℃，30 s，40 个循环，在延伸步骤采集荧光。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值表示基因相对表达量[8]，其中 $-\Delta\Delta CT = -(CT_{目标基因} - CT_{GAPDH})$，柱形统计图结果表示为各组目标基因/GAPDH 与正常对照组相比的倍数。

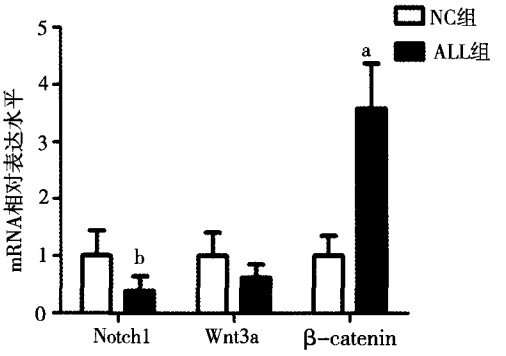
1.3 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理，各基因表达呈非正态分布，数据采用中位数和四分位数间距表示，两组间比较采用 Mann-Whitney 检验，多组间比较采用 Kruskall-Wallis 检验，多因素分析采用多元线性回归分析模型。$P<0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 骨髓中 Notch1、Wnt3a 和 β-catenin mRNA 水平的表达

ALL 组与对照组患儿年龄、性别、红细胞数及血小板数组间按 $\alpha=0.05$ 水准差异无统计学意义，具有可比性。与相应对照组相比，ALL 组患儿 Notch1 mRNA 的表达水平降低 2.6 倍（$P<0.01$），β-catenin 的表达水平增高 3.6 倍（$P<0.05$），而 Wnt3a 在 ALL 组和对照中的表达水平的差异无统计学意义（$P>0.05$）。见图 1。

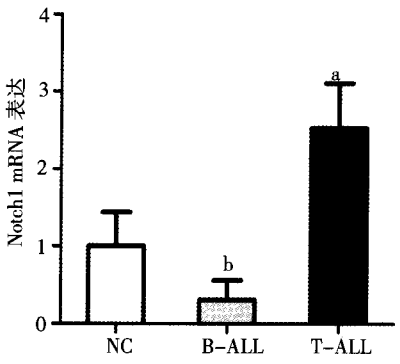


所有 ALL 患者和对照组患者骨髓 Notch1、Wnt3a 和 β-catenin mRNA 水平的比较；与 NC 组比较，a：$P<0.05$，b：$P<0.01$

图 1 ALL 及对照骨髓细胞中 Notch1、Wnt3a 和 β-catenin mRNA 的表达

2.2 Notch1 mRNA 的表达与儿童 ALL 免疫分型的关系

Notch1 mRNA 表达水平在 T 淋巴细胞型 ALL 中是明显高于对照组（$P<0.05$），但在 B 淋巴细胞型 ALL 中则明显低于对照组的（$P<0.01$）（见图 2）。并且在 B 细胞型 ALL 中，普通型 B-ALL、早前 B-ALL 及成熟型 B-ALL 各免疫亚型间，Notch1 的表达无统计学差异（$P>0.05$）。



B-ALL：B 细胞型 ALL；T-ALL：T 细胞型 ALL；与 NC 组比较，a：$P<0.05$，b：$P<0.01$

图 2　ALL 各免疫亚型及对照组中 Notch1 mRNA 表达的比

2.3　β-catenin mRNA 的表达与儿童 ALL 临床特征及分型的关系

β-catenin mRNA 的表达与年龄和外周血白细胞数有关，在患儿高危年龄 <1 岁或 >10 岁组[9]呈高表达，且高于 1~10 岁组（$P<0.05$），而在外周血高白细胞数（$\geq 50\times10^9$ 个/L）组中的表达水平也高于低白细胞组（$<50\times10^9$ 个/L）（$P<0.05$）。但是，β-catenin 的表达与性别、FAB（Franch-American-Britain）分型、免疫分型及临床危险分级无关（见表 1）。

表 1　β-catenin mRNA 的表达与儿童 ALL 临床特征的关系

组别	例数	β-catenin mRNA 表达	
		相对表达水平[P50（P25~P75）]	*P*
年龄			
<1岁	3	43.34（2.36~84.31）	
1~10岁	99	5.48（0.82~25.28）	
>10岁	23	17.89（2.53~56.36）	0.019
性别			
男	70	4.11（0.83~31.95）	
女	55	9.30（1.33~34.48）	0.260
外周血白细胞计数			
$\geq50\times10^9$ 个/L	28	12.21（0.90~109.72）	
$<50\times10^9$ 个/L	97	5.12（1.12~24.21）	0.023
FAB 分型			
L1 型	34	9.05（2.90~65.92）	
L2 型	78	3.97（0.85~30.14）	
L3 型	13	12.28（1.06~34.97）	0.283
免疫分型			
T 细胞型	13	34.48（1.11~84.31）	
B 细胞型	112	6.10（1.11~28.99）	0.278
临床分型			
低危型	60	4.49（0.78~19.37）	
中危型	32	14.46（2.42~62.08）	
高危型	33	12.11（0.83~46.45）	0.114

注：采用 Kruskall-Wallis 或 Mann-Whitney 法计算 *P* 值；数据采用中位数和四分位数间距（P25~P75）表示

2.4　多因素分析 β-catenin 的表达与儿童 ALL 临床特征的关系

以年龄、性别、白细胞数、FAB 分型、免疫分型及临床分型为自变量，以 β-catenin 的表达为因变量，采用多元线性回归分析（见表 2），回归模型具有统计学意义（$F=2.362$，$P=0.034$）。结果表明，年龄、外周血白细胞数对 β-catenin 表达的影响有统计学意义（$P<0.05$），而性别、FAB 分型、免疫分型及临床分型则无统计学意义。

表 2　多因素分析 β-catenin 的表达与儿童 ALL 临床特征的关系

临床特征	回归系数(b)	标准回归系数	*P*
年龄	15.141	0.218	0.023
性别	4.147	0.062	0.482
外周血白细胞计数	21.559	0.272	0.013
FAB分型	-1.385	-0.025	0.782
免疫分型	-11.791	-0.109	0.232
临床分型	-4.903	-0.124	0.281

3　讨　论

白血病发生的生物学本质在于造血细胞增殖、分化和凋亡的动态平衡失调，涉及调节细胞周期、增殖、分化和凋亡等细胞最根本的生命活动的各种信号通路，并与信号通路中各种癌基因和抑癌基因的活化和失活有关，其中可能有众多的环节失控，最终导致白血病发生、预后不良和复发。急性淋巴细胞白血病是儿童最常见的白血病，其发病与多种因素有关，但确切的分子机制目前尚未完全明了。随着分子生物学研究的深入，应用各种分子生物学技术检测癌基因、抑癌基因等分子标志物，能早期诊断及更精确评估肿瘤患者的预后，已成为肿瘤临床研究的一个热门领域。

Wnt/β-catenin 信号转导途径的异常激活参与了多种实体肿瘤的发生，β-catenin 作为该信号通路的细胞内信号传递因子，其酪氨酸磷酸化后，即与钙粘蛋白 β-catenin 复合体分离。当细胞质内游离的 β-catenin 异常积聚并与 Tcf-4 结合形成复合物进入细胞核内激活下游靶基因转录后，就会启动肿瘤生长程序[10]。最近研究发现 Wnt/β-catenin 信号途径对造血干细胞自我更新的异常调节可以导致白血病的发生和进展，β-catenin 异常高表达与急性髓性白血病的低缓解率及较差预后密切相关[11]。其中，报道较多的是 Wnt3a 与造血干细胞的自我增殖调节密切相关[12]。本文实验结果发现 β-catenin mRNA 的表达在儿童 ALL 也是呈异常高表达，而且与高危年龄（<1 岁或 >10 岁）及外周血高白细胞数（$\geq50\times10^9$ 个/L）等较差的预后相关，提示 β-catenin 表达异常是调控儿童 ALL 发生发展的重要途径之一，也是判断其预后的参考因素之一。由于年龄 <1 岁组患儿病例数较少（ALL 患儿主要集中于 1~10 岁，<1 岁的患儿比较少），对统计结果可能有干扰，尚需进一步深入研究，但 >10 岁组与 1~10 岁组比较，β-catenin 的表达是有差异的。此外，β-catenin 信号途径的上游信号分子 Wnt3a 的 mRNA 表达水平在 ALL 组和对照组无明显差异，可能是因为 β-catenin 在胞内的异常累积是由于其他上游分子如 Src、Dishevelled 和 GSK 3β 等的突变上调了它的表达，或

者是 Wnt 家族的其他成员如 Wnt5a、Wnt11 等的异常表达导致的。

近年来，Notch 信号通路在肿瘤中的研究也已经成为了炙手可热的话题，它不仅对正常细胞的发育、命运起重要作用，而且与一些肿瘤的发生、发展相关[13,14]，其中 Notch1 是在肿瘤细胞中最常被检测到的 Notch 受体家族成员[15]。Notch1 最早发现与人 T 细胞型急性淋巴母细胞性白血病（T-ALL）密切相关，几乎所有的 T-ALL 都高表达 Notch 1[16]，后续的研究又发现 Notch1 的表达与其它各种白血病及淋巴瘤的发病也密切相关[4,5]。因此，我们采用荧光定量 PCR 检测 Notch1 mRNA 在儿童 ALL 骨髓细胞中的表达，结果发现在 ALL 组的表达是明显低于对照组的，但进一步发现其在免疫分型各组之间的表达是完全不同的。Notch1 mRNA 的表达在 T 细胞组高于对照组，这与前期的报道相符合；而在 B 细胞组低于对照组，B 细胞型占整个儿童 ALL 约 90%，这也可能导致整个 ALL 组的 Notch1 的表达降低。至于在 B 细胞组和 T 细胞组会出现这两种截然不同的结果，之前有研究认为在肿瘤发生过程中 Notch1 既有促癌作用，也有抑癌作用；在不同组织、肿瘤发展的不同阶段，Notch1 的作用不同[17]。除了免疫分型之外，我们还分析了 Notch1 mRNA 的表达与其他临床特征之间的关系（如表 1 所列），均无统计学意义。

综上所述，本研究综合评估了多个发育相关基因在儿童 ALL 中的表达。我们发现，Notch1 和 β-catenin 在儿童 ALL 中是异常表达的，它们可能参与了儿童 ALL 的发生和发展。进一步研究发现，β-catenin mRNA 的高表达与高危年龄、高白细胞计数等高危因素有关，提示可能与预后不良有关，因此 β-catenin mRNA 检测对评估儿童 ALL 预后、指导临床有一定意义。

参 考 文 献

[1] 刘 壮，张义堂，吴香苓，等.p73 基因在儿童急性淋巴细胞白血病的表达[J].临床儿科杂志，2010，28（5）：410-413.

[2] Miele L.Notch signaling[J].Clin Cancer Res，2006，12（4）：1074-1079.

[3] Miele L，Golde T，Osborne B.Notch signaling in cancer[J].Curr Mol Med，2006，6（8）：905-918.

[4] Leong K G，Karsan A.Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis[J].Blood，2006，107（6）：2223-2233.

[5] Park M J，Taki T，Oda M，et al.FBXW7 and NOTCH1 mutations in childhood T cell acute lymphoblastic leukaemia and T cell non-Hodgkin lymphoma[J].Br J Haematol，2009，145（2）：198-206.

[6] Ysebaert L，Chicanne G，Demur C，et al.Expression of beta-catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis[J].Leukemia，2006，20（7）：1211-1216.

[7] 胡 群.急性淋巴细胞性白血病的 MICM 分型[J].实用儿科临床杂志，2008，23(15)：1141-1142.

[8] Schmittgen T D，Livak K J.Analyzing real-time PCR data by the comparative C（T）method[J].Nat Protoc，2008，3（6）：1101-1108.

[9] Wang Y R，Jin R M，Xu J W，et al.Outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia：a report of 121 patients treated at Wuhan Union hospital of China[J].Chinese Medical Journal，2008，121（5）：469-472.

[10] 胡 可，戎瑞明，汪 勇，等.β-连环蛋白和 E-钙粘蛋白在结直肠癌中的表达及其意义[J].胃肠病学，2006，11（3）：164-167.

[11] Xu J，Suzuki M，Niwa Y，et al.Clinical significance of nuclear non-phosphorylated beta-catenin in acute myeloid leukeamia and myelodysplastic syndrome[J].Br J Heamatol，2008，140（4）：394-401.

[12] Luis T C，Weerkamp F，Naber B A，et al.Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation[J].Blood，2009，113（3）：546-554.

[13] Fortini M E.Notch signaling：the core pathway and its posttranslational regulation[J].Dev Cell，2009，16（5）：633-647.

[14] Strizzi L，Hardy K M，Seftor E A，et al.Development and cancer：at the crossroads of Nodal and Notch signaling[J].Cancer Res，2009，69(18)：7131-7134.

[15] Bol ó s V，Grego B J，de la Pompa J L.Notch signaling in development and cancer[J].Endocr Rev，2007，28（3）：339-363.

[16] Aster J C，Blacklow S C，Pear W S.Notch signalling in T-cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma and other haematological malignancies[J].J Pathol，2011，223（2）：262-273.

[17] Hu X B，Feng F，Wang Y C，et al.Blockade of Notch signaling in tumor-bearing mice may lead to tumor regression，progression，or metastasis，depending on tumor cell types[J].Neoplasia，2009，11（1）：32-38.

（责任编辑：关蕴良）